

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAN ÖRNEKLERİNDE POLİMERAZ ZİNCİR
TEPKİMESİ YÖNTEMİ İLE *CANDIDA*
DNA'SININ SAPTANMASI**

SİNEM ÖZER

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2006

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAN ÖRNEKLERİNDEN POLİMERAZ ZİNCİR
TEPKİMESİ YÖNTEMİ İLE *CANDIDA*
DNA'SININ SAPTANMASI**

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİNEM ÖZER

**Danışman Öğretim Üyesi
PROF. DR. MİNE YÜCESOY**

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 05.KB.SAG.003
sayı ile desteklenmiştir.

TEŐEKKÖR

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tezime büyük bir özveri ile katkı sağlayan sayın danışman hocam Prof. Dr. Mine Yücesoy'a, eğitimimde emeği geçen diğer tüm hocalarıma ve desteklerinden ötürü çalışma arkadaşlarım ve aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ.....	i
KISALTMALAR	ii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ ve AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	8
4.1. Tarihçe	8
4.2. Genel Özellikler	9
4.3. Hücre Yapısı.....	11
4.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri	12
4.4.1. Yapışma (Aderans)	14
4.4.2. Morfolojik Değişim	14
4.4.3. Fenotip değişimi	15
4.4.4. Toksinler.....	16
4.4.5. Enzimler	16
4.4.5.1. Proteinazlar:.....	16
4.4.5.2. Fosfolipazlar:	17
4.4.5.3. Lipazlar:.....	17
4.4.6. Biyofilm Yapımı.....	18
4.4.7. Moleküler Benzeme	18
4.4.8. Sideroforları Kullanma Yeteneği.....	18
4.5. <i>Candida</i> Türlerinin Neden Olduğu İnfeksiyonlar	19
4.5.1. Kutanöz ve Mukozal Kandidoz	19
4.5.2. Kronik Mukokutanöz Kandidoz (KMK).....	21
4.5.3. Sistemik Kandidoz.....	21
4.6. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı	23
4.6.1. Direk Bakı ve Kültür	23
4.6.1.1. Kan Kültürü	27
4.6.2. Serolojik Tanı	30
4.6.2.1. Antikor Saptanan Testler:.....	30
4.6.2.2. Antijen Saptanan Testler:	32
4.6.2.3. Kombine Testler:	33
4.6.2.4. Metabolit Saptayan Testler:.....	34
4.6.3. Deri Testleri.....	35
4.6.4. Moleküler Yöntemler.....	35
4.7. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarında Sağaltım	36
5. GEREÇ ve YÖNTEMLER	38
5.1. Suşlar	38
5.2. Klinik Örnekler.....	38
5.3. Rutin Tanımlama Yöntemleri	38
5.4. PZT Yönteminin Optimizasyonu	39
5.4.1. <i>Candida</i> Kolonilerinden DNA Eldesi	39
5.4.2. PZT Yöntemi ile Pozitiflik Saptama Sınırlarının Belirlenmesi.....	39
5.4.2.1. Sağlıklı Gönüllülerden Alınan Kanlardan Hazırlanan Simüle Örneklerde PZT Yöntemi ile Pozitiflik Saptama Sınırlarının Belirlenmesi:	39

5.4.2.2. Üreme Saptanmayan BACTEC 9240 Kan Kùltürlerinde Hazırlanan Simüle Örneklerde PZT Yöntemi ile Pozitiflik Saptama Sınırının Belirlenmesi:	40
5.4.3. PZT Yönteminin Farklı Mikroorganizmalarla Hazırlanan Simüle Kan Örnekleri ile Denenmesi.....	40
5.4.4. DNA Eldesi	40
5.4.4.1. DNA Ekstraksiyon Yöntemi:.....	41
5.4.4.1.1. Kullanılan Çözeltiler:	41
5.4.4.1.2. Yöntem:	42
5.4.5. PZT Uygulaması.....	43
5.4.5.1. PZT için Kullanılan Malzemeler:	43
5.4.5.2. PZT Karışımı ve Isı Döngü Programı:	44
5.4.5.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:	45
5.4.6. Klinik Kan Kùltür Örneklerinden DNA Eldesi ve PZT.....	45
6. BULGULAR.....	46
6.1. PZT Yönteminin Optimizasyonu	46
6.1.1. Candida Kolonileri ile Elde Edilen Sonuçlar	46
6.1.2. PZT Yöntemi ile Pozitiflik Saptama Sınırlarının Belirlenmesi ile İlgili Sonuçlar.....	46
6.1.2.1. Sağlıklı Gönüllülerden Alınan Kanlardan Hazırlanan Simüle Örneklerde Saptama Sınırının Belirlenmesi Sonuçları:.....	46
6.1.2.2. Üreme Saptanmayan BACTEC 9240 Kan Kùltürlerinde Hazırlanan Simüle Örneklerde Saptama Sınırının Belirlenmesi Sonuçları:.....	47
6.1.3. PZT Yönteminin Farklı Mikroorganizmalarla Hazırlanan Simüle Kan Örneklerine Uygulanması Sonuçları.....	48
6.1.3.1. Sağlıklı Gönüllülerden Alınan Kanlardan Farklı Mikroorganizmalarla Hazırlanan Simüle Örneklerde PZT Sonuçları:	48
6.1.3.2. Üreme Saptanmayan BACTEC 9240 Kan Kùltürlerinde Farklı Mikroorganizmalarla Hazırlanan Simüle Örneklerde PZT Sonuçları:.....	50
6.1.4. Klinik Kan Kùltür Örneklerinden Elde Edilen Sonuçlar	52
6.1.4.1. Tanımlama Sonuçları	52
6.2. Süre/Maliyet Belirlenmesi	54
7. TARTIŞMA.....	55
8. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	65
9. KAYNAKLAR	66

SEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** *Candida* Koloni örnekleri ile elde edilen PZT ürünlerinin jel görüntüsü46
- Şekil 2.** Sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinde PZT saptama sınırını belirlemek için uygulanan PZT sonrası elde edilen jel görüntüsü47
- Şekil 3.** BACTEC 9240 kan kültürlerindeki örneklerde PZT saptama sınırını belirlemek için yapılan PZT sonrası jel görüntüsü48
- Şekil 4.** Farklı mikroorganizmalarla hazırlanan simüle örnekler ile elde edilen PZT sonuçları (I.)49
- Şekil 5.** Farklı mikroorganizmalarla hazırlanan simüle örnekler ile elde edilen PZT sonuçları (II.)51
- Şekil 6.** 10^8 KOÜ/ml konsantrasyonda *C. glabrata* ve *C. lusitaniae* eklenmiş örnek sonuçları52
- Şekil 7.** Klinik kan kültür örneklerinin PZT sonuçları (I.)53
- Şekil 8.** Klinik kan kültür örneklerinin PZT sonuçları (II.)54

KISALTMALAR

PZT: Polimeraz Zincir Tepkimesi

GİS: Gastrointestinal Sistem

SDA: Sabouraud Dekstroz Agar

KOÜ: Koloni Oluşturan Ünite

AIDS: Edinilmiş Bağışıklık Yetersizliği Sendromu

KOH: Potasyum Hidroksit

BHI: Beyin Kalp İnfüzyon

SABHI: Sabouraud-BHI

HDM: Hücre Duvarı Mannanı

RIA: Radio Immun Assay

EIA: Enzim Immun Assay

LA: Lateks Aglütinasyon

REA: Restriksiyon Enzim Analizi

Real-time PZT: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi

1. ÖZET

Kan Örneklerinde Polimeraz Zincir Tepkimesi Yöntemi ile Candida DNA'sının Saptanması

Kandidemilerin prognozunun uygun sağaltımdan sonra bile iyi olmadığı, yüksek mortalite oranına sahip olduğu ve tanısında altın standart kabul edilen kan kültürünün olguların %42'inde negatif kalabildiği bilinmektedir. Kandideminin hızlı ve güvenilir olarak erken tanısı antifungal sağaltıma başlanması açısından büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızın amacı; kandidemi kuşkulu olguların kan örneklerinde polimeraz zincir tepkimesi (PZT) yöntemi ile Candida türlerinin saptanması için yöntemin simüle örnekler kullanılarak standardizasyonunun sağlanmasıdır.

Çalışmamızda, *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 1021, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. krusei* ATCC 6258, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 gibi standart suşlar ile *Aspergillus fumigatus*, *C. kefir*, *C. glabrata*, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, *Rhodotorula* sp. klinik izolatları kullanılarak, sağlıklı gönüllülerden EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri ve kan kültüründe üreme saptanmayan BACTEC 9240 kan kültür şişelerinde simüle örnekler hazırlanmıştır. Ayrıca kan kültür şişelerinde üreme sinyali veren ve katı besiyerlerinde Candida türleri üreyen 23 hastanın kan kültür örneği de incelenmiştir.

