

PNA-FISH Yönteminin Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Direkt Tanımlanması ve Antifungal Tedavi Planına Olası Etki Yönünden Değerlendirilmesi*

Evaluation of PNA-FISH Method for Direct Identification of *Candida* Species in Blood Culture Samples and Its Potential Impact on Guidance of Antifungal Therapy

Özlem DOĞAN¹, Ahmet Çağkan İNKAYA², Dolunay GÜLMEZ¹, Ömrüm UZUN², Murat AKOVA², Sevtap ARIKAN AKDAĞLI¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Hacettepe University Medical School, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Hacettepe University Medical School, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma, Febril Nötropeni Kılavuz Toplantısı (29-30 Mart 2014, Ankara)'nda poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 26.07.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 18.10.2016

ÖZ

Kandidemili olgularda en kısa sürede uygun tedavinin başlanması, sağkalımı etkilemekte ve patojenin tür düzeyinde erken tanımlanması, *Candida* türlerinde görülen türe özgü primer direnç ve değişken antifungal duyarlılık profilleri nedeniyle önem taşımaktadır. Son yıllarda moleküler temelli yeni yöntemler, kan kültüründe pozitif sinyalin alınmasıyla etkenin konvansiyonel yöntemlerle tanımlanması arasında kaybedilen zamanı azaltmaya çalışmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan PNA-FISH (Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization), sık izole edilen bazı *Candida* türlerinin kan kültüründe üremesini takiben, gruplar halinde ayırt edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Bu çalışmanın amacı, maya üreyen kan kültürlerinde PNA-FISH yöntemiyle hızlı tür tanımlamasının konvansiyonel tanımlama yöntemleriyle uyumunun ve antifungal tedavi seçimine etkisinin araştırılmasıdır. Çalışmaya Ağustos-Aralık 2013 tarihlerinde pozitif sinyal alınan kan kültürlerinden Gram boyama yöntemiyle maya saptanan erişkin olgulara ait örnekler alınmıştır. Şişelerden eş zamanlı olarak "Yeast Traffic Light" PNA-FISH yöntemiyle hızlı tür tanımlaması ile katı besiyerine ekim ve üreme sonrası konvansiyonel yöntemlerle tanımlama (germ tüp testi, ID32C ve mısır unlu Tween 80 ağarda morfolojik inceleme) yapılmıştır. "Yeast Traffic Light" PNA-FISH yöntemiyle,

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Dolunay Gülmez, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sıhhiye 06100, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 305 1562, **E-posta (E-mail):** dolunayglm@gmail.com

belirlenmiş prensipler çerçevesinde, *Candida albicans* ve *Candida parapsilosis* için yeşil, *Candida tropicalis* için sarı, *Candida krusei* ve *Candida glabrata* için kırmızı renkte floresans saptanmış; en sık gözlenen beş *Candida* türünden *C.tropicalis* için tek tür olarak, diğer türler için ikili gruplar halinde hızlı tür tanımlaması yapılmıştır. Maya pozitif kan kültürünün mikoloji laboratuvarına ulaştığı, PNA-FISH sonucunun elde edildiği ve konvansiyonel yöntemle tür düzeyinde tanımlamanın sonuçlandığı zamanlar kaydedilmiştir. Konvansiyonel tanımlama yöntemleriyle 23 örnekten yedisinde *C.albicans*, altısında *C.glabrata*, üçünde *C.parapsilosis*, birinde *C.tropicalis*, birinde *C.krusei*, birinde *Cryptococcus neoformans*, birinde *Saprochaete capitata* (*Blastoschizomyces capitatus*), birinde *C.albicans* ve *Candida dubliniensis*, birinde *C.krusei* ve *C.dubliniensis*, birinde *C.glabrata* ve *C.parapsilosis* tanımlanmıştır. PNA-FISH ve konvansiyonel tanımlama yöntemi sonuçları karşılaştırıldığında, 23 örnekten 19'unda (%82.6) iki yöntemin uyumlu olduğu gözlenmiştir. PNA-FISH ile negatif sonuç alınan iki örnekte, test panelinde olmayan *S.capitata* ve *C.neoformans* üremiştir. Kültürde birden fazla tür üremesi olan üç örnekte, PNA-FISH yöntemiyle ancak bir tür maya saptanabilirken, bir örnekte konvansiyonel yöntemle tanımlanamayan ikinci bir tür PNA-FISH yöntemiyle (*C.glabrata* veya *C.krusei*) bulunmuştur. PNA-FISH ile konvansiyonel yöntemden ortalama 72 saat önce tür tanımlaması yapılabilmektedir. Etken türlerin doğru tanımlanması yönünden, PNA-FISH'in geleneksel yöntemlerle uyumlu sonuçlar verdiği, ancak beklendiği gibi, test panelinde bulunmayan türlerin saptanmasında yetersiz kaldığı gözlenmiştir. Çalışma süresince örnekleri değerlendirilen 23 hastanın 13'ü kaybedilmiştir. Kan kültürü pozitifliği saptanmadan önce kaybedilen altı ve servis izleminde tedavi başlanamayan bir olgu dışında, 16 olgu antifungal tedavi almıştır. Cins ve tür tanımlaması öncesi 10 hastada ekinokandin, beş hastada flukonazol, bir hastada ise flukonazol ve amfoterisin B kombinasyonu tercih edilmiştir. Bu çalışmada, PNA-FISH sonucu tek bir olguda klinik tablo ile birlikte tedavi değişikliğinin yapılmasında rol oynamıştır. PNA-FISH kitinin yararının merkezimizde sık izole edilen iki *Candida* türü olan *C.albicans* ve *C.parapsilosis*'i ayırt edememesi nedeniyle sınırlanmış olabileceği ve kandidemi etkeni olarak *C.glabrata*'nın daha sık gözlemlendiği merkezlerde avantajlarının ön plana çıkabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: PNA-FISH; *Candida*; antifungal tedavi; kandidemi; kan kültürü.

