

Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Tanımlanmasında Peptid Nükleik Asit Floresan İn Situ Hibridizasyon (PNA FISH) Yönteminin Değerlendirilmesi*

Evaluation of Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization (PNA FISH) Method in the Identification of *Candida* Species Isolated From Blood Cultures

Gonca AYDEMİR, Ayşe Nedret KOÇ, Mustafa Altay ATALAY

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.
Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kayseri, Turkey.

* Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (Proje No: TSY-11- 3704) tarafından desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 27.08.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 26.02.2016

ÖZ

Son yıllarda yoğun bakım ünitelerinde yatan, immün süpresif tedavi alan ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanan hastaların sayısının artması, sistemik kandidoz insidansını artırmıştır. Bu tür hastalarda en sık görülen klinik gösterge, kandidemidir. Kan kültürlerinden *Candida* türlerinin geleneksel morfolojik ve biyokimyasal yöntemler ile tanımlanması uzun sürmektedir. Bu nedenle hızlı, güvenilir ve doğru sonuç veren yöntemlere ihtiyaç vardır. Bu amaçla, direkt tanımlama yapabilen yeni sistemler geliştirilmiştir. Bu çalışmada; kan kültürlerinde üreyen *Candida* türlerinin tanımlanmasında, peptid nükleik asit floresan in situ hibridizasyon (PNA FISH) yönteminin performansının, konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Temmuz 2011-Temmuz 2012 tarihleri arasında, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri kliniklerinde sistemik mantar enfeksiyonu ön tanısıyla takip edilen ve kan kültüründe maya üreyen 50 hasta alınmıştır. İzole edilen *Candida* suşlarının tanımlanması; makroskobik ve mikroskobik morfoloji, çimlenme borusu testi, sikloheksimid hassasiyeti, üreaz aktivitesi ve API 20C AUX (bioMerieux, Fransa) testi ile karbonhidrat asimilasyonuna göre yapılmıştır. PNA FISH yöntemi için Yeast Traffic Light® PNA FISH (AdvanDx, ABD) kiti kullanılmıştır. Morfolojik ve biyokimyasal özelliklerine (konvansiyonel yöntemler) göre, 50 *Candida* izolatının 19 (%38)'ü *C.albicans*, 12 (%24)'si *C.glabrata*, beşi (%10) *C.parapsilosis*, beşi (%10) *C.kefyr*, dördü (%8) *C.krusei*, ikisi (%4) *C.guilliermondii*, ikisi (%4) *C.tropicalis* ve biri (%2) *C.lusitanae* olarak tanımlanmıştır. PNA FISH yöntemiyle ise izolatların 24 (%48)'ü

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Ayşe Nedret Koç, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 38039 Kayseri, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 352 207 6666-23379/20204, **E-posta (E-mail):** anedret@erciyes.edu.tr

C.albicans/C.parapsilosis (yeşil floresan), 16 (%32)'sı *C.glabrata/C.krusei* (kırmızı floresan) ve biri (%2) *C.tropicalis* (sarı floresan) olarak doğru şekilde tanımlanmış, ancak bir *C.tropicalis* suşu *C.albicans* olarak hatalı sonuç vermiştir. Diğer sekiz (%16) suş ise, PNA FISH kitinin değerlendirme panelinde bulunmayan türler olmaları nedeniyle (5 *C.kefyr*, 2 *C.guilliermondii* ve 1 *C.lusitaniae*) floresan vermemiş ve diğer *Candida* spp. olarak değerlendirilmiştir. Buna göre, kitin belirleyebildiği türler (*C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.krusei* ve *C.tropicalis*) dikkate alındığında, konvansiyonel yöntemlerle uyum oranı %97.6 (41/42) olarak; tüm türler için toplam tanımlama oranı ise %84 (41/50) olarak bulunmuştur. Sonuç olarak; hastanemizde kan kültürlerinden en sık izole edilen türlerin sırasıyla *C.albicans*, *C.glabrata* ve *C.parapsilosis* olduğu belirlenmiş; kan kültürlerinde üreyen *Candida* türlerinin tanımlanmasında PNA FISH yönteminin kolay, güvenilir ve kısa zamanda (90 dakika) sonuç veren bir yöntem olması nedeniyle rutin laboratuvarlarda kullanılabilir olduğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, daha fazla sayıda suşun kullanıldığı ve maliyetin de göz önüne alındığı karşılaştırmalı ileri çalışmalara gerek vardır.

