Yoğun Bakım Ünitesinde Takip Edilen Kandidemi Riski Yüksek Hastalarda *Candida* Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi ve Kan Kültürünün Karşılaştırılması

Comparison of *Candida* Polymerase Chain Reaction Method and Blood Culture in Patients with High Risk of Candidemia in Intensive Care Unit

Tuğçe ŞİMŞEK BOZOK¹ (ID), Ferit KUŞCU¹ (ID), Taylan BOZOK² (ID), Süheyla KÖMÜR¹ (ID), Aslıhan CANDEVİR¹ (ID), Ayşe SEZA İNAL¹ (ID), Behice KURTARAN¹ (ID), Filiz KİBAR³ (ID), Yeşim TAŞOVA¹ (ID)

¹ Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

¹ Cukurova University Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Adana, Turkey.

² Niğde Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Niğde.

² Nigde Training and Research Hospital, Clinic of Medical Microbiology, Nigde, Turkey.

³ Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.

³ Cukurova University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Adana, Turkey.

Makale Atfı: Şimşek Bozok T, Kuşcu F, Bozok T, Kömür S, Candevir A, Seza İnal A ve ark. Yoğun bakım ünitesinde takip edilen kandidemi riski yüksek hastalarda *Candida* polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ve kan kültürünün karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2021;55(4):568-579.

ÖZ

Yoğun bakım ünitesinde, invaziv fungal enfeksiyonların %70-90'ından *Candida* türleri sorumludur. Kandidemde erken tanı ve tedavi önemlidir. Uygun olmayan tanı ve tedavi mortalite ve morbiditeyi ciddi oranda artırır. Kan kültürlerinin geç sonuç vermesi, serolojik testlerin tek başına kullanıldıklarında duyarlılıklarının düşük olması nedeniyle moleküler yöntemlerin bu alanda araştırılması ön plana çıkmıştır. Bu çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Yoğun Bakım ve Anesteziyoloji ve Reanimasyon Ünitesinde takip edilen kandidemi riski yüksek hastalarda kan kültürü ile tam kandan çalışılan *Candida* gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR) testinin sonuçları karşılaştırılmıştır. Kandidemi şüpheli hastalarda hızlı bir tanı yöntemi olan *Candida* Rt-PCR testinin pratikte kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda rehberlerde belirlenen kriterlere göre, kandidemi riski yüksek olan 90 hasta prospektif olarak değerlendirilmiştir. Hastalardan idrar, perine, aksilla, trakeal aspirat kültürü ve iki set kan kültürü alınmıştır. Ayrıca etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)'li bir tüpe kan alınmış ve -40°C'de daha sonra *Candida* Rt-PCR çalışılması amacıyla saklanmıştır. *Candida* Rt-PCR'da türe özgül primerler kullanılarak tür ayrımı yapılmıştır. Hastaların *Candida* skoru (CS) hesaplanmıştır. Hastaların 41 (%45.5)'i kadın, 49 (%55.5)'u erkek, tüm hastaların medyan yaşı 61.5 yıl olarak saptanmıştır. Çalışmaya alınan hastaların üçünde (%3.3) kan kültüründe *Candida* üremesi olurken, 17 (%18.9)'sinde *Candida* Rt-PCR pozitif sonuç saptanmıştır. Kan kültürü ve Rt-PCR testinde bulunan *Candida* türleri birbiriyle uyumluydu. PCR ile istatistiksel olarak anlamlı derecede

daha fazla pozitiflik elde edilmiştir ($p=0.006$). Total parenteral nutrisyon (TPN) ile beslenen ($p=0.028$), malignitesi olan ($p=0.021$) ve son üç ay içinde cerrahi operasyon geçirme öyküsü olan ($p=0.003$) hastalarda *Candida* Rt-PCR pozitifliği olmayanlara göre anlamlı derecede yüksek olarak tespit edilmiştir. *Candida* Rt-PCR pozitifliği olan hastalarla Rt-PCR negatif hastalar arasındaki CS farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.015$). Kandidemi için yüksek riskli bir popülasyonda yapılan çalışmamızda *Candida* Rt-PCR kan kültüründen daha fazla pozitif sonuç bulunmuştur. Rt-PCR pozitifliği ve kan kültürü pozitifliği yüksek CS ile ilişkili bulunmuştur. Bu veriler ışığında özellikle kandidemi riski yüksek olan hastalarda moleküler yöntemlerin de tanıda kullanılmasının ve CS ile desteklenmesinin uygun olacağı düşünülmüştür. Kandidemi tanısı için altın standart olan kan kültürünün geç sonuç vermesi ve %50 oranında pozitif olduğu düşünüldüğünde, kandidemi için daha hızlı tanı yöntemlerinin kullanılmasının mortalite ve morbiditeyi azaltmak için önemli olduğu bilinmektedir. *Candida* Rt-PCR yönteminin hızlı ve iyi sonuç vermesi tanıda kullanılabileceğini göstermektedir. Ancak Rt-PCR testlerinde kullanılan primerlerin standardizasyonunun olmaması, yanlış pozitifliklere de neden olabilir. Bu yönden ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Kandidemi; kan kültürü; gerçek zamanlı PCR; *Candida* skoru; yoğun bakım ünitesi.