Tüm örneklerin DNA eldesi, eritrosit, lökosit ve fungus hücre duvarı lizis tamponları ile ön işleme takiben, MN Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Almanya)'in doku örnekleri için önerdiği standart prosedür uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'lar 5S rDNA bölgesinden seçilmiş sentetik oligonükleotit öncüllerinin kullanıldığı PZT yöntemi ile çoğaltılmış ve %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Görüntülerde 105 baz çiftlik (bp) ürün varlığı pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Uyguladığımız PZT yönteminin hazırlanan simüle örneklerde en düşük saptama sınırı 100-1000 KOÜ/ml Candida olarak belirlenmiştir. Çalışmaya alınan tüm Candida suşları ile hazırlanan örneklerde 105 bp'lik ürün varlığı gözlenmiştir. *E. coli*, *S. aureus*, *A. fumigatus* ve

Rhodotorula sp. suşlarından hazırlanan ve negatif olan kan örnekleri ise Candida DNA'sı açısından olumsuz bulunmuştur. Candida üremesi olan kan kültür örnekleri ile yapılan PZT sonucunda da yine aynı 105 bp'lik ürün varlığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada uygulanan PZT yöntemi yaklaşık 7 saatte tamamlanmakta, buna karşın rutin kan kültür yöntemleri ile Candida üremesinin belirlenmesi en erken 24-48 saate kadar uzamaktadır. Bunun yanında yöntemin hem kan hem de BACTEC 9240 şişelerine alınan örneklerle uygulanması önemli bir avantaj gibi görülmektedir. Yöntemimizin hasta başına maliyeti 8 YTL olarak belirlenmiş olup, bu para hastaya uygulanacak yanlış ya da gereksiz antifungal sağaltım ve hastane masrafları göz önüne alındığında çok düşük kalmaktadır.

Sonuç olarak; kandidemi kuşkulu olgulardan alınan gerek kan gerekse BACTEC kan kültür örneklerinde 5S rDNA genine özgü PCon 1 ve PCon 2 PZT öncüllerinin kullanıldığı PZT yöntemi ile daha kısa sürede Candida DNA'sının saptanabileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Candida, kan, PZT

2. SUMMARY

Detection of Candida DNA in blood samples by polymerase chain reaction

It is known that even after appropriate treatment, the prognosis of candidemia is poor and candidemia has high mortality rates. The blood culture which is accepted as the gold standard for the diagnosis, can remain negative in %42 of the cases. Therefore rapid and reliable diagnosis of candidemia is very important to start the antifungal treatment. The aim of our study was to standardize the polymerase chain reaction (PCR) method by using simulated samples in order to detect Candida species in blood samples of candidemia suspected cases.

In this study, simulated samples were prepared by using blood samples of healthy volunteers which were inoculated into tubes with EDTA and BACTEC 9240 blood culture bottles in which no growth was detected and standard strains as *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 1021, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. krusei* ATCC 6258, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*, *C. kefir*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *Rhodotorula* sp. Furthermore, blood culture samples of 23 patients whose blood culture bottles signaled as positive and showed growth of Candida in agar plates were examined.

DNA extraction of all samples were performed according to the standard procedure proposed by the MN Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Germany) for tissue samples; following the pre-treatment with erythrocyte, leukocyte and fungus cell wall lysis buffers. DNAs were amplified with the PCR method, using synthetic oligonucleotide primers selected from the 5S rDNA region and PCR products were “electrophoresed” in 2% agarose gel. Presence of a 105 base pair product was considered as positive.

The lowest detection limit of PCR has been determined as 100-1000 CFU/ml Candida for our simulated samples. The presence of a 105 bp band has been observed in samples prepared with all Candida strains included in the study. Blood samples spiked with *E. coli*, *S. aureus*, *A. fumigatus* and *Rhodotorula* sp. and negative blood samples has been found as

negative in terms of Candida DNA. The same 105 bp product has been observed in the PCR products of blood culture samples with Candida growth.

The PCR method applied in this study takes approximately 7 hours, whereas the detection of Candida growth takes at least 24-48 hours by routine blood culture method. Also the application of this method to both blood samples and samples obtained from BACTEC 9240 blood culture bottles seems to be an advantage. The cost of this method per patient is determined to be approximately 8 YTL and this amount is very small when compared with the cost of wrong or unnecessary antifungal therapy and hospital expenses.

As a result, it has been determined that Candida DNA from either blood or BACTEC blood culture samples, taken from candidemia suspected cases, can be detected in a shorter time by PCR using PCon 1 and PCon 2 primers which are specific for 5S rDNA gene.

Key words: Candida, blood, PCR

3. GİRİŞ ve AMAC

Fungal infeksiyonların prevalansı, son yıllarda immün yetmezlikli hastaların sayısının artması, geniş spektrumlu antibiyotikler ve damar içi kateterlerin yaygın kullanımları nedeniyle artmıştır (1). Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar tüm infeksiyonlara özellikle de mantar infeksiyonlarına duyarlıdır. Funguslar bu hastalarda hızlı gelişen, öldürücü ve sağaltımı zor klinik tablolar oluşturmaktadır (2).

Amerika Birleşik Devletleri'nde, hastane kökenli fungemiler 1980'lerde %5.4 iken 1990'larda %9.9'a yükselmiş olup, tüm nozokomiyal kan dolaşımı infeksiyonlarının %8-10'unun *Candida* türlerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (1, 3, 4, 5). İnvaziv kandidoz tablolarının temel etkeni olan *Candida albicans* immün yetmezlikli hastaların kan kültürlerinden en sık izole edilen fungal patojendir. Bunun yanında *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* gibi diğer *Candida* türlerinin de artan oranda soyutlandığı bildirilmektedir (6).

Candida türleri birçok farklı klinik tabloya neden olan en yaygın insan kommensali olup, önemli nokta immün yetmezlikli hastalarda artmış oranlarda görülen yaygın hematogen infeksiyonlardır (7). *Candida* türlerinden kaynaklanan kan dolaşımı infeksiyonları; koagülaz-negatif stafilokok, *Staphylococcus aureus* ve enterokoklardan sonra günümüzde en sık dördüncü septisemi nedeni olarak izlenmektedir (8, 9). Kandidemilerin prognozunun uygun sağaltımından sonra bile %50-80'lik bir mortalite oranı ile iyi olmadığı saptanmıştır (10). Bu nedenle kandideminin erken tanısı ve antifungal sağaltım için gelişmiş yöntemlere gereksinim söz konusudur (6).

İnfeksiyon hastalıklarının tümünde olduğu gibi kandidemide de tanı koydurucu temel yöntem kültür ile mayanın soyutlanması ve türünün belirlenmesidir. Fakat sistemik kandidoz tablolarında altın standart kabul edilen kültür ve özellikle kan kültürünün genellikle negatif sonuç verdiği bildirilmektedir (11, 12). Tanı, rutin olarak kullanılan kültür ortamlarında *Candida*'nın yavaş üremesi nedeni ile gecikmekte ve bu nedenle erken tanı her zaman

mümkün olamamaktadır. Rutin veya fungus'a özel kan kültürlerinin güvenilir olmadığı ve inkübasyon için büyük miktarda kan gerektirdiği belirtilmiştir (13, 14). İnvaziv kandidoz için kan kültürünün, olguların sadece %58'inde pozitif olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca nötropenik hastalarda, kanda *Candida* türlerinin üremesinin başarısızlığı olağan olarak kabul edilmektedir (11). Sistemik kandidozun klinik tanısında, temel yöntem olan kan kültüründe, kemoterapinin bir sonucu olarak üremenin inhibisyonu veya organizmaların kana aralıklı olarak geçmeleri nedeni ile kanıtlanmış olgularda bile *C. albicans*'ın saptanmasının zor olduğu bildirilmektedir (15). Sistemik kandidozu tanımlamak için sıklıkla iki veya daha fazla kan kültürü kullanılmasına rağmen, standart kan kültür yöntemlerinin tanı için iki ile üç gün hatta daha uzun bir süre gerektirdiği belirtilmektedir. İnvaziv *Candida* infeksiyonları hastanın hayatını ciddi biçimde tehdit eden ve sağaltımının çok hızlı başlaması gereken infeksiyonlar olması nedeni ile immün yetmezlikli hastalarda bu infeksiyonların zamanında ve doğru tanısı için daha hızlı, özgül ve duyarlı bir yöntemin gerekli olduğu vurgulanmıştır (12).

Sistemik fungal infeksiyonlar için hızlı ve tanı koydurucu stratejiler antikor, antijen veya DNA saptanmasını içermektedir (16). Özgül antikorların saptanmasına veya *Candida* antijenlerinin kandidoz tanısında kullanılmasına rağmen, bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllük gibi birçok noktada yetersiz oldukları düşünülmektedir (17). Örneğin kemik iliği alıcılarında antikor saptanmasının beklenmedik humoral yanıtlar nedeni ile sınırlı olduğu rapor edilmiştir (16). Bunun yanında serolojik testlerin immün yetmezlikli kanser hastaları için güvenilir olmadığı bildirilmiştir (18).

Sistemik kandidoz tanısında kanda *Candida*'nın saptanması için PZT yönteminin geliştirilmesi önemli bir ilerleme olarak görülmektedir. PZT'deki aşamaların kültüre göre daha kısa süre aldığı rapor edilmiştir (19). Böylece sistemik kandidoz tanısında kültüre göre belirgin bir süre avantajı söz konusu olmaktadır. Bunun yanında sağaltımın en kısa süre içinde başlaması, ölüm oranının, hastanede yatış süresinin ve infeksiyonun getireceği maddi yükün azaltılmasını sağlayacaktır. *Candida* türlerinin polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ile kandan belirlenmesinin, sistemik kandidozun tanısı için alternatif ve daha duyarlı bir yöntem olduğu belirtilmiştir (12, 16, 19). Sistemik kandidoz infeksiyonlarının sık görüldüğü hasta grubunda

profilaktik antifungal sağaltım uygulamalarının maliyeti oldukça yüksektir. Buna ek olarak sistemik kandidoz tanısının konulabilmesi için yapılan radyolojik incelemeler ile tekrarlanan kan kültürleri de maliyeti oldukça yükseltmektedir (20).