ABSTRACT

Early antifungal therapy has a major influence on survival in candidemia. Rapid identification of the species has importance for the treatment, prediction of the species-specific primary resistance and variable antifungal susceptibility. Recently, molecular-based methods attempt to reduce the time between the positive signal of a blood culture and identification of the fungus. PNA-FISH (Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization) assay distinguishes a number of frequently isolated *Candida* species in groups following the growth in blood culture. The aim of this study was to investigate the correlation of the species identified by PNA-FISH with conventional identification methods in yeast positive blood cultures and its influence on the selection of antifungal therapy. Specimens of adult patients diagnosed as yeast with Gram stain in signal-positive blood cultures between August to December 2013, were included in the study. The strains were concomitantly cultivated by subculturing from the blood culture bottles onto solid media and identified by conventional methods (germ tube test, ID32C and morphology on cornmeal Tween 80 agar). Rapid species identification was performed by Yeast Traffic Light PNA-FISH, which generates green fluorescence for *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*, yellow for *Candida tropicalis*, and red for *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *C.tropicalis* was identified as a single species whereas the others were identified in pairs. The time points when the yeast positive blood culture bottle was received by the mycology laboratory and reporting of the species identification results by PNA-FISH and the conventional methods were recorded. Seven *C.albicans*, six *C.glabrata*, three *C.parapsilosis*, one *C.tropicalis*, one *C.krusei*, one *Cryptococcus neoformans*, one *Saprochaete capitata* (*Blastoschizomyces capitatus*), one *C.albicans* and *Candida dubliniensis*, one *C.krusei* and *C.dubliniensis*, and one *C.glabrata* and *C.parapsilosis* were identified by conventional methods in 23 specimens. Results of PNA-FISH and conventional methods were in full agreement in 19 of the 23 specimens (82.6%). Two specimens were negative by PNA-FISH and yielded *S.capitata* and *C.neoformans* which were not included in the test

panel. In three specimens that were infected with multiple species, PNA-FISH detected only one of the species. On the other hand and in one specimen, PNA-FISH detected a second species (*C.glabrata* or *C.krusei*) that could not be isolated and identified conventionally. Species identification were obtained 72 hours (mean) earlier with PNA-FISH. PNA-FISH provided accurate species identification that were consistent with conventional methods. However and expectedly, it failed to detect species that were not included in the test panel. During the study period, 13 of the 23 patients have passed away. Apart from six patients died prior to blood culture positivity and the one that could not get any antifungal therapy during hospital stay, 16 patients received antifungal treatment. Of sixteen patients who received antifungal therapy, initial antifungal treatment was fluconazole for five and echinocandin for 10 patients. Fluconazole and amphotericin B combination was preferred for one patient. In this study, PNA-FISH result had an influence on the modification of the antifungal treatment of only for one patient in accordance with the clinical findings. We conclude that the utility of PNA-FISH method appeared to be limited in our center since the assay cannot differentiate *C.albicans* and *C.parapsilosis*, the two commonly isolated species among our candidemia isolates. However, advantages of the assay might be more pronounced for the centers where *C.glabrata* is a relatively more frequent species.

Keywords: PNA-FISH; *Candida*; antifungal therapy; candidemia; blood culture.