ABSTRACT

Candida species are responsible for 70-90% of invasive fungal infections in the intensive care unit. Early diagnosis and treatment is important in candidemia. Improper diagnosis and treatment increases mortality and morbidity significantly. Because of the late results of blood cultures and low sensitivity of the serological tests when used alone, molecular methods should be investigated in this field. In this study, the results of the *Candida* real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR) test, which was studied from blood culture and whole blood, were compared in patients with high candidemia risk who were followed in the General Surgery Intensive Care and Anesthesiology and Reanimation Unit of Cukurova University Faculty of Medicine. It was aimed to investigate the practical utility of *Candida* RT-PCR test, which is a rapid diagnosis method in patients with suspected candidemia. In our study, 90 patients with high risk of candidemia according to the criteria determined according to the guidelines were evaluated prospectively. Urine, perineum, axilla, tracheal aspirate culture and two sets of blood cultures were obtained from the patients. Blood sample was also drawn into an ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tube and stored at -40°C for later *Candida* Rt-PCR study. In *Candida* Rt-PCR, species-specific primers were used to distinguish species. *Candida* score (CS) of the patients was calculated. Forty one (45.5%) of the patients were female and 49 (55.5%) were male. The median age of the patients was 61.5 years. *Candida* was positive in blood culture in three (3.3%) of the patients included in the study, while *Candida* Rt-PCR was positive in 17 (18.9%). *Candida* species detected in the blood culture and Rt-PCR test were compatible with each other. Rt-PCR was significantly more positive ($p=0.006$). *Candida* Rt-PCR positivity was significantly higher in patients receiving total parenteral nutrition ($p=0.028$), malignancy ($p=0.021$), and history of surgery in the last three months ($p=0.003$). The difference in CS between patients with PCR positive and PCR negative was statistically significant ($p=0.015$). Our study was conducted in a high-risk population for candidemia and the results of *Candida* Rt-PCR was found to be more positive than blood culture. Rt-PCR positivity and blood culture positivity were associated with high CS. In the light of these data, it was thought that it would be appropriate to use molecular methods in the diagnosis and support them with CS, especially in patients with high risk of candidemia. Considering that blood culture, which is the gold standard for the diagnosis of candidemia, gives late results and is 50% positive, using faster diagnostic methods for candidemia is important to reduce mortality and morbidity. The fast and good results of *Candida* PCR method have shown that it can be used in diagnosis. However, lack of standardization of primers used in PCR tests may cause false positives. Additional studies are needed in this respect.

Keywords: Candidemia; blood culture; real-time PCR; *Candida* score; intensive care unit.

GİRİŞ

Yoğun bakım üniteleri (YBÜ), nozokomiyal enfeksiyonların en sık görüldüğü ve mortalitesinin en fazla olduğu bölümlerdir¹. Kandidemi, özellikle YBÜ'lerde önemli bir sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyondur². YBÜ'de invaziv fungal enfeksiyonların (IFE) %70-90'ın-

dan *Candida* spp. sorumluyken, %10-20'sinden *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. ve *Rhizopus* spp. sorumlu olarak tutulmaktadır³. *Candida* türleri bazı risk faktörlerinin varlığında mukozaya yapışarak çoğalır. Sonrasında mantar artışı ile kolonizasyon ve bunu izleyen dönemde de enfeksiyon gelişir^{1,4}. *Candida* türleri Amerika'da hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonlarının %8-10'una sebep olurken, koagülaz negatif stafilokok, *Staphylococcus aureus* ve enterokoklardan sonra dördüncü sırada yer almıştır⁵. Kore'de 2006-2012 yılları arasında kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık etkeni *S.aureus* iken, 2013'ten itibaren *Candida* spp. olmuştur². YBÜ'de uzun süreli yatışa bağlı olarak invaziv işlemlerin artışı, tekrarlayan cerrahi girişimler, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, transplantasyon hastaları ve immünsupresyon tedavisi, hematoloji ve solid organ kanser hastaları, nötropeni, steroid kullanımı gibi faktörler, fungal enfeksiyonlar için en önemli risk faktörleridir^{6,7}.

Kandidemide erken tanı ve tedavi önemlidir. Uygun olmayan tanı ve tedavi mortallite ve morbiditeyi ciddi oranda arttırır. Tüm tanı kılavuzlarında kan kültürünün mutlaka yapılması gerektiği belirtilmektedir. Ancak *Candida* türleri, kan kültürlerinin sadece %50'sinde üretilebilir ve üreme zamanları geçtir. Geliştirilen diğer serolojik veya moleküler testler henüz kan kültürünün yerini tutamamakta ve ek olarak yapılmaları önerilmektedir⁸. Ancak yine de kan kültürlerinin geç sonuç vermesi ve serolojik testlerin tek başına kullanıldıklarında duyarlılıklarının düşük olması nedeniyle moleküler yöntemlerin bu alanda araştırılması ön plana çıkmıştır. Bu moleküler yöntemlerden biri de polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testidir. Farklı klinik örneklerden yapılan PCR gibi moleküler testlerde, hem klinik örneklerden DNA ekstraksiyonunun sorunlu olması hem de inhibitörlerin varlığı, sonucu etkileyebilmekte ve ayrıca kolonizasyon ve enfeksiyon ayrımı sorun olmaktadır^{9,10}. Klinik örnek olarak tam kan, serum, plazma gibi kan ürünlerinin yanı sıra, bronkoalveoler lavaj ya da doku örnekleri de kullanılabilir. Testte kullanılan klinik örneğin türüne göre testin duyarlılığı değişmektedir¹¹.

