TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANDİDEMİLERİN HIZLI TANI VE İDENTİFİKASYONUNDA DİREKT KAN KÜLTÜR ŞİŞESİNDEN MALDI-TOF MS YÖNTEMİ, GERM TÜP TESTİ VE KAN KÜLTÜRÜNDE POZİTİFLEŞME SÜRESİNİN KIYASLANMASI

Kerem YILMAZ

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurten ALTANLAR

ANKARA

2020

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KANDİDEMİLERİN HIZLI TANI VE İDENTİFİKASYONUNDA DİREKT KAN KÜLTÜR ŞİŞESİNDEN MALDI-TOF MS YÖNTEMİ, GERM TÜP TESTİ VE KAN KÜLTÜRÜNDE POZİTİFLEŞME SÜRESİNİN KIYASLANMASI

Kerem YILMAZ

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nurten ALTANLAR

ANKARA

2020

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kandidemilerin Hızlı Tanı ve İdentifikasyonunda Direkt Kan Kültür Şişesinden MALDI-TOF MS Yöntemi, Germ Tüp Testi ve Kan Kültüründe Pozitifleşme Süresinin Kıyaslanması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Kerem YILMAZ
Tarih: 20/08/2020
İmza:

Kabul ve Onay

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan ii

Kabul ve Onay iii

İçindekiler iv

Önsöz vii

Simgeler ve Kısaltmalar viiii

Çizelgeler viiiiii

1. GİRİŞ 1

1.2. *Candida* Patogenezi 3

1.3. *Candida* Enfeksiyonları ve Epidemiyoloji 4

1.4. Kandidemi 6

1.5. Tanı 7

1.6. Kandidemide Laboratuvar Tanı Yöntemleri 8

1.6.1. Kültür 8

1.6.2. Germ Tüp Testi 9

1.6.3. Kromojenik Besiyerleri 10

1.6.4. Serolojik Testler 11

1.6.5. MALDI-TOF MS 12

2. GEREÇ VE YÖNTEM 15

2.1. Etik Kurul Onayı 15

2.2. Örnekler 15

2.3. Gereçler ve Kimyasallar 16

2.4. Kan Kültür Sistemi 16

2.5. *Candida* Türlerinin Kan Kültür Sisteminde Pozitfileşme Sürelerinin Tespiti 17

2.6. Gram boyama 17

2.7. Pozitif kan kültürünün işlenmesi 17

2.7.1. Germ Tüp Testi 18

2.7.2. Direkt Kan Kültür Şişesinden Germ Tüp Testi 18

2.7.3. MALDI TOF MS Yöntemi 18
2.7.4. Direkt Kan Kültür Şişesinden MALDI TOF MS Yöntemi 19

3. BULGULAR 21
3.1. *Candida* Türlerinin Kan Kültür Sisteminde Pozitifleşme Süreleri 21
3.2. Kültürden ve Direkt Kan Kültür Şişesinden Germ Tüp Testi Sonuçları 21
3.3. Kültürden ve Direkt Kan Kültür Şişesinden MALDI-TOF MS İdentifikasyon Sonuçları 22

4. TARTIŞMA 23
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 33
ÖZET 35
SUMMARY 37
KAYNAKLAR 39
EKLER 49
Ek-1. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Karar Formu 49
ÖZGEÇMİŞ 51

ÖNSÖZ

Kandidemi, sıklığı gittikçe artan, mortalitesi yüksek bir enfeksiyondur. Kandidemilerde en sık etken genellikle *Candida albicans* olmakla birlikte diğer türlerde önem taşımaktadır. *Candida* infeksiyonlarının tedavisinde, tür düzeyinde tanımlama yapılması kadar, hastalar için hızlı tanı son derece önemlidir. Non-*albicans* türü mantarların antifungal dirençlerinden dolayı identifikasyon hızı tedavi seçiminde çok önemli rol oynar. *C. albicans*, non-albicans *Candida* ayrımı için rutin laboratuvarlarda birincil olarak kullanılan test germ tüp (çimlenme borusu) testidir. Fakat sonuç için ek bir gün gerekmektedir. Bunu ekarte etmek için kan kültür şişesinden direkt germ tüp testi yapılacaktır. Bu yöntemin yanı sıra yine direkt kan kültür şişesinden plakta üreme aşaması beklenmeden MALDITOF-MS ile identifikasyon gerçekleştirilecektir. Ayrıca farklı türdeki *Candida* türlerinin kan kültür cihazında pozitif sinyal verme süreleri arasında fark olup olmadığı değerlendirilecektir. Konvansiyonel yöntemlerle identifikasyon mantarlarda 48-72 saat sürebilmektedir.

Bu tez çalışmamızın amacı çok daha kısa sürede etkenin identifikasyonunda otomatize ve manuel birkaç yöntemin değerlendirilmesi ve karşılaştırılmasıdır.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bana yardımcıolup desteklerini daima hissettiren değerli danışmanım Prof. Dr. Nurten ALTANLAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mustafa ALTINDİŞ'e ve Sayın Prof. Dr. Mehmet KÖROĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

^{o}C	Derece santrigrat
CAC	CHROMagar *Candida*
GGT	Germ tüp testi
IVD	*İnvitro* diagnostik
KKP	Kan kültür cihazında pozitiflik
MALDI-TOF MS	Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry
SDA	Sabouraud dekstroz agar

ÇİZELGELER

Çizelge 3. 1. Kan kültürü pozitifleşme süreleri 21

Çizelge 3. 2. Direkt kan kültür şişesinden germ tüp testi ve klasik germ tüp testi karşılaştırılması 21

Çizelge 3. 3. Direkt kan kültür şişesinden maldi-tof ms ile identifikasyon ve klasik kültür sonrası maldi-tof ms ile identifikasyon sonuçları 22

1. GİRİŞ

1.1. *Candida* Türlerinin Genel Özellikleri

Mantarlar; hücre duvarında kitin, kitosan, mannan ve glukan polisakkarit polimerleri içeren tek hücreli veya çok hücreli ökaryotik, hetetrofik organizmalardır (Calderone ve Braun, 1991; Çerikçioğlu ve Sancak, 2008; Dignani ve ark., 2009; İnci, 1999 ve Warnock, 2007a). Morfolojik yapılarına göre mantarlar, maya ve küf olmak üzere ikiye ayrılırlar (İnci, 1999). *Candida*'lar bir hücreli ve ökaryöt olup 4-6 µm, gram pozitif olarak boyanan, yuvarlak veya oval, şekilde görülebilen tomurcuklanan (blastakonidiyum veya blastasporlar) maya mantarlarıdır (Edwards, 2010).

Tomurcuklanma sonucunda ana hücrenin aynısı yeni bir genç hücre meydana gelir. Bu yeni hücre ana hücreden ayrılabilir veya ayrılamaz. Ayrılamayan yeni hücre ana hücre arasında boğumlar oluşturarak uzar ve gelişir ise yalancı hif (pseudohif) yapıları meydana gelmektedir (Yücel, 1987). Gerçek hif yapısında ise ana hücre ile arasında boğumlanma görülmez ve hücre duvarları birbirine paraleldir (İnci, 1999 ve Shea, 2011). *C. albicans* türü blastospor, yalancı hif, gerçek hif ve klamidospor oluşturabilir ve bu yapılar tür bazında identifikasyonda kullanılabilir (Larone, 2011).

Üreme özelliklerine göre tür düzeyinde tanımla; mısır unlu Tween 80 agara veya pirinç ektresi Tween 80 besiyerine ekilip yalancı hifin, gerçek hifin, blastakonidiyumların şekil ve yapılarına, klamidiyospor oluşturup oluşturmadığına bakılarak yapılır (Dignanive ark., 2009). Ayrıca germ tüp testi *C. albicans*'ı diğer *Candida* türlerinden ayırt edebilir. Ancak *C. dubliniensis* ve *C. stellatoidea* türlerinin de germ tüp oluşturabildiği göz önüne alınmalıdır (Dignanive ark., 2009).

Candida'ların hücre duvar yapılarının komponenti; yüksek oranda karbonhidrat, az oranda protein ve daha az oranda lipit şeklindedir. Karbonhidratların ise büyük kısmı β-glukan, daha az bir kısmı mannoprotein ve çok daha az kısmı kitin yapısındadır. Hücre duvarı, mikroorganizmanın değişik yüzeylere adezyonunda doğrudan görevlidir. Duvar komponentini oluşturan bazı yapılar antifungal ilaçlara hedef sağlarken, bazı yapılar da aynı zamanda immünolojik determinant içerir (Çerikçioğlu, 2008; Kantarcıoğlu ve Yücel, 2004 ve Yiğit ve Benli, 2005).

Candida'ların hücre membranı bünyesindeki sterol, membrandaki lipidlerinin %20' sini oluşturmaktadır. Bu sterol yapısının %95'i ergosterol şeklindedir. Antifungal ilaçlara hedef olarak en değerli yapı ergosteroldür. Hücre membranı, içeriğindeki ozmoenzimler sayesinde moleküllerin iç ve dış ortama transportunda rol alır. Ayrıca fosfolipaz C, adenilat siklaz, proteaz gibi *C. albicans*'ın sinyal iletiminde rol alan bazı enzimler de hücre membranında yer alırlar (Çerikçioğlu, 2008).

Candida cinsi mantarlar, aerobik şartlarda, 35°C'de mikrobiyolojide rutin olarak kullanımı olan genel üretim besiyerlerinde veya fungal seçiciliği olan besiyerlerinde üreyebilirler. *Candida* kolonileri 24 saat içerisinde oluşmuş olsa bile kolonilerin belirginleşmesi için en az 48 saat beklemek gerekmektedir. *Candida*'lar için primer seçici besiyeri Sabouraud dekstroz agar (SDA)'dır. Ayrıca besiyerinin içerisine çeşitli antimikrobiyaller (kloramfenikol, gentamisin) katılıp bakterilerin üremesi engellenebilir. *Candida*'lar kültür plağında krem rengi tonlarda, yumuşak yapılı, karakteristik olarak maya kokusu olan, düzgün kenarlı veya tümsekli, mat/parlak koloniler oluştururlar (Çerikçioğlu, 2008; Dignanive ark., 2009; Ener, 2008; Hazen ve Howell, 2007 ve İnci, 1999).

Mikroskobik tanıda *Candida* kökenleri Gram pozitif olarak boyanır (Shea, 2011). Ayrıca Calcofluor White floresan boyası, Giemsa, Periyodik Asit Schiff, methanamin gümüş gibi özellikli boyalarla da boyanabilirler (Snyder ve ark., 2011).

Klinik olarak *Candida*'lar insanda en sık hastalık nedeni olan mantarlardır. *C. albicans,* en yüksek oranda saptananmantardır ve mukoza enfeksiyonlarının %90-100'ünün, kan dolaşımı enfeksiyonlarının ise %50-70'inin etkenidir (Tümbay, 2010). Enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkan diğer türler; sıklıkla *C. glabrata, C. guilliermondii , C. krusei, C. lusitaniae, C. parapsilosis ve C.tropicalis* nadiren de, *C. dubliniensis, C. famata, C. inconspicua, C. kefyr, C. lipolytica, C. norvegensis*ve *C. zeylanoides*'tir (Dignanive ark., 2009).

1.2. *Candida* Patogenezi

Birçok *Candida* türü insanın normal flora (gastrointestinal sistem, deri, mukoza, vajina ve üretranın) elemanları arasındadır. İnsan vücudunda bulunma sıklığı gibi doğada ve temas ettiğimiz çevrede de en sık rastlanan mikroorganizlardandır (Dignanive ark., 2009; Hazen ve Howell, 2007 ve Tümbay, 2010). İmmünitesi sağlıklı bireyler, doğada ve folarasındaki mantarlar ile devamlı bir birliktelik olmasına rağmen fungal enfeksiyon geliştirme eğiliminde değildirler. *Candida* türleri daha çok immünitesi bozulmuş ve predispozan faktörleri olan bireylerde fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadırlar. Bu enfeksiyonların oluşumunda konağa ait faktörler dışında *Candida*'ların ayrıca kendilerine ait virülans faktörleri de enfeksiyon açısından önemlidir (Saraçlı, 2010).

Konağa ait predispozan faktörler dışında; germ tüp, adezyonu sağlayan moleküller, hücre yüzeyinin hidrofobik özelliği, biyofilm, siderfefor üretimi, maya hif dimorfizmi, fenotipik değişim, hidrolitik enzimlere ve toksinlere sahip olması, hücre duvarında bulunan moleküller gibi virülans faktörleri de enfeksiyon tablosunun oluşumunda oldukça etkilidir (Calderone ve Fonzi, 2001 ve Çeriklioğlu, 2012ve Yang, 2003).

Candida türleri, çok farklı türde enfeksiyona sebep olabilmektedirler. Bu enfeksiyon klinikleri toplumda daha çok yüzeyel enfeksiyonlar şeklindeyken;

hastanede yatan ve immün sistemi bozuk hastalarda lokal veya sistemik ciddi enfeksiyonlar şeklinde oluşmaktadır (Ener, 1999).

Candida'ların sebep olduğu enfeksiyonlar endojen veya eksojen kaynaklı gelişmektedir. Etken olan mantarlar aynı zamanda normal flora elemanı da oldukları için enfeksiyonlar daha çok endojen kaynaklı gelişmektedir (Edwards, 2015; Tümbay, 1999 ve Tümbay, 2010). Eksojen bulaş daha çok; sağlık personelinin veya hasta yakınlarının elleri, medikal araçlar (sonda vs), kontamine sıvılar ve beslenme solüsyonları ile gerçekleşmektedir (Munoz ve ark., 2001; Tümbay, 1999; Tümbay, 2010 ve Ural, 2004).

Kandidemi kliniği özelinde endojen kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarında, öncelikle *Candida*'ların gastrointestinal kanalda sayıca artıp kolonize olmaları gerekmektedir. Altta yatan kronik hastalıklar, yoğun bakım servisinde yatmak, immünsüpresif ajan kullanmak, spektrumu geniş çok sayıda antimikrobiyal ajan kullanmak *Candida'*ların hem endojen kolonizasyonunu hem de invazyonunu daha kolay hale getirir.

Gastrointestinal mukozayı aşarak veya diğer yolla (kontamine vasküler kateterler) kan dolaşım sistemine geçen *Candida,* immün sistemi düşük olan hastalarda kanda üreyip tüm organlara yayılabilir ciddi klinik tablolar oluşmasına neden olabilir (Saraçlı, 2010; Tümbay, 1999 ve Ural 2004).

1.3. *Candida* Enfeksiyonları ve Epidemiyoloji

Candida türlerinin neden olduğu enfeksiyonlara kandidoz adı verilir. Kandidozlar yüzeyel ve sistemik olarak iki kliniğe sahip olabilirler. Yüzeyel kandidozlar deri ve mukozanın enfeksiyonları olup daha çok immün sistemi normal kişilerde görülür. Sistemik enfeksiyonlar ise sıklıkla hastanede yatan, immün sistemi baskılanmış hastalarda ortaya çıkar (Tümbay, 1999).