Projemizin amacı, hastanemizde kandidemi kuşku lu olguların kan örneklerinde PZT yöntemi ile *Candida* türlerinin saptanması için yöntemin simüle örnekler kullanılarak standardizasyonunun sağlanması ve rutin laboratuvar uygulaması haline getirilmesidir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Tarihçe

M.Ö. dördüncü yüzyılda Hippocrates ve Galen'in oral lezyon olarak tanımladıkları pamukçuğun altta yatan ciddi hastalıklar ile ilgili klinik bir eleman olduğu bilinmekteydi. 1839'da Almanya'da Bernard Langenbeck, tifüslü bir hastanın oral lezyonlarından soyutladığı organizmayı "Typhus-Leichen"(tifüs cisimcikleri) olarak tanımlamış, 1841'de ise Emil Berg tarafından sağlıklı bebeklere "aftöz membran materyal" inoküle edilerek, infekte olmuş sağlıklı bebeklerde pamukçuğun fungal etyolojisi araştırılmıştır. *Candida albicans* ilk kez 1842'de Gruby tarafından tanımlanmıştır (21, 22).

1843'de, Charles Robin organizmaya *Oidium albicans* olarak ilk ismini vermiştir. O zamandan beri, bu mantar için 100'den fazla sinonim kullanılmıştır; bunlar arasında 1890'da Zoph'un bildirdiği *Monilia albicans* ve 1923'de Roth Berkhout'un önerdiği *C. albicans* yer almaktadır (21, 22).

1861'de Albert Zenker sistemik kandidoza ait ilk kez kayıtlı bir vaka tanımlamıştır. Tarihi olarak, kandidoz araştırması için en ilginç dönem antibiyotiklerin keşfi ile aynı zamana rastlamaktadır. *Candida*'nın neden olduğu ilk endokardit vakası da antibiyotiklerin kullanımının büyük oranda yaygınlaştığı 1940'da bildirilmiştir (21, 22). O zamandan bu yana kandidoz insidansında büyük bir artış olduğu kadar, bu fungusun vücudun tüm doku ve organları ile ilişkili vakaları da kayıtlanmıştır (22).

Candida türleri içinde *C. albicans*, *C. catenulata*, *C. dattila*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefir*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides* olmak üzere 15 türün patojen olduğu ve artan ilaç kullanımı, cerrahi girişimler, organ nakilleri ve AIDS gibi bireyin bağışıklığını zedeleyen çeşitli sebeplerle diğer *Candida* türlerinin de patojen olabileceği bildirilmiştir (23).

4.2. Genel Özellikler

Candida türleri tek hücreli, ökaryotik ve kemoheterotrof olup, tomurcuklanma ile üreyen 3 ile 6 µm büyüklüğünde, oval veya yuvarlağımsı maya mantarlarıdır (21).

Heterojen *Candida* cinsi Deuteromycotina (Fungi Imperfecti) içinde *Cryptococcaceae* ailesine aittir. Cins yaklaşık 200 tür içerir. *Candida* türlerinde eşeysiz çoğalma, multilateral tomurcuklanma ile gerçekleşir (24). Tomurcuklanan bu hücrelere blastokonidya adı verilir (21, 25, 26, 27). Organizmalar ağırlıklı olarak Gram pozitif boyanırlar (28). Arka arkaya tomurcuklanan blastokonidyalardan birbirinden ayrılmayıp uzayarak ve aralarında boğumlar oluşturarak yaptıkları hücre zincirleri yalancı hifleri oluşturur (25, 26). *C. glabrata* hariç, tümü uygun koşullar altında yalancı hif üretir. Azalmış oksijen miktarı, %5 ile %10 CO₂, 37°C'lik inkübasyon sıcaklığı, kısmi glukoz eksikliği ve zengin bir protein içeriği kanlı agarda üreyen *Candida* kolonilerinin alt kısmında tüylü görünüme neden olan yalancı hif üretimini desteklemektedir (28). *Candida* türleri arasında *C. albicans* blastokonidya ve yalancı hif yanında gerçek hif de oluşturarak dimorfik özellik gösterir (25, 26).

Candida türleri Sabouraud dekstroz agar (SDA) gibi rutin besiyerlerinde oda ısısında veya 37°C'de 24 saat içinde genellikle kirli beyaz veya krem rengi, nemli, düzgün veya buruşuk kenarlı, düzgün yüzeyli veya göbekli; uzayan inkübasyonla birlikte kıvrımlı hale gelen, mat yada parlak, maya kokulu yumuşak koloniler oluştururlar. Koloninin besiyeri üzerinde kalan yüzeyi blastokonidyalardan oluşmuştur. Besiyeri yüzeyinin altında ise yalancı hifler bulunur (25, 26, 27).

C. albicans'ın çoğu izolatu kanlı agar, çikolata agar gibi zengin besiyerlerinde koloni sınırlarından gelişen kısa uzantılarla "ayaklı koloniler" üretir, diğer mayaların çoğu böyle koloniler oluşturamaz, ancak *C. tropicalis* ve *C. krusei* izolatlarının da ayaklı koloniler oluşturduğu not edilmiştir. Bu koloniler belli hif/yalancı hif morfolojileri nedeniyle çimlenme borusu deneyinde kullanılmamalıdır (29, 30).

Tüm *Candida* türleri glukozu fermente eder, hiçbirisi nitrati asimile edemez (27). Bu türlerden, sadece *C. guilliermondii* dulsitol'ü ve *C. krusei* laktozu asimile eder (29). *Candida* türleri genellikle üreaz üretmez ve KNO_3 'ü kullanmaz, ancak bazı *C. krusei* izolatları üreaz pozitif olabilir (29). Bu gruptaki maya benzeri mantarların kültürlerinde etanol, asetoik ve asetik asit, formik asit, laktik asit, propionik asit, piruvik asit, suksinik asit gibi organik asitlerden zengin metabolik son ürünler oluşur (27).

Candida türleri doğada çok sayıda bitki üzerinde bulunan ve insanların mukokutanöz membranları ile memelilerin sindirim sisteminde normal flora üyesi olan fırsatçı mikroorganizmalardır (29). Doğumdan hemen sonra mukozalarda kolonize olur ve endojen infeksiyon için risk yaratırlar. *Candida* türleri insan vücudunda başta gastrointestinal sistem (GİS), orofarenks, vajen ve deri olmak üzere çeşitli bölgelerden izole edilebilir (27). Normal flora üyesi olarak *Candida* türleri dokulara geçer, immün savunmaları azalmış hastalarda yaşamı tehdit edici hastalıklara neden olur (29).

Candida'nın 150'den fazla türü vardır, fakat sadece dokuzu insanlarda en çok karşılaşılan patojenlerdendir. Bunlar *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* ve *C. glabrata*'dır. *C. albicans* uygun koşullar altında en sık patojen olan türdür. *C. albicans* belli koşullar altında in vivo veya serumda, 37°C'de in vitro birkaç saat içinde çimlenme borusu üretimi ile maya formundan derin dokulara geçebilen agresif bir form olan hif fazına dönüşebilir (21). Çimlenme borusu bir blastosporun kenarından filizlenen, onların uçlarında büyüyen, blastospora bağlanan bölgelerinde çentik görülmeyen silindirik filamentöz yapılardır (28).

4.3. Hücre Yapısı

Hücre duvarı sert bir yapıda olup, hücreye şekil verir ve maya hücresinin değişik yüzeylere tutunmasında doğrudan görev alır. Duvar yapısında bulunan bazı maddeler antifungal ajanlar için hedef oluştururken, bazıları aynı zamanda antijenik determinantları taşır. Duvar komponentlerinin %80-90'ı karbonhidratlar, %5-15'i protein ve %2-5'i lipidlerden oluşur. Karbonhidratların ise %20-30'u mannoprotein,%50-60'ı β -glukanlar ve %0.6-9'u kitin yapısındadır. *C. albicans*'ın maya ve hif formlarında glukan ve mannan içeriği benzerdir fakat, hif hücrelerinde kitin miktarı maya hücresine göre üç kat fazladır. Elektron mikroskopik çalışmalara göre *Candida*'ların hücre duvarı en az 5 katmanlıdır. Maya-hif dönüşümü sürecinde bu sayı ve kalınlık değişir. Ayrıca ortamda yüksek yoğunlukta şeker varlığında en dıştaki mannoprotein kalınlaşır ve fibriler oluşumlar artar (27).

Hücre membranı taşıdığı ozmoenzimler aracılığı ile moleküllerin iç ve dış ortama geçişinde rol alır. Kitin sentetaz gibi, duvar komponentlerinin sentezinde rolü olan enzimler de membranda bulunurlar. Ayrıca *C. albicans*'ın morfogenezi (maya-hif dönüşümü ve hif ucundan uzama) için gerekli olan sinyal iletiminde rol alan fosfolipaz C, adenilat siklaz, proteaz gibi enzimler de membranda yer alırlar. *Candida*'ların hücre membranında; fosfotidil serin ve fosfotidil inozitol gibi fosfolipidler bulunur. Tüm mantarlarda olduğu gibi, bu türün de hücre membranında bulunan sterol, membran lipidlerinin %20'sini oluşturur ve sterolün %95'i ergosterol formundadır. Bilindiği gibi ergosterol antifungal ilaçlar için önemli bir hedeftir (27).

Hücre duvarı ve hücre membranı ile bağlantılı olan hücre iskeleti turgor basıncına karşı koyan dinamik bir sistemdir. Aktin, miyozin gibi iskelet komponentlerinin birbirleri ile ilişkileri açısından Ca^{++} , Mg^{++} ve H^+ iyonlarının yoğunlukları önemlidir. Organellerin hareketliliği ve hif şeklinde uzama, bu iyonların hücre içine giriş, çıkışları ile düzenlenir. İyonlar ek olarak mitoz, mayoz, tomurcuklanma, septum oluşumu yani morfogenez ile protein kinaz gibi bazı enzimlerin regülasyonunda da rol alırlar (27).