Anahtar sözcükler: *Candida*; tanımlama; peptid nükleik asit floresan in situ hibridizasyon; PNA FISH; kandidemi.

ABSTRACT

In recent years, increased number of patients who are hospitalized in intensive care units, received immunosuppressive therapy and treated with broad-spectrum antibiotics that can lead an increase in the incidence of systemic candidiasis. In these patients, the most common clinical manifestation is candidemia. Since the identification of *Candida* species isolated from blood cultures is time consuming by conventional (morphological and biochemical) methods, rapid, reliable and accurate methods are needed. For this purpose novel systems have been developed to identify the agent directly. The aim of this study was to evaluate the peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (PNA FISH) method for the identification of *Candida* species by comparing with the conventional methods. A total of 50 patients who were admitted to Erciyes University Medical Faculty Hospital clinics and followed with prediagnosis of systemic fungal infections whose blood cultures were positive for the yeasts between July 2011 and July 2012 were included in the study. The conventional identification of *Candida* isolates was performed by considering macroscopic and microscopic morphology, germ tube test, cycloheximide sensitivity, urease activity and carbohydrate assimilation patterns with API 20C AUX (bioMerieux, France) test. PNA FISH method was conducted by the use of a commercial kit namely Yeast Traffic Light® PNA FISH (AdvanDx, USA). According to morphological and biochemical characteristics (conventional methods), 19 (38%) out of 50 *Candida* isolates were identified as *C.albicans*, 12 (24%) as *C.glabrata*, five (10%) as *C.parapsilosis*, five (10%) as *C.kefyr*, four (8%) as *C.krusei*, two (4%) as *C.guilliermondii*, two (4%) as *C.tropicalis* and one (2%) as *C.lusitaniae*. On the other hand, 24 (48%) of the isolates were identified as *C.albicans/C.parapsilosis* (with green fluorescence), 16 (32%) as *C.glabrata/C.krusei* (with red fluorescence) and one (%2) as *C.tropicalis* (with yellow fluorescence) properly, however one *C.tropicalis* strain was misidentified as *C.albicans* by PNA FISH method. Other eight (16%) strains which were not presented in the evaluation panel of PNA FISH kit (5 *C.kefyr*, 2 *C.guilliermondii* and 1 *C.lusitaniae*), gave no fluorescence and determined as other *Candida* spp. According to this, when the species that could be detected with the kit (*C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.krusei* and *C.tropicalis*) were considered, the concordance rate with the conventional methods was determined as 97.6% (41/42) and the total evaluation rate for all the species was 84% (41/50). In conclusion, the most frequent isolated species from blood cultures in our hospital was *C.albicans*, followed by *C.glabrata* and *C.parapsilosis*. Since PNA FISH testing is a practical, reliable and rapid (resulted in 90 minutes) method for the identification of *Candida* strains at species level isolated from blood cultures, it was thought to be useful in routine laboratories. However, further comparative studies are required with large number of strains with the consideration of cost-effectiveness.

Keywords: *Candida*; identification; peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization; PNA FISH; candidemia.

GİRİŞ

Candida türleri, insanlarda görülen en yaygın fungal patojenlerdir. Bumikroorganizmalar, invazif olmayan yüzeysel enfeksiyonlardan, derin dokuları tutan enfeksiyonlara kadar geniş hastalık spektrumuna sahiptirler¹. Tüm nozokomiyal fungal enfeksiyonlar arasında *Candida* türlerine bağlı enfeksiyonlar %80 olarak bildirilmekte ve kan kültürlerinden izole edilen etkenler arasında dördüncü sırada bulunmaktadırlar^{2,3}. Mantar enfeksiyonlarının, yoğun bakım biriminde hastane kaynaklı dolaşım sistemi enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan etkenler arasında *Candida* türlerinin bulunduğu, etken olarak sırasıyla *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis*'in izole edildiği bildirilmiştir⁴. Bir başka raporda ise, üç yıllık süre içinde çok merkezli hastane kaynaklı dolaşım sistemi enfeksiyonlarında, *Candida* türlerinin %7.6 oranında etken mikroorganizmalar arasında bulunduğu vurgulanmaktadır⁵. Ayrıca aynı çalışmada, *Candida* enfeksiyonlarının mortalite oranının yüksek olduğu ve en sık karşılaşılan türlerin *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis* olduğu saptanmıştır⁵.