Sistemik kandidozlarda günümüzde hala izolatların çok büyük bir yüzdesi *C. albicans* iken son 20 yılda non-*albicans Candida* türlerinin görülme sıklığındaki artış oldukça dikkat çekicidir (Pappas, 2006).

Kandidemi olgularında tür dağılımında; ülkeler, bölgeler hatta hastaneler arasında bile ciddi farklılıklar görülebilmektedir (Pfaller ve Diekema, 2007). Hastanelerdeki hasta profili, profilakside kullanılan antifungal ilaçlar da *Candida* türlerinin görülme sıklığına ve epidemiyolojisine etki edebilmektedir (Eggimann ve ark., 2015). Kandideminin en sık etkeni olan *C. albicans*; Amerika'daki bir merkezde %37 oranında saptanmışken, Norveç'teki bir merkezde %70 gibi daha yüksek bir oranda saptanmıştır (Pfaller ve Diekema, 2007). Yani her bir *Candida* türü için farklı risk faktörleri ve epidemiyolojik dağılım söz konusudur. Öne çıkan non-*albicans* türlerinden olan *C. glabrata*, ABD'de kandidemi enfeksiyonlarının ikinci sıklıktaki (%20-24) sebebi olarak saptnamışken Kanada, İspanya, Tayvan ve Norveç'te *C. glabrata*'nın ABD'deki kadar yaygın olmadığı görülmüştür. *Candida glabrata* daha çok nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan bir patojendir.

Predispozan faktörler olarak altta yatan hastalık, kateter kullanımı, profilaktik olarak azollere maruziyet özellikle diyabetik hastalardaki üriner sistem enfeksiyonlarına neden olabileceğini belirtmektedir (Eggimann ve ark., 2015 ve Pfaller ve Diekema, 2007). *Candida parapsilosis* Avrupa ve Latin Amerika'da kandidemi tablosunda *C. albicans*'dan sonra ikinci sıklıkta izole edilen etkendir. *Candida parapsilosis* daha çok deri yüzeyinde bulunan ekzojen bir patojendir. Sağlık çalışanlarının ellerinde bulunabilmesi, yüksek konsantrasyonda glukoz içeren çözeltilerden ve protezlerden kaynaklanabileceği, ayrıca vasküler kateter uçlarında biyofilm oluşturma özelliği nedeniyle parenteral beslenen hastalarda sıklıkla nozokomiyal enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *C. parapsilosis* ekzojen kaynaklı bir maya olduğu için, bu türe bağlı dolaşım sistemi enfeksiyonlarında el hijyeni, uygun kateter yerleştirilmesi ve bakımını gibi noktalara dikkat edilmesi enfeksiyonun gelişiminin önlenmesi açısından oldukça önemli ve faydalıdır (Pfaller ve Diekema,

2007). *Candida parapsilosis* kandidemi dışında özellikle endoftalmit, endokardit, septik artrit ve peritonit kliniğinde etken olarak saptanmaktadır. *Candida tropicalis*'e bağlı enfeksiyonlar özellikle hematolojik maligniteli ve nötropenik hastalarda daha sık görülmektedir. Bu hasta grubunun *C. tropicalis*'e bağlı enfeksiyonlara daha yatkın olduğu; *C. tropicalis*'in *C. albicans* ile karşılaştırıldığında daha yüksek mortalite ile seyreden dissemine enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir (Akalın, 2009; Khan ve ark., 2003 ve Wisplinghoff ve ark., 2004).

Ülkemizde farklı merkezlerin kandidemi etkeni izolat verilene göre en sık saptanan tür *C. albicans* (%38-53) olup, çalışmamızda da araştırmaya dahil ettiğimiz diğer üç etken olan; *C. parapsilosis* (%14-30), *C. tropicalis* (%5.5- 14) ve *C.glabrata* (%5.5-12) diğer en sık rastlanan türlerdir (Bakır ve ark., 2006; Çalışkan ve ark., 2013; Gültekin ve ark., 2010 ve Öztürk ve ark, 2013).

1.4. Kandidemi

Kandidemi, bir veya birden fazla kan kültüründen *Candida* türlerinin üretilmesi ile tanı konulan klinik bir tablodur. Kandidemi, organ tutulumlarıyla ilerleyen invaziv kandidoza sebep olması ve ciddi mortalite ile seyretmesi sebebiyle önemlidir. Fransa'da kandidemi ile ilişkili ölüm oranının %40, ABD'de ise %25-38 olduğu tahmin edilmektedir. Tanıdaki her bir saatlik gecikme kandidemi ilişkili mortaliteyi %1,6 oranında arttırmaktadır. Ayrıca antifungal tedavi almayan ya da geç başlanan hastalarda, tedavi alanlara kıyasla ölüm oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır (Tortorano ve ark., 2004 ve Seyedmousavı ve ark., 2015).

Candida albicans kandidemi etkenleri arasında günümüzde hala birinci sıradadır. Fakat yüzdesel olarak non-*albicans Candida*'ların görülme sıklığı tüm dünyada artış eğilimdedir (Tümbay, 1999). Kandidemi etkenlerinin dağılımında *C. albicans'* tan sonra, Amerika'da *C. glabrata,* Avrupa ve Türkiye' de *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*, izole edilme sıklığı artan non-*albicans Candida* türleridir (Yapar, 2014).

Non-*albicans Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların artışı ve antifungal ilaçlara direncin ortaya çıkması, kandidemi tedavisinde de zorluklar getirmektedir (Peraira ve ark., 2010). Non-*albicans Candida* türleri arasından *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'in, flukonazole ve azollere daha az duyarlı olduğu görülmektedir. *Candida glabrata*'nın özellikle flukonazol olmak üzere antifungal ilaçlara karşı daha dirençli olduğu bildirilmektedir. *Candida krusei,* flukonazole karşı intrensek dirençli olup bu etkenlerin oluşturduğu klinik tablolar, eski antifungal tedavi ve hastanın nötropenik oluşu ile ilişkilendirilmektedir. Tüm kandidemi olgularının % 1-2'sinden sorumlu tutulan *C. lusitaniae*'nın azollere duyarlı fakat Amfoterisin B'ye karşı yüksek bir dirence sahip olduğu bildirilmektedir (Cruciani , 2008).

Kandidemi invaziv *Candida* enfeksiyonlarının en sık sebebidir. Diğer sepsis etkenlerinde de olduğu gibi en sık rastlanan belirtisi yüksek ateştir. Spesifik bir bulgusu olmadığı için diğer sepsis etkenlerinden ayrımı oldukça zordur (Çerikçioğlu, 2008). Kandidemi, mortaliteyi %40-60 yükselmekte ve hastanede kalış süresini ortalama 30 gün uzatmaktadır (Ural, 2004). Kandidemi gelişimi için başlıca risk faktörleri; uzun süre hastanede yatış, antibiyotik tedavisi, damar içi kateterlerin kullanılması, hastanın immün sistemini baskılayıcı sebeplerdir (Giri ve Kindo, 2012).

1.5. Tanı

Kandidemide tanı klinik belirti ve bulgularının özgül olmayışı nedeni ile oldukça güçtür. Genellikle klinik ve mikrobiyolojik olarak birlikte değerlendirilmektedir. Ancak kesin tanı etkenin mikrobiyolojik olarak gösterilmesi ile konmaktadır.

1.6. Kandidemide Laboratuvar Tanı Yöntemleri

1.6.1. Kültür

Kandidemi tanısında altın standart, pozitif kan kültüründen *Candida*'nın üretilmesidir (Kauffman ve ark., 2015 ve Ostrosky-Zeichner, 2012). Kandideminin saptanmasında laboratuvarda kullanılanl izis santrifüj ile BACTEC ve Bact/ALERT gibi otomatize kan kültürü sistemleri en duyarlı yöntemlerdir (Dignani ve ark., 2009; Kauffman ve ark., 2015 ve Pfaller, 2015). Kandidemide mantarların en iyi şekilde üretilebilmesi için; alınan kan miktarının yaklaşık 20-30 ml olması ve kan/sıvı besiyeri oranının 1:5'ten az olmaması önerilmektedir. Kan kültür şişesinden etkenin izole edilebilme başarısı; alınan kanın miktarına, örnek sayısına ve kullanılan yönteme bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Croxatto ve ark., 2012ve Pfaller, 2015).

Candida türlerinin hemen hepsi rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan mikolojik ve bakteriyolojik birçok besiyerinde kolayca üremektedir. Üreme sıklıkla 24 saatte gerçekleşmesine rağmen, belirginleşmesi 48-72 saat arasında tamamlanmaktadır. Mayalar genellikle 37°C'de ürerler. Ancak özellikle patojen kökenler 25-37°C 'de ürerken saprofit olanları çok daha düşük ısılarda üreyebilirler (Segal ve Elad, 2005 ve Howell ve Hazen, 2011).

Kan kültüründe üreme olduğunda, ilk izolasyon için en sık SDA besiyeri olmak üzere, %5 koyun kanlı agar gibi rutin besiyerleri de kullanılabilir (Sutton, 2007). Ayrıca primer besiyeri olarak SDA haricinde patates dekstroz agar, Mycosel veya Mycobiotic agar gibi mantara spesifik besiyerleri de kullanılabilir (Yıldıran, 1999). Bu besiyeri içerisine antibiyotik (kloramfenikol ve gentamisin gibi) ilavesi ile bakterilerin üremesi, sikloheksimit ilavesi ile kontaminant saprofit mantarların üremesi engellenir ve seçici hale getirilebilir. Ancak bazı *Candida* türlerinin sikloheksimite duyarlı olması nedeniyle izolasyonda tek başına kullanılmaması gerekir (Segal ve Elad, 2005).

Candida türleri genellikle kirli beyaz veya krem renginde, buruşuk veya düzgün kenarlı, nemli, yumuşak kıvamlı, maya kokan koloni oluştururlar (Koç, 2002).

1.6.2. Germ Tüp Testi

Candida türlerinin identifikasyonu rutin klinik mikrobiyoloji labotaruvarlarında genellikle fenotipik özelliklerine göre yapılmaktadır. Bunlar germ tüp, mısır unu tween 80 agardaki morfolojik görünümleri gibi konvansiyonel yöntemler ile ticari olarak bulunan çeşitli asimilasyon ve fermentasyon testleridir. Konvansiyonel yöntemler basit ve ucuzdur. Ancak zaman alıcı olmaları, deneyim gerektirmesi ve iyi derecede mikroskobik deneyim gerektirmesi gibi bazı dezavantajlara da sahiptir. Ticari testler özel bir deneyim gerektirmemekte fakat identifikasyon için gereken süreyi kısaltmamaktadır. Son yıllarda moleküler temelli testler mantarların tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılmaktadır. Doğru sonuç verebilen ancak zaman alıcı, pahalı ve henüz standardize olmayan bu yöntemler de teknik olarak rutin kullanıma uygun değildir (Duran-Valle ve ark., 2014).

Candida albicans türleri, saf kültürden öze ucu kadar alınıp insan veya tavşan serumunda 37 ^{o}C de süreyi aşmayacak şekilde 2-3 saat inkübe edildiklerinde germ tüp oluşturabilmektedir. Süre sonunda maya-serum süspansiyonundan lama bir damla alınıp mikroskobik olarak incelenir. Germ tüp, maya hücrelerinden direkt oluşmakta ve hücreden çıkış noktasında daralma/boğumlanma olmayan uzantı şeklinde yapılar olarak gözlenmektedir. Bazı *Candida* türleri (*C. tropicalis, C. dubliniensis* ve *C. stellatoidea)* 3 saatlik süreden sonra germ tüp oluşturabilmektedir. Ancak bu türlerde maya hücresinin başlangıç noktasında boğumlanma olmaktadır (Howell ve Hazen, 2011 ve Yıldıran, 1999).

1.6.3. Kromojenik Besiyerleri

Mikoloji laboratuvarlarında hasta numunelerinden üretilmiş maya türleri için konvansiyonel tekniklerle cins veya tür bazında identifikasyon 2-5 gün kadar sürmektedir. Daha hızlı tanı için, *Candida* kolonilerinin renk farklılıklarına göre tanımlamasını gerçekleştiren çok sayıda özel kromojenik besiyerleri üretilmektedir.

Özel bir grup olan kromojenik besiyerleri, farklı *Candida* mantarlarının salgıladığı enzimlerle tepkimeye girebilen türe özgü farklı kromojenik substratlar içermektedir. Tepkime sonrasında ayrışan substrat yapılardan çeşitli kromojen yapıların ortaya çıkması ile oluşan farklı renkler ile tanımlama yapılır. Piyasada rutin kullanıma uygun çok çeşitli kromojenik besiyerleri mevcuttur (Howell ve Hazen, 2011).

CHROMagar *Candida* (CAC) besiyeri özellikle *C. albicans, C. tropicalis* ve *C. krusei* türlerinin diğer türlerden ayırt edilmesi için önerilmektedir. CAC besiyerinin birçok araştırmada, bu üç türün tanımlanmasındaki duyarlılığı %94-100, özgüllüğü ise %99-100 arasında bulunmuştur (Odds ve Bernaerts, 1994 ve Otağ ve ark., 2006). Fakat maddi olarak yüksek fiyatlı ürünler olmaları ve her tür için yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olmamaları sebebiyle sıklıkla tercih edilmemektedir.

Kromojenik besiyerleri özellikle kandan olmak üzere klinik örneklerde, birden fazla türün etken olduğu miks enfeksiyonların saptanmasında ve identifikasyon problemlerinin çözümünde primer izolasyon besiyeri olarak kullanılabilmektedir (Pincus ve ark., 2007). Bu besiyerleri *C. albicans, C. tropicalis* ve *C. krusei* gibi sık rastlanan türleri erken dönemde tanımlayarak ciddi enfeksiyonların tanı ve tedavi sürecinde fayda sağlamaktadır (Segal ve Elad, 2005 ve Odds ve Bernaerts, 1994).

1.6.4. Serolojik Testler

Başta kandidemi olmak üzere invaziv *Candida* enfeksiyonlarının tanısında serolojik testlerden faydalanılabilir. Bu testlerde hasta serumunda *Candida* antijenlerine karşı oluşan özgül antikorlar ve antijenik yapıları ya da *Candida* metabolitleri aranabilir (Çerikçioğlu, 1999; Gegic ve ark., 2013 ve Kalkancı, 2005).

Antikor taraması için; mannan, enolaz ve intrasitoplazmik antijenlere karşı oluşan antikorlar kullanılır (Pfaller, 2015). Fakat immün süprese ve yaşlı bireylerde tespit edilebilecek olan miktardan az sayıda antikor oluşması, saptanan antikorun kolonizasyon ve enfeksiyonu ekarte edememesi, nötralizan antikorların bulunabilmesi, anti-mannan antikorun kandan çok hızlı elimine edilmesi gibi sebeplerle antikor taramanın tanıda duyarlılığı yüksek değildir (Kalkancı, 2005). Bu yüzden fungal antijenlerin veya metabolitlerin saptanmasını hedefleyen testler, sistemik fungal enfeksiyonların serolojik tanısında daha önemli yere sahiptirler.