GİRİŞ

Candida türleri, kan dolaşımı enfeksiyonlarında dördüncü en sık etken olarak saptanmaktadır¹. Birçok merkezde *Candida albicans* en sık izole edilen tür olmakla beraber, bazı merkezlerde son yıllarda *C.albicans* dışı *Candida* türlerinin fungemi etkeni olarak saptanma sıklığında artış gözlenmektedir². Bunlar arasında genelde en sık izole edilenler, sıralamaları merkezler arasında değişiklik göstermekle birlikte, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* ve *Candida krusei*'dir. *C.albicans* ile birlikte bu beş tür, tüm kandidemilerin %90'a yakınında etken olarak saptanmaktadır³⁻⁶. Kandidemi olgularında uygun tedavinin erken dönemde başlaması, mortalite oranını etkilemekte, sağ kalımı anlamlı ölçüde değiştirmektedir⁷⁻⁹. Kandidemilerde zaman kaybetmeksizin uygun antifungal tedavinin başlanabilmesi için hızlı tanımlama ya da tanı yöntemleri öncelik kazanmıştır. Bu amaçla, etkenin kan kültüründe pozitif sinyal vermesinden önce sistemik *Candida* enfeksiyonu belirteci olarak serolojik yöntemler (β -glukan, mannan-antimannan, germ tüp antikorlu saptanması) önerilmiş ve pozitif kan kültürlerinden katı besiyerlerinde üretmeden doğrudan tür tanımlaması yapılabilmesi amacıyla floresan in situ hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu ve dizi analizi veya MALDI-TOF MS ("matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry") yöntemleri ile çalışmalar yapılmıştır¹⁰⁻¹².

"Yeast Traffic Light" PNA-FISH (Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization) (AdvanDx, Woburn, ABD), pozitif sinyal verdikten sonra mikroskopik inceleme ile maya hücreleri gözlenen kan kültürü şişelerinde, tür grupları düzeyinde hızlı tanımlama yapabilmek amacıyla tasarlanmış, floresan ile işaretli türe özgül peptid nükleik asit problemlerinin kullanıldığı ticari bir sistemdir. Yöntem, en sık izole edilen beş farklı *Candida* türünün (*C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.glabrata* ve *C.krusei*), flukonazol için belirlenmiş türe özgül duyarlılık profillerine göre üç grupta toplanacak biçimde üç farklı renkte (ye-

şil, sarı, kırmızı) saptanması esasına dayanmaktadır. Bu testle, flukonazole olası duyarlı izolatları erken belirleyerek antifungal tedavinin yönlendirilmesi sağlanmaktadır. Bu çalışmanın amacı, kan kültüründe maya saptanan olgularda PNA-FISH yöntemiyle hızlı tür tanımlamasının, konvansiyonel tanımlama yöntemleriyle uyumunun ve antifungal tedavi seçimine etkisinin araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya Alınan Örnekler

Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Klinik Patoloji Laboratuvarı'na Ağustos-Aralık 2013 tarihleri arasında gönderilen kan kültürlerinden, maya üreyen erişkin hastalara ait örnekler çalışmaya alındı. Kan kültürleri aerobik şişelere alındı ve otomatize BacT/ALERT 3D sisteminde (BioMerieux, Fransa) inkübe edildi. Pozitif sinyal alınan şişelerden Gram boyama yöntemiyle mikroskopik inceleme yapıldı ve maya saptanan şişeler ileri tanımlama işlemleri için Mikoloji Laboratuvarı'na iletildi. Mikoloji laboratuvarında bu şişelerden alınan örnekten "Yeast Traffic Light" PNA-FISH kiti ile hızlı tanımlama yapıldı. Eş zamanlı olarak, şişelerden alınan örnekten ekim de yapılarak üreyen mayalar konvansiyonel yöntemlerle tanımlandı.

Konvansiyonel Yöntemlerle Tür Tanımlaması

Mikroskopik olarak maya görülen kan kültürü şişesinden Sabouraud dekstroz agar (Acumedia, Neogen, ABD) ve *Candida* kromojenik besiyerine (HiMedia, Hindistan) ekim yapıldı. Üreyen maya mantarlarının tanımlanması için germ tüp testi, 45°C'de üreme özelliği, kromojenik besiyerinde renk oluşumu, mısır unlu tween 80 besiyerinde morfolojik görünüm ve ID32C kiti (BioMérieux, Fransa) ile elde edilen asimilasyon profilleri kullanıldı¹³. Tür düzeyinde tanımlanan maya mantarı sonucu ivedilikle bildirildi. Örneđin mikoloji laboratuvarına ulaştığı ve konvansiyonel yöntem ile tür tanımlamasının tamamlanarak sonucun bildirildiği zaman kaydedildi.