Bu çalışmamızda yoğun bakım ünitesinde yatan, kandidemi riski yüksek olan hastalardan alınan kan kültürleri ile tam kandan çalışılan *Candida* gerçek zamanlı PCR (Rt-PCR) sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 02.09.2016 ve Karar No: 19).

Hastalar ve Örnekler

Bu çalışmada Kasım 2016 ve Haziran 2018 tarihleri arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi ve Anesteziyoloji ve Reanimasyon Ünitesinde takip edilen 850 hastadan kandidemi için risk faktörlerinin en az üçüne sahip, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine rağmen persistan ateşi olan, enfeksiyon parametrelerinde düzelme olmayan, kandidemi riski yüksek olan ve daha önce hiç antifungal tedavi almamış ve çalışmaya katılım onayı alınan 90 hasta prospektif olarak değerlendirildi. Kandidemi için risk faktörleri; Yoğun bakım ünitesinde en az 10 gün yatmış olmak,

immünsupresif ilaç kullanmak, iki ve daha fazla bölgede *Candida* kolonizasyonu olması, transplantasyon, malignite veya cerrahi operasyon geçirme öyküsü olması, bir haftadan uzun süreli antibiyoterapi alıyor olmak, sepsis kliniğine sahip olmak, total parenteral nutrisyon ile besleniyor olmak, mekanik ventilasyon ile takip edilmek, akut böbrek yetmezliği olması, santral venöz kateteri olması şeklinde tanımlanmıştır^{12,13}.

Çalışmaya alınan her hastadan antifungal tedavi öncesi kan kültürü, *Candida* Rt-PCR için bir adet etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)'lı tüpe en az 3 ml tam kan örneği ve *Candida* kolonizasyonu tespiti için örnekler alındı. Tam kan örnekleri ve kan kültürleri kör test edildi.

***Candida* Kolonizasyonunun Belirlenmesi**

Candida kolonizasyonunun tespiti için alınabilecek her hastadan idrar kültürü, perine kültürü, aksilla kültürü ve trakeal aspirat kültürü alındı⁴. İdrar örnekleri asepti kurallarına uyularak foley sondadan alındı. Yapılan çalışmalarda idrarda *Candida* saptanmasının kolonizasyon ve enfeksiyon ayrımının net olarak yapılamadığı belirtildi. Bu nedenle kandidi olgularının tamamı kolonizasyon olarak kabul edildi¹⁴.

***Candida* Skoru**

Her hastanın *Candida* skoru (CS); total parenteral nutrisyon 1 puan, multifokal *Candida* kolonizasyonu 1 puan, cerrahi geçirme 1 puan ve sepsis 2 puan olacak şekilde hesaplandı⁴.

Kan Kültürü

Periferik venlerden venipunktur ile iki set kan kültürü alındı. Her set bir aerob, bir anaerob kan kültürü şişesinden oluşmaktadır. Kan kültürü örnekleri, BD BACTEC™ FX (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi kullanılarak mikrobiyoloji bölümünde çalışıldı. Üreme olan örneklerde mantar tanımlanması için VITEK 2 Compact sistemi (BioMérieux, Fransa) ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi için YST-ID ve AST-Y08 (BioMérieux, Fransa) kartları kullanıldı.

DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüpe alınan tam kan örnekleri -40°C'de saklandı. Eksi 40°C'de saklanan tam kan örnekleri oda sıcaklığında çözündürüldü ve fungal DNA elde etmek için ExiPrep16 plus tam otomatik DNA/RNA ekstraksiyon cihazı (BIONEER, Daejeon, Kore) kullanıldı. Örneklerin DNA izolasyonu için Genomic DNA ekstraksiyon kit (BIONEER, Daejeon, Kore)'i kullanıldı. Ardından DS-11+ mikro hacimli spektrofotometre (DeNovix, Wilmington, DE, ABD) cihazı kullanılarak elde edilen DNA'ların saflık derecesinin uygunluğu ve konsantrasyonların yeterliliği ölçüldü ve kayıt altına alındı.

***Candida* Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Candida Rt-PCR'da *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* ve *Candida dubliniensis*'i tespit etmek amacıyla Tablo 1'de gösterilen türe özgül primerler sentezletildi^{15,16}.

Tablo 1. Candida Polimeraz Zincir Reaksiyonu için Kullanılan Türe Özgü Primer Setleri

Primer	Primer Dizisi (5'-3')	Amplikon (bp)	Kaynak
<i>C.albicans</i>			
CALB 1/2-F	TTT ATC AAC TTG TCA CAC CAG A	~273	Hsu ve arkadaşları 2003 ¹⁶
CALB 1/2-R	ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG		
<i>C.glabrata</i>			
gla 8F/8R-F	AGG CCC GTA AAG TAA AGG TCG	~104	Zhang ve arkadaşları 2016 ¹⁵
gla 8F/8R-R	GGG GTA GAA GCG TTA CTC GTT		
<i>C.tropicalis</i>			
CTR I/anti5-F	CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T	~357	Zhang ve arkadaşları 2016 ¹⁵
CTR I/anti5-R	CGC TTA AAA TAA GTT TCC ACG TTA AAT		
<i>C.parapsilosis</i>			
CPA 1/2-F	GCC AGA GAT TAA ACT CAA CCA A	~300	Hsu ve arkadaşları 2003 ¹⁶
CPA 1/2-R	CCT ATC CAT TAG TTT ATA CTC CGC		
<i>C.krusei</i>			
CKRU 1/2-F	GCA TCG ATGA AGA ACG CAG C	~258	Hsu ve arkadaşları 2003 ¹⁶
CKRU 1/2-R	AAA AGT CTA GTT CGC TCG GGC C		
<i>C.dubliniensis</i>			
CDU 1/2-F	CTG GCG TCG CCC ATT TTA TT	~501	Zhang ve arkadaşları 2016 ¹⁵
CDU 1/2-R	GCC ACC CCC GAA AGA GTA ACT		

bp: Baz çifti.