Antijen taraması için; mannan, enolaz ve ısıya duyarlı antijen incelenmektedir. En sık tercih edilen serolojik test mannan antijen testidir. Mannan; *Candida* hücre duvarının, enfeksiyon sırasında, dolaşıma sızan karbonhidrat yapısıdır. Dolaşımda çok kısa süre kalır ve kandan çok hızlı elimine edilir. Bu yüzden tespit edilebilmesi için hastadan sıkça kan alınmalıdır. Antijen ve antikor testlerinin birlikte değerlendirilmesi duyarlılığı arttırması nedeniyle tanıya daha çok yardımcı olur (Hilmioğlu-Polat, 2007 ve Willinger ve ark., 2014).

Metabolit taraması için; Arabinitol araştırılmaktadır. D-arabinitol; *Candida*'ların enfeksiyon kliniği geliştiği sırada kişinin vücut çıktılarına (serum, idrar) salgıladığı metabolit bir üründür (Ellepola ve Morrison, 2005). Serumda arabinitol varlığının gösterilmesi kandidemi tanısına yardımcı olabilir.

1.6.5. MALDI-TOF MS

Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS); matriks aracılı lazer dezorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi son yıllarda kullanıma giren hızlı, güvenilir, düşük maliyetli ve güncel bir sistemdir (Wieser, 2012). Bu yeni sistemin en büyük avantajlarından biri, mikroorganizmaların besiyerinden tek bir koloni ile hızlı ve güvenilir şekilde tanımlamasını sağlamaktadır. Bu sayede klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanım yeri bulmaktadır. MALDI-TOF MS'in çalışma prensibinde ilk olarak mikroorganizmaya ait koloni çelik slayt üzerinde yayılıp, matriks ile kaplanır. Mikroorganizmaların sahip olduğu biyomoleküller (protein, peptid, şeker, polimer, dendrimer, makromolekül) lazer yardımı ile iyonize edildir. İyonize haldeki proteinler yüklü vakum borusu içerisinde sistemdeki dedektöre ulaşırlar. Dedektör, proteinlerin ağırlıklarına bağlı olarak varış hızlarını ölçüp, mikroorganizmanın protein profillerini çıkarır. Sonuç olarak da sistemin veri ağındaki referans mikroorganizma ile uyumuna göre mikroorganizmalar cins/tür bazında tanımlanabilmektedir (Dhimanve ark., 2011; Neppelenbroekve ark., 2014 ve Pfaller, 2015). Günümüzde, dört farklı MALDI TOF MS sistemi kullanılmaktadır. Bunlar Bruker Biotyper (Bruker-Daltonik, ABD), Axima/Saramis (Shimadzu, Japonya), VITEK MS (bioMėrieux, Fransa) ve Andromas (Andromas SAS, Fransa) sistemleridir (Bader, 2013).

MALDI-TOF MS sadece mantarlar için değil bakteri, mikobakteri ve virüslerin tanımlanmasında da kullanılmaktadır (Dhiman ve ark., 2011 ve Neppelenbroek ve ark., 2014).

Mantarların yüksek kaliteli MALDI-TOF kütle spektrumlarını elde etmek için, hücrelerin % 70 formik asit içinde parçalanması veya mekanik bozulmaya tabi tutulması gerekmektedir, % 70 formik asit ekstraksiyonun kullanılması, matriks solüsyonu uygulamasından önce gerçekleştirilir (Theel ve ark., 2012). Etanol ya da formik asit kullanılan yöntemlerin ekstraksiyon etkinliği ve spektrum kalitesi yüksektir (Drevinek ve ark., 2012).

Tanımlanmak istenen mikroorganizma kolonisi metal slayta yayılırak ve üzerine matriks solüsyonu eklenerek oda ısısında kurutulur (Posteraro ve ark., 2013). Örnek kristalize olduktan sonra cihaza yerleştirilerek lazer atışlarına maruz bırakılır. Lazer enerjisi matriks moleküllerinin aktive olmasını gerçekleştirir. Sonraki aşamada mikroorganizma-matriks yapısında küçük patlamalar meydana getirir. Sonrasında iyonizasyon işlemi sonucunda moleküller uyarılarak katı veya likit halden iyonize serbest gaz halindeki molekül şekline form değiştirirler. Uçuş zamanlı kütle analizinde, oluşturulan iyonların cihaz içinde dedektöre varmak amacıyla belli bir yolda ilerlemeleri prensibi kullanılmaktadır. Bu amaçla iyonize moleküllerin 1 metre uzunluğundaki boru içersindeki dedektöre hareketlerini hızlandırmak için 20 kV elektrik potansiyeli üreten elektrodlar ile voltaj uygulanmaktadır (Biberoğlu, 2003). Cihaz içinde meydana gelen vakumlama, hava molekülleri ile iyonların temasını önlemektedir. Bu nedenle iyonların hızı, sadece kütle/yük (m/z) oranıyla gösterilen kütle ve molekülün yüküne bağlı olarak gösterilir. Bu sistemin uygulanmasında hemen her zaman moleküller benzer şekilde yüklendikleri için yük genellikle 1'dir (Posteraro ve ark., 2013). Uçuş tüpünü katetme süresi moleküllerin kütlesi ile orantılıdır ve iyonlar kütlelerine göre dedektöre çarpar. Bu sebeple küçük kütleye sahip iyonlar dedektöre önce ulaşır. Mikroorganizmaya ait proteinlerin uçuş zamanı, kütle spektrumunun belirlenmesinde kullanılır ve sisteme kayedilir. Sonuçta MALDI-TOF MS ile tanımlama yapan sistemlerde, yeni kaydedilen spektrum, mevcut veri tabanındaki önceden iyi karakterize edilmiş mikroorganizmaların spektrumlarıyla karşılaştırılır ve sonucun güvenilirliği yüzde olarak belirtilir (Clark ve ark., 2013). Güvenirlik düzeyi yüzde yetmiş (%70) ve üstü tanımlama başarılı kabul edilir (Wattal ve Oberoi, 2016).

MALDI-TOF MS ile tanımlama işlemi yapılan tüm etkenler için farklı bir spektrum eldesinin nedeni her hücrede mevcut ve türe özgü olan ribozomal proteinlerdir. Ribozomal proteinler mikrobiyal üreme koşulları gibi durumlardan en az etkilenen dolayısıyla klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarındaki tanımlama işlemleri için ideal yapılardır. Ayrıca MALDI-TOF MS ile tanımlama işlemlerinde her zaman taze kültür tercih edilmelidir. Çünkü rRNA zamanla parçalandığı için eski

koloniden alınan örnek, pik sayısı ve pik yoğunluğunu düşürmektedir (Edwards, 2010 ve Yeğenoğlu, 2007).

Bu noktadan hareketle, çalışmamızda kandidemi tedavisinde klinisyenlerin doğru antifungal seçiminde kullanabileceği *Candida* türlerinin *albicans*/non-*albicans* ayrımınında çok daha kısa sürede etkenin identifikasyonunda otomatize ve manuel birkaç yöntemin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Etik Kurul Onayı

Bu araştırma, Ankara Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan 02-135-19 numaralı Etik Kurul Onay Yazısı sonrasında Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

2.2. Örnekler

Mart 2018-Mart2019 tarihleri arasında Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'a gelen örneklerden kan kültüründe pozitif üreme sinyali olan şişelerden hazırlanan Gram boyalı preparatlarda maya hücresi saptanan, randomize, farklı servis, yaş ve cinsiyetteki hastalara ait 50 örnek çalışmaya alınmıştır. Bu örneklerin kan kültür cihazında pozitif sinyal verme sürelerinin türlere göre ortalaması hesaplanmıştır. Ayrıca saf kültürden ve direkt kan kültür şişesinden germ tüp testi her örnek için çalışılmıştır. Pozitif sinyal veren şişelerden tür tanımlaması için, laboratuvarda rutin uygulamada yapılan MALDI-TOF MS yöntemine paralel olarak direkt kan kültür şişesinden MALDI-TOF MS yöntemi de uygulanmıştır. 4 farklı standart *Candida* ATCC suşu (*C. albicans* 90028, *C. parapsilosis* 90018, *C. glabrata* 2001, *C. tropicalis* 750) doğrulama için kullanılmıştır.

Çalışma boyunca izolatlar ve kan kültür şişeleri uygun koşullarda (+4°C ve -80°C stok) daha sonraki basamaklarda kullanılmak üzere saklandı.

2.3. Gereçler ve Kimyasallar

- BacT/Alert 3D otomatik kan kültürü cihazı (bioMėrieux, Fransa)
- Vitek MS MALDI-TOF MS cihazı (bioMėrieux, Fransa)
- Vitek MS MALDI-TOF MS plate (bioMėrieux, Fransa)
- Vitek MS MALDI-TOF MS CHCA matrix (bioMėrieux, Fransa)
- VITEK- MS-FA (Formik asit) (bioMėrieux, Fransa)
- Sabouraud-dekstroz-agar (SDA)(bioMėrieux, Fransa)
- Tween 80 %0.1 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Absolut Etanol (Merck-Millipore, ABD)
- Formik asit %70 (Sigma-Aldrich, ABD)
- Asetonitril (Sigma-Aldrich, ABD)

2.4. Kan Kültür Sistemi

Çalışmamızda incelenen hastalardan elde edilen kan kültürü örnekleri BacT-Alert 3D (bioMėrieux, Fransa) cihazında inkübe edilmiştir. BacT/Alert 3D mikrobik algılama sistemi, içerisine yerleştirilen şişeleri inkübe eden ve çalkalayan örneklerdeki üremeyi sürekli izleyen, kolorimetrik sistem olarak bilinen bir cihazdır. Bütün kültür şişelerinin alt kısmında bulunan özel sensörler mikroorganizmaların yarattığı CO_2 yükselişine bağlı pH farklılıklarının oluşumunu renk değişimleriyle gösterirler. BacT/ALERT 3D cihazları oluşan bu renk değişikliklerini belirli süre aralıklarıyla devamlı kontrol ederek sistemdeki mikrobiyal kaynaklı farklılıkları tespit eder. Cihazın sahip olduğu algoritmalar mikroorganizmaların erkenden saptanmasını mümkün kılar**.** Takip edilen örnekler cihaza yerleştirildikten sonra, pozitif veya negatif olarak saptanan kadar periyodik olarak izlenmektedir. BacT/Alert bilgi işlem sistemi ile sensörlerin yaptığı devamlı okumaları denetler ve hangi örneklerin negatif, hangilerinin pozitif olduğuna veri tabanındaki bilgilere göre karar vermektedir. Cihazdaki örneklerde üremenin saptanması halinde, cihaz tarafından sesli ve görsel uyarı verilmektedir. Bir örnek için cihaz tarafından beş

günlük süre içerisinde (özel bir mikroorganizma için özel bir inkübasyon süresi düşünülmüyor ise) herhangi bir uyarı verilmezse üreme olmadığı kabul edilir ve negatif olarak değerlendirilir.

2.5. *Candida* Türlerinin Kan Kültür Sisteminde Pozitfileşme Sürelerinin Tespiti

Hastanın servisindeki odasında BacTAlert 3D (bioMérieux, Fransa) kan kültürü şişelerine hasatadan alınmış 10 ml tam kan örnekleri oda sıcaklığında ve çok hızlı bir şekilde laboratuvara getirilerek kan kültür cihazına yüklenmiştir.

Kan kültür cihazında pozitif sinyal verme süreleri otomatik olarak kaydedilmektedir. Bu süreler daha sonra kullanılmak üzere not edilmiştir.

2.6. Gram boyama

Kan kültür cihazında pozitif sinyal vermiş olan şişelerden Gram boyama yapmak için preparat hazırlanmıştır. Alevde tespit edildiktten sonra 3 dakika kristal viyole ile sonrasında lugol çözetltisi damlatılıp 2 dakika bekletilmiştir. Alkol ile 15 saniye bekletilip dekolorizasyon tamamlandıktan sonra sulu fuksin ile 1 dakika muamele edilmiştir. Gram boyama yapıldıktan sonra preparatlar X100 büyütme ile ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir. Maya hücrelerinin varlığı belirlenen örnekler çalışmaya dahil edilmiştir (Bilgehan, 2002).

2.7. Pozitif kan kültürünün işlenmesi

Kan kültür sisteminde pozitif sinyal veren ve Gram boyama sonrası maya hücresi görülen örneklerden enjektör ile yaklaşık 1 cc'lik örnekler alınarak SDA besiyerine (bioMèrieux, Fransa) kültür için ekim yapılmıştır.

2.7.1. Germ Tüp Testi

SDA besiyerinden üretilmiş kolonilerden öze ucu ile alınıp 0,5 ml insan serumu içinde süspanse edimiştir. Bu süspansiyon 37°C'de 2-3 saat inkübe edildikten sonra bu karışımdan lam lamel arasında preparat hazırlanarak X40 büyütme ile ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir. Maya hücrelerinden direkt oluşan, kısa hif başlangıcında olan ve başlangıç noktasında boğumlanmanın olmadığı yapılar Germ tüp olarak gözlemlenmiştir. Pozitif olan suşlar *C. albicans* olarak değerlendirilmiştir (Hazen ve Howell, 2007 ve Yıldıran, 1999).

2.7.2. Direkt Kan Kültür Şişesinden Germ Tüp Testi

Kan kültür şişesinden alınan 10 ml aspirat steril 15 ml'lik bir polipropilen tüpe aktarılmıştır. Santrifüj edildikten (4000 g'de 10 dk) sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Tüpün dibindeki çökeltiden 0.5 ml numune alınarak ve 0.5 ml insan plazması içeren bir tüpe inoküle edilerek maya süspansiyonu hazırlanmıştır. Süspansiyon 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, bir damla süspansiyon germ tüp oluşumunun varlığı açısından X40 büyütme ile ışık mikroskobunda incelenmiştir.

2.7.3. MALDI TOF MS Yöntemi

MALDI-TOF MS yöntemi için önceden SDA'ya taze pasajı hazırlanan kolonilerden örnek tablasına çok az miktarda aktarılmıştır ve hücre duvar yapısını parçalamak ve protein ektraksiyonunu elde etmekiçin tablaya 1 µL VITEK- MS-FA (Formik asit) eklenmiş ve çok az beklenilmiştir. Sonrasında yine tablaya matriks çözeltisi 1µL VITEK MS-CHCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) eklenerek fiksasyonu ve kristalizasyonu sağlandıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmuştur. Plak cihaza yerleştirilerek identifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Araştırmamızda MALDI-TOF-MS sistemi olarak VITEK- MS (Biomerieux, France) sistemi kullanılmıştır. Analizler markanın önerlileri doğrultusunda yapılmıştır. Analiz sonucu alınan spektrum sonuçları güncel IVD (*in vitro* diagnostik) VITEK MS V.2.0 yazılımı kullanılarak sonuçlandırılmıştır.

Tanımlama analizinden önce MALDI-TOF kütle spektrumlarında gösterdiği karakteristik protein yapısı iyi bilinen, yeni pasaj alınmış *E. coli* ATCC 8739 standart kökeniyle cihazda otomatize bir şekilde kalibrasyon, kontrol işlemleri yapılmıştır.