PNA-FISH Yöntemi

Maya pozitif kan kültürü şişelerinden hızlı olası tür tanımlaması yapmak amacıyla, "Yeast Traffic Light" PNA-FISH kiti (AdvanDx, Woburn, ABD) kullanıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda fiksasyon için 20 dakika, PNA problemlerinin bağlanması için 30 dakika ve özgül olmayan bağlanmaların giderilmesi için 30 dakikalık yıkama süresini takiben, toplamda yaklaşık 90 dakikalık bir işlemin ardından hazırlanan preparatlar floresan mikroskopta incelendi. Mikroskopta gözlenen maya hücreleri yeşil ise *C.albicans* veya *C.parapsilosis*, sarı ise *C.tropicalis*, kırmızı ise *C.krusei* veya *C.glabrata* olarak değerlendirildi. Maya hücrelerinde floresan boyanma olmamışsa adı geçen beş *Candida* türü dışında maya mantarı üremesi olarak değerlendirildi. Her çalışmaya pozitif ve negatif kontroller dahil edildi. Değerlendirme, iki uzman doktor tarafından gerçekleştirildi. PNA-FISH yöntemi ile sonuç alınır alınmaz, elde edilen tür tanımlaması bildirildi ve bildirim zamanı not edildi.

PNA-FISH Yöntemi ile Hızlı Tür Tanımlamasının Antifungal Tedavinin Yönlendirilmesine Etkisi

Çalışmaya alınan her olgu için, kan kültüründe pozitif sinyal alınmasını takiben mikroskopik olarak maya görülmesi üzerine başlanan antifungal ilaç, varsa izlemindeki antifungal tedavi değişikliği ve bu değişikliğin PNA-FISH sonucu ile ilişkisi ve klinik sonuç kaydedildi.

Sonuçların Analizi

Çalışmaya alınan örneklerde, PNA-FISH yöntemi ile elde edilen sonuçlar, rutinde kullanılan konvansiyonel tür tanımlama yöntemleriyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. Aynı zamanda PNA-FISH ile tanımlama ve konvansiyonel tanımlama arasındaki zaman farkı araştırıldı. Bu örneklerin izole edildiği olgularda, PNA-FISH yöntemi ile hızlı tür tanımlamasının, antifungal tedavi değişimine etkisi değerlendirildi.

BULGULAR

PNA-FISH ve Konvansiyonel Tanımlama Yöntemleri Arasındaki Uyumun Değerlendirilmesi

Çalışmaya, kan kültürlerinde maya saptanan 23 örnek dahil edilmiş; bunların 19'unda (%82.6) PNA-FISH ile konvansiyonel yöntem, birbiriyle uyumlu ve pozitif sonuç vermiştir (Tablo I).

İki örnekte (no. 7 ve 8), PNA-FISH ile negatif sonuç saptanmıştır. Bu örneklerde etken mantarlar konvansiyonel yöntemler ile *Saprochaete capitata* (*Blastoschizomyces capitatus*) ve *Cryptococcus neoformans* olarak tanımlanmıştır. Bu mantarlar PNA-FISH test panelinde bulunmadıkları için, negatif sonuç alınması beklenen bir bulgudur ve yöntemlerin uyumlu olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Üç örnekte, konvansiyonel yöntemle iki, PNA-FISH yöntemi ile ise tek maya türü saptanabilmiştir: (1) 3 no'lu örnekte PNA-FISH yöntemi ile sadece yeşil floresans saptanmış ve tanımlama *C.albicans* veya *C.parapsilosis* olarak yapılmıştır. Ancak, konvansiyonel yöntem ile bu örnekte *C.parapsilosis* ile birlikte *C.glabrata* da saptanmıştır. Bu örnekte PNA-FISH *C.glabrata* varlığını gösterememiştir. (2) 10 no'lu örnekte PNA-FISH sadece *C.albicans* veya *C.parapsilosis* tanımlaması yapabilmiş, kültürde *C.albicans* ve *C.dubliniensis* birlikte üretilmiştir. (3) 23 no'lu örnekte PNA-FISH ile sadece *C.glabrata* veya *C.krusei* tanımlaması yapılabilmişken, konvansiyonel yöntem ile *C.krusei* ile eş zamanlı olarak *C.dubliniensis* izole edilmiştir.

Bir örnekte (no 18) ise, PNA-FISH yöntemi ile iki, konvansiyonel yöntemle bir tür saptanabilmiştir. Bu örnekte PNA-FISH ile iki farklı renkte floresans veren maya hücreleri net olarak gözlenmiş, *C.glabrata* veya *C.krusei* ve *C.tropicalis* sonucu verilmiş, ancak kültürde sadece *C.tropicalis* üretilmiştir.

