



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDE GELİŞEN KANDİDEMİLERİN KLİNİK VE
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ERKEN SAPTANMASI**

KHALIS MUSTAFAYEV

**DANIŞMAN
PROF. DR. GÖKHAN AYGÜN**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Khalis Mustafayev

Bu tez projesi İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 32392

İTHAF

Değerli oğlum Ömer Kaan'a ithaf ediyorum..



TEŞEKKÜR

Doktora tezimi sunarken;

*Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Ömer Küçükbasmacı**'ya,*

*Doktora eğitimim süresince bana büyük katkılar sağlayan, her konuda tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım çok kıymetli sayın hocalarım **Prof. Dr. Hrisi Bahar Tokman, Prof. Dr. Nevriye Gönüllü, Prof. Dr. Fatma Köksal Çakırlar, Prof. Dr. Sevgi Ergin, Prof. Dr. Kenan Midilli, Prof. Dr. Bekir Kocazeybek, Doç. Dr. Erdal Polat, Prof. Dr. Fehmi Tabak, Doç. Dr. Bilgül Mete**'ye,*

*Tez çalışmam, uzmanlık ve doktora eğitimim süresince her konuda bilgisini, tecrübe ve deneyimlerini benimle paylaşan, bana önderlik etmiş olan ve birlikte çalışmaktan mutluluk ve onur duyduğum çok kıymetli tez danışmanım değerli hocam **Prof. Dr. Gökhan Aygün**'e,*

*Tezime katkıda bulunan, deneyimlerini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen **Uzm. Dr. Mert Ahmet Kuşkucu**'ya,*

*Laboratuvar bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Mikoloji uzmanı **Uzm. Dr. Zeynep Yazgan**'a,*

*Doktora yıllarını özlemle anmamı sağlayacak ve dostluklarıyla hep yanımda olduklarını hissettiğim ve beraber çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum doktora öğrencileri arkadaşlarım **Esra Demir, Harika Öykü Dinç, Zeynep Taner, Zeynep Güngördü, Yağmur Eylül Doğantürk, Okan Aydoğan**'a,*

*Çalışma hayatım boyunca hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum **Nida Aydın, Muhammed Aydın, Nilşen Güney, Tuba Soysal Mumcu, Fatmagül Kızıldaş Aktemur, Orhan Yatmaz**'a,*

Kocaman bir aile olmamızda her birinin büyük katkıları olan çok sevgili sekreter, biyolog, laborant ve personel arkadaşlarıma,

*Bugünlere gelmemde hiç şüphesiz en büyük paya sahip, her zaman yanımda olan ailem, **anne ve babama,***

*Yanımda olmasından ötürü kendimi şanslı hissettiğim, en büyük destekçim değerli eşim **Uzm. Dr. Fatma Nihan Akkoç Mustafayev**'e,*

*Hayatımızı güzelleştiren minik oğlum **Ömer Kaan Mustafayev**'e,*

Bugün yanımda olamayan sevdiklerimi de anarak

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

Khalis MUSTAFAYEV

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
ÖZET	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xii
SEMBOLLER / kısaltmalar listesi	xiii
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe ve Tanım	4
2.2. <i>Candida</i> Türleri.....	5
2.2.1. Mikrobiyoloji	5
2.3. Virülans Faktörleri	9
2.3.1. Adhezyon ve adezin molekülleri.....	10
2.3.2. Temas sinyali, Dimorfizm ve Tigmotropizm.....	12
2.3.3. Fenotipik dönüşüm.....	12
2.3.4. Biyofilm	12
2.3.5. Salgısal Hidrolazlar.....	14
2.4. Epidemiyoloji ve Bulaş Yolları	15
2.4.1. <i>Candida</i> türlerinin prevalansı.....	15
2.4.2. <i>Candida auris</i> 'in Ortaya Çıkışı	16
2.5. İnvaziv Kandidiyazis Risk Faktörleri	16
2.5.1. Yoğun bakım.....	17
2.6. Patogenez ve Patoloji.....	17
2.7. İnvaziv <i>Candida</i> enfeksiyonları	20
2.7.1. Kandidemi ve Akut Dissemine Kandidiyazis	20
2.7.2. Hepatosplenik veya Kronik Dissemine Kandidiyazis.....	20

2.7.3. İnvaziv fokal infeksiyonlar	21
2.7.3.1. Üriner Sistem Kandidiyazisi	21
2.7.3.2. İnvaziv Pulmoner Kandidiyazis	21
2.7.3.3. İntraabdominal Kandidiyazis	22
2.7.3.4. Endoftalmit ve Koryoretinit	22
2.7.3.5. Osteoartiküler Kandidiyazis	22
2.7.3.6. Menenjit	23
2.7.3.7. Endokardit	23
2.8. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarının Tanısı	23
2.8.1. Mikroskopik İnceleme ve Germ Tüp Testi	24
2.8.2. Kültür	25
2.8.2.1. Kan kültürleri	26
2.8.2.2. Biyopsi materyalinin kültürü ve boyası	26
2.8.2.3. Kromojenik Besiyerine Ekim	26
2.8.2.4. Mısır Unlu - Tween 80 Agardaki Morfolojik Özellikler	27
2.8.3. Serolojik Testler	28
2.8.3.1. CAGTA (<i>Candida albicans</i> germ tube antibody)	28
2.8.3.2. (1,3)- β -D-glukan	28
2.8.3.3. <i>Candida</i> Mannan antijen ve anti-mannan antikorlar	29
2.8.4. Karbonhidrat Asimilasyon ve Fermentasyon Testleri	29
2.8.4.1. Hızlı Trehaloz Testi	30
2.8.5. Moleküler testler	30
2.8.5.1. PCR	31
2.8.5.2. Diğer Moleküler Yöntemler	32
2.8.5.3. T2 Magnetic Resonance Assay (T2MR)	32
2.8.5.4. MALDI-TOF-MS	32
2.8.5.5. PNA-FISH YTL (Yeast Traffic Light)	33
3 GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Çalışma Düzeni	34
3.2. Risk faktörlerinin belirlenmesi ve özgün <i>Candida</i> skorunun oluşturulması	36
3.3. Mikrobiyolojik Teknikler – PCR testinin geliştirilmesi	37
3.3.1. Real Time <i>Candida</i> PCR için primer çiftlerinin seçimi	38
3.3.2. Erime eğrisi analizi	39

3.4. İstatistiksel analiz	39
4 BULGULAR.....	40
5 TARTIŞMA.....	51
ETİK KURUL KARARI	59
KAYNAKLAR	60
İNİTIAL RAPORU İLK SAYFASI	73
ÖZGEÇMİŞ	74



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Real Time PCR için hazırlanan karışım	38
Tablo 2. Real Time PCR ile çoğaltma işlemi için kullanılan primer çiftleri	38
Tablo 3. Retrospektif Çalışmaya Alınan Hastaların Temel Özellikleri	40
Tablo 4. Prospektif Çalışmaya Alınan Hastaların Temel Özellikleri	40
Tablo 5. Yoğun bakım ünitesinde retrospektif olarak izlenen hastaların demografik ve klinik özellikleri	43
Tablo 6. Vaka ve kontrol gruplarına göre risk faktörleri	44
Tablo 7. Tek ve çok değişkenli indirgenmiş modelde bağımsız risk faktörleri	46
Tablo 8. CTF <i>Candida</i> Skoru ve kandidemi saptanan olguların sayısı	47
Tablo 9. CTF <i>Candida</i> skoru 4 ve üzeri olan yoğun bakım hastalarında kandidemi riski	47
Tablo 10. CTF <i>Candida</i> skoru Duyarlılık, Özgüllük, Pozitif ve Negatif Prediktif Değerleri	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. <i>Candida albicans</i> germ-tüp görünümü (Çalışmadan)	6
Şekil 2. <i>Candida albicans</i> mısır unlu agarda klamidiospor görüntüsü (Çalışmadan).....	7
Şekil 3. <i>Candida glabrata</i> mısır unlu agarda görüntüsü (Çalışmadan)	7
Şekil 4. <i>Candida parapsilosis</i> mısır unlu agardaki çalı görüntüsü x40 (Çalışmadan).....	8
Şekil 5. <i>Candida albicans</i> virülans mekanizmaları ¹⁶	10
Şekil 6. Real Time PCR protokol	38
Şekil 7. Kan Kültüründe tespit edilen <i>Candida</i> tür dağılımı %	41
Şekil 8. Infekte olan hastaların dağılımı %	41
Şekil 9. A. Tubulin, B. EF1a gen bölgelerine ait nonspesifik ve yeterli olmayan amplifikasyon eğrileri	48
Şekil 10. ITS bölgesine ait amplifikasyon ve erime eğrisi analizi	48
Şekil 11. ITS'ye ait 1000, 100, 10 ve 1 <i>Candida</i> hücresi içeren örneklere ait amplifikasyon eğrileri ile standard eğri A. <i>C. albicans</i> B. <i>C. parapsilosis</i>	49
Şekil 12. D1/D2 bölgesine ait amplifikasyon ve erime eğrisi analizi	50
Şekil 13. D1/D2'ye ait 1000, 100, 10 ve 1 <i>Candida</i> hücresi içeren örneklere ait amplifikasyon eğrileri ile standard eğri A. <i>C. albicans</i> B. <i>C. parapsilosis</i>	50

ÖZET

Mustafayev K. Yoğun Bakım Ünitesinde Gelişen Kandidemilerin Klinik ve Moleküler Yöntemlerle Erken Saptanması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (CTF) yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) takip edilen kandidemi riski yüksek olan kritik hastalarda erken tanı için risk faktörlerinin belirlenerek özgün *Candida* skorunun oluşturulması ve deneysel modelleme ile tam kandan çalışılabilen moleküler bir yöntem olan *Candida* Real-Time PCR testinin geliştirilmesi amaçlandı.

Çalışma üç aşamalı olarak dizayn edildi. Birinci aşamada YBÜ'de saptanan kandidemi olgularında risk faktörleri tanımlaması (Retrospektif Vaka-Kontrol çalışması), ikinci aşamada vaka kontrol çalışması verileri ile CTF *Candida* skor formu oluşturulması ve bu formun klinik etkinliğinin araştırılması (Prospektif kesitsel çalışma), üçüncü aşamadaysa tam kan örneklerinde PCR tabanlı bir hızlı tanı testi oluşturulması (Deneysel çalışma) planlandı.

Ocak 2017 - Aralık 2018 tarihleri arasında CTF'de takip edilen 100 YBÜ hastası (50 vaka / 50 kontrol) kayıtlardan geriye dönük olarak incelendi. İntraabdominal infeksiyon ($p = 0,001$), son üç ayda hastanede yatış öyküsü ($p = 0,006$), bir haftadan uzun antibiyotik kullanımı ($p = 0,005$) ve *Candida* skoru ($p < 0,05$) kandidemi için en önemli risk faktörleri olarak bulundu. CTF *Candida* skorunun 4 puan ve üzeri sınır değeri kandidemi için anlamlı bir risk oluşturduğu saptandı ($p < 0,05$). Real-time PCR amplikonlarının erime eğrisi analizi ile *C. albicans* ve *C. parapsilosis* izolatlarını ayırt etmek için spesifik primer çiftleri ve EvaGreen boyası kullanıldı. ITS, D1/D2 bölgelerinin amplifikasyonu ile elde edilen amplikonun özgüllüğü gösterildi. PCR testimizin *in vitro* saptama limiti 10 CFU/ml olarak belirlendi.

Sonuç olarak, çalışmamızda geliştirilen CTF *Candida* skoru ve PCR testi, konvansiyonel tanı yöntemleri ile birlikte, klinisyenlere YBÜ gibi kandidemi mortalitesinin yüksek olduğu birimlerde gereksiz antifungal kullanımından kaçınmak ve uygun antifungal tedaviye erken başlamak için rehberlik edebilir. Denenen PCR testinin duyarlılığını arttırmak için geliştirmeye ihtiyaç vardır. Klinik kullanımdaki etkinliğini doğrulamak için daha çok hasta sayısı ve daha fazla örneklem içeren çok merkezli çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Kandidemi, Real-Time PCR, ITS bölgesi, D1/D2 bölgesi, Erime eğrisi analizi

Bu tez projesi İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 32392

ABSTRACT

Mustafayev K. Early Diagnosis of Candidemia in Intensive Care Unit by Clinical and Molecular Methods. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Medical Microbiology Department. PhD Thesis. Istanbul. 2021.

To evaluate the risk factors in critically ill patients who are followed up in intensive care units (ICUs), to create a unique *Candida* score, and to develop the *Candida* Real-Time PCR for early diagnosis of candidemia was aimed.

The study was designed at three steps. We evaluated the risk factors in ICU patients with invasive candidiasis at the first step. At the second step, we created a unique *Candida* score and studied its clinical efficacy. Finally, at the third step, a rapid PCR-based test from whole blood samples was performed.

One hundred ICU patients (50 case/50 control) followed at Cerrahpasa Medical Faculty between January 2017 and December 2018 reviewed retrospectively from records. Intraabdominal infection ($p = 0.001$), history of hospitalization in the last three months ($p = 0.006$), antibiotic use longer than one week ($p = 0.005$) and *Candida* score ($p < 0.05$) found to be the most important risk factors for candidemia. The cutoff value of CTF *Candida* score of 4 points and above could determine a significant risk for candidemia ($p < 0.05$). Specific primer pairs and EvaGreen dye were used to differentiate *C. albicans* and *C. parapsilosis* isolates via melting curve analysis of real-time PCR amplicons. The specificity of the amplicon obtained by amplification of the ITS, D1/D2 regions was shown. We found that 10 CFU/ml is the *in vitro* detection limit for our PCR test.

In conclusion, CTF *Candida* score and PCR test developed in our study (with conventional diagnostic methods) can guide clinicians to avoid unnecessary antifungal use and start appropriate antifungal therapy early. Improvement is needed to increase the sensitivity of the developed PCR test. Multicenter studies with more patient numbers and more samples should be conducted to verify its effectiveness in the clinic.

Keywords: Candidemia, Real-Time PCR, ITS region, D1/D2 region, Melting curve analysis

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University.

Project No: 32392

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ABH	: Akut Böbrek Hasarı
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
APACHE	: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
AYBÜ	: Acil Yoğun Bakım Ünitesi
BDG	: Beta-D-Glukan
CAGTA	: <i>Candida albicans</i> Germ tüpe Özgül Antikor
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CFU	: Coloni Forming Unit
CRRT	: Continuous Renal Replacement Therapy
CTF	: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
DM	: Diabetes Mellitus
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik asit
EMB	: Eosin Methylene Blue
FDA	: Food and Drug Administration
GKS	: Glasgow Koma Skoru
HIV	: Human Immunodeficiency Virüs
HT	: Hipertansiyon
İFİ	: İnvaziv Fungal İnfeksiyon
İK	: İnvaziv Kandidiyazis
İÜC	: İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa
KBH	: Kronik Böbrek Hastalığı
KDCYBÜ	: Kalp Damar Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi
KOH	: Potasyum Hidroksit
MALDI-TOF-MS	: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-of-Flight Mass Spectrometry
PPD	: Pozitif Prediktif Değer
NPD	: Negatif Prediktif Değer
NRŞYBÜ	: Nöroşirurji Yoğun Bakım Ünitesi
OR	: Odds Ratio
PAS	: Periyodik Asit-Schiff
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PNA-FISH	: Protein Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization
RT-PCR	: Real-Time PCR
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
SOFA	: Sequential Organ Failure Assessment
SPSS	: Statistical Package for the Social Science
SSYBÜ	: Sadi Sun Yoğun Bakım Ünitesi
SVK	: Santral Venöz Kateter
T2MR	: T2 Magnetic Resonance Assay
TPN	: Total Parenteral Nutrisyon
VİP	: Ventilatör İlişkili Pnömoni
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi
YTL	: Yeast Traffic Light

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Candida türü mantarlar insan vücudunun belirli bölgelerinde yerleşmiş kommensal mikroorganizmalardır. Cilt, gastrointestinal sistem, solunum sistemi ve genitoüriner sistem florasının bir üyesi iken, immün sistemin harabiyeti sonucunda çoğunlukla endojen floradan kaynaklanan ve mukokütanöz tutulumdan daha ağır invaziv infeksiyonlara kadar geniş hastalık yelpazesine neden olabilmektedir.¹ Hastanede yatmakta olan hastalarda mukozaların *Candida albicans* ile kolonizasyon oranı yüksektir. Yoğun bakım üniteleri (YBÜ), kandidemilerin sıkça rastlandığı ve mortalite oranlarının çok yüksek olduğu bölümlerdir. Dokuz Avrupa ülkesinden 23 YBÜ'nin katıldığı çokmerkezli bir çalışmada kandidemilerde 30 günlük mortalite oranı %42 olarak bildirilmiştir.² Son yıllarda *Candida* türlerinin sebep olduğu invaziv infeksiyon oranları dramatik şekilde yükseliş göstermektedir. Bu artış immünesupresif ilaçların, geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süreli yaygın kullanımı, sitotoksik tedaviye bağlı uzun süren derin nötropeniler, artan invaziv girişimler (kateterler), majör abdominal ve kardiyak cerrahi işlemler ile ilişkilidir. Özellikle abdominal cerrahi geçiren, immünesupresif ve YBÜ'de yatan hastalar hem kandidemi hem de derin yerleşimli kandidiyazis açısından yüksek risk altındadırlar.^{3,4}

Kandidemi, en sık karşılaşılan üç nozokomiyal kan dolaşımı infeksiyonlarından biridir.⁵ Çoğunlukla bağışıklığı baskılanmış, cerrahi geçirmiş kritik hastalarda görülen ve uzun süreli hastane yatışına neden olarak yüksek morbidite ve mortalite oranlarına yol açan bir nozokomiyal infeksiyondur.⁶ Yoğun bakımda gelişen kandidemilerden genellikle hastaların endojen florası ve yapılan invaziv girişimler sorumlu bulunmaktadır. *Candida* türleri 75 ülkenin YBÜ'lerinin katıldığı uluslararası çalışmada *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas spp*'den sonra üçüncü sırada yer almıştır.⁷

Yoğun bakımda yatış süresinin uzamasıyla birlikte invaziv girişimlerin artışı, vasküler kateterizasyon, karın içi cerrahi girişimler, uzamış geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, immünesupresif ilaçlar, hemodiyaliz, total parenteral nutrisyon (TPN) ve hastane yatış süresinin uzaması gibi faktörler kandidiyazis için en önemli risk faktörleridir.^{3,8,9}

Kandidemide tanının hızlıca doğru bir şekilde konulması ve uygun tedavinin bir an önce başlanması çok önemlidir. Uygun antifungal tedavinin hızlıca planlanması

sağkalım oranlarını ciddi şekilde arttırabilmektedir.¹⁰ Geçmişte, bu infeksiyonların çoğuna, tipik olarak antifungallere çok duyarlı bir tür olan *Candida albicans* (*C. albicans*) neden oluyordu. Bununla birlikte, son yıllarda, çeşitli duyarlılıklar sergileyen non-*albicans* türlerinin neden olduğu infeksiyonlara doğru bir kayma gözlemlenmiş ve bu türlerin hızlı teşhisi terapötik sonucu belirleyen önemli bir faktör haline gelmiştir.³ Kan kültürü, duyarlılığı düşük olmasına rağmen kandidemi teşhisi için altın standart yöntemlerden biri olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, invaziv kandidiyazis (İK)'in kesin tedavisi genellikle kültürün duyarlılığının düşük olması nedeniyle gecikir ve bu gecikme yüksek mortalite oranlarına (% 35-75) yol açabilir.¹¹ Doğru olmayan tanı ve tedavinin geç başlanması mortaliteyi ciddi bir şekilde yükseltmektedir. *Candida* kan kültürlerinden % 50-70 oranında ve geç izole edilmektedir.¹² Kan kültürü pozitif olan hastalarda İK teşhisi kolaylıkla yapılabilir, ancak kan kültürlerinin düşük duyarlılığı nedeniyle sistemik infeksiyonu olan bazı hastalar gözden kaçırılabilir.^{4,12}

Kandidemi teşhisi için kullanılan kan kültürü sistemlerinin en önemli dezavantajlarından biri üreme sinyali için en az üç gün ve uygun besiyerine ekim yapıldıktan sonra ise identifikasyon için iki gün daha süre gerektirmesidir.¹³ YBÜ'de genel durumu ağır olan hastalarda daha hızlı ve daha duyarlı tekniklerin kullanılması elzemdir. Kan kültürlerindeki mayaların daha hızlı saptanması ve kültür bazlı olmayan yeni tekniklerin geliştirilmesi günümüzdeki en önemli araştırma alanlarından biridir. Kan kültürlerinin çok geç sonuçlanması, serolojik testlerin ise tek başına kullanıldığında düşük duyarlılık göstermesi, bir takım moleküler testlerin araştırılmasını zorunlu kılmıştır.¹³ Bu yöntemler geliştirildikçe kan kültürü negatif derin doku infeksiyonları daha iyi teşhis edilecektir. Moleküler amplifikasyon teknikleri, bir klinik numunede bulunan küçük miktarlarda mantar deoksiribonükleik asidini (DNA) doğrudan tespit ederek hızlı ve hassas tanımlama sağlar, bu da bu testleri hem erken teşhis, hem de özellikle geleneksel kültür yöntemleriyle saptanamayan İK vakaları için cazip hale getiriyor.¹³ Kan, serum, plazma gibi farklı örneklerde *Candida*'ların tespiti için çeşitli genetik sekansları ("18S rDNA, 28S rDNA, 5,8S rDNA, dahili kopyalanmış aralayıcı bölgeler (ITS), D1/D2 ve mitokondriyal DNA") hedefleyen çoklu "Polymerase Chain Reaction" (PCR) testleri geliştirilmiştir.^{11,14,15} Kullanılan primerlere bağlı olarak, mantar patojenleri, bir panfungal veya daha spesifik bir şekilde tespit edilebilir. Çeşitli tekniklerin duyarlılığı ve özgüllüğü değişkendir, ancak klasik kültüre dayalı yöntemlerle karşılaştırıldığında moleküler yöntemlerin duyarlılığı çoğunlukla yüksektir.¹³ Yapılan

çalışmalarda kandideminin saptanmasında “PCR” duyarlılığının kan kültürü duyarlılığına benzer olduğu ve hatta bazı kan kültürü negatif İK olgularında tanı koymada yardımcı olduğu gösterilmiştir.¹⁶ Bunun yanı sıra kan kültürlerinde olduğu gibi bu yöntemle de *Candida*’lar tür düzeylerine göre tanımlanabilir.¹⁷

Bu çalışmada “İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi” (İC CTF) YBÜ’de takip edilen kandidemi riski yüksek olan hastalarda risk faktörlerinin belirlenmesi, zgn CTF *Candida* skorunun oluşturulması ve deneysel modelleme ile tam kandan çalışılabilen moleküler bir yöntem olan *Candida* “Real Time PCR” testinin pratikte uygulanılabilirliği sorgulandı. Kandidemi riski yüksek olan hastalarda özgün risk faktörlerinin belirlenerek erken tanı ve uygun tedavi ile mortalitenin azaltılması hedeflendi. Çalışmamız “İ..C Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi” tarafından kabul edilmiş ve maddi olarak desteklenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve Tanım

Mayalar yüz milyonlarca yıl önce ortaya çıkmış ökaryotik mikroorganizmalardır. Pamukçuk olduğu düşünülen oral lezyonlar Galen ve Hipokrat döneminden beri tanımlanmaya başlamıştır. 1680 yılında Hollandalı bilim adamı Anton van Leeuwenhoek ilk önce mikroskopik olarak mayayı gözlemlemiş, ancak o zamanlar onları canlı olmayan küresel yapılar olarak tanımlamıştı. O dönem araştırmacılar mayaların yosun veya mantar olup olmadığından emin değillerdi. Almanyalı B. Langanbek ilk defa 1839'da ağız içi lezyonu olan bir hastadan mayayı izole etti. Vulvovajinal kandidiyazis ise ilk defa Wilkinson tarafından 1849 yılında tanımlanmıştır. Christine Marie Berkhout tarafından 1923 yılında "*Candida albicans*" olarak adlandırılmıştır. "İkinci Dünya Savaşı" sonrası antibiyotiklerin yaygın kullanımı ile birlikte kandidiyazis olguları artmaya başlamıştır. 1861 tarihinde Zenker ilk derin yerleşimli *Candida* olgusunu tanımlamıştır.¹⁸

Mayalar çapı 3-4 µm olup, ince bir hücre duvarına sahip, oval şekilli tek hücreli mikroorganizmalardır. Bazı mayaların boyutu 40 µm'ye kadar büyüyebilmektedir. Tomurcuklanma veya "füzyon" (ortadan ikiye bölünme) ile çoğalırlar.¹⁹