Son hacim 50 µl olacak şekilde; 5 µl kalıp DNA, türe özgü sentezletilen ileri ve geri primerlerin her birinden 2 µl (10 pmol) ve 41 µl grade su kullanılarak karışım hazırlandı. Hazırlanan karışım optik şeffaf film kaplı 200 µl'lik liyofilize AccuPower GreenStar qPCR PreMix (BIONEER, Daejeon, Kore) içeren PCR tüplerine aktarıldı. Karışım homojenizasyon amacıyla vortekslendi ve ExiCycler96 Q-PCR (BIONEER, Daejeon, Kore) cihazına yerleştirildi. Takip eden işlemler üreticinin önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. Rt-PCR ısı döngüsü; başlangıç denatürasyon 95°C'de 5 dakika, sonrasında 45 döngü şeklinde 95°C'de 5 saniye denatürasyon, 55°C'de 40 saniye primer bağlanması ve uzama olacak şekilde gerçekleştirildi. Okuma sırasında hedef alınan boya Syber Green olarak ayarlandı. Elde edilen sonuçlar Analysis ExiCycler (BIONEER, Daejeon, Kore) programında değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Hastaların demografik verileri, risk faktörleri, altta yatan klinik durumları, hesaplanan skorlar ile kan kültürü ve *Candida* Rt-PCR testlerinin sonuçlarının analizi IBM SPSS versiyon 20.0 (IBM, Armonk, NY, ABD) paket programı ile yapıldı. Veriler ortalama (ort) ±, standart sapma (Ss), sayı (n) ve yüzde (%) olarak gösterildi. Grupların karşılaştırılmasında bağımsız değişken t testi ve ki kare testi kullanıldı. p< 0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 90 hastanın 46 (%51.1)'si Anesteziyoloji ve Reanimasyon Ünitesi, 44 (%49.9)'ü Genel Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesinde takip edilmiştir. Hastaların 41 (%45.5)'i kadın (medyan yaş 62 yıl), 49 (%55.5)'ü erkek (medyan yaş 61 yıl) ve tüm hastaların medyan yaşı 61.5 yıl olarak saptanmıştır. Hastaların 41 (%45.5)'inin malignite, 57 sepsis (%63.3)'sinin, 13 (%14.4)'ünün genel durum bozukluğu, 64 (%71.1)'ünün ise geçirilmiş cerrahi operasyon gibi nedenlerle YBÜ'nde takip edildikleri tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan hastalar arasında hematolojik malignensi tanısı olan veya nötropenisi olan hasta olmadığı saptanmıştır.

Çalışmaya alınan 90 hastanın üçünde kan kültüründe *Candida* üremesi olurken (iki kadın, bir erkek), Rt-PCR sonucu pozitif bulunan 17 hastada (10 kadın, sekiz erkek hasta) 18 *Candida* türü saptanmıştır. Çalışmaya alınan hastalarda, *Candida* Rt-PCR testinde kan kültürüne göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla pozitiflik elde edilmiştir ($p=0.006$). Kan kültüründe tespit edilen *Candida* türleri ile *Candida* Rt-PCR testinde bulunan *Candida* türleri uyumlu bulunmuştur. Kan kültürü ve *Candida* PCR'da *Candida* tespit edilen hastalarda *Candida* türlerinin dağılımı Tablo II'de gösterilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen hastalarda kandidemi açısından en sık görülen risk faktörleri üriner kateterizasyon (%93.3), son üç ay içinde hastaneye yatış öyküsü (%87.8) ve bir haftadan uzun süreli antibiyotik kullanımı (%85.6) olarak belirlenmiştir. Risk faktörleri ve Rt-PCR ilişkisi Tablo III'te gösterilmiştir. TPN ile beslenen ($p=0.028$), malignitesi olan ($p=0.021$) ve son üç ay içinde cerrahi geçirme öyküsü olan ($p=0.003$) hastalarda *Candida* Rt-PCR pozitifliği olmayanlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Çalışmaya alınan 90 hastanın 34'ünde tek bölgede *Candida* kolonizasyonu mevcutken, multifokal *Candida* kolonizasyonu olan dört hasta saptanmıştır. Multifokal *Candida* kolonizasyonu olanlar ile olmayanlar arasında *Candida* PCR pozitifliği açısından anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). *Candida* kolonizasyonunun en fazla idrarda (%89.5) sonra trakea (%13.1) ve perinede (%7.9) olduğu görülmüştür. Aksillada *Candida* kolonizasyonuna rastlanmamıştır. Kandidemi için risk faktörlerinin *Candida* kolonizasyonu ile

Tablo II. Kan Kültürü ve *Candida* Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Tespit Edilen *Candida* Tür Dağılımı

Türler	Kan kültürü, n (%)	<i>Candida</i> PCR, n (%)
<i>C.albicans</i>	-	1 (%5.9)
<i>C.krusei</i>	-	6 (%35.3)
<i>C.parapsilosis</i>	2 (%66.7)	4 (%23.5)
<i>C.tropicalis</i>	1 (%33.3)	2 (%11.7)
<i>C.dubliniensis</i>	-	3 (%17.6)
<i>C.glabrata</i>	-	-
<i>C.krusei</i> + <i>C.parapsilosis</i>	-	1 (%5.9)
Toplam	3 (%3.3)	17 (%18.9)