PNA-FISH Yöntemi ile Hızlı Tür Tanımlamasının Antifungal Tedavinin Yönlendirilmesine Etkisi

PNA-FISH ile konvansiyonel yöntem arasında tanımlama zamanı açısından ortalama 72 saat fark olduğu saptanmıştır. Çalışmaya alınan olgulara, cins ve tür düzeyinde tanımlama öncesi başlanan antifungal tedavi, tedavinin değiştirilme durumu ve olguların klinik seyri Tablo I'de özetlenmiştir. Çalışma süresince takip edilen 23 hastanın 13'ü kaybedilmiştir. Bu hastaların 6'sı (9, 11, 15, 17, 19 ve 23 no.'lu hastalar) kan kültüründe pozitif üreme sinyali ortaya çıkmadan önce kaybedilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 23 hastadan 16'sı (kan kültürü pozitifliği saptanmadan önce kaybedilen altı hasta ve servis izleminde tedavi başlanamayan 12 no.'lu olgu dışında kalanlar) antifungal tedavi almıştır. Antifungal tedavi olarak 5 hastada flukonazol, 10 hastada ekinokandin (8'inde kaspofungin, 2'sinde anidulafungin), bir hastada (7 no.'lu hasta, *C.neoformans* izolasyonu) ise flukonazol ve amfoterisin B kombinasyonu tercih edilmiştir.

Çalışmaya alınan olgulardan 4'ünde başlangıç antifungal tedavisinde değişikliğe gidilmiş, ancak bu olguların yalnızca birinde bu değişiklik klinik bulgularla birlikte PNA-FISH sonucu nedeniyle gerçekleşmiştir: (1) Üç hastada (2, 6 ve 16 no.'lu hastalar) klinik durumunun stabil hale gelmesi ve belirgin iyileşme gözlenmesi nedeniyle kaspofungin tedavisi flukonazol ile değiştirilmiş, PNA-FISH sonucundan yararlanılmamıştır. (2) 8 no.'lu hastada, PNA-FISH sonucunun negatif çıkmasını takiben flukonazol tedavisi amfoterisin B'ye değiştirilmiştir. Bu değişiklikte; hastanın klinik olarak sepsis tablosunda olması, önceki tedaviye yanıt alınamaması ile PNA-FISH kit panelinde yer almayan bir maya türünün etken olma olasılığı rol oynamıştır. Hastada, PNA-FISH testi ile belirlenemeyen bir maya cinsi olarak *S.capitata* üremiş ve tedavi başarılı olmuştur.

TARTIŞMA

Candida türlerinde antifungal duyarlılık profili değişkenlik göstermektedir. Özellikle invazif enfeksiyonlarda tedavinin yönlendirilmesinde önemli olması açısından, etken *Candida* türünün erken tanımlanması amacıyla farklı yöntemler kullanılarak hızlı testler geliştirilmektedir^{11,12}. Bu yöntemlerden PNA-FISH yöntemi, maya pozitif kan kültürü şişesinden yaklaşık 90 dakika içinde olası türü (genelde gruplar halinde) saptayabilmektedir. Bu çalışmada, etken tür, PNA-FISH yöntemiyle konvansiyonel yöntem göre ortalama 72 saat önce belirlenebilmiştir.

Bugüne dek yapılan çalışmalarda, genellikle PNA-FISH yöntemi ile konvansiyonel yöntemlerle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir¹⁴⁻¹⁶. Türkiye'den yapılan bir çalışmada, konvansiyonel yöntemlerle *C.tropicalis* olarak tanımlanan bir izolatın PNA-FISH ile yeşil floresans verdiği (*C.albicans*/*C.parapsilosis*) bildirilmiştir¹⁷. Bizim çalışmamızda da, örnek sayısı az olmakla birlikte, PNA-FISH yöntemiyle belirlenen türler ile konvansiyonel yöntem sonuçlarının uyumlu olduğu gözlenmiştir (Tablo I).