Candida türlerinin taksonomik sınıflandırılması *Deuteromycotina* bölümü, *Blastomycetes* sınıfı ve "*Candidaceae*" ailesi şeklinde yapılmaktadır. Bu cins içerisinde 150-200'den fazla tür bulunmaktadır. *Candida* türleri normal flora üyesi olarak ciltte, solunum ve sindirim sistemi ile kadın genital sisteminde yaygın olarak bulunabilirler. İmmün sistem harabiyeti sonucunda dokulara invaze olup, hayatı tehdit edici sistemik infeksiyonlara yol açabilmektedirler. Bu bağlamda en önemli predispozan faktörler; i) kemoterapi, radyoterapi ve kemik iliği nakli gibi işlemlere bağlı ciddi immünsupresyon; ii) hastanede (özellikle YBÜ) yatış süresinin uzaması; iii) intravasküler kateterizasyon; iv) uzun süren geniş spektrumlu antibiyotik kullanılması; v) antifungal ilaçların empirik olarak yaygın kullanımı; vi) major abdominal cerrahi olarak özetlenebilir.^{8,9,19}

İnvaziv *Candida* infeksiyonlarının en sık etkeni *C. albicans*'tır, ancak birçok merkezden *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica* ve *C. kefyr* gibi non-*albicans* *Candida* türleri tarafından oluşturulan infeksiyonların sıklığında artış bildirilmektedir.^{19,20} Tür dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılık gösterse de

antifungal ajanların yaygın terapötik ve profilaktik kullanımı non-*albicans* artışına yol açmaktadır. Bununla birlikte non-*albicans Candida* türleri yanısıra klinik örneklerde *Malassezia*, *Rhodotorula*, *Wickerhamomyces (Hansenula/Pichia) anomalus* ve *Trichosporon* gibi türlerin insidansındaki artış ve bu türlere özgü olgu sunumları dikkati çekmektedir.^{3,19}

Geniş spektrumlu antibiyotikler, antineoplastik ajanlar, yaygın vankomisin kullanımı, damar içi kateterizasyon, artmış immüsupresif ve nötropenik hasta popülasyonu maya türlerindeki bu ani artışın en önemli nedenlerindedir.¹⁹ Ayrıca, flukonazolun (FLU) yoğun kullanımı flukonazole dirençli veya daha az duyarlı izolatların baskın hale gelmesine neden olmaktadır.³ Bu nedenle hastanede yatmakta olan ve çeşitli nedenlerle immun sistemi baskılanmış hastalar için *C. glabrata* ve *C. krusei* gibi daha dirençli türler ile oluşan infeksiyonlar önemli bir sorun haline gelmekte, dolayısıyla tanı ve tedavide alternatif yöntemlerin kullanımını gerektirmektedir.^{10,19,20}

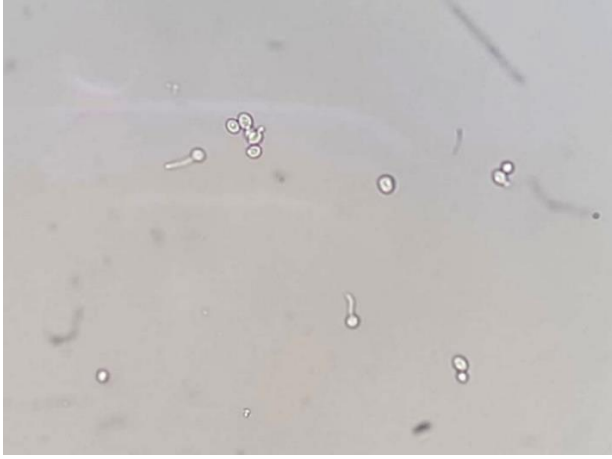
2.2. *Candida* Türleri

2.2.1. Mikrobiyoloji

Candida'lar 3-6 µm boyutunda, düzgün ve yuvarlak şekilli, tomurcuklanarak (blastospor) çoğalan maya formunda mantarlardır. Çoğu, 25°C-37°C'de 2-3 gün içerisinde Sabouraud dekstroz agarda (SDA pH<6) 2-3 mm çapında, beyaz renkli, düzgün yüzeyli, mat ya da parlak göbekli koloniler oluştururlar. Mısır unlu agar ("Cornmeal-Tween 80 Agar") gibi özel besiyeri yardımıyla her türe ait morfolojik farklılıklar ayırt edilebilir. *Candida* türü mayalar, genellikle "anamorf" (eşaysiz) mikroorganizmalardır ve tomurcuklanma veya füzyon ile çoğalırlar.^{19,21} Türlerin bir çoğu "yalancı hif" oluşturabilmektedir. *Candida albicans* ve *Candida dubliniensis* türleri "gerçek hif" üretiminin başlangıç aşaması olan "çimlenme borusu (germ tüp)" oluşturma özelliği ile diğer türlerden ayırt edilebilirler. "Germ tüp", ana hücreden başlayan hif uzantısının ilk bağlanma kısmında hiç daralma olmayan ve uzunluğu ana hücrenin uzunluğunun dört katı olan filamentöz yapıdır. *Candia tropicalis*'in oluşturduğu "psödo germ tüp" hif yapısına dikkat edilmezse yanlışlıkla "germ tüp" olarak tanımlanabilir. Psödo germ tüpte ana hücre ile büyümekte olan hifal hücre arasında darlık mevcuttur.^{19,21}

Candida albicans, oval şekilli tomurcuklanan maya, septada daralmalara sahip uzatılmış elipsoid hücreler (yalancı hif) veya paralel duvarlı gerçek hif oluşturabilen “polimorfik” bir mantardır. Ayrıca “beyaz-opak” hücre dönüşümü, “klamidospor” oluşumu da bir diğer önemli morfolojik özelliklerinden birisidir. Kandidemi olgularının kan kültürlerinin direkt incelenmesinde maya ve gerçek hif yapılarını çok açık bir şekilde görmemiz mümkündür.^{22,23}

Candida albicans; germ-tüp ve klamidospor oluşumu testleri ile diğer *Candida* türlerinden ayrılmaktadır. Serum içerisinde 37°C’de iki saat inkübasyon sonrası *C. albicans* türleri “gerçek hif” oluşturmakta olup, ana hücreden boğum oluşturmadan borucuk uzar ve “germ-tüp” adı verilen yapıyı oluşturur²¹ (Şekil 1).



Şekil 1. *Candida albicans* germ-tüp görünümü (Çalışmadan)

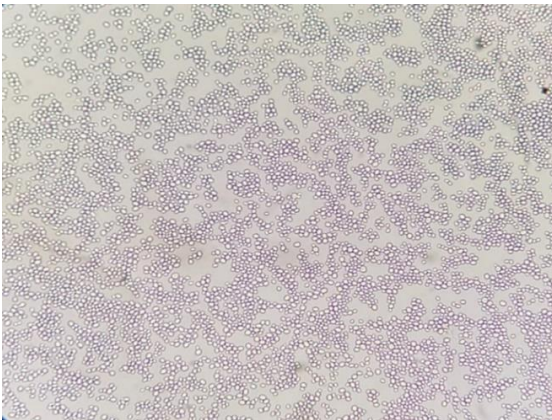
“Germ-tüp” negatif *C. albicans* türleri tanısında mısırunlu agar preparatında klamidospor oluşumu ve psödohif boyunca uzanan eşit dağılımlı blastokonidi kümeleri görünümü yardımcı olabilir (Şekil 2). *C. albicans* türlerinin yaklaşık %5’i “germ-tüp” oluşturmayabiliyorsa da hemen hemen hepsi klamidospora sahiptirler. Eğer “germ-tüp” testi negatif ve mısır unlu agarda klamidosporlar görülmediyse *C.albicans* dışlanabilir.^{19,21}



Şekil 2. *Candida albicans* mısır unlu agarda klamidospor görüntüsü (Çalışmadan)

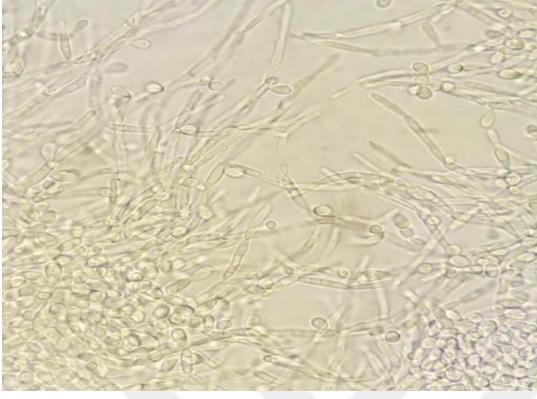
Candida tropicalis; mısır unlu agar preparatında psödohif boyunca özellikle daralma kısımlarında tek veya düzensiz yerleşimli blastokonidi kümeleri oluşturmasıyla tanımlanabilir. Ancak bu oluşumlar özellikli olmadığı için karbohidrat asimilasyon testlerine ihtiyaç vardır.¹⁹

Candida glabrata; diğer mayalara nazaran çok yavaş (48-72 saat) ürer. En önemli karakteristik özelliği mısır unlu agar preparatında 2-3 mm boyutunda bir birinden ayrılmayan düzgün şekilli maya hücre kümelerinin görülmesidir. Hif veya psödohif görülmez (Şekil 3). Glükoz ve trehalozu asimile eder. Üriner sistem infeksiyonu etkenidir ve idrar örneklerinden izole edilen mayaların %20'sini oluşturmaktadır.¹⁹ *C. glabrata* için flukonazol tedavisi almış olmak, ileri yaş, gastrointestinal cerrahi ve intravenöz ilaç kullanımı en yaygın risk faktörleridir.^{3,4}



Şekil 3. *Candida glabrata* mısır unlu agarda görüntüsü (Çalışmadan)

Candida parapsilosis; mısır unlu agar preparatında çalı görüntüsü ile kolayca ayırt edilebilir (Şekil 4). Biyofilm oluşturma özelliği sayesinde TPN alan hastalardan izole edilebilir.¹⁹ *C. parapsilosis* için SVK, TPN, yakın zamanda geçirilmiş cerrahi, ekinokandin kullanımı ve kötü infeksiyon kontrolü önemli risk faktörüdür ve özellikle cerrahi YBÜ'lerinde daha yaygındır.^{3,20}



Şekil 4. *Candida parapsilosis* mısır unlu agardaki çalı görüntüsü x40 (Çalışmadan)

Candida krusei; mikroskopik incelemede psödohiflerle birlikte uzamış “ağaç benzeri” diziliş gösteren blastokonidyumları spesifiktir. Biyokimyasal özellikleri ile diğer türlerden ayırt etmek mümkündür. Bağışıklığı baskılanmış hastalarda önemli bir etkindir. Flukonazole doğal dirençlidir.^{10,19}

Candida kefyr; mısır unlu agar preparatında yalancı hifler ve uzamış dikdörtgen blastokonidyumları rahatlıkla görebiliriz. Blastokonidyumlar çoğu kez yalancı hiften ayrılıp bir biriyle çapraz kümeler oluşturarak “ırmakta yüzen kütük dizileri” benzeri dizilim gösterir. Karbohidrat asimilasyon profili ile diğer türlerden kolayca ayırt edilebilirler.^{19,24}

Candida lusitanae; *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* ile morfolojik yapı itibariyle benzeşmektedir, sellobiyoz fermentasyonu ve ramnoz asimilasyonu ile birbirlerinden ayrılırlar. Amfoterisin B'ye karşı sporadik direnç görülmektedir. Ancak bu direncin mekanizması tam olarak bilinmemektedir.^{19,24}

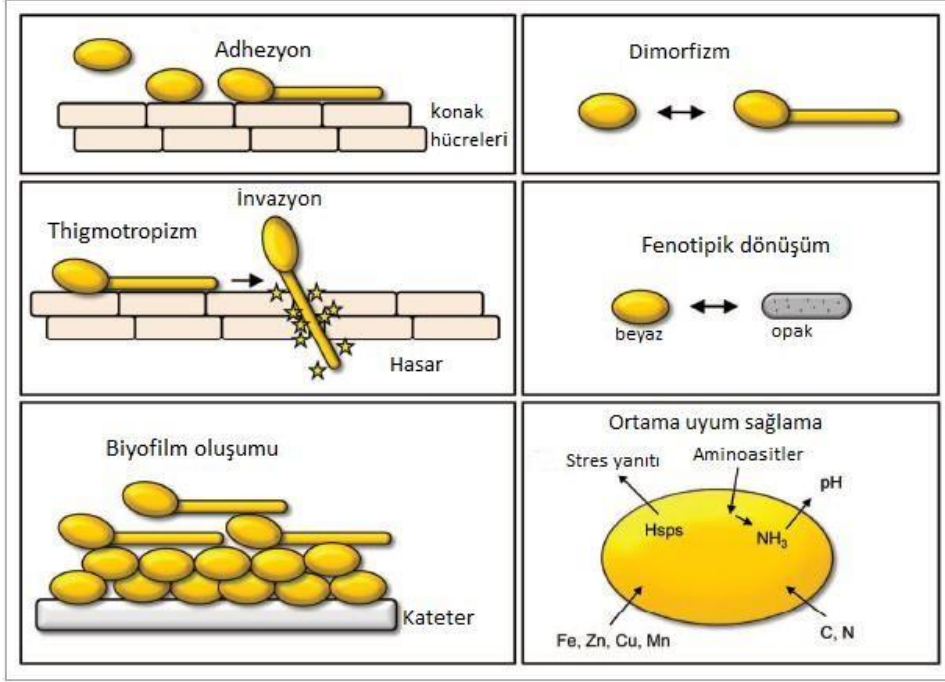
Candida dubliniensis; filogenetik analizlerde *Candida albicans* ile yakın akraba olarak tanımlanmıştır. *C. albicans*'tan 45°C'de üreyememesi, bol miktarda klamidospore üretmesi, özel besiyerinde üreyebilmesi, karbohidrat asimilasyon profili ve beta-

glukosidaz aktivitesinden yoksun olmasıyla ayrılır. Bu iki türü ayırt etmede en güvenli yöntem DNA sekanslama veya “Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry” (MALDI-TOF MS)’dir. Direnç bakımından *C. albicans* ile benzerdir. *C. dubliniensis*, *in vivo/in vitro* ortamlarda flukonazole karşı hızlı direnç oluşturduğu için doğru tanımlanması önemlidir.^{19,25}

Candida guilliermondii; mısır unlu agar preparatının mikroskopik incelenmesinde, psöдохif oluşumu çok fazla veya çok az olabilmektedir. Blastosporları kısacık zincir kümeleri şeklinde görülebilir.¹⁹

2.3. Virülans Faktörleri

Candida türleri normal mikrobiyotanın bir parçasıdır. Kommensal mikroorganizmalar oldukları için virülanslarının düşük olduğu düşünülüyor ancak son yıllarda *Candida* infeksiyonları özellikle non-*albicans Candida* infeksiyonları giderek artıyor. *Candida*’lar, konakta çoğalmak ve konağa zarar vermek üzere birçok virülans faktörlerine sahiptirler. Mantarlar keratinaz, kollajenaz, fosfolipaz ve asit proteinaz gibi besin maddelerinin alınımından, konak dokusuna tutunma, dokunun invazyonu ve konak vücudunda yayılma ile bağlantılı hücre dışı enzimler üretirler. Konağın ortam pH’ına uyum sağlama, 37°C’de çoğalabilme yeteneği, fenotipik dönüşüm, polimorfizm, çeşitli yapışma mekanizmaları ve biyofilm oluşumu en önemli virülans faktörleridir (Şekil 5). Virülans faktörlerinin ve önemli genlerin tanımlanması yeni antifungal ilaçların geliştirilmesi için umut vadetmektedir.^{26,27,28,29}



Şekil 5. *Candida albicans*'ın virülans mekanizmaları²⁶

2.3.1. Adhezyon ve adezin molekülleri

Candida albicans kateterler, greftler gibi cansız yüzeylere ve canlı mukozal dokulara sahip olduğu özel proteinleri (adhezin molekülleri) ile yapışmaktadır.^{26,27,29}

-Als (agglutinin like sequences) proteinleri:

Candida albicans, canlı ve cansız yüzeylere yapışmada önemli role sahip olan özel bir protein ailesine sahiptir. Sekiz üyeden oluşan bu Als proteini ailesi (Als1-7 ve Als9) şimdiye kadar en iyi araştırılan *C. albicans* adhezinleridir.²⁶ ALS genleri, glikozilfosfatidilinozitol (GPI) aracılı hücre yüzeyi glikoproteinlerini kodlar. Als proteinleri konak dokularına bağlanmada rol alırlar. Sekiz Als proteininden, hif ile ilişkili adhezin Als3 özellikle yapışma için önemlidir.²⁷ Oral mukozit ve vajinit durumlarında aşırı Als3 gen ekspresyonu görülür. Biyofilm oluşumu sırasında Als proteinlerinin adhezyon için büyük öneme sahip olduğu bildirilmiştir.^{23,26}

-Hwp (hyphal wall protein) hifal hücre proteinleri:

Hif oluşturma özelliği *C. albicans*'ın en önemli virülans faktörlerindedir. İn vitro koşullarda hif oluşturmamayan türlerin virülansı genellikle zayıftır. Hwp1, Als3, Sap4, Sap5, Sap6 ve hif bağlantılı Ecel ve Hyr1 gibi genlerin ekspresyonu hif oluşturma özelliğini tetiklemektedir. Hif spesifik G1 siklinle ilişkili bir proteini kodlayan Hgc1 gen mutasyonu, maya formunda büyümeye devam eden ancak hif üretemeyen hücrelerle sonuçlanır.^{26,28} Bununla birlikte bu Hgc1 mutant hücreler halen Hwp1, Ecel, Hyr1 ve Als3 gibi dört önemli hif ilişkili proteinlerin ekspresyonuna devam edebilmektedirler. Hwp1 ve Als3 adezinlerinin biyofilm oluşumuna da katkıda bulunduğu gösterilmiştir.^{23,28}

Hwp 1 memelilerin doku transglutaminazları için substrat olduğundan *C. albicans* hiflerinin konak dokularına sıkı bir şekilde bağlanmasını sağlar. Hwp1 ve Hgc1 geni devre dışı bırakılan mutant *Candida*'ların dokulara bağlanma kapasitelerinde azalma ve böylece sistemik infeksiyonu olan bir deneysel hayvan modelinde düşük virülans sergilemesi, hif oluşumunun başlı başına önemli bir virülans özelliği olduğu görüşünü desteklemektedir.^{23,27,28}

-Diğer adezinler:

GPI aracılı proteinler (Eap1, Iff4 ve Ecm33), hücre duvarıyla ilişkili proteinler (Mp65, β -glukanaz, Phr1, β -1,3 glukanosil transferaz), hücre yüzeyiyle ilişkili proteazlar (Sap9 ve Sap10) ve integrin benzeri yüzey proteini Int1 gibi proteinler bunlara örnek gösterilebilir.^{27,30,31}

C. albicans konak hücrelerine girmek için Als3 ve Ssa1 (ısı şoku proteini 70 (Hsp70) ailesinin hücre yüzeyinde eksprese edilen bir üyesi) aracılı indüklenmiş endositoz ve henüz tanımlanmamış moleküler yolların aracılık ettiği aktif penetrasyon gibi iki farklı mekanizma kullanabilen çok önemli bir patojendir.^{26,32}

-Mannoprotein;

Mantar hücre duvarının en temel komponentlerinden biri olan karbonhidratların %20-30'u mannoproteinlerden oluşur. Bu proteinler insan epitel hücreleri yüzeyindeki ligandlarla bağlantı kurarlar. Böylece mukozal epitele tutunarak ileri evrede oral ve

vajinal kandidiyazise yol açabilirler. *Candida*'lar vasküler endotele adherans sağlayıp kan beyin bariyerini aşarak menenjitte yol açabilirler.^{26,33}

2.3.2. Temas sinyali, Dimorfizm ve Tigmotropizm

Candida albicans canlı veya cansız bir yüzeyle temas ettiğinde maya hücreleri maya formundan hifal formlara geçiş yaparak biyofilm oluşturabilmektedirler.²⁶ Bu geçişin ilk aşaması germ tüp oluşumudur. Nötral pH, ortam ısısı, %5,6 CO₂ gibi faktörler hifal forma geçişi kolaylaştıran faktörlerdir.³⁴ Mayadan hifal forma dönüşümde Cch1, Phr1, Mid1, Ece1, Fig1, Hyr1 ve Rbf1 gibi genler önemli düzenleyici genlerdendir.^{26,29} İnfeksiyonun ilk aşamasında maya formlar yüzey epitel hücrelerinin içine girer. Dokulara yayılım gösterir. Daha sonraki aşamalarda fagositoz yapan immun sistem hücrelerinin etkisinden kaçmak için hifal forma geçiş olur. Farklı çıkıntılara sahip yüzeylerde hifal yapılar giderek tüm yönlerde büyümeye başlar ki buna da tigmotropizm denir.²⁹ Hifal formdaki mantarlar fagositer hücreleri mekanik olarak veya proteazlarla lizise uğratarak kaçar ve diğer dokulara yayılır. Dokuda ciddi hasar ve yaygın invazyona yol açar. Özetle mayalar dokuda yayılım; hifler ise dokuda ciddi hasar ve invazyon yaparlar.^{29,34}

2.3.3. Fenotipik dönüşüm

Candidalar özellikle *C.albicans* konaktaki çevresel koşullara uyumu kolaylaştırmak için fenotipik değişim gösterirler. *C. albicans* türlerine ait koloniler düzgün, halka, yıldız şekilli, çizgili, buruşuk, tüylü gibi farklı koloni morfolojik değişimler gösterirler. Tüm bu değişimler infeksiyon sırasında daha virulan ve daha etkili olma amacıyla düzenlenmektedir. Kolonilerdeki beyaz-opak değişim (w-o) (white-opaque) en iyi bilinen fenotipik dönüşümdür.²⁶ Beyaz hücreler oval, opak hücreler ise uzamış fasulye şeklindedirler. Beyaz hücreler daha virülandırlar ve sistemik infeksiyonlara yol açabilmektedirler.^{26,22}

2.3.4. Biyofilm

Candida albicans'ın diğer bir önemli virülans faktörü, canlı (mukozalar) veya cansız (kateterler) yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturma yeteneğidir. Kateterler, protezler, greftler, şantlar ve mukozal yüzeylere kolonize olan maya ve hifal yapıların ekstraselüler matriks tarafından çevrelendiği yapıya biyofilm denir.^{26,35}

Elektron mikroskopisi çalışmalarında *C.albicans* biyofilmi, ilk 3-6 saat içerisinde adhezini aracılı tutunma ve sonrasında germ tüp oluşumu aşamalarını takiben 24-48 saat sonra, içerisinde mayalar, yalancı hif ve gerçek hiflerin bulunduğu ve kalınlığının 25-450 μm arası olduğu olgun bir yapıdır. Biyofilm yapımından sorumlu temel elemanlar hifal formdaki mantar yapılarıdır ve bu süreçte de Efg1 ve Cph1 genlerinin önemi çok büyüktür. Bu genlerde mutasyon olduğunda sadece maya hücrelerini içeren tek katlı ince bir biyofilm oluşmaktadır.^{26,36} Genellikle biyofilmin taban kısmında mayalar, üst kısmında ise hifal formların yer aldığı saptanmıştır. Olgun biyofilmler, planktonik hücrelere kıyasla antimikrobiyal ajanlara ve konağın immün faktörlerine çok daha dirençlidir. Artan dirençten sorumlu faktörler arasında biyofilmlerin karmaşık yapısı, biyofilm matriksi, ilaç eflüks pompalarının artan ekspresyonu ve metabolik plastisite bulunmaktadır. Olgun biyofilmden koparak ayrılan maya hücrelerinin daha virülan oldukları deneysel fare modellerinde gösterilmiştir.^{26,35} Hsp90, yakın zamanda *C. albicans* biyofilmlerinden maya hücrelerinin kopması ve biyofilmin antifungal direncinden sorumlu protein olarak tanımlandı.³² Biyofilm oluşumunu kontrol eden yeni tanımlanmış Ndt80, Rob1 ve Brg1 gibi transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır. Bu faktörlerden herhangi birinde (BCR1, TEC1, EFG1, NDT80, ROB1 veya BRG1) mutasyon gelişmesi, *in vivo* fare modellerinde kusurlu biyofilm oluşumuna neden olmuştur.³⁷ BGL2, PHR1 veya XOG1'den yoksun mutantların oluşturduğu biyofilmlerin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak flukonazole daha duyarlı olduğu gösterilmiştir.³⁸ Ayrıca son araştırmalar, *C. albicans* biyofilmlerinin nötrofiller tarafından öldürülmeye dirençli olduğunu göstermektedir. Hücre dışı matriksteki β -glukanların *C. albicans'ta* bu saldırılardan koruduğu kanıtlanmıştır.^{36,38}