4.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri

Candida türleri genellikle genel durumu bozuk, birden fazla predispozan faktöre sahip bireylerde hastalık oluşturur ve hastalığın oluşumunda konak faktörleri ile mayanın sahip olduğu virulans faktörleri son derece önemli rol oynar (26).

Candida infeksiyonlarına zemin hazırlayan faktörler; geniş spektrumlu antibiyotik sağaltımı, hücresel immün yetmezlik, nötropeni, deri ve mukoz membranların değişimi, normal floranın baskılanması, intravenöz ilaç kullanımı, T-hücre bozukluğu, travma, infüzyonlar için kullanılan kateterler, renal transplantasyon, cerrahi işlemler, metal veya plastik protez kapakların kullanımı, kortikosteroid ve immünbaskılayıcı sağaltımlar, peptik ülser, diyabet, AIDS, endokrin hastalıklar (hipoparatroidizm, adrenokortikal yetersizlik, Cushing hastalığı) ve ciddi yanıklar şeklinde sıralanabilir (26, 31, 32).

Deri, infeksiyona dirençte önemli olup; deri maserasyonuna neden olan herhangi bir işlem sağlıklı bireylerde bile *Candida* invazyonuna yol açabilir. Organizma dermise veya kan dolaşımına girdiğinde, polimorf nüveli lökositler (PNL) savunmada rol oynar ve yalancı hiflere zarar verme, blastosporları fagosite etme ve öldürme kapasitesine sahiptir (21). Özellikle myeloperoksidaz ve hidrojen peroksit gibi fungisidal moleküller, PNL'lerin *C. albicans*'ı eradike edebilmesi için gereklidir. Ayrıca PNL'lerin azürofil granüllerinde bulunan antimikrobik maddelerden *defensin*'lerin *Candida* türlerine karşı aktivite gösterdikleri saptanmıştır. Bazı *defensin*'lerin *C. albicans*'ı doğrudan öldürebildikleri belirlenmiştir. Yine aynı granüllerde bulunan *cathepsin G*'nin de antifungal aktivitesi mevcuttur. Ancak PNL'lerin belirtilen kandidasidal etkilerine karşı, *C. albicans*'ın da PNL işlevlerini bozma ya da değiştirme yeteneği bulunmaktadır. Eozinofillerin de *Candida* üzerinde PNL'ye benzer etkileri söz konusudur. Yapılan çalışmalar, monositlerin myeloperoksidaz bağımlı ya da bağımsız oksidatif mekanizmalarla *Candida*'ya karşı savunma işlevini yerine getirdiğini göstermektedir. *C. albicans*'ın pulmoner dokudan eliminasyonunda PNL'ler kadar alveoler makrofajların da önemli olduğu saptanmıştır. Lenfositlerin *Candida* infeksiyonlarındaki rolü

tam anlaşılmış değildir. Aktif lenfositlerden salınan lenfokin benzeri maddelerin *C. albicans* üzerinde toksik etkisi bulunduğu öne sürülmüştür (33).

Serum ve plazma, antikor ve kompleman komponentlerini içermesine karşın, tek başına *Candida*'ları öldürmede yetersizdir. Çalışmalar myeloperoksidaz, hidrojen peroksit ile süperoksit anyon sistemi, veya bunların tümünün *C. albicans*'ın hücre içi ölümünden sorumlu olan en önemli mekanizma olduğunu göstermektedir. Ek olarak, araştırmalarda hücre içi öldürmede etkili olan bir ferröz iyon-hidrojen peroksit-iyodür sistemi tanımlanmıştır. Fagositler için bir sonraki hücre içi öldürme mekanizması kimotripsin-benzeri katyonik proteinlerle ilişkilidir. Bu proteinler muhtemelen kandidal membran geçirgenliğini arttırmada rol oynamaktadır. Makrofaj ve retiküloendotel sistem hücrelerinin de savunmada rolü olduğu öne sürülmektedir (21).

Çok sayıda araştırma *Candida*'ya karşı immun yanıtta humoral faktörlerin önemini doğrulamaktadır. Serum demir-bağlayan proteinlerin tahminen bir *Candida* büyüme faktörü olan demiri bağlamakla *Candida*'nın üremesini inhibe ettiği belirtilmektedir. Sonuçta, yalancı hif oluşturmak ve in vitro koşullarda organizmaları kümeleştirmek için *C. albicans*'ı uyaran humoral maddeler olduğu gibi, *Candida* üremesi üzerinde inhibitör etkiye sahip çok sayıda başka humoral madde de bulunmaktadır (21).

Kompleman in vitro koşullarda *Candida* blastosporlarının optimal opsonizasyonu için gereklidir. Alternatif kompleman yolağının aktivasyonunda kusurlu olan hayvanların *Candida*'ya karşı daha duyarlı olduğu saptanmıştır. *Candida* hücreleri, özellikle insan kompleman reseptör CR2 ve CR3'e benzeyen yüzey moleküllerine sahiptir (21).

Konak bağışıklığını yenmek için birlikte rol oynayan ve patogeneizde önemli yeri olan *Candida* virulans faktörleri; adezyon, morfolojik değişim, fenotip değişimi, toksinler, proteinazlar, fosfolipazlar, biyofilm yapımı, hidrofobisite, moleküler benzeme, hücre duvarı yapısı ve çeşitli sideroforları kullanma yeteneği şeklinde sıralanabilir (21, 34).

4.4.1. Yapışma (Aderans)

Adherans, mayanın konak ile ilişkisinde ilk basamağı oluşturur ve hücrelerin yüzey özellikleri ile ilişkilidir (35).

Candida'ların mukoza epitel ve endotel hücrelerine yapışması kolonizasyon ve infeksiyonun ilk aşamasıdır. Yapılan bir çalışmada *Candida spp.* için in vivo kolonizasyon ve invazyon ile adezyon arasında patojenik bir ilişki olduğu saptanmıştır (36). *C. albicans*'ı bu cins içerisinde en sık karşılaşılan tür olarak öne çıkaran özelliklerin başında mukoza yüzeylerine yapışma yeteneği gelir (23). *C. albicans*'ın diğer *albicans* dışı *Candida* türlerine göre kan damarları, epidermal korneositler, endotel hücreleri, epidermal keratinositler gibi konak hücrelerine daha fazla aderans yeteneği olduğu bildirilmiştir (37).

Çoğu *C. albicans* adezini glikoproteindir ve Als (Agglutinin-like sequence) ailesi, Ala 1 ve Hwp 1'i içermekte ve 8 gen ile kodlanmaktadır. *ALS* genleri, üreme durumlarına bağlı olarak farklı şekillerde eksprese edilmektedir. Örneğin *ALS3* hife özgü iken, *ALS4* üreme fazı ile bağlantılıdır. Ala 1 (agglutinin like adhesin), Als familyası proteinlerine benzer. Hwp 1 ise *C. albicans* hücrelerinin konak epiteline çapraz bağlanması için gerekli hife özgü bir hücre duvar proteindir (38).

C. albicans konağın epitel ve endotel hücrelerine tutunmasında iC₃b, C₃d, fibronektin ve östrojen reseptörleri, mannoprotein, salgısal aspartik proteinaz, faktör 6 (antijen 6), laminin reseptörü ve fibrinojen bağlayan proteinler gibi moleküllerin rolü bulunmaktadır (27).

4.4.2. Morfolojik Değişim

Candida türleri içinde, sadece *C. albicans* ve *C. dubliniensis*; tomurcuklanan maya hücreleri, uzun mayamsı hücre zincirlerinden oluşan yalancı hifler ve gerçek bölmeli hifler halinde gelişebilmekte olup, yalancı hifin maya hücreleri ile gerçek hif arasında ara form

oluşturduğu düşünülmektedir. Maya veya hif formunda üreyebilen bu türler polimorfik olarak tanımlanmaktadır (38, 39).

Maya-hif dönüşümünde süreci etkileyen dış faktörlerden CO₂, pH (7.5-8.0), ısı (37°C), N-asetil glukoz, prolin ve aminoasitler maya hücre membranındaki reseptörler tarafından algılanan sinyaller olup, hücre içine iletilmekte ve hücre içinde cAMP, cGMP ve bazı iyonların miktarlarında değişiklikler meydana gelmektedir. Oluşan iyon akımı sonucunda hif şeklinde uzama gerçekleşmekte olup, bu forma dönüşümün ilk basamağını çimlenme borusu oluşturmaktadır. Sinyal zayıf, ısı ve pH düşük ise septum yapımı gecikir, iyon akımı olmaz ve buradan dışarı doğru balonlaşma sonucu tomurcuk şekillenir (27).

İnfekte dokularda *C. albicans*'ın hem maya hem de hif şekli bulunsa da, hif şeklinin maya şekline göre dokuya daha fazla yapışması, fagositler tarafından sindirilememesi, aktif semptomlu infeksiyonla ilişkili olması, plastik yüzeylere yapışmayı sağlayan fibriler yüzey tabakaları oluşturması, çimlenmekte olan hücrelerin daha virulan olması, hifin patogenez ve virulansdaki rolünü kanıtlayan bulgulardır (23, 34).