2.7.4. Direkt Kan Kültür Şişesinden MALDI TOF MS Yöntemi

Pozitif kan kültür şişelerinden, üretici firma yönergelerince uygun yöntemlerle hazırlanmış solüsyonlar ve kimyasallar ile hazırlık işlemi uygulandıktan sonra MALDI-TOF MS (Vitek-MS, Biòmerieux, Fransa) ile tür düzeyinde tanımlama işlemi yapılmıştır.

Direkt kan kültür şişesinden identifikasyon işleminde, pozitif kan kültür şişesinden 8 ml örnek alınarak 10.000 rmp‘de 2 dakika oda sıcaklığında santrifüj işlemi yapılmıştır. İşlem sonrası süpernatant kısmı dökülerek dipteki pellet 2 defa 1 ml saf su ile yıkanmıştır. İkinci kez santrifüj işlemi tekrar edilerek pellet, % 0.1 Tween 80 (1 ml) içinde süspanse edilmiş ve 2 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Üçüncü bir santrifüjden sonra, pellet 2 defa 1 ml saf su ile yıkanmış tekrar santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pellet 300 ul saf su ve 900 ul mutlak etanol içinde süspanse edilmiştir. Bu süspansiyon tekrar santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Süprenatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet içine 30 ul % 70 formik asit ve 30 ul saf asetonitril eklenerek karışım iyice vortekslenmiştir. Hazırlık aşamasının son safhasında karışıma 14.000 rpm, 2 dakika, oda sıcaklığında santrifüj işlemi yapılmıştır. Her örnek için elde edilen süpernatantlar ayrılıp çalışılıncaya kadar -20°C ’de saklanmıştır (Spanu ve ark., 2012).

Elde edilen her örnekten 1 ul, MALDI-TOF MS tanımlama tablasına aktarılmıştır. Konulan yaklaşık 1 damla örnek kuruduktan sonra üzerine1µL VITEK MS-CHCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. Daha sonra plak cihaz içine yerleştirilerek identifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. *Candida* Türlerinin Kan Kültür Sisteminde Pozitifleşme Süreleri

Tüm *Candida* izolatları için kan kültür sisteminde ortalama pozitifleşme süresi 25.9 saat olarak belirlenmiştir. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* izolatları için kan kültür sisteminde ortalama pozitifleşme süreleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir. *C. glabrata* için kan kültür sisteminde pozitifleşme süresi diğer üç türe göre önemli ölçüde daha uzun olarak saptanmıştır. Bunun aksine, *C. tropicalis*'in kan kültür sisteminde pozitifleşme süresi ise diğer üç türden önemli ölçüde daha kısa olarak saptanmıştır.

Çizelge 3. 1. Kan Kültürü Pozitifleşme Süreleri

	Örnek Sayısı	**Klinik Örnek Pozitifleşme İçin Geçen Süre Ortalaması (saat)**
C. albicans	25	36,1
C. parapsilosis	12	39,4
C. tropicalis	10	17,7
C. glabrata	3	50,5

3.2. Kültürden ve Direkt Kan Kültür Şişesinden Germ Tüp Testi Sonuçları

Direkt kan kültür şişesinden 50 *Candida* türü için yapılan germ tüp testi sonuçları SDA kültürü sonrası yapılan germ tüp testi ile 49/50 (%98) oranında tutarlı olarak saptanmıştır. Sadece 1 *C. albicans* kökeninde direkt kan kültür şişesinden yapılan germ tüp testi hatalı negatif olarak saptanmıştır. 50 *Candida* kökeninin germ tüp testi sonuçları ve bu işlemler için gereken süreler karşılaştırmalı olarak Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 2. Direkt Kan Kültür Şişesinden Germ Tüp Testi ve Klasik Germ Tüp Testi Karşılaştırılması

	Örnek Sayısı	**Şişeden GT Pozitif**	**Şişeden GT Süre Ort.**	**Klasik GT Pozitif**	**Klasik GT Süre Ort.**
C. albicans	25	24	3 saat	25	48 saat
Non-*albicans*	25	25		25	

3.3. Kültürden ve Direkt Kan Kültür Şişesinden MALDI-TOF MS İdentifikasyon Sonuçları

Direkt kan kültür şişesinden MALDI-TOF MS ile 50 *Candida* türünün 37'si (%74) kültürden yapılan MALDI-TOF MS ile tutarlı olarak tanımlanmıştır. Bunların 20'si (%80) *C. albicans*, 8'i (%66,6) *C. parapsilosis*, 7'si (%70) *C. tropicalis*, 2'si (%66,6) *C. glabrata*, olarak tanımlanmıştır. İdentifiye edilemeyen 13 *Candida* türü spektrum yetersizliğ nedeni ile tanımlanamamıştır. Bu şişelerden ikinci kez çalışıldığında da benzer sonuçlar alınmıştır. Kültürden ve direkt kan kültür şişesinden MALDI-TOF MS ile identifikasyon sonuçları Çizelge 3.3'de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Spektrum yetersizliği nedeni ile identifiye edilemeyen türler; *C. albicans* (5/25; %20,0), *C. parapsilosis*(4/12; %33,3), *C. tropicalis* (3/10; %30,0) ve *C. glabrata* (1/3; %33,3) şeklindedir.

Spektrum yetersizliği gözlenen 13 suşun üretildiği kan kültür şişelerinde, Gram boyamada maya hücreleri yoğunluğunun düşük olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 3. 3. DirektKan Kültür Şişesinden MALDI-TOF MS ile İdentifikasyon ve Klasik Kültür Sonrası MALDI-TOF MS ile İdentifikasyon Sonuçları

	Örnek Sayısı	**Direkt Kan Kültüründen MS ile İdentifikasyon**	**Klasik Kültür Bazlı MS ile İdentifikasyon**
C. albicans	25	20	25
C. parapsilosis	12	8	12
C. tropicalis	10	7	10
C. glabrata	3	2	3
Toplam	50	37	50

4. TARTIŞMA

Son yıllarda mantar enfeksiyonlarının özellikle yatan hastalarda ciddi oranda artış göstermekte olduğu bildirilmektedir (Pfaller ve Diekema, 2010). *Candida* türleri, nozokomiyal enfeksiyonların %15'inden, nozokomiyal mantar enfeksiyonlarının %72'sinden ve nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının %8-15''inden etken olarak izole edilmektedir (Vazquez ve Sobel, 2003 ve Warnock, 2007b). Kandidemi kliniği invaziv *Candida* enfeksiyonlarının en sık görülen şeklidir. Yatan hastalarda morbidite ve mortalitenin de ciddi etkenlerinden biridir (Warnock, 2007b). Ayrıca kandidemi, hastaların hastanede kalış sürelerini uzatarak hasta bakım maliyetlerini arttırmakta bunun sonucunda ciddi ekonomik yüklere de neden olmaktadır (Morgan ve ark., 2005 ve Zaoutisve ark., 2005). Kandidemiye bağlı mortalite oranı diğer mikrobiyal etkenlerin sebep olduğu sepsise bağlı mortaliteden çok daha yüksek olup, bu hastalarda mortalite oranları %5 ile %71 arasında değişebilmektedir (Dignanive ark.,2009; Sofair ve ark., 2006 ve Zaoutis ve ark., 2005). Bu ciddi oranlar 24 saat içinde uygun tedavi başlanmadığında daha da artarak %97,6'lere kadar çıkmaktadır (Spanu ve ark., 2012 ve Idelevich ve ark., 2014).

Küresel boyutta invaziv kandidoz ve kandidemilerin hemen hemen tamamından sorumlu olan türler bizim de tez çalışmamızda üzerinde durduğumuz; *C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* şeklindendir. *C. albicans,* kandidemilerde izole edilen *Candida* türleri arasında günümüzde hala en yaygın saptanan etkendir. Fakat non-*albicans Candida* türlerinin izolasyon sıklığı da giderek artmaktadır (Giri ve Kindo, 2012; Richardson ve Lass-Flörl, 2008 ve Rodloff ve ark., 2011).

Yapılan ARTEMIS sürveyans çalışmasına göre; *C. albican*'sın sıklığı azalmakla birlikte kandan izole edilen maya türleri arasında hala birinci sırada yer almaktadır. Bu çalışmaya göre *C. tropicalis*'in, *C. parapsilosis*'in, *C. galabrata*'nın prevelansı yükselirken, *C. albicans*'ın prevelansı düşmüştür (Pfaller ve ark., 2005). Yirmi yıllık sürecin irdelendiği bir başka çalışmada da *Candida albicans'ın* neden

olduğu kandidozlardaki sıklığının düştüğü, buna karşılık non-*albicans Candida* türlerinden *C. tropicalis* ve *C.parapsilosis* prevelansında artış olduğu saptanmıştır (Yapar, 2014).

Non-*albicans Candida* türlerinin prevelansındaki artışta tedavi amaçlı veya profilaktik olarak yoğun antifungallerin kullanımı önemli bir yer tutmaktadır. Antifungal kullanımına bağlı olarak hastaların florasında bulunan antifungallere duyarlı *C. albicans* suşları ortadan kalkmakta ve daha az virülan olan ancak antifungallere iyi yanıt vermeyen *C. albicans* dışı türlerin seleksiyonu meydana gelmektedir. Ayrıca enfeksiyon önlemlerine yeterince uyulmaması sonucunda *C. parapsilosis* kaynaklı enfeksiyonlar artabilmektedir (Ener, 1999 ve Tümbay, 2010).

Kandidemi etkenlerininin tür bazındaki dağılımı coğrafi bölge, ülke, hatta merkezler arasında bile farklılık göstermektedir. Dünya genelinde yapılan çalışmalarda *Candida* türleri arasında kandideminin en sık sebebebi *C. albicans'* tır. Daha sonraki sıralamada görülen türler ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye değişkenlik gösterebilmektedir (Guinea, 2014). Kuzey Avrupa bölgesinde yapılan kandidemi sürveyans çalışmasında etkenler; *C albicans* %58,4, *C. parapsilosis* %19,5, *C. tropicalis* %9,3 ve *C. glabrata* %8,3 oranında tespit edilmiştir (Bassetti ve ark., 2013). İsviçrede yapılan 6 yıllık sürecin incelendiği kandidemi sürveyans çalışmasında, *C. albicans* %61,9, *C. glabrata* %17,5, *C. tropicalis* %5,9 ve *C. parapsilosis* %5,4 oranında etken olarak saptanmıştır (Orasch ve ark., 2014). Çok merkezli ve küresel boyutta yapılan bir sürveyans çalışmasında kandidemi etkenlerinin tür dağılımı; *C. albicans* %48,4, *C. glabrata* %18,2, *C. parapsilosis* %17,1, *C. tropicalis* %10,6 ve *C. krusei* %2 şeklinde saptanmıştır (Pfaller ve ark., 2011). İtalya' da birçok merkezin yoğun bakım ünitelerinin dahil edildiği bir kandidemi sürveyans çalışması sonucunda *C. albicans* %49,4 ile en yüksek oranda saptanmışken, *C. parapsilosis* %26,2, *C. glabrata* %10,4, *C. tropicalis* %6,5, *C. krusei* %2,8, *C. guillermondii* %1,5 ve *C. lusitaniae* %1,3 oranında saptanmıştır (Montagna ve ark., 2013).

Kandidemide en sık izole edilen tür literatürler incelendiğinde ülkemizde de *C. albicans*'tır .2010 yılında yapılan bir araştırmada, kandidemi etkeni olarak *C. albicans % 49, C. parapsilosis* % 23, *C. tropicalis %* 14 ve *C. glabrata* % 12 oranında saptanmıştır (Gültekin ve ark., 2010). Ülkemizde yapılan bir başka araştırmada kan kültürlerinden üretilen etkenler; *C. albicans* %40, *C. parapsilosis* %30, *C. tropicalis* %13 ve *C. krusei* %3 oranında izole edilmiş olup fakat *C. glabrata* türüne rastlamamıştır (Toprak ve ark., 2003).

Tez çalışmamız için dahil ettiğimiz araştırma dönemine ait kan kültürlerinden izole ettiğimiz kandidemi etkenleri; *C. albicans* için %50, *C. parapsilosis* için %24, *C. tropicalis* için %20 ve *C. glabrata* için %6 şeklinde ve literatürlerle benzerlik gösteren oranlarda saptanmıştır.

Tüm bulaşıcı süreçlerde olduğu gibi, uygun enfeksiyonla birlikte mantar enfeksiyonunun hızlı teşhisi erken mortaliteyi azaltır. Bu enfeksiyonların tanısında hala altın standart olarak kabul edilen kan kültürlerinin, pozitif hale gelmesi günler ve türlerin tanımlanması daha da uzun sürebilmektedir (Fernandez ve ark., 2009; Nunes ve ark, 2013 ve Pappas, 2006). Kan kültürleri için otomatik sistemlerin kullanılması kandidemi tanısında büyük ilerlemelerden biridir (Geha ve Roberts, 1994;Nunes ve ark, 2013 ve Pappas, 2006). Etken olan türün tanımlanmasına ve antifungal duyarlılık testinin yapılmasına olanak sağlar. Kan kültürleri için broth besiyerleri, bifazik besiyerleri gibi manuel sistemler ve BactAlert ve Bactek gibi ticari otomatize sistemler kullanılmaktadır. Günümüzde sıklıkla kullanılan otomatize kan kültürü sistemleri kandidemide mantar izolasyonu için son derece uygun sistemlerdir. Ayrıca devamlı takip ve sinyalizasyon olanağı nedeniyle de kandideminin erken tanısına olanak sağlamaktadırlar. Otomatize kan kültür sistemleri pozitiflik süresini her ne kadar kısaltmış olsa da günümüzde kullanılan sistemlerde inkübasyon süreleri hala on beş gün gibi uzun süreler olmakatadır ve daha aşağı çekilememektedir (Dignanive ark., 2009 ve Kauffman ve ark., 2015).

İnkübasyonun başlangıcından alarm sinyalinin başlangıcına kadar (izleme sistemi tarafından belgelendiği gibi) tanımlanan kan kültür cihazında pozitiflik (KKP) süresi klinik alanda daha az tartışılmıştır, ancak *Candida* türlerinin saptanması için ortalama sürenin türler arasında değiştiği genel olarak kabul edilmektedir (Chen ve ark., 2015). *In vitro* kan kültür sistemleri ile yaklaşık 48 saat içinde kan kültür şişeleri mayalar için pozitif olarak saptanabilmektedir, ancak tür tanımlama aşamasında bu süre uzamaktadır (Bouza ve ark., 2004 ve Fernandez ve ark., 2009). Bu nedenle, kandidemide tespit edilen KKP, etken *Candida* türlerini tahmin etmek için basit bir gösterge olabilir ve klinisyenlerin gerekli antifungal tedavi hakkında karar vermelerine yardımcı bir parametre olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Fernandez ve ark., 2009).