Biyofilmi oluşturan mikrop topluluklarında gen ekspresyonlarının regüle edilmesinde "Quorum Sensing" in (hücre-hücre sinyal iletişim mekanizması) rolü çok önemlidir. Bu hücreler arası sinyal mekanizması sayesinde gereksiz hücre artışı ve besin için rekabetin yanı sıra biyofilmin uzak bölgelere yayılımının ve enfeksiyonun kontrolü sağlanmaktadır. Özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda, biyofilmden kopan maya hücrelerinin metastatik yayılımı sonucu sistemik enfeksiyonlar ortaya çıkabilir.^{26,35}

2.3.5. Salgısal Hidrolazlar

Konak hücre yüzeylerine adhezyon ve hif yapılarının büyümesini takiben, *C.albicans* hifal yapıları doku hücrelerine aktif penetrasyonunu daha da kolaylaştırabilen hidrolitik enzimler (hidrolazlar) salgılamaktadır. Ek olarak salgılanan hidrolazların hücre dışı besin alımının etkinliğini arttırdığı düşünülmektedir.³¹ *C. albicans* tarafından üç farklı grup hidrolaz salgılanmaktadır: proteazlar, fosfolipazlar ve lipazlar.²⁶

-Salgısal aspartil proteinazlar (SAP):

İnfeksiyon sırasında besin sağlamak için albumin, hemoglobin, keratin, kollajen, laminin gibi konak proteinlerini lizise uğratmak, immünglobulinleri, kompleman sistem proteinlerini hidrolize ederek konak direnç mekanizmalarından kaçınmak ve adhezyon, invazyon sırasında konak bariyerlerinin bozulmasını sağlamak proteazların başlıca görevlerindedir.^{29,30,39}

Salgısal aspartik proteazlar 10 SAP geninden oluşan bir gen ailesi tarafından kodlanır ve *C. albicans*'ın en önemli virulans faktörlerinden birini oluşturur. SAP1-3 yalnızca mayalarda bulunur ve düşük pH'da aktif olup erken aderens, invazyon ve kutanöz infeksiyonda rol alırlar. SAP4-6'nın ise hifal formlar tarafından eksprese olmaktadır; yüksek pH'da aktiftirler ve kolonizasyonda ve dokulara invazyonda etkindirler.³⁰ SAP8 özellikle penetrasyondan sorumludur. Hem maya hem de hifal formlarda bulunan SAP9 ve 10 mantar hücre yüzeyine GPI bölgeleri ile bağlı bulunan izoenzimlerdir. Pepstatin gibi bir asit proteinaz inhibitörü varlığında *Candida*'ların virulans yeteneklerinde azalma saptanmıştır.^{30,39}

-Fosfolipazlar:

Fosfolipaz enzimi hücre membranlarındaki fosfolipitleri lizise uğratan enzimlerdir. *Candida* blastosporlarının konak hücre membranına temas etmesiyle konak doku invazyonu başlar. Bu temas sonrası blastosporlardan invazyon için gerekli olan hifal yapılar gelişmeye başlar. Bu esnada fosfolipaz aktivitesi oldukça yoğundur. Fosfolipaz ailesi dört farklı sınıftan (A, B, C ve D) oluşur. B sınıfının sadece beş üyesi (PLB1-5) hücre dışına salınarak konak hücre membranlarında bulunan fosfolipidleri parçalar ve doku invazyonda önemli rol oynarlar. Besiyerine yumurta sarısı eklenerek fosfolipaz aktivitesi değerlendirilebilir.^{26,40}

-Lipazlar:

Ekstrasellüler lipazlar 10 üyeden oluşmaktadırlar (LIP1-10). Hayvan çalışmalarında LIP8 mutasyonunun farelerde düşük virülansa yol açtığı ve lipazların *C.albicans* patojenitesinde çok fazla öneme sahip olduğu gösterilmiştir.^{26,41}

2.4. Epidemiyoloji ve Bulaş Yolları

Kandidemi özellikle YBÜ’de takip edilen ağır hastalarda mortalite ve morbidite artışına ve hastanede kalış süresinin uzamasına yol açan önemli bir hastane infeksiyonudur. Kandidemilerin %75-80’i hastane kaynaklı olup bunların da %25-50’den fazlası YBÜ’de ortaya çıkmaktadır. YBÜ’de fungal infeksiyonlar endojen veya ekzojen kaynaklı olabilir. *Candida*’lar deride, el ve ayak tırnaklarının altında, vajina ve üretrada kommensal olarak normal floramızda bulunabilir. Esas kolonizasyon bölgeleri tüm GIS’tir. Bu nedenle *Candida* infeksiyonları çoğunlukla konağın endojen florasından kaynaklı olarak gelişmesine rağmen nozokomiyal bulaş da tanımlanmıştır. Nozokomiyal infeksiyonlarda sağlık çalışanlarının elleri, kontamine infüzyon sıvıları, tıbbi cihazlar en önemli ekzojen kaynaklardır ve bu tür bulaşmada özellikle *C. parapsilosis* etken olarak saptanmaktadır.^{42,43} Hastane infeksiyonları gelişiminde en önemli mekanizmalardan biri çapraz kontaminasyon yolu ile hastadan hastaya bulaştır. Bu bulaşta bahsi geçen ekzojen kaynaklar önemli rol oynar. Yapılan birçok çalışmada YBÜ’lerindeki *Candida albicans* etkenli salgınlarda sağlık çalışanlarının ellerinin kaynak olarak saptandığı raporlanmıştır.⁴³

2.4.1. *Candida* türlerinin prevalansı

İnvaziv *Candida* infeksiyonlarının en sık etkeni *C. albicans*’tır ancak son yıllarda non-*albicans Candida* türleri tarafından oluşturulan infeksiyonların sıklığında artış olmuştur.⁴⁴ Amerika Birleşik Devletleri’nde 2004-2008 yılları arasında yürütülen çok merkezli bir sürveyans çalışmasında, kandidemi gelişen 2019 hastanın %54’ü *albicans* dışı *Candida* türlerini ve %46’sı *C. albicans*’ı temsil ediyordu. *C. glabrata* tüm kandidemi vakalarının %26’sından, *C. parapsilosis* %16, *C. tropicalis* %8 ve *C. krusei* %3’ünden sorumluydu.⁴⁵ Diğer çalışmalarda, her türün insidansı, farklı hasta popülasyonları ve coğrafi bölgelerde değişiklik gösterse de benzer bir sıklık sırası gözlenmiştir.^{46,47,48} Örnek olarak İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

hastanesinde *C. albicans*'tan sonra kan dolaşımı infeksiyonuna neden olan en yaygın türler, sırasıyla *C. parapsilosis*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* olarak bildirilmiştir.³

Non-*albicans Candida* türlerinin prevalansını bilmek önemlidir çünkü antifungal ajanlara duyarlılık türler arasında farklılık gösterir. Azol türevi ilaçların yaygın kullanımını *C. albicans* gibi daha duyarlı türlerin prevalansında azalmaya ve azoller için daha yüksek MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değerleri gösteren *C. krusei* ve *C. glabrata* gibi türlerde artmaya sebep olmuştur.⁴⁹

2.4.2. *Candida auris*'in Ortaya Çıkışı

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) 2016 yılında çoklu ilaca dirençli (MDR) ve yüksek ölüm oranına sahip bir maya olan *Candida auris*'in bir çok uluslararası merkezde sağlık bakımı ile ilişkili infeksiyonlara neden olduğuna dair uyarılar yayınladı.⁵⁰ *C. auris* ellerde ve çevre yüzeylerde kolonize olabilmekte ve sağlık tesislerindeki salgınlara neden olmaktadır. Otuzdan fazla ülkede tespit edilmiştir ve yeni vakalar tespit edilmeye devam ediliyor.⁵¹

Bazı *C. auris* suşları 3 ana antifungal sınıfına karşı yüksek minimum inhibitör konsantrasyonlarına (MIC) sahiptir ve bu da tedavi seçeneklerini ciddi şekilde kısıtlamaktadır. *C. auris* geleneksel biyokimyasal yöntemleriyle yanlışlıkla başka bir maya (*C. haemulonii*, *C. famata*, *C. sake*, *C. catenulata*, *Rhodotorula glutinis* ve *Saccharomyces cerevisiae*) olarak tanımlanabileceğinden tanımlama için özel yöntemler gerektirir.⁵¹ 2009'dan beri dört kıtada dokuz ülkede görülmesi *C. auris*'in sağlık tesislerinde salgınlara neden olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. CDC sağlık tesislerini hastalarda *C. auris* için dikkatli olmaları konusunda uyarıyor.⁵⁰

2.5. İnvaziv Kandidiyazis Risk Faktörleri

Kandidemi gelişimi açısından en yüksek riske YBÜ'deki kritik hastalar ile majör cerrahi geçirmiş ve bağışıklığı baskılanmış hastalar sahiptir. Amerika Birleşik Devletleri'nin bazı bölgelerinde damar içi ilaç kullanıcıları arasında artan kandidemi oranları gözlenmiştir.⁵² *Candida* türleri ile infeksiyon gelişiminde Toll-like reseptörlerin (TLRs) ve sitokin yollarındaki konağa özgü polimorfizmlerin önemli bir role sahip olduğu da düşünülmektedir.⁵³

2.5.1. Yoğun bakım

Yoğun bakım ünitelerindeki hastalar çoğu hastanede en fazla sayıda kandidemi vakasından sorumludur. Yoğun bakımda infekte hastalardaki mikroorganizma sıralamasına baktığımızda *Candida* 'ları ilk üçte görebiliriz.⁷ Cerrahi üniteler, özellikle travma, yanık ve yenidoğan üniteleri en yüksek *Candida* enfeksiyon oranlarına sahiptir. İleri yaş, travma ve yanıklarla ilişkili risklerin yanı sıra, diğer faktörler aşağıdakilerdir⁹:

- ✓ Santral venöz kateterler (SVK)
- ✓ Ağır sepsis ve septik şok varlığı
- ✓ TPN
- ✓ Geniş spektrumlu uzun süreli antibiyotik kullanımı
- ✓ Yüksek 'Sequential Organ Failure Assessment'(SOFA), qSOFA, APACHE ve 'Candida Skoru'
- ✓ ABH, özellikle hemodiyaliz gerekiyorsa
- ✓ Geçirilmiş abdominal cerrahi,
- ✓ Gastrointestinal sistem perforasyonları ve anastomoz kaçakları
- ✓ Hastanede yatış süresi

Azol türevi antifungallerin profilaktik ve terapötik kullanımı non-*albicans Candida* 'ların gelişimi için risk faktörüdür.⁹ Çalışmalarda non-*albicans Candida* türleri ile görülen kandidemilerde bir takım spesifik risk faktörleri olabileceği belirtilmektedir. *C. parapsilosis* için; cerrahi operasyon öyküsü, SVK varlığı ve TPN uygulanımı, *C. krusei* için; lösemi, kemik iliği transplantasyonu (KIT), azol profilaksisi, yüksek 'Acute Physiology and Chronic Healthy Evaluation II' (APACHE II) skorları, *C. glabrata* için; azol profilaksisi, solid organ malignitesi, organ nakli, üriner ve vasküler kateterlerin kullanımı risk faktörü olabileceği belirtilmiştir.⁴²

2.6. Patogenez ve Patoloji

Cilt-mukoza bariyeri ve hücrel immünite *Candida* türlerinin invazyonunda çok ciddi öneme sahiptir. *Candida* 'lar cilt, gastrointestinal mukoza ve vajen mukozasında yaygın olarak bulunurlar. Herhangi bir nedenle bağışıklık sistemi veya anatomik

baryerler bozulduğunda kan yoluyla dokulara invaze olarak yaşamı tehdit eden patolojilere yol açabilmektedirler.^{29,35,54}

Sağlam cilt *Candida* türlerinin invazyonunu engelleyen en etkili bariyerdir. İntravasküler kateterizasyon, ülserasyon, bası yarası, yanık gibi cilt bariyerinin bozulduğu durumlarda *Candida*'lar kolayca sistemik dolaşıma geçebilirler. Maya hücreleri lamina propriaya ulaştıktan sonra kanda makrofaj içinde veya serbest olarak saptanabilmektedirler.²⁹ Sağlam gastrointestinal sistem (GİS) mukozası *Candida* türleri ile dolaşım invazyonunu önlemede bir diğer mekanik bariyerdir. Antimikrobiyal ilaçlar GİS mikrobiyotasını bozarak mantarların seçilip çoğalmasına zemin hazırlar ve hastada invaziv enfeksiyona neden olabilir. Bağırsak lümeninden *Candida*'lar kolayca sistemik dolaşıma transloke olabilmektedir.^{29,54}

Konağın hücre aracılı immünitesi invazyona karşı oldukça etkili ikinci bir savunma mekanizmasıdır. *Candida*'lar bariyerleri aşyp kan dolaşımına geçtiğinde polimorfonükleer lökositler (PMNL) psödohipflere hasar verme, blastosporları fagosite etme ve öldürme yeteneğiyle savunmada rol oynarlar. İlaçların ya da hastalığın sebep olduğu ciddi granülozitopenisi olan hastalarda İK gelişmesi, savunmada granülozitlerin önemli rol oynadığını desteklemektedir.^{26,54} Nötrofil ve monositlerin miyeloperoksidazının ya da hidrojen peroksit ve süperoksit anyon yapım kapasitesinin olmaması, *C. albicans*'ın etkili bir şekilde öldürülmesini engeller. Lenfositlerin savunmadaki rolünün önemi klinik gözlemlere dayanmaktadır. Kronik mukokütanöz kandidiyazis ve Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu (EİYS/AIDS) gibi hücresele immünite bozukluklarında orofarengeal kandidiyazis, *Candida* özefajiti gibi mukoza invazyonuna sık rastlanmaktadır. Orofarengeal kandidiyazis ve *Candida* özefajiti AIDS tanımlayıcı hastalıklardan biridir.⁵⁵

İnvaziv kandidiyaziste mukozal yüzeylerle beraber birden fazla organ tutulumu ve parankimal apseler görülebilir. Yaygın kandidiyaziste PMNL'lerden oluşan mikroapseler ve mononükleer hücre infiltrasyonu tipiktir. Kronikleşen olgularda histiyositler, dev hücreler ve epitelooid hücrelerin yer aldığı granüloamatöz reaksiyonlar da gözlenebilir.⁵⁴ Ağır immün yetmezliği olan olgularda inflamatuvar reaksiyon çok az veya hiç olmadığından apseler yalnızca *Candida*'ları ve nekrotik dokuyu içerir.^{54,56}

Candida 'ların kan dolaşımına erişmesini sağlayan üç ana yol vardır:

- ✓ Gastrointestinal sistem mukozal bariyer yoluyla
- ✓ Damar içi kateter yoluyla
- ✓ Genitoüriner kanaldan - Piyelonefrit gibi lokalize bir infeksiyon odağından

Gastrointestinal sistem - Gastrointestinal sistem mukozasından penetrasyon, *Candida* türlerinin hem nötropenik hastalarda hem de yoğun bakım hastalarında kan dolaşımına girmesi için muhtemel en yaygın mekanizmadır.⁵⁷ *Candida* türleri normal bağırsak mikrobiyotasının bir parçasıdır; yukarıda belirtilen faktörlerin çoğu, mayaların aşırı büyümesine ve ardından bağırsaktan kana translokasyonuna neden olur. Bağırsak mukozasını bozan major operasyonlar, kemoterapötik ajanlar, hematolojik maligniteleri olan kemoterapötik ajan tedavisi alan hastalarda GİS mukozal hasarı sonucu *Candida*'nın bağırsaktan kana translokasyonuna yol açar.⁵⁷

İntravasküler kateterler - İntravasküler kateterler, özellikle SVK, *Candida* kan dolaşımını infeksiyonu için önemli bir kaynak olmaya devam etmektedir.⁸ Kalıcı vasküler cihazların, özellikle de merkezi kateterlerin *Candida* kolonizasyonu, yerleştirme veya giriş yerinde meydana gelebilir ve daha sonra kandidemiye yol açabilir. TPN kandidemi için önemli bir risk faktörüdür. TPN'nin kandidemi riskini arttırdığı mekanizma tam olarak anlaşılmasa da, bir *in vitro* çalışmada TPN solüsyonlarında bulunan lipid emülsiyonunun silikon-elastomer kateterlerde biyofilm üretimini arttırdığı ve *C. albicans* büyümesini desteklediği öne sürülmüştür.⁴³

Lokalize odak - Lokalize bir infeksiyon odağından *Candida*'ların kana yayılımı göreceli olarak nadirdir, ancak mantar topu ile tıkanma veya infekte idrar akışını önleyen dış kompresyon ile ilişkili artan *Candida* idrar yolu infeksiyonu iyi tanımlanmıştır.⁵⁸

Kolonizasyon - *Candida* türleri ile kolonizasyon neredeyse her zaman kandidemi ve invaziv kandidiyaz için gerekli bir ön koşuldur. YBÜ'de yatmakta olan hastalarda mukozaların *Candida albicans* ile kolonizasyon oranı yüksektir.⁵⁹ Bununla birlikte, kolonizasyon tek başına hangi hastaların fungemi geliştireceğini tahmin etmez. Yukarıda belirtildiği gibi, kolonizasyona ek olarak başka risk faktörlerine de ihtiyaç vardır. Risk faktörleri ve *Candida* türleri ile kolonizasyon olsa bile çoğu hasta kandidemik hale gelmeyebilir.

2.7. İnvaziv *Candida* İnfeksiyonları

Candida türleri ile infeksiyonun klinik belirtileri, lokal mukozal infeksiyonlardan multi organ yetmezliği ile derin doku tutulumuna kadar uzanmaktadır.⁶⁰ *Candida* türleri gastrointestinal ve genitoüriner sistem mikrobiyotasının bir parçası olarak bulunsa da, bu bölgelerdeki mukozal baryerin bozulmasıyla derin doku tutulumu ve invaziv hastalığa neden olma eğilimindedirler. Özellikle YBÜ’de geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanların kullanımı gastrointestinal kanaldaki bakteriyel mikrofloranın baskılanarak mayaların seçilip çoğalmasına ve invaziv hastalığın oluşumuna yol açmaktadır.⁶⁰

2.7.1. Kandidemi ve Akut Dissemine Kandidiyazis

Kandidemi *Candida* türlerinin etken olduğu kan dolaşımı infeksiyonudur. Bağışıklığı baskılanmış hastalar ve YBÜ’deki hastalar en yüksek risk altındadır. Ateş en sık semptomdur. YBÜ’de mortalite %40’ı geçmektedir.⁶ Akut dissemine veya invaziv İK hematojen yayılım yoluyla birden fazla organ tutulumunun olduğu bir sendromdur. Göz lezyonları, deri lezyonları ve daha az yaygın olarak kas apseleri en belirgin klinik belirtilerdir. Deri lezyonları vücudun herhangi bir bölgesinde eritemli bir tabanda birdenbire ağrısız püstül kümeleri şeklinde ortaya çıkma eğilimindedir. Lezyonlar, kolayca gözden kaçabilen merkezi nekrotik küçük püstüllerden nodüler olanlara kadar farklılık gösterebilir. Ağır nötropenik hastalarda lezyonlar püstüllerden ziyade maküler olabilir. Bir püstül tabanının bir neşter bıçağı ile kazınmasıyla elde edilen materyalin Gram boyamasında mayaları görebiliriz ve kültüründe *Candida* türlerini üretebiliriz. Alternatif olarak, histopatoloji ve kültür için deri lezyonlarının punch biyopsileri yapılabilir.⁶¹ Bu tipik periferik tutulum bölgelerine ek olarak sistemik multiorgan tutulumu da görebiliriz. Otopsi çalışmaları özellikle böbrekler, kalp, karaciğer, dalak, akciğerler, gözler ve beyinde belirgin olan yaygın visseral mikroapseleri ortaya çıkarmıştır.

2.7.2. Hepatosplenik veya Kronik Dissemine Kandidiyazis

Hepatosplenik kandidiyazis (aynı zamanda kronik dissemine kandidiyazis olarak da adlandırılır) nötropeniden yeni çıkmış hematolojik maligniteleri olan hastalarda görülür. Bazı hastalarda belgelenmiş bir kandidemi epizodu vardır; diğerlerinde,

hastanın nötropeni dönemi sırasında kandidemik olduğu varsayılır. *Candida* türlerinin portal sistem yoluyla hepatosplenik kandidiyazise yol açabileceği düşünülüyor.

Yakın zamanda nötropeniden çıkmış bir hastada yüksek ateş, sağ üst kadranda ağrı, bulantı, kusma görülmesi akla hepatosplenik kandidiyazisi getirmelidir. Laboratuvar testlerinde serum alkalın fosfataz (ALP) yüksekliği mevcuttur. Karaciğer, dalak ve bazen böbreklerde farklı kalıcı mikroapseler meydana gelebilir. Ultrason veya bilgisayarlı tomografi ile karaciğer ve dalaktaki çok sayıda karakteristik radyolüsen lezyonlar görülerek tanı konulabilir. Olguların çoğunda kan kültürleri negatiftir.⁴

2.7.3. İnvaziv fokal infeksiyonlar

2.7.3.1. Üriner Sistem Kandidiyazisi

Kandidüri hastanede yatan üriner kateteri olan ve antibiyotik kullanan hastalarda yaygındır ancak kolonizasyonu infeksiyondan ayırt etmek genellikle zordur. Yoğun bakım hastalarının idrarlarından en sık izole edilen patojen *Candida*'lardır. Bir çalışmada bu olguların %75'inin tedavisiz kendiliğinden negatifleştiği görülmüştür. Hastaların sadece %4'ü semptomatiktir.⁶² Hematojen yayılıma sekonder piyelonefrit gelişebilir ve tipik olarak çoklu mikroapseler ile karakterize edilir. Genellikle tek taraflıdır ve tıkaçıcı bir fungus topunun gelişmesiyle komplike hale gelebilir. Üriner sistem kandidiyazisine en sık sebep olan tür *C. albicans*, ikinci en sık tür ise *C. glabrata*'dır.⁵⁸

2.7.3.2. İnvaziv Pulmoner Kandidiyazis

Candida pnömonisi oldukça nadir görülmektedir.⁶³ Solunum sekresyonlarında *Candida* üremesi genellikle kolonizasyonu gösterir. Bu yüzden gerçek infeksiyonu kolonizasyondan ayırt etmek güçtür. Ağır hastalarda orofarenks içeriğinin aspirasyonu sonrası çok nadir olarak *Candida* pnömonisi ve apsesi geliştiği gösterilmiştir. Balgam kültürünün tanı değeri çok düşüktür. YBÜ'de yatan non-nötropenik hastaların bronkoalveoler lavaj (BAL) kültüründe *Candida* üremesinin pozitif prediktif değeri (PPV) <%30 olarak gösterilmiştir.⁶⁴

2.7.3.3. İntraabdominal Kandidiyazis

Yoğun bakım ünitelerinde kandidemiden sonra ikinci en sık görülen İK'tir. *Candida* sıklıkla gastrointestinal sistem perforasyonu, bağırsak cerrahisi sonrası anastomoz kaçakları veya akut nekrotizan pankreatit sonrasında ortaya çıkar.² Cerrahi drenaj gerektiren multiloküle apseler oluşabilir. Periton diyalizi alan son dönem böbrek hastalığı olan hastalarda ağır seyredebilir. *C. albicans* intraabdominal infeksiyonlarda en sık izole edilen türdür ancak *C. glabrata* artış eğilimindedir.