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

Tablo III. Risk Faktörleri ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu Arasındaki İlişki

Risk Faktörleri	<i>Candida</i> PCR pozitif (n= 17)	<i>Candida</i> PCR negatif (n= 73)	OR (%95 GA)	p
Total parenteral nutrisyon	11 (%64.7)	26 (%35.6)	3.31 (1.09-9.99)	0.028
Son üç ay içinde cerrahi geçirme	16 (%94.1)	41 (%56.2)	12.48(1.57-99.21)	0.003
Mekanik ventilasyon	4 (%23.5)	28 (%38.3)	0.49 (0.14-1.66)	0.250
Bir haftadan uzun süre antibiyotik alma	15 (%88.2)	62 (%85)	1.33 (0.26-6.64)	1.0
İmmüsupresif ilaç kullanma	4 (%23.5)	12 (%16.4)	1.56 (0.43-5.62)	0.492
Multipl <i>Candida</i> kolonizasyonu	0 (%0.0)	4 (%5.5)	-	0.323
Malignite	12 (%70.6)	29 (%39.7)	3.64 (1.16-11.42)	0.021
Sepsis	12 (%70.6)	45 (%61.6)	1.49 (0.47-4.69)	0.491
Santral venöz kateter	10 (%58.9)	53(%72.6)	0.53 (0.18-1.61)	0.264
Üriner kateterizasyon	16 (%94.1)	68 (%93.1)	1.17 (0.12-10.77)	1.0
Akut böbrek yetmezliği	0 (%0.0)	16 (%22)	-	0.035
Son üç ay içinde hastaneye yatış öyküsü	14 (%82.3)	65 (%89)	0.57 (0.13-2.44)	0.429
Dekübit veya açık yara varlığı	1 (%5.9)	11 (%15)	0.35 (0.04-2.93)	0.450

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, GA: Güven aralığı, OR: Odds ratio.

Tablo IV. *Candida* Skorunun Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçlarına göre Duyarlılık, Özgüllük, Pozitif ve Negatif Prediktif Değerleri

<i>Candida</i> Skoru	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD
≥ 2	%88.2	%28.7	%22.3	%91.3
≥ 3	%70.5	%54.7	%26.6	%88.8

PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

arasındaki istatistiksel ilişkiye baktığımızda, son üç ay içinde cerrahi geçirme öyküsü olan hastalarda (p= 0.025) özellikle son üç ay içinde abdominal cerrahi geçirme öyküsü olan hastalarda (p= 0.002) ve TPN ile beslenen hastalarda *Candida* kolonizasyon oranı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p= 0.015).

CS'si 3 ve daha fazla olan 45 hasta (%50) tespit edilmiştir. Kan kültüründe *Candida* üremesi olan üç hastanın *Candida* skorları 4 olarak saptanmıştır. *Candida* PCR pozitif olan hastaların medyan CS'si 3 (1-4), *Candida* PCR negatif olan hastaların CS'si ise 2 (0-4) olarak saptanmıştır. *Candida* PCR pozitif olanlar ile PCR negatif olan hastalar karşılaştırıldığında CS arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p= 0.015). Tablo IV'te PCR pozitifliği temel alınarak CS'nin duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değeri (PPD) ve negatif prediktif değeri (NPD) belirtilmiştir.

Hastaların *Candida* skorlarına göre *Candida* Rt-PCR pozitiflik oranları Şekil 1'de gösterilmiştir.

Şekil 1. Candida skoru değerlerine göre polimeraz zincir reaksiyonu pozitiflik oranları.

TARTIŞMA

Günümüzde *Candida* türleri ile gelişen enfeksiyonlar, özellikle kandidemi, yoğun bakım ünitelerindeki risk altındaki hasta sayısının artmasıyla daha kritik bir öneme sahip olmaktadır¹⁷. Nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan mantarların %80'inden fazlası *Candida* türleridir¹⁸.

Wellinghausen ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan çalışmada¹⁹ sepsisi veya hematolojik malignitesi olan nötropenik hastalarda ve kalıtsal/edinsel immün yetmezliği olup ateşi olan hastalarda [yetişkin (n= 329), çocuk (n= 55)] 18S rRNA gen hedefli Rt-PCR ile kan kültürü karşılaştırılmıştır. *Candida* Rt-PCR, kan kültürü negatif ancak invaziv kandidiyazisi (İK) mevcut sekiz hastanın yedisinde ve kan kültürü pozitif 12 hastanın yedisinde pozitif olarak bulunmuştur. Ayrıca 460 kan kültürü negatif örneğin 432'sinde *Candida* Rt-PCR negatif olarak tespit edilmiş ve NPD %99.8 olarak bulunmuştur. Sonuçta *Candida* Rt-PCR testinin dört saat gibi kısa sürede sonuçlanması, kandidemili hastalarda tedavide hızlı davranılarak mortalite ve morbiditenin azaltılmasında önemli olabileceği ve NPD'nin yüksek olması nedeniyle antifungal tedaviye başlanmada kararsız olunduğu durumlarda yardımcı bir tanı yöntemi olabileceği düşünülmüştür.