Fernandez ve ark. (2009), yaptığı bir çalışmada, *Candida glabrata*'nın, uygun antifungal seçiminin gecikmesine neden olabilecek BacT/ALERT sisteminde uzun KKP sürelerinin olabileceğini saptamışlardır.

2012'de yapılan 171 kandidemi vakası ile ortlama KKP süreleri incelenmiş ve *C. albicans* için; 34,2 saat, *C. parapislosis* için; 38,9 saat, *C. tropicalis* için; 16,9 saat ve *C. glabrata* için; 56,5 saat olarak saptamışlardır. Ayrıca *C. glabrata* için KKP süresi anlamlı olarak diğerlerinden daha yüksek saptanmıştır (Lai ve ark., 2012).

2015 yılında Taiwan'da 410 kandidemi tanılı hastanın ortalama KKP sürelerinin incelendiği bir çalışmada *C. albicans* için; 58,4 saat, *C. parapislosis* için; 71,3 saat, *C. tropicalis* için; 50,6 saat ve *C. glabrata* için; 90,7 saat olarak saptamışlardır (Chen ve ark., 2015).

Bizim çalışmamızda da hastaların ortalama KKP süreleri *C. albicans* için; 36,1 saat, *C. parapislosis* için; 39,4 saat, *C. tropicalis* için; 17,7 saat ve *C. glabrata* için; 50,5 saat olarak literatürlerdeki çalışmalar ile benzer olarak ve *C. tropicalis* için en düşük KKP, *C. glabrata* için en yüksek KKP süreleri saptanmıştır. Ayrıca Ben-Ami ve ark. (2008)'nın yaptığı bir başka çalışmada, *Candida* için KKP'nin kateter ilişkili

kandidemi için bir belirteç olabileceğini bildirilmiştir. Tüm bu çalışmalar ile KKP sürelerinin kandidemide önemli bir parametre olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, antifungal ajanlar ve KKP arasındaki ilişkinin daha fazla açıklığa kavuşturulması için daha fazla kanıt gerekmektedir.

Birçok konvansiyonel yöntem arasında *C.albicans*'ın diğer türlerden ayrımında laboratuvarlarda en sıklıkla tercih edilen yöntem germ tüp testidir (GTT) (Doğan ve ark., 2016). GTT oldukça güvenilir bir testtir. Fakat aynı zamanda GTT için kan kültürlerinde üreme saptandıktan sonra katı besiyerine yapılan pasaj sonrası üretien kolonilerden test gerçekleştirebilmektedir. Bu yüzden, sonuçlandırma için ekstradan 24 saat daha süreye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu zaman kaybının ekarte edilebilmesi ve *C. albicans*'ın hızlı tanımlanabilmesi için, maya olduğu saptanan kan kültür şişelerinden direkt GTT uygulanması üzerine çalışmalar yapılmıştır (Doğan ve ark., 2016; Sheppard ve ark., 2008 ve Terlecka ve ark., 2007).

Terlecka ve ark. (2007)'nın çalışmasında; maya üremesi saptanan toplam 31 kan kültürü şişesi incelenmiş ve direkt GTT negatif olan 1 *C. albicans* izolatı dışında, % 96,7 (30/31) oranında konvansiyonel GGT ile uyum olduğu rapor edilmiştir.

2013 yılında yapılan bir araştırmada Gram boya sonrası maya pozitif olan 100 pozitif kan kültüründen sekizi *Candida albicans* için her iki yöntemle de pozitif olarak saptanmıştır. Direkt GTT ile SDA'dan pasaj sonrasında gerçekleştirilen GTT arasında% 100 uyum tespit edilmiştir. Ayrıca her izolat API 20 C AUX kullanımı ile identifye edilerek araştırma kontrol edilmiştir (Saad ve ark., 2013).

2016 yılında ülkemizde maya pozitif olduğu saptanan kan kültür şişelerinden yapılan bir araştırmada, direkt şişeden GTT pozitif bulunan 80 kan örneğinin tamamında *C.albicans*/*C. dubliniensis* varlığı tespit edilmiş, yanlış pozitiflik saptanmamıştır. Direkt şişeden GTT negatif bulunan 92 örnekten 11'inde (% 12) yanlış negatiflik saptanarak *C.albicans*/*C.dubliniensis* saptanmıştır (Doğan ve ark., 2016).

Bizim tez çalışmamızda da *C. albicans* olduğunu sonrasında saptamış olduğumuz 25 örnekten 24'ü direkt GTT pozitif olarak saptanmıştır. Bir adet *C. albicans* örneği yanlış negatif olarak değerlendirilmiştir. Kalsik GTT ile 25 *C. albicans* türünün hepsi pozitif olarak saptanmıştır. Non-*albicans Candida* türlerinin ise tamamı her iki GTT ile de negatif olarak, doğru ve %100 uyumlu olarak saptanmıştır. Tüm izolatlar değerlendirildiğinde 49/50 %98 gibi yüksek bir doğruluk oranıyla her iki test irdelenmiştir. Tez çalışmamızda literatürdeki birçok yayından farklı olarak direkt GTT için ön santrifüj basamağı da eklenmiştir. Bu sayede kan kültürü şişesinde bulunan maya hücrelerini daha konsantre hale getirilerek farklı konsantrasyonda maya içeren tüm şişelerde daha doğru sonuç hedeflenmiştir.

Direkt GTT, *albicans*/non-*albicans Candida* türleri ayrımının kültürden bir gün önce tespitine olanak sağlayan, ucuz, özel ekipman gerektirmeyen ve en önemlisi konvansiyonel tanı testleri ile yüksek uyum oranı gösteren bir testtir. Çok düşük oranda da olsa yanlış negatif sonuçlar alınabileceği unutulmamalıdır.

Konvansiyonel teşhis yöntemleri maya tanımlaması için günler almaktadır ve bu yöntemlerle yanlış veya eksik tanımlamalar literatürde bildirilmiştir (Lai ve ark., 2013). Bu nedenle, uygun antifungal ajanların zamanında uygulanabilmesi için *Candida* türlerinin tanımlanması sağlayan hızlı ve doğru yöntemlere ihtiyaç vardır. Her ne kadar çeşitli tekniklerin patojenik mantarların daha erken tanımlanmasını sağladığı görülse de, bunların klinik uygulamadaki kullanımı ve etkinliği sınırlıdır (Lai ve ark., 2012).

Uygun ampirik antifungal tedavinin başlanamaması veya tedavide uygun dozun kullanılamaması nozokomiyal kaynaklı invaziv mantar enfeksiyonlarında mortalite oranlarında artışa sebep olan etkenlerdir (Mikulska ve ark., 2012). Blot ve ark. (2002)'nın yaptığı bir çalışmada, tedavide 48 saat ve üzerindeki gecikmeler sonucunda %78 oranında mortalite görülürken, daha erken zaman diliminde tedaviye başlanan hastalarda ise %44 oranında mortalite saptanmıştır. Antifungal tedavide 12-

24 saatlik gecikme, ölüm olasılığını neredeyse iki katına çıkarabilmektedir (Blot ve ark., 2002 ve Morrell ve ark., 2005).

Bu veriler klinisyenlerin kandidemi için risk faktörleri olan hastalarda *Candida albicans*'ın kültürde üremesini beklemek yerine ampirik antifungal tedaviyi düşünmeleri gerektiğini düşündürmektedir.

Candida türü patojenlerin çoğu günümüzde hala yaygın olarak kullanılan birçok antifungale karşı duyarlıdır. Ancak bazı türlerde bazı antifungallere karşı azalmış duyarlılık veya direnç mevcuttur. *C. krusei'* nin flukonazole doğal dirençli olması, *C. glabrata'* nın triazol grubuna karşı duyarlılığında azalma ve hızlı direnç gelişimi, *C. parapsilosis* ve *C. guillermondii'*de ekinokandinlere karşı duyarlılıkta azalma görülmektedir (Pfaller ve Diekema, 2007). İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarında etkenin tür düzeyinde hızlı tanımlanması, klinisyenin etkili antifungalle tedaviye en kısa sürede başlayabilmesi açısından oldukça önemlidir (Mikulska ve ark., 2012).

Doğru antifungal seçimi için tanıda kullanılan konvansiyonel yöntemler gerek hız gerekse duyarlılık ve özgüllük açısından kısıtlılıklara sahiptir. Konvansiyonel yöntemlerde karşılaşılan bu güçlüklerin giderilmesi için daha hassas, daha spesifik olan ve en önemlisi daha kısa inkübasyon süresi sağlayan alternatif testlere ihtiyaç doğmuştur. Bu doğrultuda MALDI-TOF MS klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında referans aracı olarak ortaya çıkmış, hem hız hem de doğruluk açısından eski tanımlama yöntemlerini aşmıştır (Arca-Suarez ve ark., 2017).

Son yıllarda *Candida*'ların tür tanımlamasında kullanılan yöntemlerdeki dezavantajların çoğunun mayalardan salınan spesifik proteinlerin saptanmasına dayanan MALDI-TOF MS ile aşılabileceği bildirilmektedir. Klinik laboratuvarlarında maya izolatlarını tanımlamak için kullanılan konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında, MALDI-TOF MS ile, çok daha kısa sürede ve

giderek büyüyen veritabanı sayesinde daha doğru tanımlamalar yapılabileceği öne sürülmektedir (Spanu ve ark., 2012).

Wang ve ark. (2016), 2683 klinik maya izolatından kültür bazlı MALDI-TOF MS ile identifikasyonda 41 farklı türün doğru tanımlandığını göstermişlerdir. Bütün maya izolatlarının doğru tanımlanma oranı % 98,8'dir (2651/2683).

Chen ve ark. (2013), MALDI-TOF MS ile maya identifikasyon oranını değerlendirmek için 98 klinik izolata kültür bazlı MALDI-TOF MS ile identifikasyonişlemi uygulanmış ve sonuçlar tür düzeyinde % 74,5 (73/98) ve cins düzeyinde % 94,9 (93/98) olarak belirlenmiştir.

Konvansiyonel yöntemlerle identifikasyona göre çok daha avantajı olan MALDI-TOF MS ile identifikasyon özellikle sespsis/fungemi gibi dakikaların bile önemi olduğu durumlar için kullanılmak üzere geliştirilmiş ve kültürde üretme basamağı atlanarak direkt kan kültür şişesinden patojenlerin identifikasyonunu sağlayan adaptasyonlar yapılmıştır. Ancak, bu süre avantajının yanında bazı büyük sorunlar devam etmektedir. Kan kültüründe polimikrobiyal etkenlerin varlığında, direkt şişeden yapılan identfikasyon işlemlerinde sadece bir bakteri türü tanımlanabilmekte ve yanlış tanımlama meydana gelebilmektedir. Ayrıca insan kanı bileşenleri (eritrosit, lökosit, serum proteinleri), direkt şişeden yapılan identifikasyon işlemlerinde spekturumlarda parazitlere veya sapmalara neden olabilmektedir. Bu yüzden kan kültür şişesi içeriğine ön işlemlerde bulunmak hem paraziter spekturum oluşumunu azaltmak hem de patojeni konsantre etmek için önemli bir aşamadır. Bu sorunları ortadan kaldırmak için özel kitler geliştirilmiştir ya da ön işlemler ile analiz gerçekleştirilebilmektedir (Hou ve ark., 2019).

Chien ve ark. (2016), yılında pozitif 405 adet kan kültür şişesinden direkt MALDI-TOF MS ile bakteri ve mantarları başarıyla tanımlamışlardır. Tür (% 72,1) veya cins (% 89,6) düzeyinde 365 patojen doğru olarak tanımlanmıştır.

2017 yılında İtalya'da yapılan bir çalışmada gram pozitif, gram negatif, anaerob ve maya patojenlerini ihtiva eden 101 tiyoglikolat sıvı besiyerinden 91 örnekte (% 90,1) doğrudan MALDI-TOF MS tanımlamaları, kültür sonrası geleneksel laboratuvar prosedürlerinden sonra elde edilen sonuçlarlaaynı olarak saptanmıştır. Doğrudan işleme ile yanlış tanımlanmış 10 örnekte, mayalar veya polimikrobiyal etkenlerin besiyerinde büyüdüğü veya yüksek hücresel kalıntıların varlığından dolayı doğru identifikasyonun engellenmiş olduğunu saptamışlardır (Arca-Suarez ve ark., 2017).

Van Belkum ve ark. (2017), yaptıkları çalışma ile klinik örneklerden direkt MALDI-TOF MS ile identifikasyonda örnekteki patojen miktarının kültüre edildikten sonra yapılan klasik identifikasyondaki patojen miktarına göre düşük olacağını bunun da, doğru spektrum elde edilmesine izin vermeyeceğini ileri sürmüşlerdir. Aynı zamanda, kan kültüründe, mikrobiyal yük genellikle yeterliyken spektral analizinden önce konsantre edilmesi ve saflaştırılması gerektiği ifade edilmiştir. Direkt kan kültüründen identifikasyon için; konsantrasyon ve ekstrasyon için lizis filtrasyon ya da santrifüjle ön işlemlere tabi tutulması gerektiği bildirilmiştir.

Direkt kan kültür şişesinden identifikasyonda öne çıkan problemler, mantarların identifikasyonunda hücre duvarı komponentleri ve kalınlığının da etkisiyle daha çok sorun oluşturmaktadır.

2011 yılında sadece *Candida* türlerinin direkt kan kültür şişesinden MALDI-TOF MS ile identifikasyonunun hedeflendiği, özel yıkama ve santrüfüj protokollerinin ilave edildiği bir araştırmada tanımlama sonuçları *Candida albicans*'ın % 95,9'u (187/195) ve non-*albicans Candida* türlerinin % 86,5'i (128/148) için geleneksel kültüre dayalı yöntemin sonuçlarıyla uyumlu olarak saptanmıştır. Sonuçlar 30 dakika içinde elde edilmiş (medyan) ve bu yaklaşımın kan dolaşımı enfeksiyonuna neden olan *Candida* türlerinin rutin tanımlanması için güvenilir, zaman kazandıran bir araç olduğunu düşünülmüştür (Spanu ve ark., 2012).