Tanı için aşağıdakilerden en az biri gereklidir:²

- ✓ Cerrahi veya kateterle alınan nekrotik veya pürülan batın içi örnekte *Candida* üremesi veya direkt mikroskopta görülmesi
- ✓ Sekonder ve tersiyer peritoniti olan bir vakada başka bir patojen olmadan kanda *Candida* üremesi
- ✓ Batına yerleştirilen drenaj kateterlerinden ilk 24 saat içerisinde alınan örnekte *Candida* üremesi

2.7.3.4. Endoftalmit ve Koryoretinit

Candida endoftalmiti ve koryoretinit travma, göz ameliyatından sonra veya hematogen yayılım ile gelişebilir.⁶⁵ Bu yüzden tüm kandidemi vakalarında ilk bir hafta içerisinde göz dibi muayenesi yapılmalıdır. İlk başvuru semptomu görme keskinliğinde azalmadır; ağrı bazen ortaya çıkabilir. Koryoretinal tutulumun klasik bulguları retinada fokal, derin, beyaz, infiltratif lezyonlardır. Vitroz genişleme olduğunda bulanıklık, puslu bir görüntü mevcuttur; bazen 'vitreusda kabarık beyaz toplar' veya 'kartopları' görülür. Derhal tedavi edilmezse infeksiyon görmeyi tehdit edebilir. Tedavide 4-6 hafta süre ile intravenöz flukonazol veya vorikonazol önerilmektedir. Maküler ve vitreal tutulum varsa intravitreal amfoterisin B ve vorikonazol yapılabilir.⁶⁵

2.7.3.5. Osteoartiküler Kandidiyazis

Candida türleri eklem içi enjeksiyon, cerrahi prosedür veya damar içi ilaç kullanımının bir sonucu olarak hematogen yayılıma bağlı kemikleri ve eklemleri infekte edebilir.⁶⁶ Çoğu infeksiyon doğal eklemlerde tanımlanmış olsa da, protez eklemler de etkilenebilir. *Candida* osteomyelitinin en önemli semptomu o bölgede ağrıdır. Kan

kültürleri genellikle negatiftir. Teşhis infekte bölgeden alınan kültür ile konulur. *Candida* artriti osteomyelitte göre daha kolay doğrulanır çünkü sinoviyal sıvı kültürü kolayca alınabilir. Eklem sıvısı, kemik biyopsisi, aspirat kültüründe tek bir *Candida* kolonisi bile patojen olarak değerlendirilmelidir.⁶⁶

2.7.3.6. Menenjit

Candida'lar hematogen yayılmaya ek olarak nöroşirürjikal cerrahi sonrası ventriküloperitoneal veya ventriküloatriyal şant yoluyla Merkezi Sinir Sistemine (MSS) girebilir.⁶⁷ *Candida* menenjitinin tanısı zordur. Bu nedenle uygun antibiyotik tedavisine cevap vermeyen menenjit öntanılı hastalar ve nörolojik semptomları ortaya çıkan dissemine kandidiyazisli hastalarda akla gelmelidir. Baş ağrısı, ateş ve ense sertliği en sık görülen belirtilerdir. BOS'ta artmış protein, normal/düşük glukoz, nötrofilik veya lenfositik hücre artışı vardır. Kültür için lomber ponksiyonla bol miktarda beyin omurilik sıvısı (BOS) almak gerekir. Tanı etkenin BOS'ta üretilmesi ile kesinleştirilebilir.⁶⁷

2.7.3.7. Endokardit

Candida endokarditi kandidiyazisin en ciddi belirtilerinden biridir ve fungal endokarditin en yaygın nedenidir.⁶⁸ *Candida* endokarditi kandidemiden kaynaklanır ve genellikle protez kalp kapağı olan hastalarda, damar içi ilaç kullanan kişilerde, kalıcı SVK ve uzamış kandidemisi olan hastalarda görülür. Septik emboliler görülme oranı yüksektir.⁶⁹ Infekte kateter mutlaka çekilmelidir. Kan kültürlerinde kandidemi sebat eden çoğu hastada ekokardiyografi ile vejetasyonlar rahatlıkla görülebilir. Persistan kandidemi vakaları endokardit ve septik tromboflebit açısından değerlendirilmelidirler.

2.8. *Candida* İnfeksiyonlarının Tanısı

Candida infeksiyonlarının tanısında direk mikroskopik inceleme, kültür, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır.²¹

2.8.1. Mikroskopik İnceleme ve Germ Tüp Testi

Direk mikroskopik inceleme hızlı ve basit bir uygulamadır. Bu inceleme ile örnekte mayaların olup olmadığı kolay ve hızlıca değerlendirilerek kültür için uygun besiyeri seçimi yapılabilir. Klinik materyalin serum fizyolojik ile veya % 10'luk potasyum hidroksit (KOH) ile hazırlanan boyasız preparatlarında tomurcuklanan maya hücreleri, hif ya da yalancı hif yapıları görülebilmektedir.²¹ Yine mikroskopik inceleme için çeşitli boyalarda da preparatlar hazırlanıp değerlendirilebilir. *Candida* tanısı için örnekler metilen mavisi, Gram, giemsa boya gibi boya kullanılarak ışık mikroskopunda incelenebileceği gibi kalkoflor beyazı gibi floresan boya ile boyanarak floresan mikroskopunda da incelenip tanı konulabilir.^{19,21} Gram boyamada *Candida*'lar Gram pozitif boyanmış tomurcuklanan maya hücreleri olarak görülürler. Yine Gram ve diğer boya ile de maya hücreleri ve hif-psödohif yapıları görülebilir. Kalkoflor beyazı ile incelemede *Candida*'lar parlak yeşil floresan veren oval/yuvarlak maya hücreleri olarak görülebilirler. Bir diğer alternatif mikroskopik inceleme testi "**germ tüp**" testidir.^{19,21} Germ tüp testi için besiyerinde üreyen *Candida* kolonilerinden bir miktar alınarak tavşan veya insan serumundan 0,5 ml içeren tüp içine inoküle edilir ve 37°C'de en fazla iki saat olacak şekilde inkübe edilir. İnkübasyondan sonra tüp içindeki serumdan bir damla temiz bir lama damlatılır üzerine lamel kapatılarak mikroskopta x400 büyütmede germ tüp varlığı açısından incelenir.^{19,21} *C. albicans* izolatlarının % 90'ından fazlası bu süre içinde 'germ-tüp' adı verilen ana hücreden boğum oluşturmada uzayan gerçek hif yapısını oluşturduğunu görebiliriz. Bu yapı ana hücrenin yaklaşık yarı genişliğinde ve 3-4 kat uzunluğundadır. Germ tüp testinde, germ tüp oluşumu tespit edildiğinde *C. albicans* olarak tanımlanır ve çoğunlukla ek teste tabi tutulmaz. Ancak *C. albicans* dışında *C. dubliniensis* de germ tüp oluşturmaktadır. Bu iki türün ayrımı için farklı testlere gereksinim vardır. Ancak genelde tüm laboratuvarlar germ tüp oluşturan izolatları *C. albicans* olarak raporlamaktadır. *C. tropicalis* türü ise özellikle germ tüp testi iki saatten sonra değerlendirilir ise yalancı pozitifliğe neden olabilir. Bunun nedeni bu türün psödohifleri uzayarak germ tüp gibi bir görünüm oluşturabilmektedir. Bu psödohif yapısının gerçek germ tüpten ayırt edilmesi için hif/psödohif yapısının ana hücreden ayrıldığı bölge dikkatli incelenmelidir. Zira *C. tropicalis*'e ait psödohifin ana hücre ile birleştiği bölgede tipik daralma görüntüsü bulunmaktadır. *C. albicans* türlerinin %5 kadarı da germ tüp oluşturmamaktadır.^{19,21} Doku incelenmesinde hematoksilin eozin, periyodik asit-schiff (PAS) ve Gomori'nin metenamin gümüş

boyası tanıda yararlıdır. Derin dokuların biyopsi örneklerinde mayanın görülmesi kandidiyazisin kesin tanısını sağlar.⁷⁰

2.8.2. Kültür

Mantar infeksiyonunun tanısı ve etkenin belirlenmesinde kültür çok önemli bir tanı aracıdır. Klinik örnekten primer izolasyon ve identifikasyon için çeşitli besiyerleri kullanılmaktadır. *Candida*'lar bakterilerin izolasyonu için kullanılan kanlı agar, çikolatamsı agar, Eosin methylene blue (EMB) agar gibi besiyerlerinde rahatlıkla üreyebilmektedir.¹⁹ Ancak bu besiyerlerinde mantarlara özgül yapılar, sporlanmalar zayıf olabilmektedir. Bu yüzden çoğu laboratuvar da mantarlar için özel olarak hazırlanan ve kullanılan çeşitli besiyerleri bulunmaktadır. *Candida*'lar mantarlara özgül besiyerleri olan Sabouraud Dekstroz Agar (SDA), Mycosel veya Mycobiotic Agar gibi besiyerlerinde rahatlıkla ürerler.^{19,21} *Candida*'ların primer izolasyonu için en sık kullanılan besiyeri SDA'dır.⁷⁰ Mantar besiyerlerinin içerisine, bakterilerin üremesini engellemek için penisilin, gentamisin streptomisin ve kloramfenikol gibi antibakteriyel ajanlar eklenebilir. Bakterilerin dışında hızlı üreyen kontaminan küf mantarlarının üremesini engellemek amacıyla da besiyeri içine sikloheksimid eklenebilir.²¹ İK'ten şüphelenilen hastalardan dren yerleri ve kan kültürlerinin alınması gereklidir. Örnekler genellikle bir seçici, bir de seçici olmayan (beyin-kalp infüzyon agar, Sabouraud dekstroz agar gibi) besiyerine ekilir.⁷¹ Besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra oda ısısında (22-26°C) veya 37°C'de inkübe edilirler. *Candida*'lar rutin besiyerlerinde genellikle 1-3 gün içerisinde ürerler. Maya kolonileri genellikle gri-beyaz, krem renkli, macunumsu, düzgün yüzeyli (S tipi) dir. Üreyen kolonilerden Gram boyama yapılarak tomurcuklanan maya hücrelerinin görülmesi üzerine ileri tanımlama için çeşitli işlemler ve subkültürler yapılır. Primer izolasyon besiyerlerinde üreyen maya hücrelerinin identifikasyonu için germ tüp testi, kromojenik agar besiyerine ekim, biyokimyasal ve karbonhidrat asimilasyon testleri, mısır unlu agardaki morfolojik özellikleri ve otomatize yöntemler kullanılabilir.²¹ *Candida* türlerinin izolasyonu için kromojenik besiyerleri laboratuvarlarda (CHROMagar *Candida*, BD CHROMagar *Candida*, *Candida* ID) oldukça kullanışlıdır ve *albicans* ile non-*albicans* *Candida* türlerini identifiye edebilir.^{70,71}

2.8.2.1. Kan kültürleri

Kan kültürü, duyarlılığı düşük olmasına rağmen kandidemi teşhisi için altın standart yöntemlerden biri olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, İK'in kesin tedavisi genellikle kültürün duyarsızlığı nedeniyle gecikir ve bu gecikme yüksek mortalite oranlarına (% 35-75) yol açabilir.¹¹ Kandidemi şüphesi olan tüm hastalardan kan kültürü alınmalıdır. *Candida*'ların tespit edilebilmesi için BACTEC sistem ve BacT/Alert gibi kan kültürü sistemleri kullanılabilir.⁷² *Candida* kan kültürlerinde % 50- 70 oranında ve geç ürer.¹² Kan kültürü pozitif olan hastalarda İK teşhisi kolaylıkla yapılır, ancak kan kültürlerinin düşük duyarlılığı, derin doku infeksiyonu olan bazı hastaların gözden kaçırılacağı anlamına gelir. Kandidemi teşhisi için kullanılan kan kültürü sistemlerinin en önemli dezavantajlarından biri üreme sinyali için en az üç gün ve uygun besiyerine ekim yapıldıktan sonra ise identifikasyon için iki gün daha süre gerektirmesidir. YBÜ'de genel durumu ağır olan hastalarda daha hızlı ve daha duyarlı tekniklerin yapılması gerekmektedir. Kan kültürlerindeki mayaların daha hızlı saptanması ve kültür bazlı olmayan yeni tekniklerin geliştirilmesi günümüzdeki en önemli araştırma alanlarından biridir. Kan kültürlerinin geç sonuç vermesi, serolojik testlerin tek başına kullanıldıklarında duyarlılıklarının düşük olması nedeniyle moleküler yöntemlerin bu alanda araştırılması ön plana çıkmıştır. Bu yöntemler geliştirildikçe kan kültürü negatif derin doku infeksiyonları daha iyi teşhis edilebilecektir.¹²

2.8.2.2. Biyopsi materyalinin kültürü ve boyası

Deri lezyonları veya visseral organ tutulumu olan hastalarda boyama, kültür ve histopatolojik değerlendirme için biyopsi yapılmalıdır.⁷³ Doku biyopsisi genellikle kesin bir tanıya ulaşmamıza olanak sağlar. Özel boyalar kullanılarak yapılan histopatolojik incelemede *Candida* türlerinin karakteristik özelliği olan tomurcuklanan mayaları, hif ve psödohif yapılarını görebiliriz.⁷³

2.8.2.3. Kromojenik Besiyerine Ekim

CHROMagar *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis*'in tanımlanmasında kullanılan seçici besiyeridir ve bu besiyerinde suşlar

35°C’de bir gecelik inkübasyonun ardından sırasıyla elma yeşili, metalik mavi, pürüklü pembe, parlak beyaz ve koyu pembe-mor renkte kolaylıkla ayırt edilebilen koloniler oluşturmaktadırlar.⁷⁴

CHROMagar mayalar tarafından salınan L-prolin aminopeptidaz ve beta-galaktosaminidaz enzimleri ile tepkimeye giren kromojenik substratlar içermektedir.⁷⁴ Bu substratların türe özgü enzimlerle hidrolizi sonucu farklı renk ve morfolojide koloniler oluşur. *C. albicans* genellikle elma yeşili renk değişikliği oluşturur. Yapılan bir çalışmada *Candida* tanımlanmasında maliyet ve süre açısından CHROMagar ile SDA karşılaştırılmıştır.^{71,74} Çalışmada AIDS ve nötropenik olan hastaların örneklerinden izole edilen 21 maya izolatında, CHROMagar duyarlılığının %95,2 olduğu, *C. albicans* için ise %100 duyarlı ve %100 spesifik olduğu bulunmuştur.⁷¹ Bu yüzden çalışmadaki araştırmacılar CHROM agarın *Candida*’ların ön tanımlanmasında ucuz ve hızlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Hatta bu araştırmacılar kan kültürlerinin pozitif şişelerinden yapılan boyamada maya hücreleri görüldüğünde CHROMagara doğrudan pasajlanmasının da hızlı tanı için faydalı olabileceğini söylemektedir.^{21,71,74}

2.8.2.4. Mısır Unlu - Tween 80 Agardaki Morfolojik Özellikler

Tween 80’li mısır unlu agar *Candida*’ların hifal özelliklerine göre tanımlanması ve ayırt edilebilmesi için kullanılan bir besiyeridir.^{15,19} Tween 80 özellikle *C. albicans*’ ın klamidospore yapısı oluşumunun gösterilmesi için besiyerine eklenmektedir. Bu yöntem için besiyerinde üreyen maya kolonilerinden iğne öze ile alınarak mısır unlu besiyeri yüzeyine 1 cm aralıklarla üç paralel çizgi şeklinde ekim yapılır ve ekim alanlarının üzerini kaplayacak şekilde bir lamel kapatılır. Plaklar 30°C de 24-48 saat kadar inkübe edilir. Inkübasyon sonunda lamel üzerinden 100x ve 400x lük büyütmede morfolojik özellikler açısından incelenir.¹⁹ Mısır unlu agardaki morfoloji incelenirken tomurcuklanan maya hücrelerinin, blastokonidyalardan ve psödohif yapılarının görülmesi izolatın *Candida* cinsine ait olduğunu düşündürür. Tür tanımlaması için ise bazı türlere ait spesifik morfolojik özellikler kullanılır. Örneğin klamidospore yapısının görülmesi ve psödohif üzerine kümeler şeklinde blastokonidyalardan görülmesi üreyen türün *C. albicans* olduğunu düşündürür. *C. albicans* türlerinin yaklaşık %5’i germ-tüp oluşturamayabiliyorsa da hemen hemen hepsi klamidospore sahiptir.¹⁹ Eğer germ-tüp testi negatif ve mısır unlu agarda klamidosporelar görülmediyse *C. albicans* dışlanabilir.

Yine *Candida*'lar içerisinde psödohif oluşturmeyen tür olarak bilinen *C. glabrata* da mısır unlu agarda yalancı hif oluşturmeyen, tomurcuklanan düzenli maya hücreleri kümeleri şeklinde görülebilir. *C. parapsilosis* de mısır unlu agarda ekim çizgileri boyunca çalı şeklinde görülen satellit üreme paterni göstermesiyle ayırt edilir (Şekil 4). Aynı zamanda *C. parapsilosis*; mısır unlu agarda örümceğebenzer dev hücreleri çağrıştıran kolonilere sahip bir türdür. Mısır unlu agar preparatında yalancı hiflerden ayrılan uzun dikdörtgen blastokonidyumların “ırmakta yüzen kütük dizileri” benzeri dizilim göstermesi ise tanıyı *C. kefyf*'e yönlendirir.^{15,19}

2.8.3. Serolojik Testler

Mantar infeksiyonlarının tanısında serolojik testlerin kullanımı belirli etkenlerle sınırlıdır. Yalancı pozitiflik ve yalancı negatiflik çeşitli nedenlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle bu testler mantar hastalıklarının tanısında tek başına yeterli olmayıp klinik, radyoloji ve diğer tanı yöntemleri ile birlikte değerlendirilmelidir. Serolojik testlerde ya mantar antijeni ya da bu antijenlere karşı oluşmuş antikorlar aranmaktadır. *Candida* infeksiyonları için antijen aranan testler daha çok kullanılmaktadır.^{73,75}

2.8.3.1. CAGTA (*Candida albicans* germ tube antibody)

C. albicans'ın germ tüp yapısına karşı antikor aranmasında kullanılan İFA ve ELISA testleri mevcuttur. Yapılan çalışmalarda CAGTA saptanmasının özellikle hematolojik malignitesi olanlarda ve YBÜ hastalarında İK tanısında faydalı olabileceği belirtilmektedir. CAGTA titrelerindeki azalmanın, İK'i olan ve antifungal tedavi alan hastalarda tedaviye yanıtın izlenmesinde de yardımcı olacağı bildirilmiştir.⁷⁶

2.8.3.2. (1,3)-β-D-glukan

Candida hücre duvarı antijenlerinden (1,3)-β-D-glukanın serum seviyesinin tespiti de İK'in erken tanısında tarama testi olarak son yıllarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bu antijen panfungal bir antijen olduğu için *Candida*'ya spesifik değildir, diğer mantar infeksiyonlarında da pozitif olabilmektedir.⁷⁷ Yapılan çalışmalarda Beta-D glukan duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla % 75-80 ve % 80 olarak bulunmuştur.⁷⁷ İK olgularında kan kültürlerinin beta-D-glukan testi veya PCR ile birlikte kullanılması tek başına kan kültürlerinden daha yüksek tanısallıkla ilişkilendirilmiştir.⁷⁸

2.8.3.3. *Candida* Mannan antijen ve anti-mannan antikorlar

Candida'ların somatik antijenlerine karşı antikor aranan testler mevcuttur. Ancak bu testlerin pozitif sonuçlarının invaziv infeksiyona mı yoksa kolonizasyona mı bağlı olduğu ayırt edilememektedir.⁷⁵ Bu nedenle bu antikor testlerinin anlamlı olması için ya yüksek titrede pozitif olması ya da tekrarlayan ölçümlerde antikor titresinin artışının saptanması gerekmektedir.⁷³ *Candida* hücre duvarı yapısında bulunan polisakkarit mannan antijenine karşı oluşan antikorlar da ELİSA ve RIA testleri ile saptanabilmektedir. Mannan antijeni özgün bir antijen olmasına karşın serum yarı ömrünün kısa olması ve antikora hızlı bağlanması nedeniyle tanı açısından uygun bir antijen değildir.⁷⁶ Sağlıklı bireylerde *Candida* türlerine karşı gelişen antikorlar mannani kandan hızla uzaklaştırmaktadır. Bu nedenle immünkompetan kişilerde tanı değeri sınırlıdır. Ancak immünkompromize kişilerde yeterli antikor yanıtı olmadığından mannan antijeninin aranması tanıda katkı sağlayabilir.⁷⁹ Kandidiyazis kliniği bulgularının varlığında, ardışık alınan serumlarda antikor titresinin artmaya devam etmesi infeksiyon lehine değerlendirilebilir.⁷⁶ Ayrıca antijen testleri ile kombine değerlendirildiklerinde tanıya yardımcı olabilirler. Bir meta-analizde İK için mannan ve anti-mannan IgG antikorunun duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %58 ve %93, %59 ve %86 olarak bulunmuştur.⁷⁶ En iyi sonuçlar, mannan antijeni ve anti mannan antikorun kombine kullanımı ile elde edilmiştir.⁷⁶ Mannan ve anti-mannan kombine kullanımında ise duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %83 ve %86'dır. En iyi sonuçların *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* infeksiyonlarında alındığı görülmüştür.⁷⁶ Bu testlerin negatif prediktif değeri (NPV) yüksek, pozitif prediktif değerleri (PPV) ise düşüktür.⁷³

2.8.4. Karbonhidrat Asimilasyon ve Fermentasyon Testleri

Asimilasyon testleri mayaların oksijen varlığında karbonhidratları tek karbon kaynağı olarak kullanma özelliklerinin araştırıldığı testlerdir. Fermentasyon ise karbonhidratların CO₂ ve etanol üretimiyle sonuçlanan anaerobik kullanımını gösterir.²¹ Karbonhidratların fermentasyonu sonucu oluşan asit, besiyerine eklenen fenol kırmızısı gibi pH belirteçleri yardımıyla ortaya çıkan renk değişimleri ile saptanır. Besiyerinin sarı renk olması reaksiyonun pozitifliğini, kırmızı renkte kalması karbonhidratların fermente olmadığını yani reaksiyonun negatifliğini gösterir.⁷⁰ Mantar infeksiyonlarındaki artış bu patojenlerin tanımlanması için hızlı ve doğru manuel ve

otomatize ticari sistemlerin geliştirilmesini gerektirmiştir. Bu otomatize sistemlerden ID 32C sistemi (bioMerieux, France) genellikle Avrupa ülkelerinde kullanılırken, API 32C mantar identifikasyon sistemi (bioMerieux Vitec) ABD’de en sık kullanılan mantar tanımlama sistemlerinden biridir.^{21,80}

2.8.4.1. Hızlı Trehaloz Testi

C. glabrata’nın 3 saat içerisinde tanımlanmasına olanak sağlayan hızlı ve kullanışlı bir testtir. CLSI, *C. glabrata*’nın trehalozu asimile etmesi özelliğinin esas alındığı hızlı bir test prosedürünü, M35-A dokümanında *C. glabrata*’nın identifikasyonu için yayınlamıştır.^{21,81} Hızlı trehaloz broth besiyerinde 42°C de 3 saatlik inkübasyon sonrası sarı renk oluşumu testin pozitif olduğunu gösterir. Bu test için GLABRATA RTT adlı bir ticari kit mevcuttur.²¹

2.8.5. Moleküler testler

Günümüzde moleküler testler klinik örnekten direk maya izolasyonu için rutin olarak kullanılmamaktadır. Daha çok araştırma ve epidemiyolojik çalışmalar için tercih edilmektedir. Ancak giderek bu yöntemlerin kullanımı artmaktadır. Mantar infeksiyonlarında moleküler yöntemler tanı için kullanılabilmesinin yanı sıra tür tanımlaması, antifungal direnç, epidemiyolojik amaçlarla da kullanılır.¹¹ İlk olarak hibridizasyon yöntemleri kullanıma girmiştir. Problemlerle PCR ürünlerinin saptandığı yöntemlerde hibridizasyon kullanılır. Kan kültürlerinden maya mantarlarının hızlı tanısında floresan in situ hibridizasyondan yararlanılabilir.¹⁴ Sonrasında nükleik asit amplifikasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Moleküler amplifikasyon teknikleri, bir klinik numunede bulunan küçük miktarlarda mantar DNA’sını doğrudan tespit ederek hızlı ve hassas tanımlama sağlar, bu da bu testleri hem erken teşhis, hem de özellikle geleneksel kültür yöntemleriyle saptanamayan İK vakaları için cazip hale getiriyor. Kan, serum, plazma gibi farklı örneklerde *Candida*’ların tespiti için çeşitli genetik sekansları (18S rDNA, 28S rDNA, 5,8S rDNA, dahili kopyalanmış aralayıcı bölgeler (ITS) ve mitokondriyal DNA) hedefleyen çoklu PCR testleri geliştirilmiştir.^{11,17,82} Kullanılan primerlere bağlı olarak mantarlar bir panfungal veya daha spesifik bir şekilde tespit edilebilir. Çeşitli tekniklerin duyarlılığı ve özgüllüğü değişkendir, ancak klasik kültüre dayalı yöntemlerle karşılaştırıldığında moleküler yöntemlerin duyarlılığı çoğunlukla yüksektir. Bu moleküler yöntemlerden biri de PCR testidir. Yapılan çalışmalarda kandideminin saptanmasında PCR duyarlılığının kan kültürü duyarlılığına benzer

olduğu ve hatta bazı kan kültürü negatif İK olgularında tanı koymada yardımcı olduğu gösterilmiştir.¹⁶ Bunun yanı sıra kan kültürlerinde olduğu gibi bu yöntemle de *Candida*'lar tür düzeylerine göre tanımlanabilir. Yine PCR ile çeşitli örneklerdeki *Candida* DNA'sının kantitasyonu saptanarak kolonizasyon ile infeksiyon ayrımı yapılabilir.⁸³