PNA-FISH yöntemi, ancak kandidemilerde daha sık etken olan beş *Candida* türünü, üç grup halinde tanımlayabilmektedir. Bu nedenle, bizim hastanemizde olduğu gibi, özellikle çok farklı mantar türlerinin fungemi etkeni olabildiği merkezlerde tek başına

Tablo 1. Çalışmaya alınan 23 örnekten PNA-FISH yöntemi ve konvansiyonel yöntem kullanılarak elde edilen tanımlama sonuçları, tanımlama için gereken süreler arasındaki fark, antifungal tedavi seçimleri ve klinik sonuç

No	Kültür Alınma Tarihi	PNA-FISH Sonucu	Konvansiyonel Tanımlama Sonucu	PNA-FISH Sonucu Tarihi	Tanımlama Sonucu Tarihi	Fark (Saat) ¹	Ampirik Antifungal Tedavi	Antifungal Tedavi Değişim	Klinik Sonuç
1	30.08.2013	<i>C. albicans/C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	02.09.2013	04.09.2013	48	Kasopfungin	Hayır	Exitus
2	28.08.2013	<i>C. albicans/C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	02.09.2013	06.09.2013	96	Anidulafungin	Evet, flukonazol	Taburcu edildi
3	07.09.2013	<i>C. albicans/C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i> ve <i>C. glabrata</i>	11.09.2013	13.09.13 ve 27.09.13	48	Flukonazol	Hayır	Taburcu edildi
4	18.09.2013	<i>C. albicans/C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	23.09.2013	24.09.2013	24	Flukonazol	Hayır	Taburcu edildi
5	23.09.2013	<i>C. albicans/C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	24.09.2013	26.09.2013	48	Kasopfungin	Hayır	Exitus
6	10.09.2013	<i>C. albicans/C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	24.09.2013	26.09.2013	48	Kasopfungin	Evet, flukonazol	Taburcu edildi
7	01.10.2013	Negatif	<i>C. neoformans</i>	04.10.2013	08.10.2013	96	Flukonazol + amfoterisin B	Hayır	Exitus
8	06.10.2013	Negatif	<i>S. capitata</i>	08.10.2013	11.10.2013	72	Flukonazol	Evet, amfoterisin B	Taburcu edildi
9	06.10.2013	<i>C. albicans/C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	08.10.2013	10.10.2013	48	Yok	-	Exitus
10	07.10.2013	<i>C. albicans/C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i> ve <i>C. dubliniensis</i>	08.10.2013	11.10.2013	72	Kasopfungin	Hayır	Taburcu edildi
11	28.10.2013	<i>C. glabrata/C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	31.10.2013	05.11.2013	144	Yok	-	Exitus
12	29.10.2013	<i>C. glabrata/C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	01.11.2013	05.11.2013	96	Yok ²	-	Exitus
13	06.11.2013	<i>C. glabrata/C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	08.11.2013	11.11.2013	72	Anidulafungin	Hayır	Exitus
14	12.11.2013	<i>C. glabrata/C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	15.11.2013	20.11.2013	120	Flukonazol ³	Hayır	Exitus
15	23.11.2013	<i>C. albicans/C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	25.11.2013	27.11.2013	48	Yok	-	Exitus
16	22.11.2013	<i>C. albicans/C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	27.11.2013	29.11.2013	48	Kasopfungin	Evet, flukonazol	Taburcu edildi
17	26.11.2013	<i>C. albicans/C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	28.11.2013	29.11.2013	24	Yok	-	Exitus
18	30.11.2013	<i>C. glabrata/C. krusei</i> ve <i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	01.12.2013	03.12.2013	48	Kasopfungin	Hayır	Exitus
19	07.12.2013	<i>C. glabrata/C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>	10.12.2013	13.12.2013	72	Yok	-	Exitus
20	16.12.2013	<i>C. albicans/C. parapsilosis</i>	<i>C. albicans</i>	16.12.2013	19.12.2013	72	Flukonazol ⁴	Hayır	Taburcu edildi
21	24.12.2013	<i>C. glabrata/C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	26.12.2013	31.12.2013	96	Kasopfungin	Hayır	Taburcu edildi
22	26.12.2013	<i>C. albicans/C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	28.12.2013	02.01.2014	120	Kasopfungin	Hayır	Taburcu edildi
23	26.12.2013	<i>C. glabrata/C. krusei</i>	<i>C. krusei</i> ve <i>C. dubliniensis</i>	08.01.2014	11.01.2014	72	Yok	-	Exitus

¹ Hem PNA-FISH uygulamaları hem de konvansiyonel tür tanımlama için asimilasyon reaksiyonları ve misir unlu tween 80 besiyerindeki incelemeler, sadece hafta içi ve mesai saatlerinde yapılmıştır.

² Kasopfungin önerilmiş ancak başlanmamıştır.

³ Olgu kandidüri nedeniyle flukonazol almaktadır. İzleminde kasopfungin de önerilmiş ancak başlanmamıştır.

⁴ Kasopfungin önerilmiş, ancak geri ödemede sorunu nedeniyle flukonazol başlanabilmiştir.

kullanıldığında türün saptanmasında yetersiz kalmaktadır⁵. Bu çalışmada, test panelinde bulunmayan iki maya türü PNA-FISH yöntemiyle beklenen şekilde negatif bulunmuştur.