Fothergill A ve ark. (2013), tarafından yapılan çalışmada BacT/Alert şişelerinden bir miktar alınan kan kültürü sıvısının oda sıcaklığında 2-4 dakika süreyle lizis tamponu ile inkübe edildikten sonra elde edilen lizatın filtrelenerek, patojenlerin toplanması ve Vitek MS ile identifikasyonuna dayanan, bakteri ve maya türleri hızlı bir şekilde tanımlanmıştır. Çalışmada 259 kan kültür şişenin 189 (%73)'unda mikroorganizma tür seviyesinde tanımlanırken, 51 (%19,7)'inde tanımlanamamış, altısında (% 2,3) yanlış tanımlanmıştır. Bu protokolin santrifüj basamağı gerektirmemesi ve 15 dakikadan daha kısa bir sürede analiz için temiz bir spektrum eldesi, çalışmanın avantajları olarak saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda da direkt kan kültür şişesinden MALDI TOF MS ile 50 *Candida* türünün 37'si (%74) kültürden yapılan MALDI TOF MS ile tutarlı ve literatürlerle paralel olarak tanımlanmıştır. Bunların 20'si (%80) *C. albicans*, 8'i (%66,6) *C. parapsilosis*, 7'si (%70) *C. tropicalis*, 2'si (%66,6) *C. glabrata*, olarak saptanmıştır. Direkt klinik örnekten MALDI-TOF MS ile identifikasyon için farklı protokoller ve farklı doğru identifikasyon oranları mevcuttur. Saptanan bu oranlar ön işlemler ile daha saf ve daha konsantre patojeninin elde edilmesine ve kandaki fungal yüke bağlanmaktadır (Spanu ve ark., 2012). Çalışmamızda identifiye edilemeyen 13 *Candida* türü spektrum yetersizliği nedeni ile tanımlanamamıştır. Bu 13 hastanın kanındaki fungal yükün daha düşük olduğu bu sebeple saflaştırma ve konsantre etme aşamasında yeterli maya komponenti eldesi sağlanamadığı düşünülmektedir.Ayrıca klasik kültür bazlı MALDI-TOF MS ile identifikasyona göre yaklaşık 48 saat süre avantajı sağladığı tespit edilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kandidemi, insidansı gün geçtikçe yükselen, mortalitesi oldukça yüksek bir enfeksiyondur. Kandidemi kliniğinden en sık sorumlu mikroorganizma sıklıkla *Candida albicans*'tır. Fakat diğer türler de önem taşımaktadır. *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde, tür düzeyinde tanımlama yapılması kadar, hastalar için hızlı tedavi son derece önemlidir. Non-*albicans* türü mantarların antifungal dirençlerinden dolayı identifikasyon hızı tedavi seçiminde çok önemli rol oynar. Bu nedenle mantar enfeksiyonlarında erken tanıyı sağlamak ve mortalite oranını düşürmek için kısa sürede ve güvenilir sonuç veren yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu tez çalışması ile hızlı, güvenilir ve ekonomik olarak kullanılabilecek KKP, direkt şişeden GTT ve direkt kan kültüründen MALDI-TOF MS ile identifikasyondan oluşan üç parametre kandidemi tanısı için değerlendirilmiştir.

KKP sürelerinin kandidemide önemli bir parametre olduğu görülmektedir. KKP süreleri, kandidemili hastalar arasında nihai tür tanımlanmasından önce tür tahminine yönelik bir ipucu olabilir. Bununla birlikte, antifungal ajanlar ve KKP arasındaki ilişkinin daha fazla açıklığa kavuşturulması için daha fazla kanıt gerekmektedir.

Direkt GTT, *albicans*/non-*albicans Candida* türleri ayrımının kültürden bir gün önce tespitine olanak sağlayan, ucuz, özel ekipman gerektirmeyen ve en önemlisi konvansiyonel tanı testleri ile yüksek uyum oranı gösteren testlerdir. Çok düşük oranda da olsa yanlış negatif sonuçlar alınabileceği unutulmamalıdır.

Direkt kan kültür şişesinden patojenin identifikasyonunda %74 gibi yüksek doğruluk oranları tespit edildi ve bu doğru antifungal tedavinin başlanmasında klasik

kültür bazlı MALDI-TOF MS ile identifikasyona göre yaklaşık 48 saat süre avantajı sağladığı tespit edilmiştir.

Araştırmamızdaki veriler, tür çeşitliliğinin ve çalışılan örnek sayısının az olması nedeni ile daha geniş bir yorum yapmayı engellemektedir. Spektrum yetersizliğinden kaynaklanan identifikasyon hatalarının çözümünü sağlayacak, daha fazla *Candida* türünü içeren daha kapsamlı çalışmalara gerek vardır.

ÖZET

Kandidemilerin Hızlı Tanı ve İdentifikasyonunda Direkt Kan Kültür Şişesinden MALDI-TOF MS Yöntemi, Germ Tüp Testi ve Kan Kültüründe Pozitifleşme Süresinin Kıyaslanması

Kandidemi, insidansı gün geçtikçe yükselen, mortalitesi oldukça yüksek bir enfeksiyondur. Kandidemi kliniğinden en sık sorumlu mikroorganizma sıklıkla *Candida albicans*'tır. Fakat diğer türler de önem taşımaktadır. *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde, tür düzeyinde tanımlama yapılması kadar, hastalar için hızlı tedavi son derece önemlidir. Non-*albicans* türü mantarların antifungal dirençlerinden dolayı identifikasyon hızı tedavi seçiminde çok önemli rol oynar. Bu nedenle mantar enfeksiyonlarında erken tanıyı sağlamak ve mortalite oranını düşürmek için kısa sürede ve güvenilir sonuç veren yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmamızın amacı çok daha kısa sürede etkenin identifikasyonunda otomatize/manuel birkaç yöntemin değerlendirilmesi ve karşılaştırılmasıdır.

Araştırmada, Mart 2018-Mart 2019 tarihleri arasında Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen pozitif kan kültürlerinden izole edilen 50 *Candida* suşunun kan kültür sisteminde pozitifleşme süre ortalamaları türlere göre tespit edilmiştir. Tüm örneklere direkt kan kültür şişesinden germ tüp testi ve MALDI-TOF MS ile identifikasyon, saf kültür eldesi sonarası kültürden germ tüp testi ve MALDI-TOF MS ile identifikasyon işlemi yapılmıştır. Elde edilen veriler karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan çalışmada kan kültür sisteminde pozitifleşme süre ortalamaları olarak türlere göre; *C. albicans* 36,1 s, *C. parapsilosis* 39,4 s, *C. tropicalis* 17,7 s, *C. glabrata* 50,5 s olarak belirlenmiştir. Germ tüp testi ile direkt kan kültür şişesinden ve saf kültür eldesi sonrası yapılan işlemlerde 49 kökende (%98) uyum bulunmuştur. Çalışmamızda incelediğimiz 50 adet *Candida* türünün direkt kan kültür şişesinden MALDI-TOF MS yöntemine göre identifikasyon sonuçları; 20 *C. albicans,* 8 *C. parapsilosis,* 7 *C. tropicalis,* 2 *C. glabrata* olarak belirlenmiştir. Saf kültür eldesi sonrası MALDI-TOF MS tanımlama yöntemine göre ise; 25 *C. albicans,* 12 *C. parapsilosis,* 10 *C. tropicalis,* 3 *C. glabrata* olarak identifiye edilmiştir. MALDI-TOF yöntemi iledirekt kan kültür şişesinden ve saf kültür eldesi sonrası yapılan identifikasyon işlemlerinde 37 kökende (%74) uyum bulunmuştur. Tanımlanamayan

örneklerin yanlış identifikasyon nedeniyle değil, spektrum yetersizliği nedeniyle olduğu gözlenmiştir.

KKP süreleri, kandidemili hastalar arasında nihai tür tanımlanmasından önce tür tahminine yönelik bir ipucu olabilir. Direkt GTT, *albicans*/non-*albicans Candida* türleri ayrımında kültürden bir gün önce tespitine yüksek doğruluk oranıyla olanak sağlamaktadır. Otuz yedi *Candida* türünde standart yöntemlerle %100 uyumlu olacak şekilde tanımlama yapılmış ve bu yöntemin saf kültür eldesi gerektiren MALDI-TOF MS yöntemine göre en az 48 saat avantaj sağladığı görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: *Candida* spp, Germ Tüp, Kandidemi, Matrix-yardımlı Laser Desorpsiyon-Ionizasyon Kütle Spektrometrisi

SUMMARY

Rapid Detection and Identification of Candidemia by MALDI-TOF MS, Germ Tube From Blood Culture Bottles and Time To Positivity of Blood Culture

Candidemia is an increasing in prevalence infection with a high mortality. *Candida albicans* is the most common factor in candidemia but other species are also important. In treatment of *Candida* infections, rapid treatment is extremely important for patients as much as performing species level identification. Identification time plays a very important role in the treatment selection due to the antifungal resistance of non-*albicans Candida*. Therefore, in order to provide early diagnosis in fungal infections and decrease the mortality rate, methods which provide reliable results in a short time are needed.

The objective of this thesis study is to evaluate and compare several automated/manual methods in identification of the factor in a much shorter time.

In the study, average time to become positive in blood culture system for 50 *Candida* strains which were isolated from positive blood cultures sent to Sakarya University Training and Research Hospital Medical Microbiology Laboratory between March 2018 and March 2019 was determined according to the species. All samples were applied germ tube test and identification with MALDI-TOF MS directly from blood culture bottle, after obtaining pure culture, culture was applied germ tube test and identification with MALDI-TOF MS. The data obtained was evaluated comparatively.

In the study, average time to get positive in blood culture system in terms of species was determined to be 36,1 h for *C. albicans*, 39,4 h for *C. parapsilosis*, 17,7 h for *C. tropicalis*, 50,5 h for *C. glabrata*. In the processes performed after germ tube test from direct blood culture bottle and obtaining of pure culture, compatibility was found in 49 roots (98%). Identification results according to MALDI TOF MS method from direct blood culture bottle for 50 *Candida* species analyzed in our study was found to be; 20 for *C. albicans*, 8 for *C. parapsilosis*, 7 for *C. tropicalis* and 2 for *C. glabrata*. According to MALDI-TOF MS method after obtaining pure culture, it was identified as follows; 25 for *C. albicans*, 12 for *C. parapsilosis*, 10 for *C. tropicalis* and 3 for *C. glabrata*. In the identification processes performed after MALDI-TOF method from direct blood culture bottle and obtaining of pure culture, compatibility was found in 37 roots (74%). It was observed that unidentified samples were due to spectrum deficiency, not due to false identification.

Time to get positive in blood culture may be a clue for prediction of species before final species identification among patients with candidemia. Direct GTT enables the detection of albicans/non-*albicans Candida* species the day before the culture with high accuracy. Thirty-seven *Candida* species were identified to be 100% compatible with standard methods, and this method was shown to provide at least 48 hours advantage over the MALDI-TOF MS method, that requires pure culture yield.

Keywords: *Candida* spp, Candidemia, Germ Tube, Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry

KAYNAKLAR

AKALIN H (2009). Fungal İnfeksiyonlar. In: Yalçın AN, Erbay RH. Yoğun Bakım Ünitesinde İnfeksiyonlar. Nobel Tıp Kitapevleri, ss: 147-153.

ARCA-SUAREZ J, GALAN-SANCHEZ F, MARİN-CASANOVA P, RODRİGUEZ-IGLESİAS MA (2017). Direct identification of microorganisms from thioglycolate broth by MALDI-TOF MS.*PLoS One*, 12.

BADER O (2013). MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*,**13(5)**:788-99.

BAKIR M, ÇERİKÇİOĞLU N, BARTON R, YAĞCI A (2006). Epidemiology of candidemia in a Turkish Tertiary Care Hospital. *APMIS* , **114**:601-610.

BASSETTİ M, MERELLİ M, RİGHİ E, DİAZ-MARTİN A, ROSELLO EM, LUZZATİ R, PARRA A, TRECARİCHİ EM, SANGUİNETTİ M, POSTERARO B (2013). Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *Journal of clinical microbiology,* **51(12)**: 4167-4172.

BEN-AMİ R, WEİNBERGER M, ORNİ-WASSERLAUFF R, SCHWARTZ D, ITZHAKİ A, LAZAROVİTCH T, BASH E, AHARONİİ Y, MOROZ I, GİLADİ M (2008). Time to blood culture positivity as a marker for catheter-related candidemia. *J Clin Microbiol*, **46**:2222-2226.

BİBEROĞLU G (2003). Kütle spektrometresi ve tıp alanında kullanımı. T Klin Tıp Bilimleri, **23**:491-498.

BİLGEHAN H (2002). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 3. Baskı. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir.

BLOT SI, VANDEWOUDE KH, HOSTE EA, COLARDYN FA (2002). Effects of nosocomial candidemia on outcomes of critically ill patients. *Am J Med*, **113(6)**:480-485.

BOUZA E, SOUSA D, MUN˜OZ P, RODRI´GUEZ-CRE´İXEMS M, FRON C, LECHUZ JG (2004). Bloodstream infections: a trial of the impact of different methods of reporting positive blood culture results. *Clin Infect Dis*, **39**:1161-1169.

CALDERONE RA, BRAUN PC (1991). Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev, **55*(1)**,** 1-20.

CALDERONE RA, FONZİ WA (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol, **9*(7)**: 327-335.

CHEN JH, YAM WC, NGAN AH, FUNG AM, WOO WL, YAN MK, CHOİ GKY, HO PL, CHENG VCC, YUEN KY (2013). Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory. *J Clin Microbiol*, 51.

CHEN LY, YANG SP, CHEN TL, LİAO SY, CHEN YY, CHAN YJ, CHEN LK, WANG FD (2015). Clinical significance of time to positivity for yeast in candidemia. *J Microbiol Immunol Infect*, **48**:425-430.

CHİEN JY, LEE TF, DU SH, TENG SH, LİAO CH, SHENG WH, TENG LJ, HSUEH PR (2016). Applicability of an in-house saponin-based extraction method in Bruker biotyper matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of bacterial and fungal species in positively flagged blood cultures. *Front Microbiol,* **7**:1432.

CLARK AE, KALETA EJ, ARORA A, WOLK DM (2013). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev,* **26(3)**: 547–603.

CROXATTO A, PROD'HOM G, GREUB G (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS microbiology reviews,* **36(2)**: 380-407.

CRUCİANİ M, SERPELLONİ G (2008). Management of *Candida* infections in the adult intensive care unit. *Expert Opin Pharmacother,* **9(2)**:175-191.

ÇALIŞKAN E, DEDE A, BİTEN GÜVEN G (2013). Kan kültürlerinde saptanan *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *ANKEM Derg,* **27(1)**:25-30.

ÇERİKÇİOĞLU N (1999). Mantar İnfeksiyonlarında Seroloji ve Deri Testleri. In *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. Ustaçelebi, Ş., Günal, M., İmir, T., Cengiz, T., Tümbay, E., Mete, Ö. (Eds.), Güneş kitabevi, Ankara. 1081-1086.

ÇERİKÇİOĞLU N (2008). *Candida* Türleri. In *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. pp. 2411-2426.

ÇERİKÇİOĞLU N, SANCAK B (2008). Mantarların Genel Özellikleri ve Tanı Yöntemleri. In *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. Topçu, A. W., Söyletir, G., Doğanay, M. (Eds.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 2391-2397.

ÇERİKLİOĞLU N (2012). Mantarlarda Virülans Faktörleri. *ANKEM Derg, 26(Ek 2)*: 261-269.

DHİMAN N, HALL L, WOHLFİEL SL, BUCKWALTER SP, WENGENACK NL (2011). Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *Journal of clinical microbiology,* **49(4)**: 1614-1616.

DİGNANİ MC, SOLOMKİN JS, ANAİSSİE EJ (2009). *Candida*. In *Clinical Mycology*. Anaissie, E. J., McGinnis, M. R., Pfaller, M. A. (Eds.), Elsevier Health Sciences. 197-229.