2.8.5.1. PCR

İnvaziv kandidiyazis tanısında kan kültürlerinin geç sonuç vermesi ve duyarlılığın düşük olması nedeniyle daha hızlı sonuç veren, duyarlılık ve özgüllüğü daha yüksek olan testlere ihtiyaç duyulmuştur. Kültür dışı yöntemlerin güncel odak noktalarından biri kandidemi ve İK için yüksek duyarlılığa sahip bir PCR testinin geliştirilmesidir.⁸⁴ Kan kültürü ile beraber kullanılan PCR testinin duyarlılığının ise % 98'lere kadar çıktığı belirtilmiştir.⁷⁸ DNA ekstraksiyonu için kullanılan yöntemle bağı olarak serbest DNA veya sağlam patojen hücreler tespit edilebilir. Sağlam hücreleri saptayan moleküler testlerin özgüllüğü antifungal tedavi gören hastalarda özellikle artmış olabilir. Öte yandan, serbest DNA'yı tespit eden tahlillerden elde edilen pozitif sonuçların yorumlanması zor olabilir.¹¹ Bu yüzden bu testlerin belli bir standardizasyonu yoktur. Yayımlanan çalışmalar gösteriyor ki, *Candida* PCR duyarlılığı kan kültüründen daha yüksektir ancak kan kültürleri ve/veya beta-D glukan gibi ek testlerle birlikte kullanıldığında en iyi etkinliği gösterir.⁷⁸ Bir çalışmada İK vakalarında PCR veya beta-D-glukan testi ile birleştirilmiş kan kültürlerinin duyarlılığı sırası ile %98 ve %79 olarak gösterilmiştir. Bu nedenle kültür temelli olmayan bu iki tahlil kan kültürleri ile birleştirildiğinde İK için kültür yöntemlerinin duyarlılığını artırma potansiyeline sahiptir.^{11,78}

Etkili antifungal tedaviye erken başlanması daha iyi sonuçlar doğurduğundan,⁶⁰ tedaviye mümkün olduğunca erken başlamak çok önemlidir. Moleküler yöntemlerle kan kültüründen direkt *Candida* türlerinin hızlı identifikasyonu uygun antifungal tedavinin erkenden başlanmasına ciddi olanak sağlar. Bu sayede de doğru antifungal yönetimi sağlanabilir. Ancak bu moleküler yöntemler çok merkezli çalışmalarda standardizasyonu sağlanmadığı için araştırmalar devam etmektedir. Bu yüzden moleküler yöntemlerin doğrulanması için çok merkezli çalışmalardan daha fazla veriye ihtiyaç duyulmaktadır.^{11,85}

2.8.5.2. Diğer Moleküler Yöntemler

İnvaziv kandidiyazis tanısında kan kültürlerinin geç sonuç vermesi, serolojik testlerin tek başına kullanıldıklarında duyarlılıklarının düşük olması, PCR standardizasyonunun olmaması nedeniyle tanıda kullanılacak ek yöntemlerin geliştirilmesi ihtiyacı doğmuştur. Bu yöntemlerden bazıları; MALDI-TOF-MS, Yeast Traffic Light PNA-FISH (Protein nucleic acid fluorescence in situ hybridization) ve T2 *Candida* Panel yöntemleri olarak sıralanabilir.^{11,86}

2.8.5.3. T2 Magnetic Resonance Assay (T2MR)

Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) 2014 yılında *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*'nin neden olduğu kan dolaşımı infeksiyonunun tespiti için T2*Candida* panelini onayladı. T2*Candida* paneli bu patojenleri bir tam kan örneğinden 4 saat içinde, kan kültürlerinden çok daha hızlı bir şekilde tespit edebilir. Moleküler bir yöntemdir. DNA ekstrasyonundan sonra; hedef DNA'yı kopyalar ve amplifiye edilmiş DNA'yı manyetik rezonans teknolojisi kullanarak tespit eder. Bir çalışmada T2*Candida*'nın genel duyarlılığı %91, özgüllüğü ise %99 olarak belirtilmiştir.⁸⁷ Kan kültürü ve antijen testi ile karşılaştırıldığında T2*Candida* Paneli İK'in saptanması için en yüksek duyarlılığa sahiptir.⁸⁸ Kan kültürü ve T2*Candida* Panel kombinasyonu ile en yüksek duyarlılık elde edildiği görülmüştür.⁸⁸ Bir çalışmada antifungal tedavi gören hastalarda pozitif kan kültürleri sayısı azalsa da, T2*Candida* panelinin bu gözden kaçan kandidemileri tanımladığını göstermiştir. T2*Candida*, kan kültürlerine kıyasla *Candida* saptama ve tür tanımlama sürelerini kısaltıp, etkin antifungal tedavinin erkenden başlanmasına olanak sağlayarak, gereksiz antifungal kullanımını ortadan kaldırabilir.⁸⁹

2.8.5.4. MALDI-TOF-MS

MALDI-TOF MS'de örnek metal bir plak üzerine damlatılır, üzerine bir matriks solüsyonu konur ve havada kurutulur. MS aygıtı içine yerleştirilip lazer ışınları ile vuruşlar yapıldıktan sonra, matriks ışığı emerek hedef molekül (DNA veya proteinler) haline dönüştürür. Tek yükü olan yalnızca tek bir iyonize tür edildikten sonra elektrik veya manyetik alandan geçirilerek protein profilleri çıkarılarak birçok maya türünden elde edilen geniş bir protein veri tabanıyla karşılaştırılır.^{86,90} Pozitif kan kültürü

şişesinden direkt yapılabilir ve sonuçlar 30 dakika gibi kısa bir sürede okunabilir. Yapılan çalışmalar mayaların tanımlanmasında MALDI-TOF MS'in başarı oranını %85-100 arasında göstermektedir.⁸⁶ Ayrıca bu yöntemde mantar türleri ve antifungal duyarlılıkları da belirlenebilmektedir. *C. auris* geleneksel biyokimyasal yöntemleriyle yanlışlıkla başka bir maya (*C. haemulonii*, *C. famata*, *C. sake*, *C. catenulata*, *Rhodotorula glutinis* ve *Saccharomyces cerevisiae*) olarak tanımlanabileceğinden tanımlama için özel yöntemler gerektirir.⁵¹ Çok ilaca dirençli ve geniş çaplı salgınlara neden olan *C. auris*'in doğru tanımlanması MALDI-TOF MS ile yapılmaktadır.^{86,91}

2.8.5.5. PNA-FISH YTL (Yeast Traffic Light)

“Yeast Traffic Light PNA-FISH” pozitif kan kültürlerinden 5 *Candida* türünün (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* ve *C. tropicalis*) hızlı bir şekilde tanımlanması için FDA tarafından onaylanan yeni nesil flöresan işaretli üç problu bir hibridizasyon sistemidir.⁹² Klinik örneklerdeki mayaların genomları üzerindeki hedef bölgelerin tanımlanması için floresan mikroskobu altında floresan probları kullanılarak yapılan tekniktir. Yaklaşık 90 dakika içerisinde *Candida* türleri ayırt edilebilmektedir. Yapılan çalışmada duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla % 99 ve % 98 olarak bildirilmiştir.⁹³

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Düzeni

Projemizde, İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa (İÜC), Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (CTF) hastanesi YBÜ'lerinde (Sadi Sun Yoğun Bakım Ünitesi (SSYBÜ), Acil Yoğun Bakım Ünitesi (AYBÜ), Kalp Damar Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi (KDCYBÜ), Nöroşirurji Yoğun Bakım Ünitesi (NRŞYBÜ)) gelişen kandidemilerin klinik ve moleküler yöntemlerle erken ve hızlı tanı konarak, uygun tedavinin en kısa sürede başlanmasını sağlamak amaçlı yeni bir yöntem geliştirilmesi hedeflendi. Kandidemi riski yüksek olan hastalarda tam kandan çalışılabilen moleküler bir yöntem olan *Candida* PCR testinin pratikte uygulanılabilirliği sorgulandı. Kandidemi şüpheli hastaların hızlı bir şekilde tanısının konulması, özgün risk faktörlerinin belirlenerek özgün CTF *Candida* skorunun oluşturulması, etkin tedavinin hızlı bir şekilde başlanarak mortalite ve morbiditenin azaltılması amaçlandı. Bu çalışmada YBÜ'lerinde takip edilen kandidemi riski yüksek olan hastalarda kan kültürü ile tam kandan çalışılabilen moleküler bir yöntem olan *Candida*'ya özgü gen bölgelerini hedefleyen tekli Eva-Green tabanlı real time PCR testi araştırıldı. Çalışmamız İÜC Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından kabul edilmiş ve maddi olarak desteklenmiştir.

Çalışma üç aşamalı olarak planlanmıştır:

- 1- YBÜ'de saptanan kandidemi olgularında risk faktörleri tanımlaması (Retrospektif Vaka-Kontrol çalışması)
- 2- Vaka Kontrol çalışması verileri ile CTF *Candida* skor formu oluşturulması ve bu formun klinik etkinliğinin araştırılması (Prospektif kesitsel çalışma)
- 3- Tam kan örneklerinde PCR tabanlı bir hızlı tanı testi oluşturulması (Deneysel çalışma)

İlk aşamada Ocak 2017- Aralık 2018 yılları arasında CTF YBÜ'de takip edilen nötropenik olmayan 50 kandidemi olgusu ve 50 kontrol grubu olmak üzere toplamda 100 hasta dosyası retrospektif olarak incelendi. Nötropenik ve 18 yaş altı hasta grubu çalışmaya alınmadı. Hastalar aşağıdaki risk faktörlerinin varlığı açısından sorgulandı;

– Son üç ayda hastaneye yatış öyküsü,

- Bir haftadan uzun süreli antibiyoterapi alması,
- İmmünesupresif ilaç kullanımı,
- Malignite,
- Sepsis kliniğinin olması,
- İntraabdominal infeksiyon öyküsü olması,
- İki ve daha fazla bölgede *Candida* kolonizasyonu olması,
- YBÜ kalış süresinin uzaması,
- CRP ve Prokalsitonin düzeyi,
- TPN ile beslenmesi,
- Mekanik ventilasyon ile takip edilmesi,
- Açık dekübit yarasının olması,
- Transplantasyon öyküsünün olması,
- ABH olması,
- SVK olması,
- Major cerrahi operasyon öyküsü olması

Hastaların komorbid hastalıkları (Hipertansiyon (HT), Diabetes Mellitus (DM), kalp hastalığı, böbrek hastalığı, akciğer hastalığı, karaciğer hastalığı, transplantasyon öyküsü, geçirilmiş cerrahi öyküsü, kanser öyküsü) sorgulandı ve bilgileri kaydedildi.

İmmünesupresif ilaç kullanımı, bir haftadan uzun süreli antibiyotik kullanımı, TPN ile beslenme, SVK, üriner kateterizasyon, dekübit veya açık yara varlığı, eşlik eden infeksiyonları, hastanede yatış öyküsü, kullandığı antibiyotikler, mekanik ventilasyon ile takip varlığı açısından değerlendirildi ve bilgileri kaydedildi.

Sağlık bakımı ile ilişkili infeksiyonların tanımlanmasında Centers for Disease Control and Prevention (CDC) kriterleri kullanıldı. Her hastanın '*Candida* skoru',

qSOFA ve SOFA skoru hesaplandı. SOFA skoru ortalama arteriyel basınç, PaO₂/FIO₂, bilirubin, kreatinin, trombosit düzeyi, Glasgow Koma Skoru (GKS) değerleri puanlanarak elde edildi.²

3.2. Risk faktörlerinin belirlenmesi ve özgün *Candida* skorunun oluşturulması

Projemizin ikinci aşamasında iki grup (vaka-kontrol) arasında karşılaştırma yapılarak *Candida* risk faktörleri belirlendi. Bu karşılaştırma sonucu ortaya çıkan çok değişkenli indirgenmiş modelde saptanan '*Candida* skoru', son üç ay içinde hastane yatışı ve ABH gelişmesi kriterleri dışında klinikte çok sık gözlemlediğimiz intraabdominal infeksiyon varlığı ve >7 gün antibiyotik kullanımı gibi risk faktörleri kullanılarak hastanemize özgü bir skorlama sistemi (CTF *Candida* Skoru) oluşturuldu. Hastanemize özgü bu skorlama sistemi YBÜ vizitlerinde prospektif olarak kullanıldı. 1 Aralık 2020 tarihi ile 10 Ocak 2021 tarihleri arasında YBÜ'nde 72 saattan daha uzun süre yatan toplamda 75 hasta prospektif çalışmaya dahil edildi. Yatışlarından sonra 72. saatte ve günlük olarak izlenerek formlar dolduruldu. Hastalar YBÜ'nden çıkana kadar ya da kandidemi gelişen hastalarda kandidemi gününe kadar izlemde kaldılar. Aşağıda oluşturduğumuz form ile YBÜ'ne yatırılan tüm hastalar günlük olarak izlendi ve *Candida* risk skoru açısından puanlama yapıldı. Kandidemi gelişen olgularda kandidemi gelişen günkü, diğer hastalardaysa takip sırasında saptanan en yüksek skor değerlendirilmedi dikkate alındı.

CTF *Candida* SKORU FORMU

	1.gün	2.gün	3.gün	...		
<i>Candida</i> skoru 3 ve üstü						
İntraabdominal infeksiyon						
ABH ve /veya CRRT/HD						
>7 gün antibiyotik kullanımı						
Son üç ayda hastane yatış öyküsü						
TOPLAM SKOR						

'*Candida* skoru'; modifiye edilerek kullanıldı. Multifokal *Candida* kolonizasyonu yerine kan dışı herhangi bir örnekte *Candida* üremesi saptanması 1 puan olarak yorumlandı. Diğer skorlar tanımlandığı şekliyle alındı: Ağır sepsis: 2 puan, Cerrahi girişim: 1 puan, TPN uygulanması: 1 puan.

Akut böbrek hasarı (ABH): 2012 yılı KDIGO (The Kidney Disease: Improving Global Outcomes) kriterleri ile tanımlanarak belirlendi.

3.3. Mikrobiyolojik Teknikler – PCR testinin geliştirilmesi

Son olarak da deneysel modelleme ile tam kanda *Candida* DNA varlığı ITS, D1/D2, EF1a ve Tubulin gen bölgelerini hedefleyen tekli Eva-Green tabanlı real time PCR testi ile araştırıldı ve saptama sınırı belirlendi. PCR çalışmaları İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi.

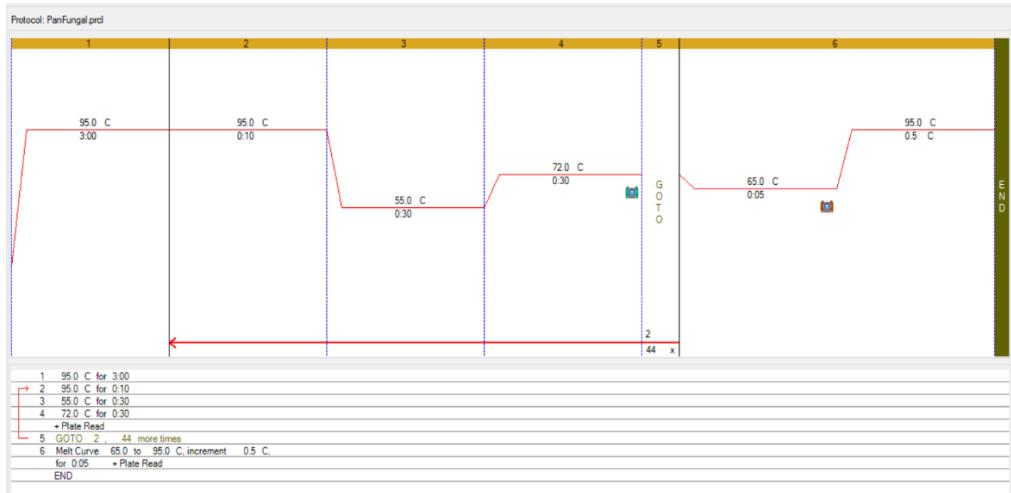
Kan kültüründen üretilmiş, konvansiyonel yöntemler (germ tüp, Chrom-agar, mısır unlu jeloz, API 20C testleri) ile tanımlanmış ve MALDI-TOF MS ile tanısı doğrulanmış *C. albicans* ve *C. parapsilosis* izolatı çalışmaya alındı. *C. albicans* ve *C. parapsilosis*'in SDA besiyerindeki 24 saatlik pasajlarından hazırlanan SF içindeki 1 McFarland yoğunluğundaki asıntıları yapılarak, 1/10 seri dilüsyonları hazırlandı, Thoma lamında hücre sayımları yapıldı. Sayımlar sonucunda *C. albicans* ve *C. parapsilosis*'in sırası ile 10.000, 1000, 100 ve 10 hücresi sayılan asıntıları alındı, EDTA'lı kan örneği ile 1/10 oranında karıştırılarak ml'de sırası ile 1000, 100, 10 ve 1 hücre içeren standard kan örnekleri hazırlandı.

Kan örnekleri sonrasında 1'e 3 oranında Eritrosit yıkım tamponu ile (Qiagen, Almanya) karıştırıldı, oda ısısında 5 dakika hafif çalkalanarak eritrosit hücreleri parçalandı, 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü ve altta kalan hücreler 1 ml DNaz RNAz içermeyen su ile yıkandı ve tekrar 14.000 rpm'de 2 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Çöküntü üstüne 400 µl resüpsansiyon buffer eklenerek ekstraksiyona alındı. Ekstraksiyon için ticari kit (Ribospin, Almanya) kullanıldı, lizis tüpüne alınan örnekler 65 °C'de 15 dakikalık inkübasyon ve sonrasında 90 °C'de 10 dakikalık lizis aşamasından sonra ve üretici talimatları doğrultusunda ekstraksiyon

gerçekleştirildi. Ekstratlarda *Candida* DNA varlığı ITS, D1/D2, EF1a ve Tubulin gen bölgelerini hedefleyen tekli Eva-Green tabanlı real time PCR testi araştırıldı.

Tablo 1. Real Time PCR için hazırlanan karışım

Bileşen	Miktar (µl)
Eva Green PCR Mastermix	10
Primer F (10 pM)	2,5
Primer R (10 pM)	2,5
Örnek Nükleik Asit	5
Toplam Hacim	20



Şekil 6. Real Time PCR protokol

3.3.1. Real Time *Candida* PCR için primer çiftlerinin seçimi

Real Time PCR ile çoğaltma işlemi için tablo 1’de verilen primerler çiftleri için ayrı ayrı PCR testleri oluşturuldu ve tablo 2’de verilen real time PCR karışımı hazırlanarak testler gerçekleştirildi.^{11, 14, 15, 17, 82}

Tablo 2. Real Time PCR ile çoğaltma işlemi için kullanılan primer çiftleri

Primer	Dizi	Tm (°C)
ITS1F ITS4R	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA TCCTCCGCTTATTGATATGC	60
NL1 NL4	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG GGTCCGTGTTCAAGACGG	65
EF1a-F EF1a-R	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG AACTTGCAAGCAATGTGG	60
bTUB-F bTUB-R	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTC ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC	65

3.3.2. Erime eğrisi analizi

RealTime PCR için BioRad CFX 96 cihazı (BioRad, Almanya) kullanıldı. Uygulanan ısı döngüsü (resim 6'da sunulmuştur) ile çoğaltma işlemleri gerçekleştirildi. Çoğaltma sonrası oluşan ampliconlar erime eğrisi analizi ile de test edildi. ITS ve D1/D2 bölgesine ait amplifikasyon ve erime eğrisi özgünlüğü araştırıldı.

3.4. İstatistiksel analiz

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan en düşük, en yüksek, frekans ve oran değerleri kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı kolmogorov simirnov test ile ölçüldü. Nicel bağımsız verilerin analizinde bağımsız örneklem t test, mann-whitney u test kullanıldı. Nitel bağımsız verilerin analizinde ki-kare test, ki-kare test koşulları sağlanmadığında fischer test kullanıldı. Etki düzeyi tek değişkenli ve çok değişkenli lojistik regresyon ile araştırıldı. Analizlerde SPSS 26.0 programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Ocak 2017- Aralık 2018 yılları arasında retrospektif olarak çalışmaya alınan 100 hastanın 70'i (% 70) SSBÜ, 22'i (% 22) AYBÜ'nde değerlendirilmiştir. Çalışmaya alınan hastaların temel özellikleri tablo 3'te gösterilmiştir.

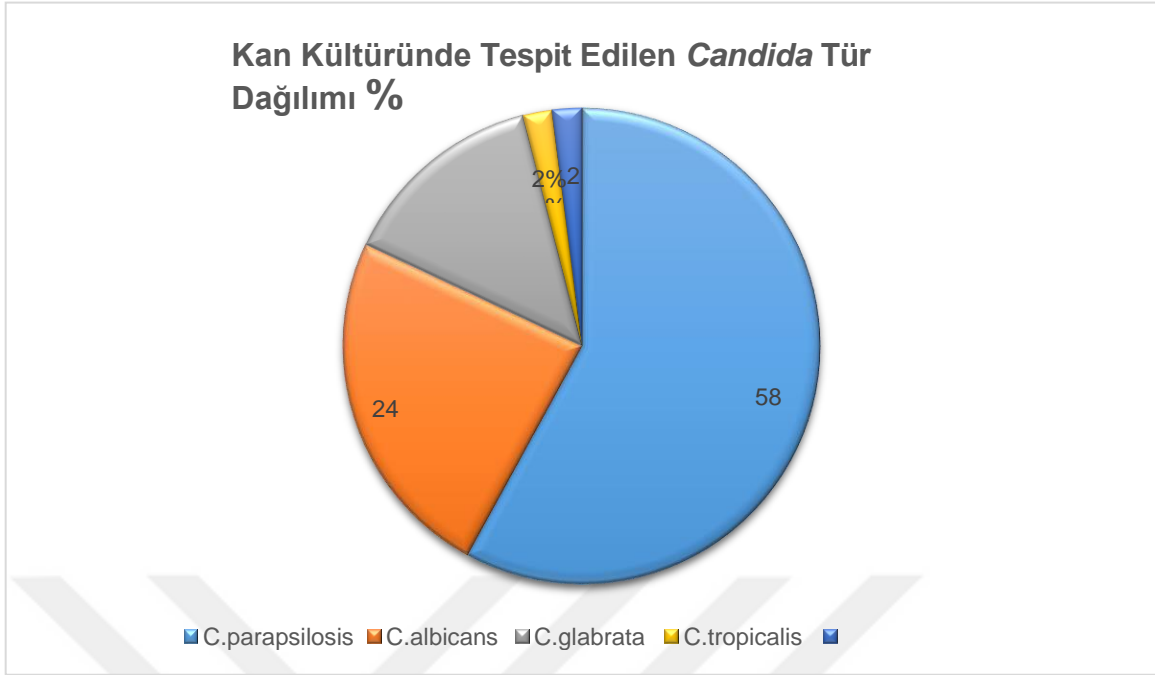
Tablo 3. Retrospektif Çalışmaya Alınan Hastaların Temel Özellikleri

YAŞ	63 (19-96)
Cinsiyet (K/E)	45/55
YATILAN Birim	70
SSBÜ	22
AYBÜ	8
KDCYBÜ	
Mortalite	70 (% 70)

1 Aralık 2020 tarihi ile 10 Ocak 2021 tarihleri arasında 72 saatten daha uzun süre YBÜ'nde yatarak prospektif olarak izlenen 75 olgunun temel özellikleri tablo 4'te belirtilmiştir.

Tablo 4. Prospektif Çalışmaya Alınan Hastaların Temel Özellikleri

YAŞ	67,8 (35-97)
Cinsiyet (K/E)	27/48
YATILAN Birim	
SSBÜ	53
AYBÜ	11
Ü	11
NŞYBÜ	
Mortalite	43 (% 57,3)
Takip süresi	9.1 gün (4-37)



Şekil 7. Kan Kültüründe tespit edilen *Candida* tür dağılımı %

Elli Kandidemi olgusunda 49 hastada (% 98) sepsis, 48 hastada (% 96) son üç ay içerisinde hastanede yatış öyküsü, 48 hastada (% 96) bir haftadan uzun süren antibiyotik kullanım öyküsü, 31 hastada (% 62) major cerrahi operasyon, 29 hasta (%58) TPN ile beslenme ve 23 hastada (%46) intraabdominal enfeksiyon vardı. Infekte olan hastaların dağılımı şekil 7’de gösterilmiştir.