4.4.3. Fenotip değişimi

C. albicans kolonileri yüksek sıklıkta (10^{-4} - 10^{-1}), yıldız, şapka, düz, pürüklü, düzensiz kırışık ve tüylü gibi farklı fenotipler arasında değişim göstermektedir. Bununla birlikte fenotipik değişimin ana mekanizması ve bu değişim ile *C. albicans*'ın virulansı arasındaki ilişki açık değildir. Bu değişimin daha önce belirtilen tomurcuk-hif değişimini etkilediği bildirilmiştir (41). Fenotipik değişim yeteneğinin, organizmanın farklı mikroçevrelerde canlı kalabilme ve immün yanıtta kaçış durumlarında rol oynadığı düşünülmektedir. Fenotipik değişimine uğramış izolatların antifungallere daha yüksek seviyede direnç gösterdiği ve fenotipik değişimin; antijenik yapıyı, adezyonu, hif oluşumunu, nötrofillere ve oksidanlara duyarlılığı ve de antifungallere duyarlılığı etkilediği bildirilmektedir (38, 41).

C. albicans'ın düzgün yüzeyli, beyaz renkli koloniler oluşturan yuvarlak-oval, tomurcuklu "beyaz" faz hücreleri; geniş yüzeyli, yassı, yüzeyi pürüklü, gri renkli koloniler oluşturan uzun, büyük "opak" faz hücrelerine dönüşmektedir (W-O değişimi) (35). Derleme bir makalede çeşitli çalışmalarda *C. albicans* yanında *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. lusitaniae* türlerinde bu dönüşümün izlendiği bildirilmiştir (42).

4.4.4. Toksinler

C. albicans'ın maya fazında endotoksin benzeri maddeler ve hemolizin üretimi gösterilmiştir. Bu toksinler; glikoprotein toksinler ve kanditoksin olup, glikoprotein toksinler, toksik bileşikler olarak karbonhidrat (mannoz, glikoz) ve protein içeren maddelerdir. Özellikle mannopteinler toksik rollerine ek olarak, vücut yüzeylerinde kolonizasyonda adezin olarak da görev yaparlar (23).

4.4.5. Enzimler

İnfeksiyon süresince hidrolitik enzimlerin salgılanması, adezyonu kolaylaştırmak için konak yüzeylerinin degradasyonuna, konak immün faktörlerinin yıkımına ve ek olarak besin kazanımına yol açar. *C. albicans*'ın salgıladığı önemli hidrolazlar; salgısal aspartik proteinaz (Sap), fosfolipaz ve lipaz ailelerini içermektedir (38).

4.4.5.1. Proteinazlar:

Proteinazlar; serum albümin, ovalbumin, hemoglobin, keratin, kollajen, laminin, fibronektin, IgA ve IgG'nin Fc kısmı ve komplemanın C3 komponentini hidrolize ederek organizmaların virulansını ve dokulara invazyonunu arttırıcı etki gösterir (27, 35). Çalışmalarda proteolitik aktivite ile virulans ve mukozal infeksiyonlar arasında bir korelasyon saptanmıştır (43, 44). Bir çok patojen *Candida* türünün özellikle *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. lusitaniae*'nin ekstrasellüler proteinaz salgıladığı saptanmıştır (45, 46).

C. albicans'da ekstrasellüler asit proteinaz ailesini oluşturan 10 gen (SAP) tanımlanmıştır (38). Ayrıca SAP gen ekspresyonunun organizmanın mayadan hife geçişi ve fenotip değişimi ile ilgili olduğu ortaya konmuştur. SAP1, SAP2, SAP3 genlerinin yalnızca maya hücrelerinde; SAP4, SAP5, SAP6'nın ise hif yapılarında; SAP1'in *C. albicans*'ın opak fenotipinde, SAP2 ve SAP3'ün ise hem opak hem de beyaz fenotipte eksprese olduğu belirtilmiştir (34). Sap 1-3 enzimlerinin yüzeysel, mukozal ve kutanöz infeksiyonlarda, Sap 4-6 enzimlerinin ise sistemik infeksiyonlarda patojen rol oynadığı gösterilmiştir (47).

4.4.5.2. Fosfolipazlar:

Konağın membran fosfolipidlerini hidrolize ederek invazyonda rol oynayan fosfolipaz enzimi, patojen *Candida*'larda %30-50 oranında saptanmaktadır. Kothavade ve Panthaki (48) çalışmalarında *C. albicans*'daki in vitro fosfolipaz aktivitesi ile virulans arasında bir korelasyon saptamışlardır (48). Fosfolipaz enzimi A, B, C ve D ile lizofosfolipaz ve lizofosfolipaztransaçılaz olarak sınıflandırılmış olup; fosfolipaz B, fosfolipaz aktivitesinde ilk sırada yer almaktadır. Fosfolipaz B ailesi (*PLB 1-5*)'nden, *PLB 1*'in ekstrasellüler fosfolipaz aktivitesinin çoğundan sorumlu olduğu ve maya ile yalancı hiflerde, hif hücrelerinden daha çok eksprese edildiği bildirilmektedir (35, 38).

4.4.5.3. Lipazlar:

Hidrolitik enzimlerin üçüncü grubu olan lipazlar da on üyeli bir gen ailesi (*LIP 1-10*) tarafından kodlanır. *LIP* genlerinin bazılarının tek karbon kaynağı olarak lipidler üzerinde üreme süresince eksprese edilmelerine rağmen, lipidlerin yokluğunda da eksprese edilebilirler. *LIP 2* ve *LIP 9* sadece lipidlerin varlığında eksprese olur, bu da bu lipazların besin kazanımında alternatif bir rol oynadığını desteklemektedir (38). *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* suşlarının lipaz aktivitesi gösterdiği ve bu genleri eksprese ettiği saptanmıştır (49).

4.4.6. Biyofilm Yapımı

Sistemik *Candida* infeksiyonları sıklıkla kateter, yapay eklem ve protez kalp kapağı gibi medikal aletlerin varlığı ile ilişkilidir. *Candida* türleri bu aletlerin yüzeylerine yapışıp, biyofilm üretimi ile kolonizasyon oluşturabilir ki, bu kateter ile ilişkili antifungal direnç ve kandidemide artışa yol açar. Virulansın derecesi ve biyofilm oluşturma yeteneği arasında pozitif bir ilişki varlığı bildirilmiştir (35, 38).

Kateterde ortaya çıkan biyofilmlerde hem mikroorganizmaya hem de konağa ait faktörlerin rol oynadığı; bu yapışma ve kolonizasyon için mantarın “slime” faktörünün, konağın da fibrin ve fibronektinlerinin gerekli olduğu bildirilmektedir. Biyofilmlerdeki hücrelerin ana (planktonik) hücrelerden tamamen farklı fenotipik özellikler gösterdiği, klinikte kullanılan antifungallere de planktonik hücrelere göre daha dirençli olduğu bildirilmiştir (50).

Biyofilm yapımı, özellikle *C. parapsilosis* için önemli bir virulans faktörü olup, kateter kaynaklı infeksiyonlarda yüksek oranlarda rol oynamaktadır. Ayrıca *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*'in de slime ürettiği saptanmıştır (37, 51, 54).

4.4.7. Moleküler Benzeme

Candida infeksiyonlarında moleküler benzeme olduğu saptanmıştır. Örneğin kronik vajinal kandidoz olgularında timus ve overlere karşı antikorlar saptanmıştır (53).

4.4.8. Sideroforları Kullanma Yeteneği

Demir çoğu canlı tarafından indirgenme-yükseltgenme enzimlerinin kofaktörü olarak kullanılır. *Candida* türlerinin patojenliğini etkileyen önemli bir faktörün de hem diğer

Candida'ların hem de *Candida* dışı mikroorganizmaların sideroforlarının kullanılabilmesi olduğu bildirilmiştir (54).

4.5. *Candida* Türlerinin Neden Olduğu İnfeksiyonlar

Candida türleri invaziv olmayan yüzeysel infeksiyonlardan, derin dokuları tutan çok sayıda organ sistemi ile ilişkili sistemik, yaşamı tehdit edici infeksiyonlara kadar geniş bir hastalık spektrumuna sahiptir (55). İnfeksiyonlar klinik olarak kutanöz ve mukozal, kronik mukokutanöz ve sistemik kandidoz olmak üzere başlıca 3 tipte incelenmektedir (25).

4.5.1. Kutanöz ve Mukozal Kandidoz

Kutanöz *Candida* infeksiyonları genellikle doğal olarak oluşmakta ve travma, diabet, AIDS, gebelik, genç veya ilerlemiş yaş, doğum kontrol hapları, kortikosteroidler veya antibiyotiklerle sağaltım, kan glukoz düzeyinin yüksekliği, hücresel immün yetmezlik, endokrin dengesizlik ve derinin uzun süre nemli kalması gibi bazı koşullar nedeniyle artış göstermektedir (21, 25). Müköz membranların kandidozu; sıklıkla oral kavite ve vajinal kanal ile ilişkilidir (56).

Pamukçuk: Dil, dudaklar, diş etleri ve damak gibi oral mukozal yüzeyler üzerinde kremi beyaz, yamalar şeklinde yalancı membranların bulunduğu lezyonlar ile karakterize olan oral kandidozun özel bir formudur (25). Membranlar kazınarak kaldırılabilir ve yerini nemli, kanayan ve ağrılı bir yüzeye bırakır. Bu membranlar maya, yalancı hif, epitel hücreleri, lökositler, bakteriler, keratin, nekrotik doku ve besin artıklarını içerir (21). Pamukçuk yeni doğanlarda oldukça yaygın bir hastalık olup, organizma doğum esnasında vajinal kandidoza sahip anneden yeni doğana kolonize olur (22). Endojen pamukçuk ise bakteriyel florayı azaltarak *Candida* üremesine neden olan özellikle geniş spektrumlu antibiyotiklerin veya immünbaskılayıcı ajanların kullanılması sonucu gelişir (57). Pamukçuğun insidansının yüksek olduğu diğer hastalar kanser ve AIDS hastalarıdır (21). Oral kandidozun günümüzde AIDS'li

hastaların hemen hemen %100'ünde görülen AIDS'i tanımlayıcı bir durum olduğu bilinmektedir (56).