DOĞAN Ö, GÜLMEZ D, ARIKAN AKDAĞLI S (2016). Fungemi olgularında hızlı bir ön tanımlama testi: Pozitif kan kültürü şişesinden yapılan doğrudan germ tüp (çimlenme borusu) testinin değerlendirilmesi. *ANKEM Derg*, **30(3)**:102-108.

DREVİNEK M, DRESLER J, KLİMENTOVA J, PİSA L, HUBALEK M (2012). Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Lett Appl Microbiol*, **55(1)**: 40-46.

DURAN-VALLE MT, SANZ-RODRIGUEZ N, MUNOZ-PARA PC, ALMAGRO-MOLTO M, GOMEZ-G, JOSE L (2014). Identification of clinical yeasts by Vitek MS system compared with API ID 32 C. *Medical Mycology*. **52(1)**:342–349.

EDWARDS JE (2010). *Candida* Species. In: Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R. *Mandell, Douglas, and Bennett' s Principles and Practice of Infectious Diseases*. Vol 2, 7th edn. Churchill Livingstone: Philadelphia 3225-3241.

EDWARDS JE (2015). *Candida* Species. In *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Bennett, J. E., Dolin, R., Blaser, M. J., Mandell,G. L., Douglas, R. G. (Eds.), pp: 2879-2894.

EGGİMANN P, QUE YA, REVELLY JP, PAGANİ JL (2015). Preventing invasive *Candida* infections. Where could we do better?.*J Hosp Infect*, **89(4)**:302-308.

ELLEPOLA AN, MORRİSON CJ (2005). Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol*, **43**:65-84.

ENER B (1999). Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olarak Mantarlar. In *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. Ustaçelebi, Ş., Günal, M., İmir, T., Cengiz, T., Tümbay, E., Mete, Ö. (Eds.), Güneş kitabevi, Ankara. 1123-1128.

ENER B (2008). *Candida* İnfeksiyonlarında Epidemiyoloji ve Laboratuvar Tanı. *ANKEM Derg*, 22 Ek(2): 263-274.

FERNANDEZ J, ERSTAD BL, PETTY W, NİX DE (2009). Time to positive culture and identification for *Candida* bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **64**:402-407.

FOTHERGİLL A, KASİNATHAN V, HYMAN J, WALSH J, DRAKE T, WANG YF (2013). Rapid Identification of Bacteria and Yeasts from Positive-Blood-Culture Bottles by Using a Lysis-Filtration Method and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrum Analysis with the SARAMIS Database. *J Clin Microbiol*, Mar;**51(3)**:805-809.

GEGİC M, NUMANOVİC F, DELİBEGOVİC Z, TİHİC N, NURKİC M, HUKİC M (2013). The importance of serological tests implementation in disseminated candidiasis diagnose. *Coll Antropol,* **37(1)**: 157-163.

GEHA DJ, ROBERTS GD (1994). Laboratory detection of fungemia. *Clin Lab Med*, **14**:83–97.

GİRİ S, KİNDO A (2012). A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian journal of medical microbiology,* **30(3)**: 270.

GUİNEA J (2014). Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection,* **20(s6)**: 5-10.

GÜLTEKİN B, EYİGÖR M, TELLİ M, AKSOY M, AYDIN N (2010). Yedi yıllık dönemde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin retrospektif olarak incelenmesi. *ANKEM Derg*, **24(4)**:202-208.

HAZEN KC, HOWELL SA (2007). *Candida*, *Cryptococcus*, and Other Yeasts of Medical İmportance. In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L, Pfaller, M. A. (Eds.), 9 ed. ASM Press, Washington. 1762-1788.

HİLMİOĞLU-POLAT S (2007). Sık Görülen Sistemik Mikozlarda Serolojik Tanı. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection),* 21(Ek1): 63-67.

HOU TY , CHİANG-Nİ C , TENG SH (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J Food Drug Anal*, **27**:404–414.

HOWELL SA, HAZEN KC (2011). *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: Versalovic, J. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol 2, 10th edn.Washington D.C: ASM Press, 1793-1821.

IDELEVİCH EA, GRUNEWALD CM, WÜLLENWEBER J, BECKER K (2014). Rapid Identification and Susceptibility Testing of *Candida* spp. from Positive Blood Cultures by Combination of Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry and Direct Inoculation of Vitek 2. *Plos One*, **9**: 1-14.

İNCİ R (1999). Mantarların Yapıları, Üreme Özellikleri ve Sınıflandırılması. In *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. Ustaçelebi, Ş., Günal, M., İmir, T., Cengiz, T., Tümbay, E., Mete, Ö. (Eds.), Güneş kitabevi, Ankara. 1015-1021.

KALKANCI A (2005). Mikozların serolojik tanısında yenilikler. Tuncer İ, Fındık D, Arslan U.(editor) 4. *Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Tutanaklar*. Konya: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, **49**:61-74.

KANTARCIOĞLU AS, YÜCEL A (2004). *Candida albicans*'da Mannan: Çeşitli Özellikleri ve Önemi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi,* **35(1)**:42-46.

KAUFFMAN CA, MARR KA, THORNER AR (2015). Clinical manifestations and diagnosis of candidemia and invasive candidiasis in adults. Erişim Adresi: [https://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-and-diagnosis-of-candidemia-and-invasive-candidiasis-in-adults.]. Erişim tarihi: 10/06/2020.

KHAN ZU, CHANDY R, METWALİ KE (2003). *Candida albicans* strain carriage in patients and nursing staff of an intensive care unit: a study of morphotypes and resistotypes 11-12. *Mycoses*, **46**: 479–486.

KOÇ AN (2002). Tıbbi Bakımdan Önemi Olan *Candida* Türlerinin Mikolojik Özellikleri. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. *Candida Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu, Tutanaklar*. Eskişehir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, **43**:37-45.

LAİ CC, WANG CY, LİU WL, HUANG YT, HSUEH PR (2012). Time to positivity of blood cultures of different *Candida* species causing fungaemia. *J Med Microbiol*,**61**:701–704.

LARONE DH (2011). Medically Important Fungi A Guide to Identification. Yeast and Yeast Like Organisms. 5nd ed. Washington DC: ASM Press. 109–143.

MİKULSKA M, DEL BONO V, ROTTO S, VİSCOLİ C (2012). Occurrence presentation and treatment of candidemia. *Expert Rev Clin Immunol*, **8(8)**:755-765.

MONTAGNA MT, LOVERO G, BORGHİ E, AMATO G, ANDREONİ S, CAMPİON L, CASCİO GL, LOMBARDİ G, LUZZARO F, MANSO E, MUSSAP M, PECİLE P, PERİN S, TAMNGORRA E, TRONCİ M, IATTA R, MORACE G (2014). 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*, **18(5)**:661-674.

MORGAN J, MELTZER MI, PLİKAYTİS BD, SOFAİR AN, HUİE-WHİTE S, WİLCOX S, HARRİSON LH, SEABERG EC, HAJJEH RA, TEUTSCH SM (2005). Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a case-control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, **26(06)**: 540-547.

MORRELL M, FRASER VJ, KOLLEF MH (2005). Delaying the empiric treatment of *Candida* blood stream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother*, **49(9)**:3640-3645.

MUNOZ P, GUİNEA J, ROJAS L, BOUZA E (2010). New antifungal agents for the treatment of candidaemia. *Int J Antimicrob Agents*, **36(2)**: 63-69.

NEPPELENBROEK K, SEÓ R, URBAN V, SİLVA S, DOVİGO L, JORGE J, CAMPANHA N (2014). Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral diseases*, **20(4)**: 329-344.

NUNES CZ, MARRA AR, EDMOND MB, DA SİLVA VİCTOR E, PEREİRA CA (2013). Time to blood culture positivity as a predictor of clinical outcome in patients with *Candida albicans* bloodstream infection. *BMC Infect Dis*, **13**: 486.

ODDS FC, BERNAERTS R (1994). CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol*, **32(8)**:1923-1929.

ORASCH C, MARCHETTİ O, GARBİNO J, SCHRENZEL J, ZİMMERLİ S, MÜHLETHALER K, PFYFFER G, RUEF C, FEHR J, ZBİNDEN R (2014). *Candida* species distribution and antifungal susceptibility testing according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and new vs. old Clinical and Laboratory Standards Institute clinical breakpoints: a 6-year prospective candidaemia survey from the fungal infection network of Switzerland. *Clinical Microbiology and Infection*, **20(7)**: 698-705.

OSTROSKY-ZEİCHNER L (2012). Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med*, **125(1)**: 14-24.

OTAĞ F, ASLAN G, ŞEN S, EMEKDAŞ G (2006). Fungemi etkeni *Candida* türlerinin hızlı tanısında CHROMagar *Candida* besiyerininin kullanımı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **36(4)**:200-204.

ÖZTÜRK T, ÖZSEVEN AG, ÇETİN ES, KAYA S (2013). Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarının tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. *Kocatepe Medical Journal*, **14**:17-22.

PAPPAS PG (2006). Invasive candidasis. *Infect Dis Clin North Am*, **20**:485-506.

PEREİRA GH, MÜLLER PR, SZESZS MW, LEVİN AS, MELHEM MS (2010). Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans Candida* species. *Med Mycol*, **48(6)** : 839-842.

PFALLER MA (2015). Application of Culture-Independent Rapid Diagnostic Tests in the Management of Invasive Candidiasis and Cryptococcosis. *Journal of Fungi*, **1(2)**: 217-251.

PFALLER MA, DİEKEMA DJ (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a Persistent public health problem. *Clini Microbiol Rev*, **20(1)**:133-163.

PFALLER MA, DİEKEMA DJ (2010). Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical reviews in microbiology*, **36(1)**: 1-53.

PFALLER M, DİEKEMA D, RİNALDİ MG, BARNES R, HU B, VESELOV A, TİRABOSCHİ N, NAGY E, GİBBS D, GROUP GAS (2005). Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of

Candida and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. *Journal of clinical microbiology*, **43(12)**: 5848-5859.

PFALLER MA, MESSER SA, MOET GJ, JONES RN, CASTANHEİRA M (2011). *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, **38(1)**:65-69.

PİNCUS DH, ORENGA S, CHATELLİER S (2007). Yeast İdentification-Past, Present, and Future Methods. *Med Mycol*, **45**:97-121.

POSTERARO B, DE CAROLİS E, VELLA A, SANGUİNETTİ M (2013). MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. Expert Rev Proteomics, **10(2)**:151-164.

RİCHARDSON M, LASS-FLÖRL C (2008). Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect*, **4(1)**:5-24.

RODLOFF C, KOCH D, SCHAUMANN R (2011). Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis. *Eur J Med Res*, **16(4)**:187-195.

SAAD U,SİDDİQUİ S, JAMİL N, JAMİL S, HAFİZ S (2013). Detection of *Candida albicans* from Positive Blood Culture Bottles. *Int j pathol*, **11(2)**: 54-57.

SARAÇLI MA (2010). Tıbbi mikrobiyoloji. In. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A., Başustaoğlu, A. C., Yıldıran, Ş. T., Tanyüksel, M., Yapar, M. (Eds.), Atlas Kitapçılık. 679-688.

SEGAL E, ELAD D (2005). Candidiasis. In: Merz W, Hay R. *Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections. Medical Mycology*. 10th edn. London: Hodder Arnold, 579-623.

SEYEDMOUSAVI S, İLKİT M, DURDU M, ERGİN Ç, HİLMİOĞLU-POLAT S, MELCHERS W, VERWEİJ P (2015). *Candida* ve Kandidoz: Epidemiyoloji, Tanı, Tedavi, Antifungal İlaç Direnci ve Konağın Genetik Yatkınlığında Güncel Durum. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **45(1)**: 1-11.

SHEA YR (2011). General Approaches for Direct Detection of Fungi. In: Versalovic, J. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol 2, 10th edn.Washington D.C: ASM Press.1776-1792.

SHEPPARD DC, LOCAS MC, RESTİERİ C, LAVERDİERE M (2008). Utility of the germ tube test for direct identification of *Candida albicans* from positive blood culture bottles, *J Clin Microbiol*, **46(10)**:3508-3509.

SNYDER JW, ATLAS RM, LAROCCO MT (2011). Reagents, Stains, and Media: Mycology. In: Versalovic J. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol 2, 10th edn.Washington D.C: ASM Press.1767-1775.

SOFAİR AN, LYON GM, HUİE-WHİTE S, REİSS E, HARRİSON LH, SANZA LT, SKAGGS BAA, FRİDKİN SK (2006). Epidemiology of community-onset candidemia in Connecticut and Maryland. *Clinical Infectious Diseases*, **43(1)**: 32-39.

SPANU T, POSTERARO B, FİORİ B, D'INZEO T, CAMPOLİ S, RUGGERİ A, TUMBARELLO M, CANU G, TRECARİCHİ EM, PARİSİ G, TRONC M, SANGUİNETTİ M, FADDA G (2012). 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*, **50**:176 –179.

SUTTON DA (2007). Specimen Collection,Transpor, and Procecessing:Mycology. In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Pfaller, M. A.(Eds.), 9. Baskı ed. ASM Press, Washington. 1728-1736.

TERLECKA JA, DU CROS PA, ORLA MORRİSSEY C, SPELMAN D (2007). Rapid differentiation of *Candida albicans* from non-*albicans* species by germ tube test directly from BacTAlert blood culture bottles, *Mycoses*, **50(1)**:48-51.

THEEL ES, SCHMİTT BH, HALL L, CUNNİNGHAM SA, WALCHAK RC, PATEL R, WENGENACK NL (2012). Formic Acid-Based Direct, On-Plate Testing of Yeast and Corynebacterium Species by Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J ClinMicrobiol*, **50(1)**:3093–3095.

TOPRAK NÜ, ERDOĞAN S, ÇELİK C, JOHANSSON C (2003). Kandidemi olgularında etken mayaların hızlı tanısında CHROMagar *Candida*'nın Yeri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **33**:262-265.

TORTORANO AM, PEMAN J, BERNHARDT H, KLİNGSPOR L, KİBBLER CC, FAURE O (2004). 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*, **23(1)**: 317–322.

TÜMBAY E (2010). Tıbbi mikrobiyoloji. In. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A., Başustaoğlu, A. C., Yıldıran, Ş. T., Tanyüksel, M., Yapar, M. (Eds.), Atlas Kitapçılık.751-774.

TÜMBAY T (1999). *Candida* Türleri. In *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. Ustaçelebi, Ş., Günal, M., İmir, T., Cengiz, T., Tümbay, E., Mete, Ö. (Eds.), Güneş kitabevi, Ankara. 1081-1086.

URAL O (2004). Fungal İnfeksiyonların Epidemiyolojisi ve Korunma. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, **8**: 159-167.

VAN BELKUM A, WELKER M, PİNCUS D, CHARRİER JP, GİRARD V (2017). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry in Clinical Microbiology: What Are the Current Issues? *Ann Lab Med*, **37(6)**: 475-483.

VAZQUEZ JA, SOBEL JD (2003). Candidiasis. In: Dismukes, W. E., Pappas, P. G., Sobel, J. D. *Clinical Mycology*. New York: Oxford University Press.141-188.