Şekil 8. İnfekte olan hastaların dağılımı %

Vaka ve kontrol grubunda hastaların yaşları, cinsiyet dağılımı anlamlı ($p > 0,05$) farklılık göstermemiştir. Vaka grubunda CRP ve Prokalsitonin değeri kontrol grubundan anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha yüksekti. Vaka ve kontrol grubunda ateş, immunsupresif ilaç kullanım oranı, malignite oranı anlamlı ($p > 0,05$) farklılık göstermemiştir. Vaka grubunda sepsis ve son üç ay içerisinde hastaneye yatış oranı kontrol grubundan anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha yüksekti. Vaka ve kontrol grubunda dekübit, açık yara oranı, Ventilatör ilişkili Pnömoni (VIP) oranı, Üriner Sistem enfeksiyon (ÜSİ) oranı, TPN oranı, majör cerrahi operasyon oranı, transplantasyon oranı, mekanik ventilasyon oranı anlamlı ($p > 0,05$) farklılık göstermemiştir. Vaka grubunda bir haftadan uzun süre antibiyotik kullanım oranı kontrol grubundan anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha yüksekti. Vaka ve kontrol grubunda HT, DM, akciğer hastalığı, kalp hastalığı, kronik böbrek yetmezliği, kronik karaciğer hastalığı oranı anlamlı ($p > 0,05$) farklılık göstermemiştir. Vaka grubunda ABH oranı kontrol grubundan anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha yüksekti. Vaka ve kontrol grubunda H2 reseptör blökorü kullanım oranı, nazogastrik tüp oranı, toraks tüp oranı, batın dren oranı, nefrostomi oranı, intraaortik balon oranı, mekanik ventilasyon oranı, üriner kateter oranı, kolostomi oranı, nefrostomi oranı, trakeostomi oranı, sistofiks oranı, anlamlı ($p > 0,05$) farklılık göstermemiştir. Vaka grubunda perikard tüp oranı, SVK oranı, kolonizasyon oranı, PEG oranı kontrol grubundan anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha yüksekti. Vaka grubunda periferik venöz kateter oranı, periferik arteriyel kateter oranı, CRRT (continuous renal replacement therapy) oranı kontrol grubundan anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha düşüktü. Vaka ve kontrol grubunda YBÜ kalış süresi anlamlı ($p > 0,05$) farklılık göstermemiştir. Vaka grubunda ölüm oranı kontrol grubundan anlamlı ($p < 0,05$) olarak daha yüksekti (Tablo 6).

Tablo 5. Yoğun bakım ünitesinde retrospektif olarak izlenen hastaların demografik ve klinik özellikleri

	Min-Mak	Medyan	Ort.±ss. /n-%	
Yaş	19,0 - 96,0	63,0	60,7 ± 16,5	
Cinsiyet	Kadın		45	45,0%
	Erkek		55	55,0%
SOFA	0,0 - 19,0	10,0	9,2 ± 4,3	
qSOFA	0,0 - 3,0	3,0	2,4 ± 0,7	
<i>Candida</i> skoru	0,0 - 5,0	3,0	3,1 ± 1,4	
CRP	12,0 - 417,0	165,0	176,6 ± 98,8	
Prokalsitonin	0,0 - 449,0	0,0	13,1 ± 48,2	
Ateş	35,0 - 39,5	37,0	37,0 ± 1,4	
<i>Candida</i>	<i>C. parapsilosis</i>		29	29,0%
	<i>C. albicans</i>		12	12,0%
	<i>C. glabrata</i>		7	7,0%
	<i>C. tropicalis</i>		1	1,0%
	<i>C. guilliermondii</i>		1	1,0%
Mekanik Ventilasyon			91	91,0%
Sepsis			88	88,0%
1 haftadan uzun süren antibiyotik kullanımı			84	84,0%
Son 3 ay içerisinde hastaneye yatış öyküsü			78	78,0%
Major cerrahi operasyon			58	58,0%
Total parenteral nutrisyon			52	52,0%
Malignite			37	37,0%
Dekübit açık yara			37	37,0%
İmmünesupresif ilaç kullanımı			30	30,0%
İntraabdominal infeksiyon			30	30,0%
Üriner sistem infeksiyonu			7	7,0%
Ventilatör ilişkili pnömoni			5	5,0%
Transplantasyon			2	2,0%
<i>Komorbidite</i>				
Akut böbrek hasarı			46	46,0%
Hipertansiyon			35	35,0%
Kalp hastalığı			32	32,0%
Akciğer hastalığı			24	24,0%
Diabetes mellitus			23	23,0%
Kronik böbrek yetmezliği			16	16,0%
Kronik karaciğer hastalığı			3	3,0%

Tablo 6. Vaka ve kontrol gruplarına göre risk faktörleri

	Kontrol Grubu		Vaka Grubu		P
	Ort.±ss. /n-%	Medyan	Ort.±ss. /n-%	Medyan	
Yaş	60,0 ± 15,2	62,5	61,4 ± 17,9	64,0	0,436 ^m
Cinsiyet	Kadın	22 44,0%		23 46,0%	0,841 ^{X²}
	Erkek	28 56,0%		27 54,0%	
SOFA	9,5 ± 4,7	10,5	9,0 ± 4,0	10,0	0,478 ^m
qSOFA	2,2 ± 0,7	2,0	2,6 ± 0,7	3,0	0,007 ^m
<i>Candida</i> skoru	2,2 ± 1,3	2,0	3,9 ± 1,0	4,0	0,000 ^m
CRP	151,4 ± 99,5	145,3	201,9 ± 92,2	176,0	0,010 ^t
Prokalsitonin	4,4 ± 15,3	0,0	21,9 ± 65,5	0,9	0,025 ^m
Ateş	36,9 ± 1,2	36,0	37,0 ± 1,7	38,0	0,935 ^m
İmmünespresif ilaç kullanımı	11 22,0%		19 38,0%		0,081 ^{X²}
Malignite	15 30,0%		22 44,0%		0,147 ^{X²}
Sepsis	39 78,0%		49 98,0%		0,002 ^{X²}
Son 3 ay hastaneye yatış öyküsü	30 60,0%		48 96,0%		0,000 ^{X²}
Dekübit açık yara	23 46,0%		14 28,0%		0,062 ^{X²}
Ventilatör ilişkili pnömoni	2 4,0%		3 6,0%		0,646 ^{X²}
Üriner sistem infeksiyonu	4 8,0%		3 6,0%		0,695 ^{X²}
İntraabdominal infeksiyon	7 14,0%		23 46,0%		0,000 ^{X²}
Total parenteral nutrisyon	23 46,0%		29 58,0%		0,230 ^{X²}
Majör cerrahi operasyon	27 54,0%		31 62,0%		0,418 ^{X²}
Transplantasyon	2 4,0%		0 0,0%		0,495 ^{X²}
1 haftadan uzun süren antibiyotik kullanımı	36 72,0%		48 96,0%		0,001 ^{X²}
Mekanik ventilasyon	44 88,0%		47 94,0%		0,295 ^{X²}
<i>Komorbidite</i>					
Hipertansiyon	19 38,0%		16 32,0%		0,529 ^{X²}
Diabetes mellitus	11 22,0%		12 24,0%		0,812 ^{X²}
Akciğer hastalığı	8 16,0%		16 32,0%		0,061 ^{X²}
Kalp hastalığı	13 26,0%		19 38,0%		0,198 ^{X²}
Akut böbrek hasarı	15 30,0%		31 62,0%		0,001 ^{X²}
Kronik böbrek yetmezliği	10 20,0%		6 12,0%		0,275 ^{X²}
Kronik karaciğer hastalığı	2 4,0%		1 2,0%		1,000 ^{X²}

Tablo 6 devamı

	0	0,0%	2	4,0%	0,495	X ²
H2 reseptör blokörü						
Nazogastrik tüp	36	72,0%	35	70,0%	0,826	X ²
Toraks tüpü	12	24,0%	20	40,0%	0,086	X ²
Batın dreni	15	30,0%	22	44,0%	0,147	X ²
Nefrostomi	2	4,0%	1	2,0%	1,000	X ²
Perikard tüpü	0	0,0%	4	8,0%	0,041	X ²
İntraaortik balon pompası	0	0,0%	1	2,0%	1,000	X ²
Periferik venöz kateter	50	100,0%	13	26,0%	0,000	X ²
Periferik arteriyel kateter	37	74,0%	23	46,0%	0,004	X ²
Mekanik ventilasyon	43	86,0%	45	90,0%	0,538	X ²
Üriner kateter	48	96,0%	50	100,0%	0,495	X ²
Santral venöz katater	39	78,0%	50	100,0%	0,000	X ²
Kolonizasyon	5	10,0%	45	90,0%	0,000	X ²
Perkütan endoskopik gastrostomi	2	4,0%	8	16,0%	0,046	X ²
Kolostomi	7	14,0%	14	28,0%	0,086	X ²
Nefrostomi	2	4,0%	1	2,0%	1,000	X ²
Trakeostomi	8	16,0%	15	30,0%	0,096	X ²
Sistofiks	1	2,0%	2	4,0%	1,000	X ²
CRRT	27	54,0%	7	14,0%	0,000	X ²
Yoğun bakım ünitesinde kalış süresi	22,2 ± 19,0	17,5	29,4 ± 27,1	17,5	0,145	m
Exitus	28	56,0%	42	84,0%	0,002	X ²

^m Mann-whitney u test / ^t Bağımsız örneklem t test/ ^{X²} Ki-kare test(Fischer test)

Tek değişkenli modelde vaka ve kontrol grubun ayrımında qSOFA, ‘*Candida* skoru’, CRP, Prokalsitonin, sepsis, son üç ay içinde hastaneye yatış, intraabdominal infeksiyon öyküsü, bir haftadan uzun süren antibiyotik kullanımı, ABH, periferik venöz kateter, kolonizasyon, PEG, CRRT’nin anlamlı ($p < 0,05$) etkinliği gözlenmiştir (Tablo 7).

Çok değişkenli indirgenmiş modelde vaka ve kontrol grubun ayrımında ‘*Candida* skoru’, son üç ay içinde hastaneye yatış, ABH’nın anlamlı ($p < 0,05$) bağımsız etkinliği gözlenmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Tek ve çok değişkenli indirgenmiş modelde bağımsız risk faktörleri

	Tek Değişkenli Model			Çok Değişkenli Model		
	OR	% 95 CI	p	OR	% 95 CI	p
qSOFA	2,09	1,15 - 3,81	0,01			
<i>Candida</i> skoru	3,37	2,10 - 5,40	0,00	9,50	3,33 - 27,0	0,000
CRP	1,01	1,00 - 1,01	0,01			
Prokalsitonin	1,03	1,00 - 1,06	0,04			
Sepsis	13,8	1,71 - 111,72	0,01			
Son 3 ay hastaneye yatış öyküsü	16,0	3,49 - 73,41	0,00	13,0	2,10 - 81,2	0,006
İntraabdominal infeksiyon	5,23	1,98 - 13,85	0,00			
1 haftadan uzun süren antibiyotik kullanımı	9,33	1,99 - 43,68	0,00			
Akut böbrek hasarı	0,26	0,11 - 0,60	0,00	0,10	0,02 - 0,50	0,005
Periferik venöz kateter	0,30	0,13 - 0,69	0,00	0,04	0,01 - 0,24	0,001
Kolonizasyon	81,0	21,93 - 299,19	0,00			
Perkütan endoskopik gastrotomi	4,57	0,92 - 22,73	0,06			
CRRT	0,14	0,05 - 0,37	0,00			

Logistic Regression (Forward LR)

Yoğun Bakım Üniteleri'nde kandidemi olguları ile ortaya çıkan çok-değişkenli modelde saptanan (Tablo 7). '*Candida* skoru', son üç ay içinde hastane yatışı ve ABH gelişmesi kriterleri dışında, klinikte çok sık gözlemediğimiz intraabdominal infeksiyon varlığı ve >7 gün antibiyotik kullanımı gibi risk faktörleri kullanılarak hastanemize özgü bir skora sistemi oluşturuldu. '*Candida* skoru'; modifiye edilerek kullanıldı. Multifokal *Candida* kolonizasyonu yerine kan dışı herhangi bir örnekte *Candida* üremesi saptanması 1 puan olarak yorumlandı. Diğer skorlar tanımlandığı şekliyle alındı: Ağır sepsis: 2 puan, Cerrahi girişim: 1 puan, TPN uygulanması: 1 puan. '*Candida* skoru' ve kandidemi saptanan olguların sayısı tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. CTF *Candida* Skoru ve kandidemi saptanan olguların sayısı

CTF <i>Candida</i> skoru	Kandidemi / Toplam sayı
0	0/10
1	0/17
2	0/20
3	1/20
4	3/7
5	0/1
Toplam	4/75

Prospektif izlemde CTF *Candida* skoru <3 puan ile İK saptanmadı. Dört puan ve üzerinin kandidemi yönünden anlamlı bir risk belirleyebileceği düşünüldü. CTF *Candida* skoru ile kandidemi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (Fisher's Exact $p < 0,05$). CTF *Candida* skoru 4 ve üzeri olanlarda kandidemi olma riskinin 40,2 kat daha fazla olduğu istatistiksel olarak gösterildi. Oluşturduğumuz CTF *Candida* skoru sisteminde >4 puan için duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %75 ve %93 olarak belirlendi (Tablo 9).

Tablo 9. CTF *Candida* skoru 4 ve üzeri olan yoğun bakım hastalarında kandidemi riski

CTF <i>Candida</i> skoru	Kandidemi Yok	Kandidemi Var	p	OR (%95 CI)	Duyarlılık (%95 CI)	Özgüllük (%95 CI)
	N (%)	N (%)				
<4	66 (93,0)	1 (25,0)	0,003	40,2 (3,5-460,7)	75,0 (19,4-99,4)	93,06 (84,5-97,7)
>4	5 (7,0)	3 (75,0)				

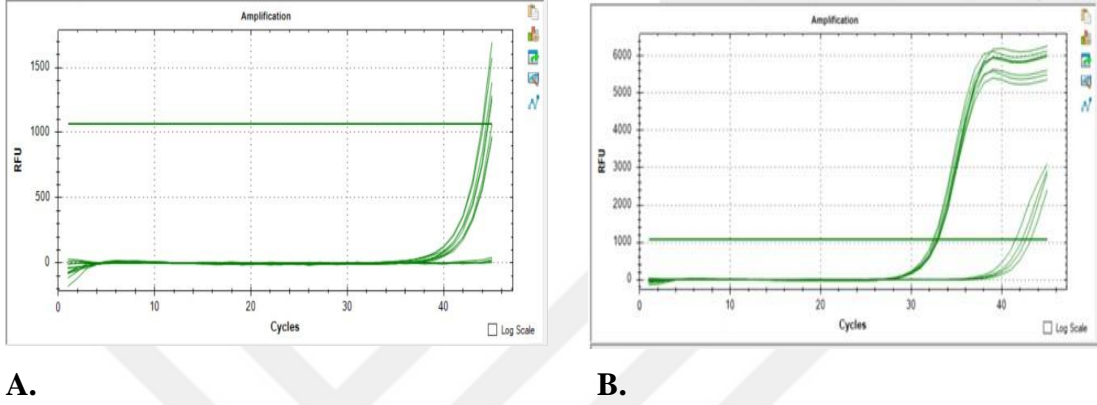
CTF *Candida* skoru 4 puan ve üzeri için negatif prediktif değer (NPD): %98,53, pozitif prediktif değer (PPV): %37,5 olarak bulundu (Tablo 10).

Tablo 10. CTF *Candida* skoru Duyarlılık, Özgüllük, Pozitif ve Negatif Prediktif Değerleri

CTF <i>Candida</i> skoru	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)
≥4	75,0	93,06	37,5	98,53

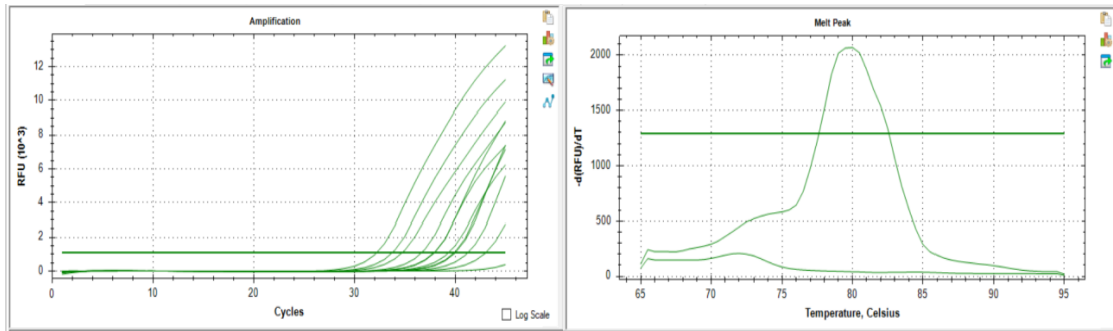
PCR testi sonuçları,

Real Time PCR amplifikasyon eğrileri incelendiğinde Tubulin ve EF1a gen bölgelerine ait eğrilerin non spesifik ve yeterli olmayan amplifikasyonlar nedeni ile çalışmaya uygun olmadığı ve daha ileri optimizasyonlar gerektirdiği görüldü. Şekil 9’da Tubulin ve EF1a’ya ait amplifikasyon eğrileri sunulmuştur.



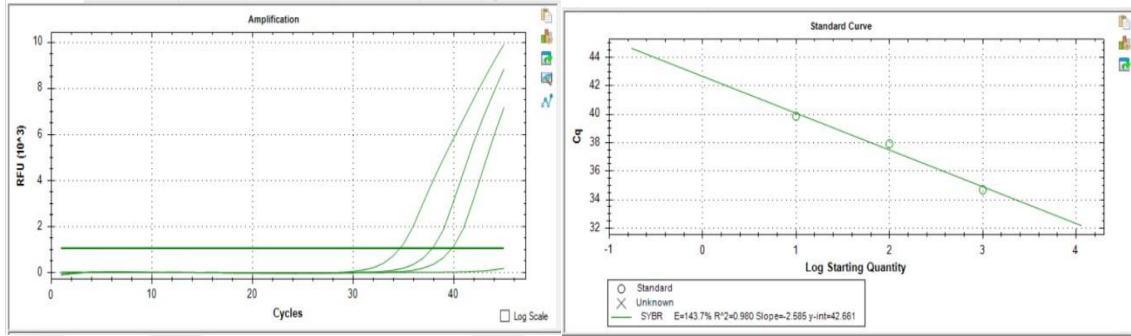
Şekil 9. A. Tubulin, B. EF1a gen bölgelerine ait nonspesifik ve yeterli olmayan amplifikasyon eğrileri

ITS bölgesini kapsayan primerler ile 1000, 100 ve 10 *Candida* hücrelerini içeren kanlarda pozitif amplifikasyon saptanırken 1 *Candida* hücrelerini içeren kanda amplifikasyon saptanmadı, bu nedenle testin saptama sınırı 10 hücre/ml olarak belirlendi. Ayrıca yapılan erime eğrisi analizi ile oluşan amplikonun özgünlüğü gösterildi (Şekil 10).

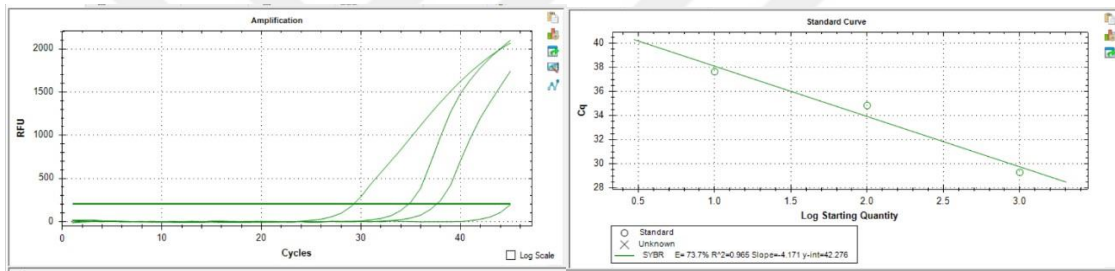


Şekil 10. ITS bölgesine ait amplifikasyon ve erime eğrisi analizi

Kantitatif olarak çizilen standard eğrinin eğimi *C. albicans* için -2,585, uyumu 0,960 ve kesim noktası 42,661, *C. parapsilosis* için -4,171, uyumu 0,965 ve kesim noktası 42,276 olarak bulundu. Şekil 11’de 1000, 100, 10 ve 1 *Candida* hücresi içeren örneklere ait amplifikasyon eğrileri ile standard eğri sunulmuştur.



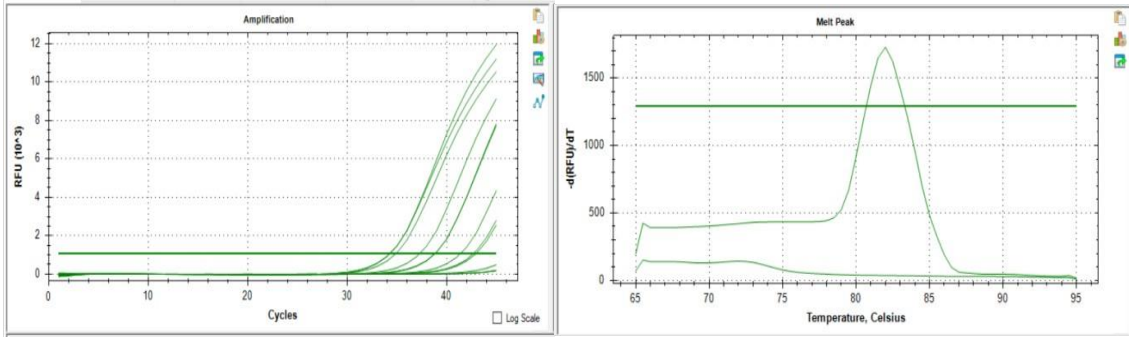
A.



B.

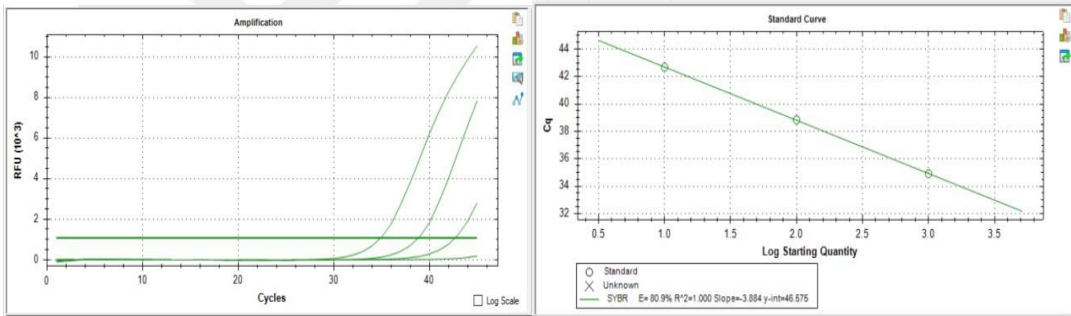
Şekil 11. ITS’ye ait 1000, 100, 10 ve 1 *Candida* hücresi içeren örneklere ait amplifikasyon eğrileri ile standard eğri A. *C. albicans* B. *C. parapsilosis*

D1/D2 bölgesini kapsayan primerler ile 1000, 100 ve 10 *Candida* hücresini içeren kanlarda pozitif amplifikasyon saptanırken 1 *Candida* hücresini içeren kanda amplifikasyon saptanmadı, bu nedenle testin saptama sınırı 10 hücre/ml olarak belirlendi. Ayrıca yapılan erime eğrisi analizi ile oluşan amplikonun özgünlüğü gösterildi (Şekil 12).

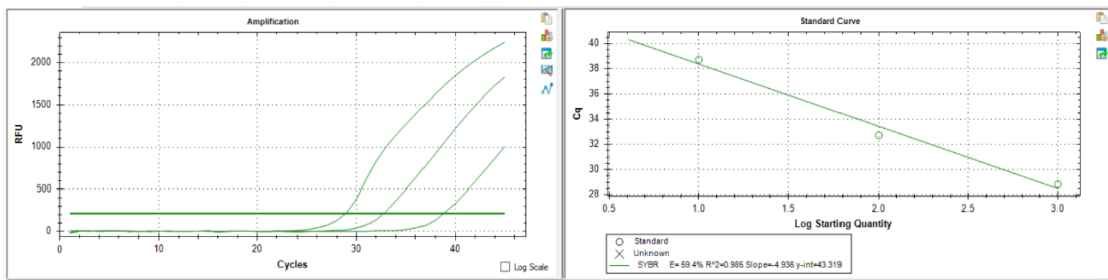


Şekil 12. D1/D2 bölgesine ait amplifikasyon ve erime eğrisi analizi

Kantitatif olarak çizilen standard eğrinin eğimi $-3,884$, uyumu $1,000$ ve kesim noktası $46,575$ *C. parapsilosis* için $-4,936$, uyumu $0,986$ ve kesim noktası $43,319$ olarak bulundu. Şekil 13'te 1000 , 100 , 10 ve 1 *Candida* hücresi içeren örneklere ait amplifikasyon eğrileri ile standard eğri sunulmuştur.