İntertriginöz Kandidoz: Genellikle koltuk altı, kasık, memealtı, perianal bölge ve ayak parmak arası gibi vücut bölgelerinde, karşılıklı gelen deri yüzeylerinin sıcak ve nemli bir ortam sağladığı alanlarda vezikül ve püstüllerin gelişimiyle karakterizedir. İnfekte bölgeler kırmızı ve nemli, döküntülüdür, vezikül gelişebilir. Bu infeksiyon sıklıkla diabetik, obez ve suyla sık temas eden bireylerde yaygındır (25, 56).

Onikomikoz ve Paronişya: Onikomikoz, tırnak materyalinin sertleşmesine ve kalınlaşmasına neden olan bir tırnak infeksiyonudur. Sıklıkla tırnak çevresindeki deri ile de ilişkilidir, tırnak subkutanöz dokularının bu infeksiyonu paronişya olarak bilinir. Bu infeksiyon tırnakların uzun süre suyla temasından kaynaklanmaktadır (25, 58).

Candida Özofajiti: Altta yatan hastalığı bilinmeyen hastalarda az sayıda görülmesine rağmen, daha çok hematopoetik veya lenfatik sistem malignitelerinin sağaltımı ve AIDS ile ilişkilidir. *Candida* özofajiti, özellikle yeni doğanlarda pamukçuğun yayılımı ile gerçekleşmektedir (21, 56). Sıklıkla asemptomatiktir, fakat substernal ağrı yapabilir veya yutmayı engelleyebilir. Çoğu lezyon özofagusun distal üçüncü kısmındadır ve endoskopide kırmızılık ve ödem, yerel beyaz yamalar veya ülserler görülmektedir (31).

Vajinal Kandidoz (Vulvovajinit): Vajinal mukozanın maya ile invazyonu; inflamasyon, iritasyon, kaşıntı ve vajinal akıntı ile karakterize olan vulvovajinite yol açar. Bu yaygın infeksiyon sıklıkla mikrobiyal flora ve lokal pH'yı değiştiren diabet, gebelik, doğum kontrol ilaçları ve antibakteriyal ilaç sağaltımı ile ilişkilidir (21, 22, 25). Antibiyotik sağaltımı, *Candida* vajinitinden sorumlu en önemli faktördür. Normalde bu bölgede düşük pH oluşturarak *Candida* üremesini kontrol edebilen mevcut laktobasillerin herhangi bir faktör nedeniyle sayıca azalması, *Candida* türlerinin üremesine yol açmaktadır. Vajinal kandidoz cinsel ilişkiyi takiben eşlerde de kandidoza yol açabilir; bu nedenle cinsel yolla bulaşan

hastalık olarak da düşünülebilir. Erkeklerde bu durum “kandidal balanit” olarak ortaya çıkar ve kaşıntı ile yanmaya eşlik eden yüzeysel maserasyonlar ile karakterizedir (21, 22).

4.5.2. Kronik Mukokutanöz Kandidoz (KMK)

Lökosit fonksiyonu veya endokrin sistemle ilgili çok sayıda genetik kusur ile ilişkili deri ve mukoz membranların kronik, dirençli yüzeysel infeksiyon ile karakterize fırsatçı bir infeksiyonudur. KMK ile ilişkili endokrin bozukluklar arasında hipoparatroidizm, hipoadrenalizm, hipotiroidizm, pernisiyöz anemi, gonadal yetmezlik, Addison hastalığı ve diabetes mellitus sayılabilir (55, 56). Hastalık T-hücre bozukluğu olan çocuklarda görülmekte olup, erken çocuklukta başlar (25). KMK’ün birlikte görüldüğü özel bir tümör timoma’dır. Timoma ile birlikte olan KMK tipik olarak daha ileri yaşlarda ortaya çıkar. Mukokutanöz kandidal infeksiyonlar tümör saptanmadan önce ortaya çıkabilecekleri gibi tümörle eş zamanlı da olabilir (33).

4.5.3. Sistemik Kandidoz

Sistemik kandidoz; *Candida* türlerinin hematogen yayılımından kaynaklanmaktadır ve vücudun herhangi bir doku veya organı ile ilişkili olabilir. İnfeksiyonun en sık yerleştiği bölgeler; kalp (perikardit, miyokardit, endokardit), meninksler (menenjit), idrar yolu (üretit, sistit), deri, göz, karaciğer ve dalaktır (26, 57).

Sistemik kandidoz, kandidemiye izler. Kandidemi, kanıtlanmış organ tutulumu olmaksızın, infeksiyon belirtisi ve bulguları olan bir hastada en az bir yada daha fazla kan kültüründe *Candida* üremesi anlamına gelmektedir (27). İmmün sistemi baskılanmış hasta popülasyonundaki artış ve hastanede kalış süresinin uzaması kandidemi gelişiminde rol oynayan önemli risk faktörleri olarak bildirilmektedir. Bunun yanısıra kandidemi sıklıkla uzun süre geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, kortikosteroid veya diğer immün baskılayıcı ilaçlar, santral venöz kateterler, cerrahi girişimler, deri veya gastrointestinal mukozadaki

harabiyet, damar içi ilaç kullanımı ve nütropeni ile ilişkili olarak da ortaya çıkmaktadır (25, 26). Konak savunmasının normal olduğu durumlarda, kandidemi geçici olup, vücut kısa sürede mantarı uzaklaştırır. Buna karşılık immün yetmezlik durumlarında *Candida* kandan uzaklaştırılmaz, kanda çoğalıp herhangi bir organ veya sisteme yerleşerek infeksiyon odakları oluşturur (26).

C. albicans kan kültürlerinden soyutlanan temel fungal patojen olmakla birlikte, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* gibi diğer *Candida* türlerinin soyutlanmasında da artan bir oran mevcuttur (6).

Candida endokarditi çoğu kez maya ve yalancı hiflerin kalp kapağı protezlerinde birikimi ve üremesi ile ilişkilidir (25). İnfeksiyon özellikle immünyetmezlikli hastalarda ve intravenöz ilaç kullanıcılarında görülmektedir (56). Tüm endokardit olgularının %2'si *Candida*'lara bağlı olarak gelişmektedir (27).

Bronkopulmoner kandidoz temelde bakteriyel pulmoner hastalık için alınan antibiyotik tedavisinden kaynaklanan sekonder bir infeksiyon olarak gözlenmektedir. (59).

Sistit ve pyelonefrit gibi üriner sistem kandidozu nispeten nadirdir. Sıklıkla *C. glabrata*'nın etken olduğu sistit, tipik olarak mesaneye yapılan girişimler sonucunda gelişir ve çoğunlukla gebelik, diyabet, kateter ve antibiyotik kullanımı ile ilişkilidir. Pyelonefrit ise uzak bir odaktan hematojen yayılım veya mesane infeksiyonu sonucunda meydana gelir (26, 56).

Hastane infeksiyonları arasında da fungusların ve özellikle bunlardan *Candida* infeksiyonlarının ayrı bir önemi söz konusudur. Hastane kökenli *Candida* infeksiyonları, immün yetmezlikli hasta grubunda morbidite ve mortalitenin giderek daha önemli konuma geçen temel nedenidir (60).

Son 10-15 yıl içinde hastane kökenli infeksiyonların %15'inden, tüm hastane kökenli mantar infeksiyonlarının %86'sından ve hastane kökenli kan infeksiyonlarının % 8-10'undan etken olarak *Candida* türleri soyutlanmaktadır. *Candida* türleri ile gelişen hastane kökenli fungeminin hastanede kalış süresini ortalama 30 gün uzattığı ve tek başına % 38 mortaliteye neden olduğu gösterilmiştir (61). Kandidemi insidansının hastaneler için genel popülasyondan daha fazla, fakat kanser ve ciddi hastalıklı hastalardan daha düşük olduğu gösterilmiştir (9). Hastane kökenli kandidoz etkeni olarak en sık görülen türün *C. albicans* olduğu, bunu non-*albicans Candida* türlerinden *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata*'nın izlediği bildirilmektedir (56).

4.6. *Candida* İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı

Candida infeksiyonlarının tanısı için alınacak örnekler, yüzeysel lezyonlardan kazıntı ve sürüntüler, kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), doku biyopsileri, idrar, eksuda ve intravenöz kateter materyallerini kapsamaktadır (25).

4.6.1. Direk Bakı ve Kültür

Tanı için alınan örneklerden ilk yapılması gereken işlem direk bakıdır. Bu amaçla balgam, eksüda, santrifüj edilmiş BOS ve diğer örneklerden yaş preparat hazırlanır. Burada mayanın şekil ve büyüklüğü, tomurcuğun bağlanma durumu ve yalancı hif, gerçek hif veya artrokonidya varlığı incelenir (29). Daha sonra örneklerden yalancı hif ve tomurcuklanan hücreler açısından Gram boyalı preparatlar hazırlanır. Preparatta sadece mayalar bulunuyorsa, kolonizasyon düşünülmelidir, yalancı ve gerçek hif yapılarının gözlenmesi ise invazyonu gösterir. *Candida*'lar Gram pozitif olarak izlenir (25, 58). Deri ve tırnak kazıntıları %10'luk KOH ve kalkoflor-beyazı ile hazırlanan preparatlarla incelenir (21, 25).