Kan kültürlerinden mayaların tanımlanması 1-4 gün gibi uzun süre almaktadır. Bu nedenle hızlı tanı sağlayabilen, özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek laboratuvar yöntemlerine ihtiyaç vardır. Son yıllarda özellikle hızlı tanı için moleküler yöntemler geliştirilmiştir^{6,7}. Yapılan çalışmalarda, pozitif kan kültürlerinde *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.glabrata* ve *C.krusei*'nin tanımlanması için tasarlanmış, FDA onayı almış peptid nükleik asit floresan in situ hibridizasyon (PNA FISH) (Yeast Traffic Light® PNA FISH, AdvanDx) yönteminin kullanılabileceği bildirilmektedir^{7,8-12}. Bu çalışmada, kan kültürlerinde üreyen *Candida* türlerinin tanımlanmasında, PNA FISH yöntemin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Temmuz 2011 - Temmuz 2012 tarihleri arasında, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri kliniklerinde sistemik mantar enfeksiyonu ön tanısıyla takip edilen ve kan kültüründe maya üreyen 50 hasta alındı. Hastaların yaşı, cinsiyeti, altta yatan hastalığı ve yattığı servis gibi demografik bilgileri kaydedildi.

Kan kültürleri Bact/Alert 3D otomatize sistemi (bioMerieux, Fransa) ile değerlendirildi. Çocuklar için BacT/Alert PF Pediatric FAN ve erişkinler için BacT/Alert FA FAN® Aerobic şişeleri (bioMerieux, Fransa) kullanıldı. Cihazda üreme sinyali veren şişelerden Gram boyama sonucu maya olarak tanımlanan kan kültürü örnekleri toplandı. Kan kültürü şişelerinden öncelikle Sabouraud dekstroz agara (SDA) ekim yapıldı. Standart suş olarak *C.albicans* ATCC 90028 kullanıldı.

Kan kültürlerinde üreyen *Candida* suşlarının tanımlanmasında; makroskopik ve mikroskopik morfolojisi, çimlenme borusu testi, siklohekzimid hassasiyeti, üreaz testi, API 20C AUX (bioMerieux, Fransa) karbonhidrat asimilasyonu testi kullanıldı¹³.

PNA FISH (Yeast Traffic Light® PNA FISH, AdvanDx, ABD) yönteminin uygulanmasında; kan kültürü şişesinden alınan 10 µl örnek, bir lam üzerine konulan bir damla tespit solüsyonu ile hafifçe karıştırıldı ve metanol ile tespit edildi. Tespit edilen lamların üzerine

bir damla hibridizasyon probu damlatıldı. Lamalar 55°C'de, önceden ısıtılmış yıkama solüsyonunda 30 dakika boyunca bekletildi ve sonra çıkartılarak dışarıda kuruması sağlandı. Üzerine bir damla destek (mounting) sıvısından eklendi; lamelle kapatıldı ve floresan mikroskopta çift bant filtresi (AdvanDx, ABD) takılarak 40-100X büyütmede incelendi. Değerlendirmede; yeşil renkte floresan verenler *C.albicans* ve *C.parapsilosis*, kırmızı floresan verenler *C.glabrata* ve *C.krusei*, sarı floresan verenler ise *C.tropicalis* olarak kabul edildi.