Kan kültüründe birden fazla maya türünün ürettiği durumlarda, PNA-FISH ile konvansiyonel tanımlama yöntemi arasında uyumsuzluk gözlenmiştir. Üç örnekte konvansiyonel yöntemle iki farklı *Candida* türü izole edilmiş, ancak PNA-FISH ile tek renk gözlenmiştir. Bu örneklerden ikisinde üreyen ikinci tür olan *C.dubliniensis*'in PNA-FISH test panelinde bulunmaması nedeniyle saptanamadığı düşünölmüştür. Ancak, 3 no'lu örnekten izole edilen türlerin (*C.parapsilosis* ve *C.glabrata*) ikisi de test panelinde yer almasına karşın, *C.glabrata* PNA-FISH ile saptanamamıştır. Bir örnekte, PNA-FISH yöntemiyle iki farklı renkte maya hücrelerinin net bir şekilde ayırt edilebilmesine karşın, konvansiyonel yöntemle tek bir tür izole edilebilmiştir. Bu durumun, ikinci türün (*C.glabrata* veya *C.krusei*) kültürde üretilmemesinden kaynaklanabileceği düşünölmüştür.

Bu sonuçların ışığında, birden fazla mantar türünün etken olduğu olgularda PNA-FISH ile etkenlerden birinin atlanabileceği sunucuna varılmıştır. Örneğin, bu çalışmada 3 no.lu örnekte konvansiyonel yöntem ile PNA-FISH ile saptanan *C.parapsilosis*'in yanında, flukonazole duyarlı olmayan *C.glabrata* türüne ait bir suş üretilmiştir. Ayrıca, 10 no'lu örnekte *C.albicans* ile birlikte flukonazole direnç oranları *C.albicans*'a göre daha yüksek olabilen *C.dubliniensis* türüne ait bir suş üremiştir. Bu gibi durumlarda, sadece PNA-FISH sonucu dikkate alınarak antifungal tedavinin flukonazole yönlendirilmesinin, direnç ve tedavi yönünden riskli olabileceği düşünölmüştür¹⁸.

PNA-FISH yönteminin özel ekipman gerektirmekle birlikte kolay uygulanabileceği görölmüştür. Maya hücrelerinde farklı renkte boyanma net şekilde seçilebilmektedir. Ancak, çoğu mikoloji laboratuvarında floresan mikroskop bulunmaması ve floresan mikroskop kullanım deneyimi olmaması, rutin laboratuvarlarda PNA-FISH kullanımını sınırlayabilmektedir.

Merkezimizde, kan kültüründe maya saptanan olgularda, literatürdeki güncel kılavuzlara uygun olarak, tanımlama sonucu çıkana kadar genelde ekinokandin ile tedavi tercih edilmekte, izlemlerinde olguların klinik durumuna göre tedavi flukonazole değiştirilebilmektedir^{19,20}. Maliyet analizi yapılan bir çalışmada, erken dönemde tür ve olası duyarlılık durumu bilgisi sağlanması durumunda, maliyeti daha yüksek olan ekinokandin grubu antifungal ilaçlardan flukonazole geçişin, merkezlere sekonder ekonomik kazanımlar sağlayabileceği öne sürölmüştür¹⁵. Stone ve arkadaşları¹⁶ ise, kan kültürü şişelerine eklenen kandidemi etkeni izolatları PNA-FISH ile değerlendirmiş ve hastaların %29'unda tedavi değişikliği yapılabileceğini öngörmüşlerdir. Ancak özellikle nötropenik hastaların ve komplike olguların sık göröldüğu üçüncü basamak hastanelerde, flukonazol direncinin yüksek olma olasılığı nedeniyle, bu değişiklik dikkatle irdelenmeli, antifungal duyarlılık testi sonuçları beklenmelidir. PNA-FISH yönteminin *C.albicans* ile *C.parapsilosis*'i ayıramadığı düşünöldüğünde, (düşük oranda da olsa) *C.parapsilosis*'te görölebilen azol direnci akılda tutulmalı, merkezler bu konuda kendi antifungal direnç profillerini bilmeksizin ekinokandin/flukonazol değişikliğinden kaçınmalıdır^{21,22}. Bizim çalışmamızda ise yalnızca

bir olguda PNA-FISH sonucunun klinik bulgularla birlikte tedavi değişiminde etkili olduğu görülmüştür. Bu çalışma, PNA-FISH ile erken dönemde maya tür tanımlamasının tedaviye olası etkisini inceleyen Türkiye’den ilk çalışmadır.