Klinik örneklerden *Candida* türlerinin soyutlanması için en sık kullanılan besiyeri SDA'dır. Tüm örnekler SDA besiyerine ekilerek 30°C'de inkübe edilir. *Candida* türleri 24

saat içinde genellikle kenarları düzgün, biraz kubbeli veya düz ve tereyağ kıvamında, yumuşak, krem renkli, maya kokulu koloniler oluştururlar, ancak 48 saatte koloniler daha belirgin hale gelir. Sıklıkla koloninin periferinden örümcek ağı benzeri uzantılar oluşmasına rağmen, aerial hif geliştirmezler (26, 56). SDA dışında; beyin kalp infüzyon (BHI) agar, Sabouraud beyin kalp infüzyon (SABHI) agar veya “yeast-phosphate” agar gibi besiyerleri de kullanılabilir. Bu besiyerleri içine sikloheksimit gibi antimikotik; kloramfenikol ve gentamisin gibi antibiyotikler katılarak sırasıyla kontaminan saprofit mantarlar ve bakterilerin üremesi engellenmektedir (62).

Çimlenme borusu (“germ tube”) testi, klinik örneklerden tanımlanan mayaların yaklaşık %75’ini oluşturan *C. albicans*’ın, diğer *Candida* türlerinden ayrılmasını sağlayan hızlı, kolay ve değerli bir testtir (56, 63). Çimlenme borusu testinde koloninin küçük bir miktarı 0.5 ml tavşan ya da insan plazması veya serumu içeren deney tübünde süspansiyon edilir. Tüp 35°C’de 2 saatten uzun olmamak koşulu ile inkübe edilir. Daha sonra maya-serum süspansiyonundan lama bir damla damlatılır ve lamel ile kapatılıp, çimlenme borusu varlığı açısından mikroskopik olarak incelenir. Çimlenme borusu, maya hücresinin boyunun yaklaşık 3-4 katı ve genişliğinin yarısı kadar, paralel kenarlı, septasız filamentöz bir uzama olarak tanımlanmakta olup, çıkış noktasında boğumlanma yoktur (56). Eğer çimlenme borusu gözlenirse; etken olasılıkla *C. albicans*’dır, gözlenmezse; *C. albicans* dışı *Candida* olduğu düşünülür; ancak, *C. albicans*’ların yaklaşık %5’inin de çimlenme borusu yapmadıkları belirtilmektedir. Bu durum uzun inkübasyon ve yoğun maya inokulumu kullanılması nedeniyle ortaya çıkabileceği gibi antifungal sağaltım uygulanması durumunda da görülebilir. (29, 56).

Daha ileri tanımlama için mayalar mısır unu-tween 80 agar, pirinç özütü-tween 80 agar ve “trypan blue” agar gibi besin açısından fakir besiyerlerine inoküle edilerek lam kültürü yapılır (57, 63). Bu amaçla mısır unu-tween 80 agara ekim için yeni üremiş bir koloniden öze ile çok küçük bir miktar alınıp, öze 45°’lik açı ile tutularak besiyeri yüzeyine 3 paralel çizgi çekilir. Agarın yüzeyine, inokülasyon çizgilerini örtecek şekilde steril bir lamel kapatılır. 30°C’de 24 ile 48 saat inkübe edilir ve mikroskopik olarak incelenir. Mısır unu-tween 80

agarda yalancı hif ve/veya gerçek hif varlığı, blastokonidyalarda büyüklüğü, şekil ve dizilimleri, klamidospore oluşup oluşmadığı incelenir (26, 56).

Mısır unu-tween 80 agarda hiflerin uçlarından geniş, kalın duvarlı, genellikle tekli terminal klamidospore ve yalancı hif boyunca dağılmış yoğun kümeler halinde düzenlenmiş blastokonidyalarda görülmesi *C. albicans* olarak yorumlanır (30, 56).

Zarif, uzun yalancı hifler boyunca, boğumlanma noktalarında tekli veya küçük düzensiz kümeler halinde az sayıda blastokonidya üretimi ve nadiren yalancı hiflerin uçlarında ince duvarlı, göz yaşı damlası şeklindeki hücreler *C. tropicalis*'i tanımlamaktadır. Gerçek hif de gözlemlenebilir (30, 56).

C. guilliermondii az sayıda, kısa yalancı hif ve bunların boğumları çevresinde küçük blastokonidya kümeleri oluşturur. Gerçek hif üretmez (30).

C. parapsilosis bükük veya eğri görünümdeki kısa yalancı hifler boyunca tekli veya küçük kümeler halinde dizilmiş blastokonidya ve nadiren dev hücreler olarak isimlendirilen büyük hifler üretir (30).

C. krusei kesişen çapraz kibrit çöpleri veya ağaç benzeri bir görünüme sahip uzamış blastokonidya ve yalancı hifler oluşturur (30).

C. glabrata terminal tomurcuklanma ile sadece küçük (2-3×3.5-4.5 µm) oval maya hücreleri üretir, yalancı hif oluşturmaz, sıklıkla oval hücrelerin birkaç küçük zinciri görülür (30).

C. kefyr tipik olarak bir derede yüzen kütükler görünümü veren belirgin şekilde dağınık, çapraz giden kümeler oluşturan dikdörtgen şeklinde uzamış blastokonidyalardan oluşan hifler oluşturur (30, 56).

Candida türlerinin tanısında metabolik testler olarak karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon ile üreaz üretimi reaksiyonları da kullanılabilir (21). Karbonhidrat asimilasyon (glukoz, galaktoz, maltoz, sükröz, trehaloz, nişasta, D-ksiloz) testleri mayanın oksijen varlığında karbonun tek kaynağı olarak özel bir karbonhidrattan yararlanma özelliğini ölçer (29).

Candida türlerinin identifikasyonu için karbonhidrat asimilasyonu ve/veya enzim saptama amacıyla ticari olarak testler bulunmaktadır. Bacti-Card Candida (Remel Laboratories, Lenexa Kan), Murex C. albicans-50 (MurexDiagnostics, Norcross Ga.), ve Albicans-sure (Clinical Standards Laboratories, Rancho Dominguez, Calif.) β -galaktoz aminidaz ve L-prolin aminopeptidaz enzimlerini saptamak için tasarlanmıştır. API 20C AUX (bioMerieux-Vitek, Hazelwood, Mo.), API Candida (bioMerieux, France), Uni-Yeast-Tek kit (Remel Laboratories, Lenexa, Kan.) ve Microscan Yeast Identification Panel (Baxter-MicroScan, West Sacramento, Calif.) gibi testler belirli bir kimyasal profil üretmek için farklı substratları içeren kuyucuklardaki turbiditede artışı veya renk üretimini kullanır (64).

Tür identifikasyonunda kullanılan diğer sistemler; ID 32Cstrip system (bioMerieux), Vitek Yeast Biochemical Card system (bioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.), Vitek 2 ID-YST card system (bioMerieux Vitek, Inc.), Quantum II (Abbott Laboratories, USA), Biolog YT MicroPlate system (Biolog, USA) ve RapidID Yeast Plus system gibi otomatize biyokimyasal sistemleri içermektedir (63, 64).

Karbonhidrat fermentasyon (glukoz, galaktoz, maltoz, sükröz) testleri ise mayanın CO₂ ve alkol üretimini araştırır (29). Endojen karbonhidratların hücre duvarına bağlanabilmesi nedeniyle sıklıkla yanlış pozitif reaksiyonlar görülebilmektedir (56).

Candida türlerinin identifikasyonunda üreaz testi de kullanılabilir. Hemen tüm *Candida* türleri, *C. lipolytica* ve *C. krusei*'nin bazı suşları hariç üreaz negatiftir (29).

Candida türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu için CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Paris, France), *Albicans* ID2 agar (AID; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), *Candida* ID (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), Candiselect medium (Sanofi Diagnostics, Marnes-La-Coquette, France), BiGGY agar (Oxoid, Basingstoke, UK), Fluoroplate *Candida* (Merck, Germany), Fongiscreen 4H (Sanofi Diagnostics Pasteur), Murex *Candida albicans* (Murex Diagnostics, USA) gibi çok sayıda kromojenik besiyeri bulunmaktadır. Bu besiyerlerinde tanı, tür spesifik ekzoenzim aktivitesi ile çeşitli kromojenik substratların parçalanması sonucu farklı kromojenik ayrışma ürünlerinin ortaya çıkmasına bağlı olarak farklı morfoloji ve değişik renkte koloni oluşumu temeline dayanmaktadır (29).

Yapılan çalışmalarda, bu kromojenik besiyerleri içinde özellikle CHROMagar *Candida* ile *Albicans* ID2 ve *Candida* ID agar'ın başta *C. albicans* olmak üzere bazı non-*albicans* *Candida* türlerini tanımlayabilen kolay ve değerli besiyerleri oldukları bildirilmektedir (65, 66, 67, 68).

4.6.1.1. Kan Kültürü

Kandidemide tanı koydurucu temel yöntem kültür ile *Candida*'nın izolasyonu ve türünün belirlenmesidir (19). Kan kültürü pozitifliğinin yakalanabilmesi için yeterli miktarda kanın besiyerine ekilmiş olması önemlidir. Eğer kan hacmi yeterli ise, genellikle 2 veya 3 kan kültürü optimum kan kültür duyarlılığını sağlamak için yeterlidir (69). Eğer fungemi süresince kanda az sayıda organizma mevcut ise, kültür sıklığı ve alınan toplam kan hacmi kan kültür tekniğinden daha fazla olarak fungemi saptanması olasılığını etkilemektedir (28).