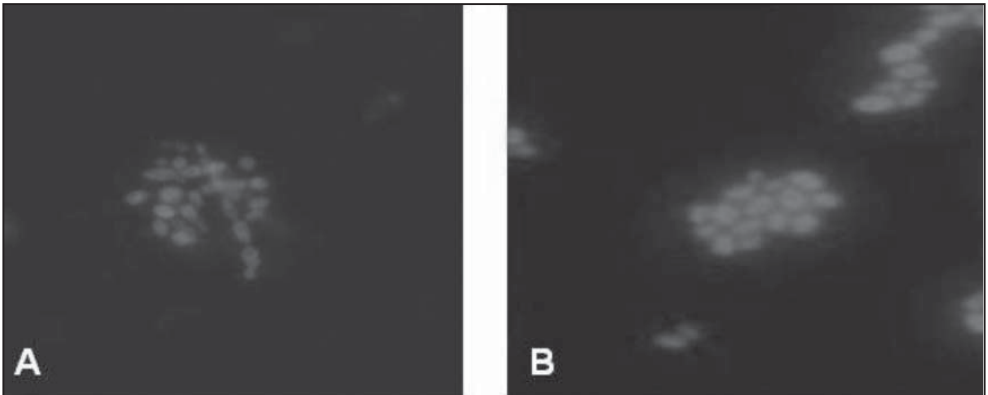
BULGULAR

Konvansiyonel (morfolojik ve biyokimyasal) yöntemler ile, kan kültürlerinden izole edilen 50 *Candida* suşunun %38'i *C.albicans*, %24'ü *C.glabrata*, %10'u *C.parapsilosis*, %10'u *C.kefyr*, %8'i *C.krusei*, %4'ü *C.guilliermondii*, %4'ü *C.tropicalis* ve %2'i *C.lusitaniae* olarak tanımlanmıştır.

PNA FISH yöntemiyle; yeşil renkli floresan veren 24 (%48) suş *C.albicans* veya *C.parapsilosis*, kırmızı renkli floresan veren 16 suş *C.glabrata* ve *C.krusei*, sarı renkli floresan veren bir suş ise *C.tropicalis* olarak değerlendirilmiştir (Resim 1) (Tablo I). *C.albicans* olarak tanımlanan bir *C.tropicalis* suşu dışındaki suşların uyumlu sonuç verdiği izlenmiştir (41/42; %97.6) (Tablo I). Floresan vermeyen 8 suş ise diğer *Candida* türleri olarak değerlendirilmiştir. Buna göre PNA FISH'in değerlendirme panelinde olmayan 5 *C.kefyr*, 2 *C.guilliermondii* ve 1 *C.lusitaniae* suşu tanımlanamamıştır. *C.albicans* ATCC 90028 standart suşu PNA FISH yöntemiyle yeşil renkli floresan vermiştir.

TARTIŞMA

Sistemik kandidozun sıklığı gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Bunlar içinde en önemli klinik gösterge kandidemidir. Kandidemi, zor tanı konulan, sistemik tedavi gerektiren, hastanede kalış süresini uzatan ve sıklıkla ölümlü sonuçlanan bir enfeksiyondur¹⁴. Kandidemiye en sık *C.albicans* türü neden olsa da, diğer *Candida* türleri de yaygın etken olarak görülmektedir¹⁵. Lockhard ve arkadaşları¹⁶ 2329 kan kültürü ile yaptıkları



Resim 1. PNA FISH yöntemiyle; yeşil renkli floresan veren *C.albicans* (A) ve kırmızı renkli floresan veren *C.glabrata* (B) görülmektedir.

Tablo I. Candida suşlarının tanımlanmasında her iki yöntemle alınan sonuçlar

Suş Sayısı	Olgu sayısı (%)	
	Konvansiyonel yöntemler	PNA FISH*
19	<i>C.albicans</i>	Yeşil
12	<i>C.glabrata</i>	Kırmızı
5	<i>C.parapsilosis</i>	Yeşil
5	<i>C.kefyr</i>	-
4	<i>C.krusei</i>	Kırmızı
2	<i>C.guilliermondii</i>	-
1	<i>C.tropicalis</i>	Yeşil**
1	<i>C.tropicalis</i>	Sarı
1	<i>C.lusitaniae</i>	-

* Bu yöntemde yeşil renk *C.albicans* ve *C.parapsilosis*; kırmızı renk *C.glabrata* ve *C.krusei*; sarı renk ise *C.tropicalis*'i ifade etmektedir.
** Uyumsuz sonuç.
(-) Yöntemin değerlendirme panelinde bulunmayan türler.