Kullanılan “Yeast Traffic Light” PNA-FISH kiti, merkezimizde sık izole edilen iki *Candida* türü olan *C.albicans* ve *C.parapsilosis*’i ayırt edemediğinden, PNA-FISH yönteminin bizim merkezimizde antifungal tedavi seçimini yönlendirmekte anlamlı bir fark yaratamayabileceği de düşünülmüştür. Ancak *C.albicans*, maya pozitif kan kültürü şişelerinden doğrudan germ tüp testi yapılarak da diğer türlerden ayırt edilebilmektedir²³. *C.glabrata*’nın daha sık izole edilen bir kandidemi etkeni olduğu merkezlerde, PNA-FISH kullanımı ile ilgili avantajlar daha ön planda gözlenebilir.

Az sayıda örnek ile yapılan bu çalışmada, PNA-FISH yönteminin maya pozitif kan kültürlerinde tür tanımlamasında başarılı olduğu görülmüştür. Ancak birden fazla tür ile fungemi gelişen olgularda, yöntemler arası uyumsuzluk söz konusu olmuştur. Bu konu ile ilgili daha ayrıntılı yorum için, karışık fungal üreme sayılarının daha fazla olduğu bir olgu grubunun analiz edilmesi gerektiği düşünülmüştür. Fungemi etkeninin PNA-FISH katkısı ile erken dönemde saptanmasının ve bildirilmesinin tedaviye etkisi sınırlı bulunmuştur. Sonuç olarak dirençli türlerin daha sık izole edildiği merkezlerde, erken bildirim avantajlarının daha görülebilir olabileceği kanısına varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada kullanılan “Yeast Traffic Light PNA-FISH” kiti, MSD firması tarafından bağış olarak temin edilmiştir. Katkılarından dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* 2010; 16(5): 445-52.
2. Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73(1): 45-8.
3. Pfaller MA, Messer SA, Moet GJ, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38(1): 65-9.
4. Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance(R)) registry, 2004-2008. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74(4): 323-31.
5. Alp S, Arıkan-Akdagli S, Gulmez D, et al. Epidemiology of candidaemia in a tertiary care university hospital: 10-year experience with 381 candidaemia episodes between 2001 and 2010. *Mycoses* 2015; 58(8): 498-505.
6. Gomez J, Garcia-Vazquez E, Espinosa C, et al. Nosocomial candidemia at a general hospital: the change of epidemiological and clinical characteristics. A comparative study of 2 cohorts (1993-1998 versus 2002-2005). *Rev Iberoam Micol* 2009; 26(3): 184-8.
7. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(9): 3640-5.

8. Andes DR, Safdar N, Baddley JW, et al. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. *Clin Infect Dis* 2012; 54(8): 1110-22.
9. Kollef M, Micek S, Hampton N, Doherty JA, Kumar A. Septic shock attributed to *Candida* infection: importance of empiric therapy and source control. *Clin Infect Dis* 2012; 54(12): 1739-46.
10. 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* 2013; 56(9): 1284-92.
11. Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, et al. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* 2012; 54(9): 1240-8.
12. 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.
13. Larone DH. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. 2011, 5th ed. ASM Press, Washington, DC.
14. 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.
15. Heil EL, Daniels LM, Long DM, et al. Impact of a rapid peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization assay on treatment of *Candida* infections. *Am J Health Syst Pharm* 2012; 69(21): 1910-4.
16. 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.
17. Aydemir G, Koç AN, Atalay MA. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin tanımlanmasında peptid nükleik asit floresan in situ hibridizasyon (PNA FISH) yönteminin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2016; 50(2): 293-9.
18. Pinjon E, Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. *Biochem Soc Trans* 2005; 33(Pt 5): 1210-4.
19. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48(5): 503-35.
20. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, et al; ESCMID Fungal Infection Study Group. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(Suppl 7): 19-37.
21. Gülmez D, Doğan Ayçık Ö, Arkan-Akdağlı S. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarında önceki ile karşılaştırmalı olarak yeni CLSI direnç sınır değerlerinin triazol duyarlılık kategorilerinin belirlenmesine etkisi. 1. Ulusal Tıbbi Mikoloji Kongresi. 24-26 Eylül 2014, Ankara.
22. Grossman NT, Pham CD, Cleveland AA, Lockhart SR. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in *Candida parapsilosis* isolates from a U.S. surveillance system. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(2): 1030-7.
23. Doğan Ayçık Ö, Gülmez D, Arkan Akdağlı S. Fungemi olgularında hızlı bir ön tanımlama testi: Pozitif kan kültürü şişesinden yapılan doğrudan germ tüp (çimlenme borusu) testinin değerlendirilmesi. 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi. 18-22 Kasım 2015, Antalya.