A.



B.

Şekil 13. D1/D2'ye ait 1000 , 100 , 10 ve 1 *Candida* hücresi içeren örneklere ait amplifikasyon eğrileri ile standard eğri A. *C. albicans* B. *C. parapsilosis*

5. TARTIŞMA

Kandidemi, YBÜ'lerinde karşımıza çıkmaya devam eden ciddi bir klinik durumdur. Yoğun bakım hastalarının büyük bir kısmı *Candida* türleri ile kolonize olmakta ve yaklaşık üçte birinde kandidemi gelişmektedir. Progresif kolonizasyon ve majör abdominal cerrahi, *Candida* infeksiyonu için iyi bilinen risk faktörleridir.⁹⁴ Kandidemiyi tahmin etmek zordur ve erken teşhis önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Ek olarak, mikrobiyolojik dokümantasyon genellikle infeksiyon seyrinin geç dönemlerinde ortaya çıkar. Hem tanı, hem de uygun ve etkin tedaviyi başlamadaki gecikmeler, artan mortalite ile ilişkilendirilmiştir. Kandidemi, özellikle YBÜ'lerinde yatan hastalarda önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olmaya devam etmektedir. Diğer taraftan, kandidemi hastanede kalış süresinin aylarca uzamasına ve milyonlarca dolar ek maliyete yol açabilmektedir.⁹⁵

Mikrobiyolojik olarak dökümente edilmemiş İK hastalarında *Candida* ile ilişkili mortaliteyi azaltmaya yönelik başlanan empirik sistemik antifungal tedavi bu ilaçların aşırı kullanım endişesine yol açmaktadır. Bu nedenle erken antifungal tedaviden fayda görebilecek yüksek riskli İK hastalarına tanı konulmasında yatak başı skorlamaya sistemleri veya erken tanı testleri yardımcı olabilmektedir. Ancak bu tür testlerin negatif prediktif değeri pozitif prediktif değerinden daha yüksektir. Mannan, anti-mannan, (1,3)-b-D-glukan ve özellikle polimeraz zincir reaksiyonu gibi İK biyobelirteçleri erken tanı ve tedaviyi sağlamak için giderek klinikte daha fazla kullanılmaktadır.⁹⁴

İnvaziv *Candida* infeksiyonlarının en sık etkeni *C. albicans*'tır ancak son yıllarda non-*albicans Candida* türleri tarafından oluşturulan infeksiyonların sıklığında artış olmuştur.⁴⁴ Amerika Birleşik Devletleri'nde 2004-2008 yılları arasında yürütülen çok merkezli bir sürveyans çalışmasında, kandidemi gelişen 2019 hastanın %54'ü *albicans* dışı *Candida* türlerini ve %46'sı *C. albicans*'ı temsil ediyordu. *C. glabrata* tüm kandidemi vakalarının %26'sından, *C. parapsilosis* %16, *C. tropicalis* %8 ve *C. krusei* %3'ünden sorumluydu.⁴⁵ Diğer çalışmalarda, her türün insidansı, farklı hasta popülasyonları ve coğrafi bölgelerde değişiklik gösterse de benzer bir sıklık sırası gözlenmiştir.^{46,47,48} Örnek olarak İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi hastanesinde Mete ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *C. albicans*'tan sonra kan dolaşımı infeksiyonuna neden olan en yaygın türler, sırasıyla *C. parapsilosis*, *C.*

glabrata ve *C. tropicalis* olarak bildirilmiştir.³ Bizim çalışmamızda 2017-2018 yılları arasında YBÜ hastalarında *Candida* tür dağılımı *C. parapsilosis* % 58 (29 hasta), *C. albicans* % 24 (12 hasta), *C. glabrata* % 14 (7 hasta), *C. tropicalis* % 2 (1 hasta), *C. guilliermondii* % 2 (1 hasta) olarak tespit edilmiş olup, görüldüğü üzere %76 oranla non *albicans Candida* 'lar giderek artmaktadır. Yapılan bir çok güncel çalışmalarda da bizim çalışmamıza benzer şekilde non *albicans Candida* türlerindeki artış gösterilmiştir.^{3,45} *Candida* 'lar kan dolaşımına GIS, damar içi kateter ve piyelonefrit gibi lokalize bir infeksiyon odağından erişebilmektedirler. Gastrointestinal sistem mukozasından penetrasyon, *Candida* türlerinin hem nötropenik hastalarda hem de YBÜ hastalarında kan dolaşımına girmesi için muhtemel en yaygın mekanizmadır.⁵⁷ *Candida* türleri normal bağırsak mikrobiyotasının bir parçasıdır; geniş spektrumlu antibiyotik kullanımına bağlı aşırı çoğalabilmekte ve uygulanan kemoterapötik ajanlar veya major abdominal cerrahilerle oluşan GIS mukozal hasarı sonucu bağırsaktan kana kolayca transloke olabilmektedirler.⁵⁷

Bizim çalışmamızda da literatüre uygun olarak kandidemi ilişkili risk faktörleri; intraabdominal infeksiyon (p=0,001), son üç ay içinde hastaneye yatış öyküsü (p=0,006), bir haftadan uzun süren antibiyotik kullanımı (p=0,005) ve ABH (p=0,005) olarak bulundu. Literatürde risk faktörlerinin araştırıldığı diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar saptanmıştır.⁹⁶

C.parapsilosis, özellikle cerrahi YBÜ'lerinde daha yaygındır; SVK, TPN, yakın zamanda geçirilmiş cerrahi, ekinokandin kullanımı ve kötü infeksiyon kontrolü önemli risk faktörü olarak bir çok çalışmada gösterilmiştir.^{43,97}

C. glabrata için, flukonazol tedavisi almış olmak, ileri yaş, gastrointestinal cerrahi ve intravenöz ilaç kullanımı en yaygın risk faktörleridir. Çalışmamızda intraabdominal infeksiyon, uzun süreli antibiyotik kullanımı ve son üç ay içerisinde hastaneye yatış öyküsü en önemli risk faktörleri olarak belirlendi.^{43,45}

Bizim çalışmamızda *C. parapsilosis*'in yüksek oranda görülmesi, hastaların büyük çoğunluğunun cerrahi YBÜ'de TPN ile beslenen, SVK kullanımı olan, yakın zamanda cerrahi geçirmiş odak kontrolünün sağlanamadığı intraabdominal infeksiyona sahip hastalar olması ile ilişkili olabilir. Retrospektif analizde kandidemi saptanan hastaların %62'si major cerrahi operasyon geçirmiş hastalardı. İstatistiksel olarak vaka grubunda sepsis, son üç ay içerisinde hastaneye yatış, bir haftadan uzun süren antibiyotik kullanımı, kolonizasyon ve SVK oranı kontrol grubundan anlamlı (p < 0.05)

olarak daha yüksekti. Çalışmamızda vaka ve kontrol grubu arasında YBÜ kalış süresinin uzaması istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$).

Candida spp., YBÜ hastalarında antifungal tedaviye rağmen %40'a varan mortalite ile ilk dört nozokomiyal kan dolaşımı infeksiyonu arasında yer almaktadır.⁹⁸ Tek başına veya kombinasyon halinde 1,3-b-D-glucan ve prokalsitonin gibi biyobelirteçlerin faydası umut vadetsede, yatak başı *Candida* skora sistemleri klinik karar aşamasına rehberlik etmede oldukça yararlı olabilmektedir.⁹⁹ Son zamanlarda rehberler erken tanı ve biran önce antifungal tedavinin başlanması için bu tür *Candida* skora sistemlerinin kullanımını önermektedirler.¹⁰⁰ Yaygın olarak kullanılan Leon ve arkadaşlarının non-nötropenik İK hastalarında erken antifungal tedavi başlanması amacıyla oluşturdukları '*Candida* skoru' sisteminde >2,5 puan için duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %81 ve %74'tür.¹⁰¹ Cerrahi hastalarının fazlalık teşkil ettiği YBÜ'lerde bu skora çok işe yaramaktadır, ancak cerrahi olmayan nedenlerle YBÜ'de yatan hastalarda bu skor yetersiz kalabilmektedir. Erken tanı için geliştirilmiş olan birçok klinik skora sistemleri olsa da hiç biri '*Candida* skoru' gibi prospektif olarak doğrulanmamıştır ve pozitif prediktif değerleri çok düşüktür. Bizim çalışmamızda 2017-2018 yılları arasında pozitif kan kültürü olan hastaların (n=50), %94'ünün pozitif '*Candida* skoru'na (>2,5) sahip olduğunu bulduk. Bu durum o dönem yoğun bakımda kritik cerrahi hastalarının, özellikle intraabdominal infeksiyonların üstünlük teşkil etmesinden kaynaklanıyordu. Çalışmamızda en yaygın risk faktörleri şiddetli sepsis/septik şok (%98), 1 haftadan uzun süren antibiyotik kullanımı (%96) ve son üç ay içinde hastaneye yatış öyküsü (%96) idi. Yine Leon ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada '*Candida* skoru' <3 ile %2,3 İK insidansı bildirilmiş, bizim çalışmamızda da buna benzer şekilde düşük oranda (%6) İK insidansı saptanmıştır.¹⁰² Ancak başka bir çalışmada '*Candida* skoru' <3 ile %63 İK insidansı bildirilmiş ve sepsis ile multifokal *Candida* kolonizasyonunun benzer oranlarda olduğu gösterilmiştir.¹⁰³ Bu nedenle de empirik antifungal tedavi gerektiren kritik YBÜ hastalarını daha doğru bir şekilde belirlemek amacıyla modifiye edilmiş *Candida* skora sistemlerinin geliştirilmesi ihtiyacı doğmuştur. Bizim çalışmamızda YBÜ'lerinde kandidemi olguları ile ortaya çıkan çok değişkenli modelde saptanan '*Candida* skoru', son üç ay içinde hastane yatışı ve ABH gelişmesi kriterleri dışında klinikte çok sık gözlemlendiğimiz intraabdominal infeksiyon varlığı ve > 7 gün

antibiyotik kullanımı gibi risk faktörleri kullanılarak hastanemize özgü bir skorlama sistemi - CTF *Candida* skoru geliştirildi. Prospektif izlemde CTF *Candida* skoru <3 ile İK saptanmadı. Çalışmamızda 4 puan ve üzeri toplam sekiz hastadan üçünde kandidemi gelişti ve bu skorun kandidemi riskini belirlemede önemli olduğunu bulduk. CTF *Candida* skoru ile kandidemi arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) farklılık bulundu.

Leon ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı YBÜ’de takip edilen nütropenik olmayan hastaların dahil edildiği prospektif bir çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde İK ile kandida skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bir ilişki olduğu gösterildi. Leon ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları çalışmada ‘*Candida* skoru’ sınır değeri 2,5 puan için duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %81 ve %74 olarak belirlenmiş, *Candida* skoru >2,5 puan olanlarda İK riski 7,75 kat fazla olduğu bildirilmiştir.¹⁰¹ Bizim çalışmamızdaysa oluşturduğumuz CTF *Candida* skoru sınır değeri 4 puan için duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %75 ve %93 olarak belirlendi, CTF *Candida* skoru 4 puan ve üzeri olanlarda İK riskinin 40,2 kat daha fazla olduğu bulundu (Tablo 9).

Kautzy ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi bizim çalışmamızda da KS <2,5 olan hastaların hiçbirinde İK gelişmedi ve NPD yüksek olarak bulundu.¹⁰⁴ Böylece geliştirdiğimiz hastanemize özgün CTF *Candida* skorunun NPD’nin (%98,53) yüksek bulunması gereksiz antifungal kullanımını önlemede çok yararlı olabileceğini gösterdi. Oluşturduğumuz CTF *Candida* skoru sisteminde >4 puan için duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %75 ve %93 olarak belirlendi (Tablo 9). Ayrıca CTF *Candida* skoru 4 puan ve üzeri için NPD %98,53, PPV %37,5 olarak bulundu. Böylece geliştirdiğimiz özgün CTF *Candida* skoru nütropenik olmayan YBÜ hastalarında gereksiz antifungal kullanımını önleme ve empirik antifungal tedavinin erkenden başlanması kararı için rehber hükmünde olabilir.¹⁰²

Kandidemi YBÜ hastalarında gelişen çok ciddi bir klinik durumdur ve rutin olarak kesin tanı kan kültürü sonucuna göre konulmaktadır. Kandidemi teşhisi için kullanılan kan kültürü sistemlerinin en önemli dezavantajlarından biri üreme sinyali için en az üç gün ve uygun besiyerine ekim yapıldıktan sonra ise identifikasyon için iki gün daha (toplamda 3-5 gün) süre gerektirmesidir. Bununla birlikte, İK’in kesin tedavisi genellikle kültürün duyarsızlığı nedeniyle gecikir ve bu gecikme yüksek mortalite

oranlarına (% 35-75) yol açabilir.¹¹ *Candida* kan kültürlerinden % 50-70 oranında ve geç izole edilmektedir.¹² Kan kültürü pozitif olan hastalarda İK teşhisi kolaylıkla yapılır, ancak kan kültürlerinin duyarlılığının düşük olması, sistemik infeksiyonu olan bazı hastaların gözden kaçırılacağı anlamına gelir. YBÜ’de genel durumu ağır olan hastalarda daha hızlı ve daha duyarlı tekniklerin yapılması gerekmektedir. Kan kültürlerindeki mayaların daha hızlı saptanması ve kültür bazlı olmayan yeni tekniklerin geliştirilmesi literatürde en önemli araştırma alanlarından biridir. Kan kültürlerinin geç sonuç vermesi, serolojik testlerin tek başına kullanıldıklarında duyarlılıklarının düşük olması nedeniyle moleküler yöntemlerin bu alanda araştırılması ön plana çıkmıştır. Bu yöntemler geliştirildikçe kan kültürü negatif derin doku infeksiyonları daha iyi teşhis edilebilecektir.¹² Böylece PCR yöntemiyle konulan hızlı ve güvenilir kandidemi tanısı, uygun tedavinin erkenden başlanarak mortalitenin azaltılmasına yol açacaktır.⁸³

İnvaziv kandidiyaziste karşımıza çıkan esas sorunlardan biri de kan kültürü negatif şüpheli olgularda empirik/pre-emptif antifungal tedavi seçiminin yapılmasıdır. Tedavinin geç başlanması, direnç profili, uygun olmayan doz ve yetersiz tedavi süreleri ölüm oranlarını ciddi bir şekilde arttırmaktadır.² Garey ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kandidemili hastalarda antifungal tedavi başlanmasındaki gecikme, mortaliteyi önemli ölçüde arttırmıştır. Kültür gününden 12 saat ve 72 saat sonra antifungal tedavi başlanmasının mortaliteyi paralel olarak 2-3 kat arttırdığı gösterilmiştir.¹⁰⁵ Bu nedenle antifungal tedavi gecikmelerini önlemek için hızlı tanı testleri ve özgü risk faktörlerinin belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Literature baktığımızda kandidemi etkeni olan patojen türlerin saptanması için farklı moleküler yaklaşımlar geliştirilmekte olduğunu görebiliriz. PCR amplifikasyonu için, mantarların ribozomal DNA’daki ITS bölgelerinden seçilen türe özgü primerler kullanılmaktadır. ITS, mantar türlerine özgü dizileri hedefler ve türler arası fark panfungal primerler tarafından üretilen erime eğrisi analizi ile oluşan amplikonun özgünlüğü gösterilerek mümkündür.⁸² Çalışmamızda kan dolaşımı infeksiyonlarına neden olan *Candida* türlerinin direkt kandan tespiti için hızlı, duyarlı ve özgün bir moleküler yöntem olarak tekli EvaGreen tabanlı real time PCR geliştirildi. Dört çift panfungal primer kullanıldı. MALDI-TOF MS ile tanısı doğrulanmış *C. albicans* izolatu çalışmaya alındı. *C. albicans*’ın sırası ile 10.000, 1000, 100 ve 10 hücresi sayılan asıntıları alındı, EDTA’lı kan örneği ile 1/10 oranında karıştırılarak ml’de sırası ile

1000, 100, 10 ve 1 hücre içeren standard kan örnekleri hazırlandı. Ekstraksiyon için ticari kit (Ribospin, Almanya) kullanıldı. Ekstraksiyon işlemi sonrası *Candida* DNA varlığı ITS, D1/D2, EF1a ve Tubulin gen bölgelerini hedefleyen tekli Eva-Green tabanlı Real Time PCR testi araştırıldı. Real Time PCR ile çoğaltma işlemi için ITS1F-ITS4R, NL1-NL4, EF1a-F-EF1a-R, bTUB-F-bTUB-R gibi primer çiftleri için ayrı ayrı Real Time PCR testleri gerçekleştirildi. Real Time PCR için BioRad CFX 96 cihazı (BioRad, Almanya) kullanıldı ve çoğaltma sonrası oluşan amplikonlar erime eğrisi analizi ile de test edildi. Fidler ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmanın aksine bizim çalışmamızda Real Time PCR amplifikasyon eğrileri incelendiğinde Tubulin ve EF1a gen bölgelerine ait eğrilerin non spesifik ve yeterli olmayan amplifikasyonlar nedeni ile çalışmaya uygun olmadığı ve daha ileri optimizasyonlar gerektirdiği görüldü.⁸⁵

ITS ve D1/D2 bölgesini kapsayan primerler ile 1000, 100 ve 10 *Candida* hücrelerini içeren kanlarda pozitif amplifikasyon saptanırken 1 *Candida* hücrelerini içeren kanda amplifikasyon saptanmadı, bu nedenle testin saptama sınırı 10 hücre/ml (CFU/ml) olarak belirlendi. Ayrıca ITS, D1/D2 bölgelerinin amplifikasyonu ve EvaGreen boyası kullanılarak yapılan erime eğrisi analizi ile oluşan amplikonun özgünlüğü gösterildi. Leaw ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ITS1 ve ITS2 sekans analizi ile doğru tanımlama oranlarının sırasıyla %98,8 ve %99,7 olduğu ve ribozomal hedefler, özellikle RNA operonunun ITS1, ITS2 ve D1/D2 alanlarının moleküler tanımlama için umut vadettiği bildirilmiştir.¹⁷ Çalışmada bizim çalışmamıza benzer şekilde ITS bölgelerinin dizi analizinin klinik önemi olan mayaları güvenilir bir şekilde tanımlayabildiği açıkça gösterilmiştir.¹⁷ Bir diğer çalışmada da çoğu maya türünün D1/D2 dizi analizi ve ITS bölgeleri aracılığıyla özgü PCR primerleri kullanılarak hızlı bir şekilde tanımlanabileceği açıklanmıştır.¹⁰⁶

Başka bir çalışmada yine bizim çalışmamıza benzer şekilde ITS dizilerinin erime eğrisi analizi yapılarak her amplikonun spesifik erime noktası olduğu saptanmış ve bu moleküler yöntemin *Candida* türlerinin erken tespiti için potansiyel tanı aracı olabileceği ortaya çıkmıştır.⁸³

Aynı zamanda bu çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da Eva-Green tabanlı Real Time PCR yöntemi prob kullanmadan tek aşamada gerçekleştirilebilmesi önemli avantajlarından. Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda 4 çift primer kullanılmıştır, bunlardan ikisinin özgünlüğü gösterilmiştir.

Somogyvari ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da invaziv maya türlerini saptamak için erime eğrisi analizine dayalı hızlı bir deneysel yöntem olarak Real Time PCR seçildi. Çalışmada klinik numunelerde belirli mantar türlerinin beklendiği durumlarda bu moleküler yöntemin oldukça faydalı olabileceği belirtilmiştir.¹⁰⁷

Bizim çalışmamızda geliştirdiğimiz moleküler testin saptama sınırı 10 CFU/ml olarak belirlendi ve 1 *Candida* hücresini içeren kanda amplifikasyon saptanmadı. Çok düşük mantar yüküne sahip olan İK hastalarının saptanamaması bu testin en önemli kısıtlıklarındandır. Pfeiffer ve arkadaşlarının çalışmasında da 10 CFU/ml *in vitro* saptama sınırı duyarlılığının iyi olduğu gösterilmiştir.¹⁰⁸ Ancak Loeffler ve arkadaşları mantar sepsisinde kandaki mantar yükünün genellikle <10 CFU/ml olduğunu ve kendi geliştirdikleri moleküler yöntemin duyarlılığını 5 CFU/ml olarak açıklamışlardır.¹⁰⁹ Somogyvsari ve arkadaşları¹⁰⁷ ile Horvath ve arkadaşları¹¹⁰ da bizim çalışmamızdan farklı olarak geliştirdikleri moleküler testin *in vitro* saptama sınırını 5 CFU/ml olarak bildirmişlerdir. Ayrıca Pfeiffer ve arkadaşları kan kültürlerinin < 5 CFU/ml altında mantar yükünü saptayabileceğini yayınlamışlardır.¹⁰⁸

Çalışmalarda özellikle YBÜ hastalarında başlanan empirik/profilaktik antifungal tedavinin kan kültürlerinde üremeyi engelleyebileceği ancak bu durumun moleküler testlerin performansını negatif yönde etkileyemeyeceği gösterilmiştir.¹¹¹

Çalışmamızda geliştirdiğimiz moleküler testi tam kandan çalıştık. Tanı için tam kan seçilmesi, tam kan örneklerinde mantar hücrelerinin sağlam olması veya lökositlerin içinde bulunması nedeniyle çalışmalarda desteklenmiştir. Bunun tersine serum ve plazma örneklerinde sadece serbest DNA tespit edilebilir; dolayısıyla tam kan örnekleri daha fazla DNA sunar.¹⁰⁹ DNA ekstraksiyonu için kullanılan yöntemle bağlı olarak serbest DNA veya sağlam patojen hücreler tespit edilebilir. Sağlam hücreleri saptayan tam kandan çalışılan moleküler testlerin özgüllüğü antifungal tedavi gören hastalarda özellikle artmış olabilir. Öte yandan, serbest DNA'yı tespit eden tahlillerden elde edilen pozitif sonuçların yorumlanması zor olabilir.¹¹ Bu yüzden bu testlerin belli bir standardizasyonu yoktur. Yayımlanan çalışmalar gösteriyor ki, *Candida* PCR duyarlılığı kan kültüründen daha yüksektir ancak kan kültürleri ve/veya beta-D glukon gibi ek testlerle birlikte kullanıldığında en iyi etkinliği gösterir.⁷⁸ Bir çalışmada İK vakalarında PCR veya beta-D-glukan testi ile birleştirilmiş kan kültürlerinin duyarlılığı sırası ile

%98 ve %79 olarak gösterilmiştir. Bu nedenle kültür temelli olmayan bu iki tahlil kan kültürleri ile birleştirildiğinde İK için kültür yöntemlerinin duyarlılığını artırma potansiyeline sahiptir.⁷⁸

Kısıtlılıklar:

İnvaziv kandidiyazis olgularının kan kültürü ile % 50-70'nin yakalanabileceği, geri kalan %30-50 vakada ise kan kültürünün negatif olabileceği bildirilmiştir.^{12,4} Biz de bu çalışmada kan kültüründe üremeyi kesin tanı kriteri olarak kullandık. Serolojik bir tanı testi kullanılmamış olunması çalışmanın bir kısıtlayıcı yanı olarak değerlendirilebilir. Fakat serolojik yöntemlerin de YBÜ kandidiyazis olguları için standart olmaması ve ekonomik kısıtlılıklar nedeniyle bu yöntem çalışmaya dahil edilememiştir.

Yeni koronavirüs hastalığı (COVID-19) pandemisi nedeniyle YBÜ yatışlarında COVID-19 tanılı hastaların çoğunluk oluşturması (diğer hasta grubunda tanımlanmış risk faktörleri ile örtüşmeyebildiğinden) geliştirdiğimiz CTF *Candida* skorlama sisteminin COVID-19 dışı YBÜ hastalarında yeniden değerlendirilmesini gerektirmektedir. Bu daha sonraki süreçlerde tamamlanabilecektir.

Gerçek hastaların kanlarından PCR çalışmalarının yapılamamış olması, yeterli kaynak olmadığı için yöntemin klinik kullanımının değerlendirmesinin eksik kalmasına neden olmuştur.