çalışmada; izole edilen *Candida* türlerini sıklık sırasına göre; *C.albicans* (%38), *C.glabrata* (%29), *C.parapsilosis* (%17) ve *C.tropicalis* (%10) olarak bildirmişlerdir. İtalya'da yapılan, 462 kandidemi epizotunun incelendiği çok merkezli bir çalışmada; en sık izole edilen türün *C.albicans* (%49.2) olduğu, bunu *C.parapsilosis* (%26.2) ve *C.glabrata* (%10.4) türlerinin izlediği rapor edilmiştir¹⁷. Aynı çalışmada 2000-2013 yılları arasında Avrupa'da yapılan çalışmalar değerlendirilmiş; Fransa, İngiltere ve Kuzey Avrupa'da *C.glabrata*; Türkiye, İspanya ve Yunanistan'da ise *C.parapsilosis* türünün en yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir¹⁷. Gültekin ve arkadaşları¹⁸ kan kültürlerinden en fazla izole edilen türün *C.albicans* olduğunu, ikinci sıklıkta ise *C.parapsilosis*'in görüldüğünü ifade etmişlerdir. Diğer bazı çalışmalarda, kan kültüründe *C.guilliermondii*, *C.krusei* ve *C.famata* türlerine de rastlanmıştır^{18,19}. Bizim çalışmamızda, 50 adet kan kültüründen en sık izole edilen tür *C.albicans* (%38) olmuş, bunu *C.glabrata* (%24), *C.parapsilosis* (%10) ve *C.kefyr* (%10), *C.krusei* (%8), *C.guilliermondii* (%4), *C.tropicalis* (%4) ve *C.lusitaniae* (%2) izlemiştir.

Enfeksiyon hastalıklarının erken tanısında, kültür gibi klasik yöntemler altın standart olarak önemini korumakla birlikte, birçok etkeninin tanımlanmasında yetersiz kalmaktadır. Çoklu dirençli mantarlarla oluşan enfeksiyonlarda, etken türünün hızla belirlenip tedaviye erken başlanması hayati önem taşımaktadır. Ancak klasik yöntemlerle bu süreç uzun zaman almaktadır. Moleküler yöntemler bu süreci azaltmakta, ayrıca üremesi güç olan ve zaman alan mantarların tanımlanmasında da önem taşımaktadır^{6,7}. FISH yöntemi ile, kültür ve fenotipik özelliklerin belirlenmesine gerek kalmadan etken mikroorganizmanın tanısı kısa sürede yapılabilmektedir. Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan bu yöntemin, pratik ve kolay olmasının yanı sıra yaklaşık 90 dakika gibi kısa bir sürede tür düzeyinde tanımlamaya olanak sağlaması önemli avantajlardır^{8,9}. Bu yöntemin, kan kültürlerinden *Candida* türlerinin doğru ve hızlı tanımlanmasında ve kandidemi ile ilgili mortalite ve morbiditeyi azaltacak etkin antifungal tedavinin uygulanmasında önemli olduğu rapor edilmiştir¹⁰⁻¹². FISH yöntemiyle, direkt kan kültürlerinde belirlenebilen *Candida* türleri;

literatürde ve bu çalışmada da belirlediği gibi, sık karşımıza çıkan *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.krusei* ve *C.tropicalis* türlerdir. Çalışmamızda, PNA FISH yöntemi, bu türlerden oluşan 42 adet izolatın 41'ini doğru olarak tanımlamış ve konvansiyonel yöntemlerle uyumu %97.6 olarak bulunmuştur. Buna karşın kit değerlendirme prosedürüne göre toplam tanımlama oranı %84 (41/50) olmuştur. Testin performansı değerlendirildiğinde; PNA FISH yöntemiyle bir *C.tropicalis* suşu *C.albicans* olarak tanımlanmış; kit panelinde yer almayan üç türe ait sekiz izolat (5 *C.kefyr*, 2 *C.guillermoidii* ve 1 *C.lusitaniae*) ise tanımlanamamıştır.

Stone ve arkadaşları⁸, 54 klinik izolatla yaptıkları çalışmada, mayalarla süspansiyon hazırlayarak negatif kan kültürü şişelerine inoküle etmiş, inkübasyon sonucunda PNA FISH yönteminin duyarlılığını, *C.albicans/C.parapsilosis* için %100, *C.glabrata/C.krusei* için %92.3 ve *C.tropicalis* için %100 olarak bulmuşlardır. Çeşitli çalışmalarda da, PNA FISH yönteminin hızlı, kolay uygulanabilir ve tanımlama süresini önemli ölçüde azaltabilecek bir yöntem olduğu rapor edilmiştir^{9,10}. Lakner ve arkadaşlarının¹¹, 110 klinik izolat kullanarak yaptıkları çalışmada, fenotipik yöntemlerle PNA FISH yöntemi karşılaştırılmış ve PNA FISH yönteminin duyarlılığı %100 olarak bulunmuştur. Yapılan bir diğer çalışmada, PNA FISH yönteminin performansı, 17 periton ve 103 kan kültürü örneğinde değerlendirilmiş; kitin değerlendirme panelinde olmayan suşların ve bir *C.albicans* suşunun tanımlanamadığı bildirilmiştir¹². Amerika'da 216 ve İngiltere'de 50 pozitif kan kültürü kullanılarak yapılan çalışmalarda ise, yöntemin tanımlama doğruluğu bizim çalışmamızda da olduğu gibi %96 olarak bulunmuştur^{7,16}.