WANG H, FAN YY, KUDİNHA T, XU ZP, XİAO M, ZHANG L, FANX, KONG F, X YC (2016). A comprehensive evaluation of the Bruker biotyper MS and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of yeasts, part of the National China hospital invasive fungal surveillance net (CHIF-NET) study, 2012 to 2013. *J Clin Microbiol*, 54.

WARNOCK DW (2007a). Taxonomy and Clasification of Fungi. In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Pfaller, M. A.(Eds.), 9 ed. ASM Press, Washington. 1721-1727.

WARNOCKDW (2007b). Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Jpn J Med Mycol*, **48**:1-12.

WATTAL C, OBEROİ JK (2016). Microbial identification and automated antibiotic susceptibility testing directly from positive blood cultures using MALDI-TOF MS and VITEK 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **35(1)**:75-82.

WİESER A, SCHNEİDER L, JUNG J, SCHUBERT S (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics identification of microorganisms and beyond. *Appl Microbiol Biotechnol*, **93(3)**:965-974.

WİLLİNGER B, KİENZL D, KURZAİ R (2014). Diagnostic of fungal infections. In: Esser K, Kurzai O. *The Mycota. Human fungal Pathogens*. 2nd edn. Vol 12. New York: Springer, 229-253.

WİSPLİNGHOFF H; BİSCHOFF T, TALLENT SM, SEİFERT H, WENZEL RP, EDMOND MB (2004). Nosocomial bloodstream infec-tions in US hospitals : analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*, **1;39(3)**:309-317.

YANG YL (2003). Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect*, **36(4)**: 223-228.

YAPAR N (2014). Epidemiology and risk factors fori İnvasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*, **13(10)**:95-105.

YEĞENOĞLU Y (2007). İnvaziv mantar hastalıklarının mikolojik tanısı. *İst Tıp Fak Derg*, **70**:23-28.

YILDIRAN ŞT (1999). Mantar İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı. In *Temel ve klinik mikrobiyoloji*. Ustaçelebi, Ş., Günal, M., İmir, T., Cengiz, T., Tümbay, E., Mete, Ö. (Eds.), Güneş kitabevi, Ankara.1127-1144.

YİĞİT N, BENLİ M (2005). Maya hücre duvar yapısının dinamikleri. *Mikrobiyoloji Dergisi*, **3(3)**: 11-17.

YÜCEL A (1987). Tıp bakımından önemli *Candida* türlerinin mikolojisi. *Türk Mikrobiol Cem Derg*, **17(1-2)**:45-59.

ZAOUTİS TE, ARGON J, CHU J, BERLİN JA, WALSH TJ, FEUDTNER C (2005). The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. *Clinical Infectious Diseases*, **41(9)**: 1232-1239.

EKLER

Ek-1 Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kandidemi Hızlı Tanı ve İdentifikasyonunda Direkt Kan Kültür Şişesinden MALDI-TOF MS, Germ Tüp Testi ve Kan Kültüründe Pozitifleşme Sürecinin kıyaslanması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:02-135-19**	**Tarih:28 Ocak 2019**	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.İrfan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Levent YAZICIOĞLU	Kalp ve Damar Cerrahisi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Şule ŞENGÜL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.İnci İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Serap SIVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Derya GÖKMEN	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	—
Doç.Dr.Pınar HURİ	Biyomedikal Mühendisliği	A.Ü. Mühendislik Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	H.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	—
İffet BERKTAŞ	Matematik Mühendisliği	Türkiye Kömür İşletmeleri Genel Müdürlüğü	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	—

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

Berna IŞIK
A.Ü.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Asıl Gibidir

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kandidemi Hızlı Tanı ve İdentifikasyonunda Direkt Kan Kültür Şişesinden MALDI-TOF MS, Germ Tüp Testi ve Kan Kültüründe Pozitifleşme Sürecinin kıyaslanması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhıye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Nurten ALTANLAR			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Farmasötik Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar Araştırması			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

Berna IŞIK
A.Ü.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
Aslı Gibidir

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı ve soyadı: Kerem YILMAZ

Doğum yeri ve tarihi : Bornova, 1985

Uyruğu : TC

Medeni durumu : Bekar

İletişim adresi ve telefonu: Soma Devlet Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Turgutalp, Manisa/Türkiye, +90 532 478 34 18.

II- Eğitimi

Doktora : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2016-

Tıpta Uzmanlık: Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2015- 2019

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2011-2013

Lisans : Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2003-2007

Yabancı Dili: İngilizce

III- Ünvanları

Eczacı: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2007

Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanı: Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2019

IV- Mesleki Deneyimi

Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanı: Soma Devlet Hastanesi, 2019-

Araştırma Görevlisi: Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2015-2019

Araştırma Görevlisi: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2012-2015

Eczacı: Kerem Eczanesi, 2008-2009

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

KLİMUD

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

Yilmaz K, Altindis M, Dikicier BS, Yüksekal G, Köroglu M. Is there a relationship between rosacea with gut dysbiosis? *Dermatol Sin,*2020;38:88-93.

Altındis M, Köroglu M, Demiray T, **Yilmaz K**, İnci MB, Ölmez M, Altındis S, Erkorkmaz U. Microbial contamination and infection risks of narghile besides hazards of tobacco, *Cent Eur J Public Health*, 2020,28(1):74–78.

Yilmaz K, Demiray T, Koroglu M, Hatipoğlu H, Kilic U, Karabay O, Altındis M. Rapid differentiation of *Candida albicans* from non-*albicans* species by germ tube test directly from blood culture bottles and early candidiasis treatment. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob,*2019;8:37.

Yilmaz K, Demiray T, Koroglu M, Hatipoğlu H, Kilic U, Karabay O, Altındis M. Investigation of Colistin and Sulbactam Combination Effectivity in Multi Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains with Diagonal Gradient Strip Test Method. *Clin. Lab,* 2018;31;64(11

Demiray T, **Yılmaz K**, Aydemir Ö, Köroğlu M, Özbek A, Halis F, Altındiş M. Mıcrobıologıcal Evaluatıon Of Urınary Tract Infectıons In Elderly Men Wıth Benıgn Prostatıc Hyperplasıa. *Turkish Journal of Geriatrics/Türk Geriatri Dergisi*, 2016;*19*(3):183-8.

Yılmaz K, Altındiş M. Sindirim Sistemi Mikrobiyotası ve Fekal Transplantasyon. *Nobel Medicus Journal*,2017;13(1):9-15.

Aydemir Ö, Hatipoğlu H, **Yılmaz K**, Köroğlu M, Kara İ, Demiray T. Mitral and Aortic Valve Endocarditis due to a Rare Microorganism: *Abiotrophia defectiva* and literature review, *Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2017;25(4):650-653.

Demiray T, Aydemir Ö, Kılıç Ü, **Yılmaz K**, Köroğlu M, Altındiş M. Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Saptanmasında Karbapenemaz İnaktivasyon Testinin Kullanımı, *Turk Mikrobiyol Cem Derg*, 2017;47(2):78-82.

Bildirileri:

Yılmaz K, Demiray T, Köroğlu M, Kılıç Ü, Karabay O, Altındiş M, Germ tube test for early direction of treatment of Candidiasis by the rapid discrimination of *Candida albicans* from non-*albicans*, EKMUD Kongresi, Antalya, Mayıs, 2018.

Hatipoğlu H, Kılbaş İ, Kılıç Ü, **Yılmaz K**, Köroğlu M, Altındiş M, Çoklu ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarında kolistin ve sulbaktamın sinerjik etkinliğinin kombine gradient şerit test yöntemi ile araştırılması, EKMUD Kongresi, Antalya, Mayıs, 2018.

Aydemir Ö, Hatipoğlu H, **Yılmaz K**, Köroğlu M, Kara İ, Demiray T, Altındiş M, A case of mitral and aortic valve endocarditis due to a rare microorganism*: Abiotrophia defectiva*, EKMUD Kongresi, Antalya, Mayıs, 2018.

Aydemir Ö, Hatipoğlu H, **Yılmaz K**, Köroğlu M, Kara İ, Demiray T, Altındiş M, Abiotrophia defectiva'nın Neden Olduğu Enfektif Endokardit Olgusu,Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Kasım, 2017.

Altındiş M, Aslan FG, **Yılmaz K**, Demiray T, Köroğlu M, Hepatit B Hastalarında Hepcidin Viral Yük İlişkisi, BUHASDER Kongresi, Dalaman, Kasım, 2017.

Yılmaz K, Demiray T, Simsek A, Köroğlu M, Karabay O, Altindis M. A Case of Meningitis and Brain Abscess Caused by *Streptococcus constellatuss*. ECCMID Kongresi, Viyana, Nisan, 2017.

Kılıç Ü, Demiray T, Köroğlu M, **Yılmaz K**, Özbek A, Altındiş M. Detection and clinical implicaitons of biofilm formation among clinical isolates of *Sphingomonas paucimobilis*. ECCMID Kongresi, Viyana, Nisan, 2017.

Altındiş M, Aslan FG**, Yılmaz K**, Demiray T, Köroğlu M, Relationship Between Viral Load and Hepcidin in Hepatitis B Paients, ESVC Kongresi, Stresa, Eylül, 2017.

Demiray T,Hafızoğlu T**,** Köroğlu M, **Yılmaz K**, Altındiş M**,** Baseline Evaluation of Causative Agents and Their Susceptibility Patterns of Late-Onset Blood Stream Infections in A NICU, Balkan Kongresi, Sofia, Kasım, 2017.

Yılmaz K, Demiray T, Köröğlu M, Kiliç Ü, Karabay O, Şahin K, Altindiş M (2016). Germ Tube Test for the Rapid Discrimination of *Candida albicans* from Non-*albicans* Species by from Positive Blood Culture Bottles, GCCMID Kongresi, Dubai, Mayıs, 2016.

Yılmaz K, Demiray T, Şimşek A,Köroğku M, Karabay O, Altindiş M (2016). Nadir Bi Menenjit Etkeni Olarak *Streptococcus constellatus*. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Kasım, 2016.

Yılmaz K, Aydemir Ö, Aydemir Y, Demiray T, Köroğlu M, AltindiSş M (2016). Bronşektazi Tanisi İle Takip Edilen Bir Hastada Alt SolunumYolu Enfeksiyonu Etkeni Olarak *Pasteurella canis*. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Kasım, 2016.

Demiray T**,** Köroğku M, Kılıç Ü, **Yılmaz K**, Özdemir M, Altindiş M (2016). Kolistin Dahil Çoklu İlaç Dirençli *K. pneumoniae* İzolatlarinda Seftazidim/Aviabaktam Kombinasyonunun *In-vitro* Etkinliği 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Kasım, 2016.

Karakeçe E, Köroğlu M, **Yılmaz K**, Aydemir Ö, Terzi H, Aslan FG, Altindiş M (2016). Anti-Hiv½ PozitifVe Western Blot Test Sonuçlarinin İrdelenmesi. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Kasım, 2016.

Altindiş M, Köroğlu M, **Yılmaz K**, Demiray T, İnci M, Ölmez M (2016). Nargileler Enfeksiyon Riski Taşiyor Mu? 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Kasım, 2016.

Öztaş FZ, Demiray T, Aydemir Ö, **Yılmaz K**, Köroğlu M, Altindiş M (2016). Kan Dolaşımı Enfeksiyonu Etkeni Olarak İzole Edilen *Staphylacoccus aureus* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Oranları; Sakarya, 6. Türkiye EKMUD Kongresi, Antalya, Mayıs, 2016.

Yılmaz K, Demiray T, Aydemir Ö, Kiliç Ü, Köroğlu M, Çakmak G, Özbek A, Altindiş M (2016). *Streptococcus anginosus*'un neden olduğu primer peritonit olgusu, 6. Türkiye EKMUD Kongresi, Antalya, Mayıs, 2016.

Kiliç Ü, Demiray T, **Yılmaz K**, Aydemir Ö, Köroğlu M, Özbek A, Uslu Yuvaci H, Altindiş M (2016). Gebelerde HBsAg, Anti-HCV ve Anti-HIV 1⁄2 seroprevelansı; Sakarya, 6. Türkiye EKMUD Kongresi, Antalya, Mayıs, 2016.

Demiray T, **Yılmaz K**, Aydemir Ö, Köroğlu M, Özbek A, Altindiş M (2016). Geriatrik Yaş Grubunda Benign Prostat Hiperplazisi Hastalarda İdrar Yolu Enfeksiyonu Etkenleri, 31. ANKEM Tanısı Almış Kongresi, Muğla, Mayıs, 2016

Demiray T, Aydemir Ö, Kiliç Ü, **Yılmaz K**, Köroğlu M, Özbek A, Altindiş M (2016). Karbapenemaz İnaktivasyon Testinin Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Tanısal Değerinin İrdelenmesi, 31. ANKEM Kongresi, Muğla, Mayıs, 2016.

Aydemir Ö, **Yılmaz K**, Köroğlu M, Demiray T, Altindiş M (2016). Otomatik Kan Kültür Cihazında Pozitif Sinyal Alınan Şişelerden Gram Boyama Ve Kültür Sonuçlarının Uyumu, 31. ANKEM Kongresi, Muğla, Mayıs, 2016.

Demiray T, Köroğlu M, Hafizoğlu T, **Yılmaz K**, Altindiş M (2016). Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesinde Üç Yıllık Kan Kültürü Sürveyansı; Sakarya, 12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, İstanbul, Nisan , 2106.

Yılmaz K, Demiray T, Terzi HA, Köroğlu M, Özbek A, Altindiş M (2016). Gebelerde İdrar Kültürlerinde *Streptococcus agalactiae* Üreme Oranları; Sakarya. 12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, İstanbul, Nisan, 2016.

Yılmaz K Özbek A, Köroğlu M, Kiliç Ü, Demiray T, Terzi HA, Altindiş M (2016). Pediatrik Yaş Grubunda Hepatit B ve C Virüsü Seroprevalansı; Sakarya, 13. Ulusal Viral Hepatit Kongresi, Antalya, Mart, 2016.

Yılmaz K, Ermertcan Ş, Taşlı H, Kurutepe S (2014). Üropatojenik *E. coli* İzolatlarında Virülans Faktörleri ile GSBL Varlığının ve Antimikrobiyal Duyarlılığının Belirlenmesi, Ulusal, Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, Haziran 2014.

Yılmaz K, Ermertcan Ş, Taşlı H, Kurutepe S. Determination of virulence factors, antimicrobial susceptibility and ESBL production rates of pediatric uropathogenic *E. coli* strains. ECCMID Kongresi, Barselona, Mayıs, 2014.

Kitap Bölümü:

Temel, Klinik ve Tanısal Tıbbi Viroloji-Bölüm 16

Mikrobiyota, Probiyotikler ve Akılcı Beslenme-A39 Alkol, Karaciğer Hastalığı ve Bağırsak Mikrobiyotası

Sözlü Bildiri:

Mikrobiyota, Probiyotikler ve Akılcı Beslenme Sempozyumu, 9 Mayıs 2018, Sakarya Alkol ve Mikrobiyota, Arş. Gör. **Kerem Yılmaz**