2011'de Avni ve arkadaşları tarafından yapılan, 54 çalışmanın dahil edildiği 4694 hasta (963'ü kanıtlanmış veya olası İK olan) ile yapılan bir meta-analiz derlemede²⁰, kanıtlanmış ve muhtemel İK hastalarında PCR pozitifliği oranları %85 (%78-91)'ken kan kültürleri %38 (%29-46) oranında pozitif bulunmuştur. Araştırmacılar İK tanısı için tam kandan direkt yapılan PCR testinin duyarlılık ve özgüllüğünün iyi olduğu ve erken tanıda önemli bir yöntem olabileceği sonucuna varmıştır. 2010-2012 yılları arasında yapılan bir çalışmada, yoğun bakımda takip edilen İK şüphesi olan 63 hasta prospektif olarak çalışmaya dahil

edilmiştir. Hastalardan 0, 2, 7, 14 ve 21. günlerde kan kültürü alınmış ve hem tam kandan hem de serumdan multipleks kantitatif gerçek zamanlı PCR (mqRt-PCR) çalışılmıştır. mqRt-PCR'da altı *Candida* türünün (*C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.krusei* ve *Candida guilliermondii*) tespiti yapılmış ve mqRt-PCR'ın duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD'si sırasıyla %96.3, %97.3, %92.8 ve %98.7 olarak belirlenmiştir. mqRt-PCR testi, serum ve tam kanda benzer sonuçlar vermiştir. Sonuç olarak, mqRt-PCR'ın yüksek özgüllük ve PPD'si nedeniyle diğer tanı yöntemlerinden ve klinik skorlamalardan daha faydalı olabileceği belirtilmiştir²¹. Yapılan başka bir çalışmada 82 hastadan alınan tam kan örneğinden 5.8 rRNA temelli Rt-PCR çalışılmış ve kan kültürü ile karşılaştırılmıştır. Rt-PCR'ın duyarlılığı %100 ve özgüllüğü %98.4 olarak bulunmuş ve tam kandan çalışılan PCR testinin güvenilir olduğu belirtilmiştir²². 2019'da yapılan bir çalışmada yoğun bakım ünitelerinde kandidemi şüphesi yüksek olan 58 hastada kan kültürü ile *Candida*'ya spesifik mRt-PCR kiti karşılaştırılmış ve PCR testinin %100 duyarlılık ve %94.1 özgüllük değerleriyle tanı için önemli olduğu belirtilmiştir²³. Çalışmamıza dahil edilen hastalarda, tam kandan çalışılan *Candida* PCR testi ile kan kültürüne göre daha fazla pozitif sonuç tespit edilmiştir (p= 0.006) ve kan kültüründe üreme olan *Candida* türleri ile *Candida* Rt-PCR ile tespit edilen *Candida* türlerinin uyumlu olduğu görülmüştür. Bu veriler ışığında, moleküler bir yöntem olan *Candida* Rt-PCR testinin, daha hızlı sonuç vermesi nedeniyle kandidemi şüpheli hastaların tanı ve tedavisinin hızlı bir şekilde yapılmasına olanak sağlayıp, kandidemiye bağlı mortalite ve morbiditeyi azaltacağını düşünmekteyiz.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada sekiz yıllık dönemde 1379 pozitif kan kültürünün 67 (%4.9)'ünde fungal etken saptanmıştır. Etkenlerin 57 (%85.1)'inde *Candida* spp. olduğu belirtilmiştir. Kan kültüründe üreyen 57 *Candida* türünün 49 (%86)'u *C.albicans* dışı *Candida* türleri olup en sık olarak *C.tropicalis* (%51) saptanmıştır. Hematolojik kanserli ve nötropenik hastalarda ampirik antifungal seçerken, bu hastalarda *C.albicans* dışı *Candida* oranının yüksek olduğunun (%86) dikkate alınması gerektiği sonucuna varılmıştır²⁴. Yoğun bakımda yatan nötropenik olmayan hastaların dahil edildiği bir yıllık dönemi kapsayan çalışmada; *C.albicans* %58.6 (17/29), *C.glabrata* %20.68 (6/29), *C.tropicalis* %6.89 (2/29), *C.parapsilosis* %6.89 (2/29), *C.lucitaniae* %3.44 (1/29), *C.dubliniensis* %3.44 (1/29) olarak tespit edilmiştir. 17 Yurt dışında yapılan bir çalışmada ise sadece beş tür *Candida* türünün olguların %92'sini (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* ve *C.krusei*) oluşturduğu gösterilmiştir. Küresel olarak *C.albicans* sıklığı azalırken, *C.glabrata* ve *C.krusei* stabil kalmakta ve *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis* artmaktadır. Hasta özellikleri ve önceki antifungal tedavinin, coğrafi alandan bağımsız olarak *Candida* spp.'nin dağılımı ve sıklığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir²⁵. Çalışmamızda PCR ile *C.krusei* (%35.3) türü en yüksek oranda tespit edilmiştir. Bu durum *C.albicans* dışı türlerin etkin olduğu gerçeğini destekler nitelikte olmasının yanında sıra dışı bir bulgudur. Bunun nedeninin, hasta sayısının az olması ve hastaların altta yatan hastalıklarına bağlı olabileceği gibi PCR testlerinde kullanılan primerlerin standardizasyonunun olmaması ve örnek alımı sırasında oluşabilecek kontaminasyonlar gibi birçok etkene de bağlı olabilir. Bu yönden ek çalışmalarla desteklenmesinde fayda vardır.