Sonuç olarak, hastanemizde kan kültürlerinden en sık izole edilen türler, PNA FISH yönteminin tanımlama yapabildiği (*C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.krusei* ve *C.tropicalis*) türlerdir. Bu nedenle, kan kültürlerinden *Candida* türlerinin tanımlanmasında, PNA FISH yönteminin kolay, doğru ve güvenle kullanılabilir olduğu kanısına varılmıştır. Bu yöntem ayrıca, 90 dakika gibi kısa bir sürede tanımlama yapabildiğinden, rutin laboratuvarlarda kullanılmasının faydalı olabileceği düşünülmektedir. Buna karşın, daha fazla sayıda suş kullanılarak ve maliyet analizi yapılarak gerçekleştirilecek karşılaştırmalı ileri çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Verduyn Lunel FM, Meis JF, Voss A. Nosocomial fungal infections: candidemia. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34(3): 213-20.
2. Singh N. Changing spectrum of invasive candidiasis and its therapeutic implications. Clin Microbiol Infect 2001; 7 Suppl 2: 1-7.
3. Beck-Sague C, Jarvis WR. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. J Infect Dis 1993; 167(5): 1247-51.
4. Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, et al. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. Clin Infect Dis 1999; 29(2): 253-8.
5. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. Clin Infect Dis 1999; 29(2): 239-44.

6. Meletiadiş J, Arabatzis M, Bompola M, et al. Comparative evaluation of three commercial identification systems using common and rare bloodstream yeast isolates. *J Clin Microbiol* 2011; 49(7): 2722-7.
7. Gorton RL, Ramnarain P, Barker K, et al. Comparative analysis of Gram's stain, PNA-FISH and Sepsityper with MALDI-TOF MS for the identification of yeast direct from positive blood cultures. *Mycoses* 2014; 57(10): 592-601.
8. Stone NR, 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* 2013; 51(4): 1301-2.
9. Da Silva RM Jr, Da Silva Neto JR, Santos CS, et al. Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the detection of fungi directly from blood cultures and cerebrospinal fluid from patients with suspected invasive mycoses. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2015; 14:6.
10. Gherna M, Merz WG. Identification of *Candida albicans* and *Candida glabrata* within 1.5 hours directly from positive blood culture bottles with a shortened peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization protocol. *J Clin Microbiol* 2009; 47(1): 247-8.
11. Lakner A, Essig A, Frickmann H, Poppert S. Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the identification of *Candida albicans* in comparison with three phenotypic methods. *Mycoses* 2012; 55(3): e114-23.
12. Harris DM, Hata DJ. Rapid identification of bacteria and *Candida* using PNA-FISH from blood and peritoneal fluid cultures: a retrospective clinical study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013; 12:2.
13. Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance, p: 1762. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), *Manual of Clinical Microbiology*. 2007, 9th ed. ASM Press, Washington D.C.
14. Das I, Nightingale P, Patel M, Jumaa P. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. *Int J Infect Dis* 2011; 15(11): e759-63.
15. 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* 2004; 23(4): 317-22.
16. Lockhart SR, Iqbal N, Cleveland AA, et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. *J Clin Microbiol* 2012; 50(11): 3435-42.
17. Montagna MT, Lovero G, Borghi E, et al. Candidemia in intensive care unit: a nationwide prospective observational survey (GISIA-3 study) and review of the European literature from 2000 through 2013. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18(5): 661-74.
18. Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y, Kırdar S, Aydın M. Investigation of antifungal susceptibilities and some virulence factors of *Candida* strains isolated from blood cultures and genotyping by RAPD-PCR. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(2): 306-17.
19. Hall L, Le Febvre 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* 2012; 50(4): 1446-8.