Sonuç:

Sonuç olarak bu çalışmada yüksek riskli YBÜ hastalarında kandideminin saptanması için, yatakbaşında özgün *Candida* skoru (CTF *Candida* skor), kan kültürü ile birlikte uygun antifungal tedavinin hızlıca başlanması için klinisyenlere rehberlik edebilir. Moleküler yöntemlerle klinik önemi olan mayaları erken saptayabiliriz ancak invaziv fungal infeksiyonlarda (İF) düşük mantar yükü (<10 CFU/ml) nedeniyle tanı konulmayabilir. Denenen ve geliştirilen PCR testinin duyarlılığını arttırmak için geliştirmeye ihtiyaç vardır ve klinik kullanımdaki etkinliğini doğrulamak için daha çok hasta sayısı ve daha çok örneklem içeren çok merkezli çalışmalar yapılmalıdır.

ETİK KURUL KARARI

İÜC Tarih ve Sayı: 05/10/2018-70166



T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Doktora Öğrencisi Dr.Khalıs
Mustafayev'in etik kurul kararı
A-02

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :10.09.2018 tarih, 64414572-604.01.01-53634 sayılı yazı

Anabilim Dalımız öğretim üyesi **Prof.Dr.Gökhan AYGÜN**'ün danışmanlığında **Doktora Öğrencisi Dr.Khalıs MUSTAFAYEV**'in yürütücülüğünde "**Yoğun Bakım Ünitesinde Gelişen Kandidemilerin Klinik ve Moleküler Yöntemlerle Erken Saptanması**" başlıklı **Doktora Tezi** hakkında ilgi yazınız ve ekleri **02 Ekim 2018** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar etik kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

e-İmzalı
Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN
Bölüm Başkanı

NOT: Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun ve Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Desteği Onay Belgesinin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak için: <http://dogrulama.istanbulc.edu.tr/enVision.sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BENU0K75C>
Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 Faks : 0 (212) 632 00 33
E-posta : etik@istanbulc.edu.tr Elektronik A5 : www.istanbulc.edu.tr

KAYNAKLAR

1. Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol*. Published online 2000.
2. Bassetti M, Giacobbe DR, Vena A, et al. Incidence and outcome of invasive candidiasis in intensive care units (icus) in europe: Results of the eucandicu project. *Crit Care*. Published online 2019. doi:10.1186/s13054-019-2497-3
3. Mete B, Zerdali EY, Aygun G, et al. Change in species distribution and antifungal susceptibility of candidemias in an intensive care unit of a university hospital (10-year experience). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Published online 2020. doi:10.1007/s10096-020-03994-6
4. Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med*. Published online 2009. doi:10.1097/CCM.0b013e31819efac0
5. Bassetti M, Peghin M, Timsit JF. The current treatment landscape: Candidiasis. *J Antimicrob Chemother*. Published online 2016. doi:10.1093/jac/dkw392
6. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: Results of 28-Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Published online 2004. doi:10.1007/s10096-004-1103-y
7. Vincent JL, Rello J, Marshall J, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA - J Am Med Assoc*. Published online 2009. doi:10.1001/jama.2009.1754
8. Playford EG, Marriott D, Nguyen Q, et al. Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: Risk factors for non-*albicans* *Candida* spp. *Crit Care Med*. Published online 2008. doi:10.1097/CCM.0b013e3181760f42
9. Chow JK, Golan Y, Ruthazer R, et al. Risk factors for *albicans* and non-*albicans*

- candidemia in the intensive care unit. *Crit Care Med*. Published online 2008. doi:10.1097/CCM.0b013e31816fc4cd
10. Sipsas N V., Kontoyiannis DP. Invasive fungal infections in patients with cancer in the Intensive Care Unit. In: *International Journal of Antimicrobial Agents*. ; 2012. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.11.017
 11. Camp I, Spettel K, Willinger B. Molecular methods for the diagnosis of invasive candidiasis. *J Fungi*. Published online 2020. doi:10.3390/jof6030101
 12. Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the missing 50% of invasive candidiasis: How nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis*. Published online 2013. doi:10.1093/cid/cit006
 13. Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: Systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol*. Published online 2011. doi:10.1128/JCM.01602-10
 14. Mirhendi H, Bruun B, Schönheyder HC, et al. Differentiation of *Candida glabrata*, *C. nivariensis* and *C. bracarensis* based on fragment length polymorphism of ITS1 and ITS2 and restriction fragment length polymorphism of ITS and D1/D2 regions in rDNA. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Published online 2011. doi:10.1007/s10096-011-1235-9
 15. Aydin M, Kustimur S, Kalkanci A, Duran T. Identification of medically important yeasts by sequence analysis of the internal transcribed spacer and D1/D2 region of the large ribosomal subunit. *Rev Iberoam Micol*. Published online 2019. doi:10.1016/j.riam.2019.05.002
 16. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol*. 2002;40(7):2483-2489. doi:10.1128/JCM.40.7.2483-2489.2002
 17. Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol*. Published online 2006.

doi:10.1128/JCM.44.3.693-699.2006

18. Greuter W, McNeill J, Barrie FR, et al. *International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code): Sixteenth International Botanical Congress, St Louis, Missouri, USA, July-August 1999.*; 2000.
19. Procop GW, Church DL, Hall GS, et al. *Koneman's Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology*. SEVENTH.; 2017.
20. Hachem R, Hanna H, Kontoyiannis D, Jiang Y, Raad I. The changing epidemiology of invasive candidiasis. *Cancer*. Published online 2008. doi:10.1002/cncr.23466
21. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: Phenotypical methods. *Med Mycol*. Published online 2001. doi:10.1080/mmy.39.1.9.33
22. Stevenson JS, Liu H. Regulation of white and opaque cell-type formation in *Candida albicans* by Rtt109 and Hst3. *Mol Microbiol*. Published online 2011. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07754.x
23. Kim S, Nguyen QB, Wolyniak MJ, et al. Release of transcriptional repression through the HCR promoter region confers uniform expression of HWP1 on surfaces of *Candida albicans* germ tubes. *PLoS One*. Published online 2018. doi:10.1371/journal.pone.0192260
24. Wise MG, Healy M, Reece K, et al. Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. Published online 2007:778-787. doi:10.1099/jmm.0.47106-0
25. McMullan R, Metwally L, Coyle P V., et al. A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults. *Clin Infect Dis*. Published online 2008. doi:10.1086/528690
26. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119-128. doi:10.4161/viru.22913

27. Sundstrom P. Adhesins in *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. Published online 1999. doi:10.1016/S1369-5274(99)80062-9
28. Zheng X, Wang Y, Wang Y. Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *EMBO J*. Published online 2004. doi:10.1038/sj.emboj.7600195
29. Odds FC. Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol*. Published online 1994. doi:10.1016/S0190-9622(08)81257-1
30. Chen YC, Wu CC, Chung WL, Lee FJS. Differential secretion of Sap4-6 proteins in *Candida albicans* during hyphae formation. *Microbiology*. Published online 2002. doi:10.1099/00221287-148-11-3743
31. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. Published online 2003. doi:10.1128/membr.67.3.400-428.2003
32. Robbins N, Uppuluri P, Nett J, et al. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. *PLoS Pathog*. Published online 2011. doi:10.1371/journal.ppat.1002257
33. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev*. Published online 1991. doi:10.1128/membr.55.1.1-20.1991
34. Biswas S, Van Dijck P, Datta A. Environmental Sensing and Signal Transduction Pathways Regulating Morphopathogenic Determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rev*. Published online 2007. doi:10.1128/membr.00009-06
35. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis*. Published online 2016. doi:10.1093/femspd/ftw018
36. Cavalheiro M, Teixeira MC. *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Front Med*. Published online 2018. doi:10.3389/fmed.2018.00028
37. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*. Published online 2012.

doi:10.1016/j.cell.2011.10.048

38. Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, et al. A Candida Biofilm-Induced Pathway for Matrix Glucan Delivery: Implications for Drug Resistance. *PLoS Pathog.* Published online 2012. doi:10.1371/journal.ppat.1002848
39. Felk A, Kretschmar M, Albrecht A, et al. Candida albicans hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases Sap4 to Sap6 are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun.* Published online 2002. doi:10.1128/IAI.70.7.3689-3700.2002
40. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* Published online 2000. doi:10.1128/CMR.13.1.122-143.2000
41. Gácsér A, Stehr F, Kröger C, Kredics L, Schäfer W, Nosanchuk JD. Lipase 8 affects the pathogenesis of Candida albicans. *Infect Immun.* Published online 2007. doi:10.1128/IAI.00372-07
42. Hachem R, Hanna H, Kontoyiannis D, Jiang Y, Raad I. The changing epidemiology of invasive candidiasis: Candida glabrata and candida krusei as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. *Cancer.* Published online 2008. doi:10.1002/cncr.23466
43. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* Published online 2007. doi:10.1128/CMR.00029-06
44. Messer SA, Jones RN, Fritsche TR. International surveillance of Candida spp. and Aspergillus spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *J Clin Microbiol.* Published online 2006. doi:10.1128/JCM.44.5.1782-1787.2006
45. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: Data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis.* Published online 2009. doi:10.1086/599039
46. Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, et al. Epidemiology of candidemia:

- 3-Year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol*. Published online 2002. doi:10.1128/JCM.40.4.1298-1302.2002
47. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). *J Clin Microbiol*. Published online 2011. doi:10.1128/JCM.01398-10
 48. Fortún J, Martín-Dávila P, Gómez-García de la Pedrosa E, et al. Emerging trends in candidemia: A higher incidence but a similar outcome. *J Infect*. Published online 2012. doi:10.1016/j.jinf.2012.02.011
 49. 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*. Published online 2010. doi:10.1093/jac/dkq136
 50. Centers for Disease Control and Prevention. Clinical Alert to U.S. Healthcare Facilities - June 2016 | Fungal Diseases | CDC. Fungal Diseases.
 51. Tsay S, Kallen A, Jackson BR, Chiller TM, Vallabhaneni S. Approach to the Investigation and Management of Patients with *Candida auris*, an Emerging Multidrug-Resistant Yeast. *Clin Infect Dis*. Published online 2018. doi:10.1093/cid/cix744
 52. Zhang AY, Shrum S, Williams S, et al. The Changing Epidemiology of Candidemia in the United States: Injection Drug Use as an Increasingly Common Risk Factor-Active Surveillance in Selected Sites, United States, 2014-2017. *Clin Infect Dis*. Published online 2020. doi:10.1093/cid/ciz1061
 53. Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. *J Infect Dis*. Published online 2012. doi:10.1093/infdis/jir867
 54. Van De Veerdonk FL, Kullberg BJ, Netea MG. Pathogenesis of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*. Published online 2010.

doi:10.1097/MCC.0b013e32833e046e

55. Deschamps MM, Fitzgerald DW, Pape JW, Johnson J. HIV infection in Haiti: Natural history and disease progression. *AIDS*. Published online 2000. doi:10.1097/00002030-200011100-00014
56. Platenkamp GJ, Duin AMV, Porsius JC, Schouten HJA, Zondervan PE, Michel MF. Diagnosis of invasive candidiasis in patients with and without signs of immune deficiency: A comparison of six detection methods in human serum. *J Clin Pathol*. Published online 1987. doi:10.1136/jcp.40.10.1162
57. Nucci M, Anaissie E. Revisiting the source of candidemia: Skin or gut? *Clin Infect Dis*. Published online 2001. doi:10.1086/323759
58. Fisher JF, Kavanagh K, Sobel JD, Kauffman CA, Newman CA. Candida urinary tract infection: Pathogenesis. *Clin Infect Dis*. Published online 2011. doi:10.1093/cid/cir110
59. León C, Álvarez-Lerma F, Ruiz-Santana S, et al. Fungal colonization and/or infection in non-neutropenic critically ill patients: Results of the EPCAN observational study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Published online 2009. doi:10.1007/s10096-008-0618-z
60. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. Published online 2015. doi:10.1093/cid/civ933
61. Barnes PD, Marr KA. Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients. *Br J Haematol*. Published online 2007. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06812.x
62. Kauffman CA. Candiduria. *Clin Infect Dis*. Published online 2005. doi:10.1086/430918
63. Meersseman W, Lagrou K, Spriet I, et al. Significance of the isolation of Candida species from airway samples in critically ill patients: A prospective, autopsy study. *Intensive Care Med*. Published online 2009. doi:10.1007/s00134-009-1482-8

64. Azoulay E, Cohen Y, Zahar JR, et al. Practices in non-neutropenic ICU patients with Candida-positive airway specimens. *Intensive Care Med*. Published online 2004. doi:10.1007/s00134-004-2316-3
65. Oude Lashof AML, Rothova A, Sobel JD, et al. Ocular manifestations of candidemia. *Clin Infect Dis*. Published online 2011. doi:10.1093/cid/cir355
66. Gamaletsou MN, Kontoyiannis DP, Sipsas N V., et al. Candida osteomyelitis: Analysis of 207 pediatric and adult cases (1970-2011). *Clin Infect Dis*. Published online 2012. doi:10.1093/cid/cis660
67. Bridges KJ, Li R, Fleseriu M, Cetas JS. Candida Meningitis After Transsphenoidal Surgery: A Single-Institution Case Series and Literature Review. *World Neurosurg*. Published online 2017. doi:10.1016/j.wneu.2017.08.115
68. Negi N, Ahmad A. Current updates on fungal endocarditis. *Fungal Biol Rev*. Published online 2018. doi:10.1016/j.fbr.2017.11.001
69. Ellis M. Fungal endocarditis. *J Infect*. Published online 1997. doi:10.1016/S0163-4453(97)91347-5
70. Versalovick J, Carroll K, Funke G, Jorgense J, Landry M, Warnock D. *Manual of Clinical Microbiology (Manual of Clinical Microbiology)*.; 2015.
71. Ainscough S, Kibbler CC. An evaluation of the cost-effectiveness of using CHROMagar for yeast identification in a routine microbiology laboratory. *J Med Microbiol*. Published online 1998. doi:10.1099/00222615-47-7-623
72. Wilson ML, Davis TE, Mirrett S, et al. Controlled comparison of the BACTEC high-blood-volume fungal medium, BACTEC Plus 26 aerobic blood culture bottle, and 10-milliliter isolator blood culture system for detection of fungemia and bacteremia. *J Clin Microbiol*. Published online 1993. doi:10.1128/jcm.31.4.865-871.1993
73. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: Diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect*. Published online 2012. doi:10.1111/1469-0691.12038

74. 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*. Published online 1996. doi:10.1128/jcm.34.1.58-61.1996
75. Mikulska M., Calandra T. PD. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis. *Crit care*. Published online 2010.
76. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: Recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care*. Published online 2010. doi:10.1186/cc9365
77. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1→3) β-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis*. Published online 2005. doi:10.1086/432470
78. Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, et al. Performance of candida real-time polymerase chain reaction, β-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis*. Published online 2012. doi:10.1093/cid/cis200
79. Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing invasive candidiasis. *J Clin Microbiol*. Published online 2018. doi:10.1128/JCM.01909-17
80. Durán-Valle MT, Sanz-Rodríguez N, Muñoz-Paraíso C, Almagro-Moltó M, Gómez-Garcés JL. Identification of clinical yeasts by Vitek MS system compared with API ID 32 C. *Med Mycol*. Published online 2014. doi:10.1093/mmy/myt036
81. Krisher K. Survey results: The use of the NCCLS standard, M22-A2, and “Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media” by clinical laboratories. *Clin Microbiol Newsl*. Published online 2001. doi:10.1016/S0196-4399(01)89016-4
82. Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, Khan Z. Rapid and accurate identification of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by real-time PCR and melting curve analysis. *Med Princ Pract*. Published online 2019. doi:10.1159/000493426

83. Dunyach C, Bertout S, Phelipeau C, Drakulovski P, Reynes J, Mallié M. Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler® real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Published online 2008. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.09.014
84. Kourkoumpetis TK, Fuchs BB, Coleman JJ, Desalermos A, Mylonakis E. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Infect Dis*. Published online 2012. doi:10.1093/cid/cis132
85. Fidler G, Leiter E, Kocsube S, Biro S, Paholcsek M. Validation of a simplex PCR assay enabling reliable identification of clinically relevant *Candida* species. *BMC Infect Dis*. Published online 2018. doi:10.1186/s12879-018-3283-6
86. Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect*. Published online 2014. doi:10.1111/1469-0691.12210
87. Mylonakis E, Clancy CJ, Ostrosky-Zeichner L, et al. T2 magnetic resonance assay for the rapid diagnosis of candidemia in whole blood: A clinical trial. *Clin Infect Dis*. Published online 2015. doi:10.1093/cid/ciu959
88. Arendrup MC, Andersen JS, Holten MK, et al. Diagnostic performance of T2Candida among ICU patients with risk factors for invasive candidiasis. *Open Forum Infect Dis*. Published online 2019. doi:10.1093/ofid/ofz136
89. Clancy CJ, Pappas PG, Vazquez J, et al. Detecting Infections Rapidly and Easily for Candidemia Trial, Part 2 (DIRECT2): A Prospective, Multicenter Study of the T2Candida Panel. *Clin Infect Dis*. Published online 2018. doi:10.1093/cid/cix1095
90. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, et al. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: An observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol*. Published online 2012. doi:10.1128/JCM.05742-11
91. Prakash A, Sharma C, Singh A, et al. Evidence of genotypic diversity among

- Candida auris isolates by multilocus sequence typing, matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and amplified fragment length polymorphism. *Clin Microbiol Infect*. Published online 2016. doi:10.1016/j.cmi.2015.10.022
92. Hall L, Le Febre KM, Deml SM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Evaluation of the yeast traffic light PNA FISH probes for identification of Candida species from positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. Published online 2012. doi:10.1128/JCM.06148-11
93. Stone NRH, Gorton RL, Barker K, Ramnarain P, Kibbler CC. Evaluation of PNA-fish yeast traffic light for rapid identification of yeast directly from positive blood cultures and assessment of clinical impact. *J Clin Microbiol*. Published online 2013. doi:10.1128/JCM.00028-13
94. Ostrosky-zeichner L. What 's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients. Published online 2014. doi:10.1007/s00134-014-3281-0
95. Wan Ismail WNA, Jasmi N, Khan TM, Hong YH, Neoh CF. The Economic Burden of Candidemia and Invasive Candidiasis: A Systematic Review. *Value Heal Reg Issues*. Published online 2020. doi:10.1016/j.vhri.2019.07.002
96. Poissy J, Damonti L, Bignon A, et al. Risk factors for candidemia: A prospective matched case-control study. *Crit Care*. Published online 2020. doi:10.1186/s13054-020-2766-1
97. Forrest GN, Weekes E, Johnson JK. Increasing incidence of Candida parapsilosis candidemia with caspofungin usage. *J Infect*. Published online 2008. doi:10.1016/j.jinf.2007.10.014
98. Lamoth F, Lockhart SR, Berkow EL, Calandra T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *J Antimicrob Chemother*. Published online 2018. doi:10.1093/jac/dkx444
99. Cortegiani A, Misseri G, Ippolito M, et al. Procalcitonin levels in candidemia versus bacteremia: A systematic review. *Crit Care*. Published online 2019. doi:10.1186/s13054-019-2481-y

100. Martin-Loeches I, Antonelli M, Cuenca-Estrella M, et al. ESICM/ESCMID task force on practical management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Med*. Published online 2019. doi:10.1007/s00134-019-05599-w
101. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, et al. A bedside scoring system (“Candida score”) for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit Care Med*. Published online 2006. doi:10.1097/01.CCM.0000202208.37364.7D
102. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, et al. Usefulness of the “candida score” for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: A prospective multicenter study. *Crit Care Med*. Published online 2009. doi:10.1097/CCM.0b013e31819daa14
103. Laine ME, Flannery AH, Moody B, Thompson Bastin ML. Need for expanded Candida Score for empiric antifungal use in medically critically ill patients? *Crit Care*. Published online 2019. doi:10.1186/s13054-019-2525-3
104. Kautzky S, Staudinger T, Presterl E. Invasive *Candida* infections in patients of a medical intensive care unit. *Wien Klin Wochenschr*. Published online 2015.
105. Garey KW, Rege M, Pai MP, et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: A multi-institutional study. *Clin Infect Dis*. Published online 2006. doi:10.1086/504810
106. Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol*. Published online 2000. doi:10.1099/00207713-50-3-1351
107. Somogyvari F, Horvath A, Serly J, Majoros H, Vagvolgyi C, Peto Z. Detection of invasive fungal pathogens by real-time PCR and high-resolution melting analysis. *In Vivo (Brooklyn)*. Published online 2012.
108. Pfeiffer CD, Samsa GP, Schell WA, Reller LB, Perfect JR, Alexander BD. Quantitation of *Candida* CFU in initial positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. Published online 2011. doi:10.1128/JCM.00609-11

109. Löffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol*. Published online 1997. doi:10.1128/jcm.35.12.3311-3312.1997
110. Horváth Á, Pet Z, Urbán E, Vágvölgyi C, Somogyvári F. A novel, multiplex, real-time PCR-based approach for the detection of the commonly occurring pathogenic fungi and bacteria. *BMC Microbiol*. Published online 2013. doi:10.1186/1471-2180-13-300
111. Fuchs S, Lass-Flörl C, Posch W. Diagnostic performance of a novel multiplex PCR assay for candidemia among ICU patients. *J Fungi*. Published online 2019. doi:10.3390/jof5030086



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDE GELİŞEN KANDİDEMİLERİN KLİNİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ERKEN SAPTANMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%10 BENZERLİK ENDEKSİ	%9 İNTERNET KAYNAKLARI	%4 YAYINLAR	%3 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
---------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
2	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	%1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
4	www.ankemdernegi.org.tr İnternet Kaynağı	%1
5	Submitted to Istanbul Medipol Āniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
6	www.yumpu.com İnternet Kaynağı	<%1
7	acikerisim.baskent.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	infeksiyon.dergisi.org İnternet Kaynağı	<%1

Yayımları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Kitap/Kitap Bölümleri:

1. **Mustafayev Khalis**. Inflammatory Breast Lesions. “Current Approaches to Breast Cancer”. Uluslararası editörlü kitapta bölüm yazarlığı (under revision)

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler (SSCI, SCI-E, AHCI Kapsamına Giren Dergilerde Yayımlananlar):

1. Ozaras, Resat & Vatankulu, Betül & **Mustafayev, Khalis**. (2014). Hepatic alveolar echinococcosis. *The American Journal of Gastroenterology*. 109. 1526. 10. 1038/ajg.2014.311.

Hakemli Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar:

- 1) Balkan II, Aygün G, **Mustafayev H**, Yemişen M, Kuşkucu M, Mete B. et al. “Hematolojik Onkoloji Birimlerinde Karbapenem Dirençli Klebsiella Kolonizasyonu Taraması ve Sağ Kalıma Katkısı”, Febril Nötropeni Kılavuz Toplantısı, ANKARA, TÜRKİYE, 29-30 Mart 2014, cilt.1, ss.11-11
- 2) Ceren Cıvcık, Damla Çetinkaya, Afshin Mashayekhi, **Khalis Mustafayev**, Ayşegül Gündüz, Güneş Kızıltan, Hülya Apaydın. Nadir bir olgu: Merkezi Sinir Sistemi Enfeksiyonuna sekonder demans, parkinsonizm ve ikinci motor nöron etkilenimi. 52. Ulusal Nöroloji Kongresi Nörokongre 2016
- 3) Murat Günaydın, Mehrdad Ataei, Selcan Çolakoğlu Akyol, **Khalis Mustafayev**, Yavuz Uyar. NDP Air Total+’in Hastane Enfeksiyonu Etkeni Mikroorganizmalara Karşı Etkinliğinin Araştırılması. 9. Uluslararası Katılımlı Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi - Kongre Kitabı Aralık 2015
- 4) Resat Ozaras, **Khalis Mustafayev**, Gulhan Deniz, Mustafa Ozguroglu, Fehmi Tabak. Hepatitis B Reactivation Despite Pre-existing Anti-HBs Antibodies: Even Patients with Solid Tumors are Under the Risk. ESCMID 2015-Copenhagen

- 5) **Mustafayev K**, Guner AL, Mustafayev FNA, Er O. A Case Report: Post-crizotinib management by ceritinib in an ALK-positive non-small cell lung cancer patient. 2nd International Congress on Oncological Sciences. Turkey, 2018.
- 6) Nadir Bir Olgu: *Gemella haemolysans*'a Bağlı Akciğer Apsesi. **Khalis Mustafayev**, Koray Güven, Yeşim Beşli, Hasret Tuğçe Alemdaroğlu, Özlem Er The 19th KLİMİK Congress, Turkey, 2018.
- 7) Ozlem Er, **Khalis Mustafayev**. Metastatik renal hücreli karsinom tedavisinde kombine immünoterapi uygulaması: Olgu sunumu

Sözlü Sunum:

1. **Mustafayev K**. HIV enfeksiyonlu hastalarda gelişen dermatolojik tutulumların irdelenmesi. HIV/AIDS Kongresi. Türkiye, 2017.