Blumberg ve arkadaşlarının yaptığı çok merkezli olarak gerçekleştirilen ve kandidemi için risk faktörlerini belirlemeyi amaçlayan çalışmada¹² bağımsız risk faktörleri; geçirilmiş cerrahi öyküsü, akut böbrek yetmezliği, total parenteral nütrisyon olarak belirtilmiştir. Literatürde yapılmış diğer çalışmalarda, kandidemi ilişkili risk faktörleri arasında en sık olarak geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, santral kateter uygulaması, mekanik ventilasyon ve üriner kateter uygulaması yaklaşık olarak benzer oranlarda saptanmıştır^{13,26}. Çalışmamızda da literatüre uygun olarak kandidemi ilişkili risk faktörleri; TPN ile beslenme ($p= 0.028$), son üç ay içinde cerrahi operasyon geçirme ($p= 0.003$) ve malignite öyküsü ($p= 0.021$) olarak bulunmuştur. Bu risk faktörlerine sahip hastalarda kandidemi riski açısından daha dikkatli olunması gerektiği sonucuna varılmıştır.

2009 yılında Leon ve arkadaşlarının yaptığı prospektif, çok merkezli, YBÜ'de takip edilen, nötropenik olmayan 1107 hastanın dahil edildiği çalışmada⁴, CS'nin ≥ 3 olmasının duyarlılığının %77.6, özgüllüğünün %66.2, PPD'nin %13.8, NPD'nin %97.7 olarak bulunduğu ve İK ile CS arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.001$) doğrusal bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Kautzky ve arkadaşlarının çalışmasında²⁷, $KS \geq 2.5$ olmasıyla duyarlılık %100, özgüllük %80, PPD %29.4, NPD %100 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda da literatüre uygun olarak kandidemi saptamada $CS \geq 2$ olduğunda duyarlılık %88.2, özgüllük %28.7, PPD %22.3, NPD %91.3; $KS \geq 3$ olduğunda duyarlılık %70.5, özgüllük %54.7, PPD %26.6 ve NPD %88.8 olarak bulunmuştur. *Candida* PCR pozitif ve PCR negatif hastalar arasında CS farkı anlamlı bulunmuştur ($p= 0.015$). Bu sonuçlarla kandidemi riski yüksek hastalarda kan kültürünün geç sonuç vermesi nedeniyle ve *Candida* PCR'ın yapılamadığı durumlarda CS'nin kullanılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir. Özellikle NPD'nin yüksek olması nedeniyle antifungal tedavi başlanması gerekmeyen hastaların tedavi yükünün azalacağı da öngörülmektedir. $CS \geq 3$ olduğunda, kandidemi açısından özgüllüğün arttığı düşünüldüğünde hastaların klinik ve laboratuvar bulguları da göz önüne alınarak antifungal tedavinin başlanmasının uygun olacağı görüşündeyiz.

Çalışmamızda *C.parapsilosis*'in tespiti için kullanılan primer seti CPA1/2, yapılan çalışmalarda çevresel kontaminant olan *Aspergillus* spp. ile çapraz etkileşim gösterse de kullandığımız klinik örneklerin tam kan olması ve steril koşullarda örnek alımı *Aspergillus* spp. kontaminasyonunu engellemektedir. Ayrıca PCR pozitif tespit edilen 17 örneğin beşinde *C.parapsilosis* saptanmıştır ve bunların ikisi kültür üremesiyle doğrulanmıştır. Bu nedenle çalışmamızda *Aspergillus* spp. ile çapraz reaksiyon gelişimi olmadığını düşünmekteyiz. Yine de bu örnekler için yanlış pozitifliğin ekarte edilmesi daha doğru olacaktır.

Bu çalışmada elde edilen veriler, kandidemi tanısında *Candida* PCR ve kan kültürünü karşılaştıran diğer çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur. Çalışmamızdaki kültür negatif ve PCR pozitif hastaların o sırada kandidemi geçirdiklerine dair bir kanıt yoktur. Ancak çalışmaya alınan hastaların altta yatan hastalıkları, kandidemi için risk faktörlerine sahip olması, CS ve *Candida* PCR pozitifliği göz önüne alınarak kandidemi olabileceği düşünülmüştür. Ancak maddi kısıtlamalar ve zaman kısıtlamaları nedeniyle hasta sayısının azlığı, moleküler testlerin standardizasyonunun olmaması ve yalancı pozitifliklerin olma ihtimali

çalışmamızın kısıtlılığıdır. Ayrıca çalışmamızda her hasta için alınan kan volümünün en az 40 ml olup olmadığı teyit edilememiştir. Kan kültürü negatifliğinin yüksek olmasının nedenlerinden biri bu olabilir.

Kandideminin mortalite oranının yüksek olduğu düşünüldüğünde, tanısının hızlı konması ve tedaviye ivedilikle başlanması gerekmektedir. Bu nedenle *Candida* Rt-PCR testinin tam kandan çalışılarak hızlı sonuç vermesi ve kan kültürüne göre, kandidemi şüphesi olan olgularda pozitif tespit edilme olasılığının daha fazla olması nedeniyle pratikte kullanılması uygun olabilir. *Candida* Rt-PCR ve kan kültürünün etkinliğini karşılaştırmak için daha fazla çalışmaya gereksinim olduğu akılda tutulmalıdır.

TEŞEKKÜR

Öğrettikleri ve yaptıklarıyla bize her zaman yol gösteren, kaybettiğimiz değerli hocamız Prof. Dr. Hasan Salih Zeki Aksu'ya minnetlerimizi sunarız.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 02.09.2016 ve Karar No: 19).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Tabak F. Tanımlar ve Epidemiyoloji. In: Köksal İ, Çakar N, Arman D (eds). Yoğun Bakım Enfeksiyonları. 1st ed. Bilimsel Tıp Kitapevi, Ankara, 2005:45-51.
2. Kim EJ, Lee E, Kwak YG, Yoo HM, Choi JY, Kim SR, et al. Trends in the epidemiology of candidemia in intensive care units from 2006 to 2017: results from the Korean National Healthcare-Associated Infections Surveillance System. *Front Med* 2020; 7: 606976.
3. Sezer BE, Arman D. Yoğun bakım ünitesinde gelişen fungal enfeksiyonlar.. In: Ulusoy S, Arman D, Uzun Ö (eds). Önemli ve Sorunlu Fungal Enfeksiyonlar. 2nd ed. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2012:161-73.
4. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Galván B, Blanco A, Castro C, et al. Usefulness of the "Candida score" for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: a prospective multicenter study. *Crit Care Med* 2009; 37(5): 1624-33.
5. Beck-Sagué CM, Jarvis WR, System NNIS. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis* 1993; 167(5): 1247-51.
6. Michallet M, Ito JI. Approaches to the management of invasive fungal infections in hematologic malignancy and hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2009; 27(20): 3398-409.
7. Enoch D, Ludlam H, Brown N. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol* 2006; 55(7): 809-18.
8. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. Third European Conference on Infections in Leukemia Group. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care* 2010; 14(6): R222.
9. Howel SA, Hazen KC. *Candida*, cryptococcus and other yeasts of medical importance. In: Versalovic J, Karen C, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. DC: ASM Press, Washington, 2011:1786-96.

10. Montagna MT, Caggiano G, Borghi E, Morace G. The role of the laboratory in the diagnosis of invasive candidiasis. *Drugs* 2009; 69(1): 59-63.
11. Sancak B, Çerikçioğlu N. Mantarların genel özellikleri ve tanı yöntemleri. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M(eds). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Etkenlere Göre Enfeksiyonlar*. 4th ed. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2017: 2097-105.
12. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, et al. Risk factors for *Candida* bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. *Clin Infect Dis* 2001; 33(2): 177-86.
13. Conde-Rosa A, Amador R, Perez-Torres D, Colón E, Sánchez-Rivera C, Nieves-Plaza M, et al. Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical center. *P R Health Sci* 2010; 29(1): 26-9.
14. Blot S, Dimopoulos G, Rello J, Vogelaers D. Is *Candida* really a threat in the ICU? *Curr Opin Crit Care* 2008; 14(5): 600-4.
15. Zhang J, Hung GC, Nagamine K, Li B, Tsai S, Lo SC. Development of *Candida*-specific real-time PCR assays for the detection and identification of eight medically important *Candida* species. *Microbiol Insights* 2016; 18(9): 21-8.
16. Hsu MC, Chen KW, Lo HJ, Chen YC, Liao MH, Lin YH, et al. Species identification of medically important fungi by use of real-time LightCycler PCR. *J Med Microbiol* 2003; 52(12): 1071-6.
17. Sarı S, Dal HC, Mungan İ, Tezcan B, Kazancı D, Turan S. Yoğun bakım ünitelerinde gelişen, non-nötropenik kandidemi olgularının retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Yoğun Bakım Derg* 2018; 9(3): 74-7.
18. Akalin H. Nozokomiyal fungal enfeksiyonlar, pp: 626-37 In: Willke TA, Söyletir G, Doğanay M (eds). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Etkenlere Göre Enfeksiyonlar*. 4th ed. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2017: 626-37.
19. Wellinghausen N, Siegel D, Winter J, Gebert S. Rapid diagnosis of *Candidaemia* by real-time PCR detection of *Candida* DNA in blood samples. *J Med Microbiol* 2009; 58(8): 1106-11.
20. Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2011; 49(2): 665-70.
21. Fortun J, Meije Y, Buitrago M, Gago S, Bernal-Martinez L, Pemán J, et al. Clinical validation of a multiplex real-time PCR assay for detection of invasive candidiasis in intensive care unit patients. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(11): 3134-41.
22. Guo Y, Yang Jx, Liang GW. A real-time PCR assay based on 5.8 S rRNA gene (5.8 S rDNA) for rapid detection of *Candida* from whole blood samples. *Mycopathologia* 2016; 181(5-6): 405-13.
23. Fuchs S, Lass-Flörl C, Posch W. Diagnostic performance of a novel multiplex PCR assay for Candidemia among ICU patients. *J Fungi* 2019; 5(3): 86.
24. Yılmaz G, Çiftçioğlu A, Gündüz M, Özen M, Sarıcaoğlu EM, Akan H. Kandidemi saptanan hematolojik kanserli hastalarda etken dağılımı ve risk faktörlerinin değerlendirilmesi. *Klinik Derg* 2015; 28(3): 117-21.
25. Guinea J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(s6): 5-10.
26. Viudes A, Peman J, Canton E, Ubeda P, Lopez-Ribot J, Gobernado M. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21(11): 767-74.
27. Kautzky S, Staudinger T, Prestler E. Invasive *Candida* infections in patients of a medical intensive care unit. *Wien Klin Wochenschr* 2015; 127(3-4): 132-42.