Kan kültürü için kullanılan başlıca kan kültür sistemleri 3 grupta toplanmaktadır:

4.6.1.1.1. Klasik Sistemler- Bu sistemler için laboratuvarda hazırlanmış ya da ticari olarak satılan ağzı kapalı, içerisinde triptikez soya buyyonu, beyin kalp infüzyon buyyonu veya Columbia buyyonu gibi besiyerleri içeren şişeler kullanılır. Bazı şişeler hem sıvı hem de katı kısımları içerir (bifazik).

4.6.1.1.2. Lisis Santrifügasyon Sistemi- Isolator (Wampole Laboratories) sistem özellikle yavaş-üreyen organizmaların tanısı için geliştirilmiş otomatize olmayan lisis temelli ticari bir kan kültür sistemidir (70). Bu sistemde Isolator tüplerine alınan kanın, konak hücrelerini parçalayan ve fungusların canlılığına zararlı olabilen bazı antimikrobiyal ajanları inaktive eden karışımda lize olması sağlandıktan sonra santrifüjlenerek oluşan çökelti katı bir besiyerine inoküle edilmektedir. Isolator sistemin avantajı; fagositlerden mikroorganizmaların serbest kalmasını sağlayan lisis işlemi ile canlı mikroorganizma sayısını arttırmasıdır (64).

Bile ve ark. (71) mayaların klasik sistemlerle ortalama 4.90 günde, Isolator sistemle ise 2.12 günde saptandığını göstermişlerdir. Ayrıca çalışmacılar Isolator sistemin kullanılması ile kan kültürlerinden mantarların saptanmasında %36.6'nın üzerinde bir artış olduğunu da bildirmişlerdir. Ancak bu sistemin kullanımında klasik sistemlere göre kontaminasyon oranlarında 2 ile 8 kat artış izlenmesi önemli bir sorun olarak görülmektedir. Bu sistem örnek işlemlenmesinin pahalı ve zor olması, örneklerin ve inoküle edilmiş plakların manipulasyonu nedeniyle biraz daha yüksek oranda kontaminasyona neden olması ve laboratuvar personeli için risk oluşturması gibi dezavantajlara sahiptir. Ateşli, nötropenik hastaların değerlendirilmesinde, Isolator tüplerin rutin kullanımı kontaminasyon ve yanlış pozitif sonuçları nedeniyle önerilmemektedir (64, 70, 71, 72).

4.6.1.1.3. Otomatize Sürekli İzlemeli Sistemler- Bu sistemler bilgisayar desteği ile hazır kültür şişeleri içerisinde farklı üreme indikatörlerinde meydana gelen değişimlerin izlenmesi esasına dayanır. Genel olarak sistemlerin içerisinde baz besiyeri (beyin kalp infüzyon

buyyonu, Columbia buyyonu, triptikez soya buyyonu...vb.), antikoagulan olarak antilozomal ve antikompleman aktivi sodyum polianethol sulfonat (SPS), tercihe göre antimikrobiallerin inaktivasyonu için iyon değiştirici reğine ya da polimerik absorbanlar bulunmaktadır. Üreme kontrollü otomatik sistemlerde duyarlılık, manuel yöntemlere göre daha yüksek olup, iş yükünü de hafifletmektedir. Adı geçen sistemlerin şişe kapasitesi, üreme indikatörleri ve veri tabanları açısından değişik tipleri geliştirilmiş ve değişik modelleri ülkemizde yaygın kullanım alanı bulmuştur. BACTEC (Becton Dickinson Microbiology Systems) ve BacT/Alert (Organon Teknika) sistemleri mikroorganizmaların metabolizması sonucu besiyeri içinde açığa çıkan CO₂'in spektrofotometrik ve kolorimetrik olarak ölçümü prensibine dayanır (70, 73). BACTEC sistemleri çok sayıda besiyeri formülasyonuna sahip olup; bunlardan "Myco/F-Lytic" mantar ve mikobakterilerin saptanması için özel tasarlanmıştır, fakat bakteriyal patojenlerin üremesini de desteklemektedir (73).

Otomatize iki kan kültür sisteminin simüle örnekler kullanılarak karşılaştırıldığı bir çalışmada, her iki sistemde aerop, anaerop ve mikolojik besiyerleri değerlendirilmiş; BACTEC sistemi için Plus Aerop/F, Plus Anaerop/F, ve Myco/F litik şişeleri ve BacT/Alert sistemi için MB şişeleri kullanılmıştır. Her iki sistem aerop kan kültür besiyeri kullanıldığı zaman tüm *Candida* türlerinin üremesi için karşılaştırılabilir sonuçlar vermiştir. BACTEC ve BacT/Alert sistemleri *Candida* izolatlarının %90 ve %100'nü saptamıştır. Ayrıca her iki sistemle de özel mikoloji besiyeri kullanılarak 50 *Candida* izolatının tümü belirlenebilmiştir. Bununla birlikte, aerop kültür ortamında birçok antifungale duyarlılığı azalmış *C. glabrata*'nın üremesinin saptanması için ortalama sürenin BacT/Alert sisteminde BACTEC'e göre belirgin olarak daha kısa olduğu izlenmiştir (74).

Kolorimetrik veya floresan izlem yerine sürekli manometrik izlem kullanan bir otomatize kan kültür sistemi olan "Difco Extra Sensing Power" (ESP) kan kültür sistemi (Trek Diagnostic Systems) her 12-dakikada şişe içindeki gaz basıncının ölçümü esasına dayanmaktadır. BacT/Alert ve BACTEC 9240/9120 sistemlerinden farklı olarak; CO₂ üretimi manometrik olarak belirlenir ve hem gaz tüketimi hem de üretimi saptanır (70). Bu mikroorganizmaların metabolik faaliyetleri ile ürettiği ya da tükettiği gazların (O₂, H₂, N₂ ve

CO₂) oluşturduğu basınç değişiklikleri kan kültür şişelerine bağlanan duyarlı bir dedektör ile izlenir (69, 73). Burada okuma H₂ ve O₂ tüketimi fazı süresince olur, O₂ tüketimi replike olan mikroorganizmalar üremenin log fazına girince hızlanmaktadır. Bu nedenle bu okuma saptanabilir miktarda CO₂ üretilmeden önce inkübasyon periyodunun erken döneminde mümkündür. Okumaların sadece CO₂ üretimine bağlı olmaksızın genellikle 1-8 saat önce gerçekleşmesi bu sisteme farklı bir avantaj sağlamaktadır (70). Vital kan kültür sisteminde (bioMeriux) ise CO₂ konsantrasyonu, pH değişiklikleri ve oksidasyon-redüksiyon modifikasyonu varlığında floresan verimini azaltan floresan bir molekül, buyyon solusyonu içindedir ve kültürde var olan mikroorganizmaları saptayan bir indikatör olarak görev yapar (69).

Sistemik kandidozu tanımlamak için sıklıkla iki veya daha fazla kan kültürü kullanılmasına rağmen, standart kan kültür metotları tanı için iki ile üç gün hatta daha uzun bir süre gerektirmektedir. Üstelik tanıda altın standart olan fungal kan kültürü iç organlarda *Candida*'nın geniş çapta yayılımına rağmen negatif kalabilmektedir (12). Kan kültürleri, derin yerleşimli kandidozun otopsi ile ispatlanmış vakalarının %50'sine yakınında negatif veya sadece geç pozitif olabilmektedir (64).

4.6.2. Serolojik Tanı

Sistemik *Candida* infeksiyonlarında tanı amacıyla *Candida* türlerine özgü antikor, antijen veya metabolitlerin saptanması temelinde çeşitli serolojik testler geliştirilmiştir.

4.6.2.1. Antikor Saptanan Testler:

Sistemik kandidoz tanısı için antikor saptanması tanımlayıcı değerinin düşük olması ve de saptanamayan antikor seviyelerine sahip immün yetmezlikli hastalarda yanlış negatif sonuçlar ve yüzeysel kolonizasyonlu hastalarda yanlış pozitif sonuçlar nedeniyle sınırlıdır (64, 75). İnsan serumunda anti-*Candida* antikorlarını saptayan çok sayıda yöntem tanımlamıştır

(64, 75). Bu yöntemler *C. albicans*'ın kaba ekstratlarına karşı presipitinlerin saptanmasından radyo immün assay (RIA) ve enzim immün assay (EIA) ile özgün antijenlere karşı antikorların kantitasyonuna kadar değişmektedir (28, 75).

Sistemik *Candida* infeksiyonlarının tanısında mannan, 46, 47 kDa'luk sitoplazmik protein antijenleri, enolaz, *C. albicans* blastokonidya ve çimlenme borusu, salgısal aspartik proteinaz (Sap) gibi çeşitli *Candida* antijenlerine karşı oluşmuş antikorlar araştırılmıştır.

47 kDa-29 kDa antijenlerin kullanıldığı bir çalışmada EIA yöntemi kullanılarak invaziv kandidozlu olgular ile sağlıklı bireylerin ayırt edilebildiği ve yöntemin duyarlılığının %81.5 ve özgüllüğünün %97 olduğu bildirilmiştir (76). Blastokonidyalara karşı IgM tipi antikorların araştırıldığı bir diğer çalışmada yöntemin %100 duyarlılık ve özgüllük ile sistemik kandidoz tanısı açısından anlamlı olduğu belirtilmiştir (77). *C. albicans* çimlenme borusuna karşı oluşan antikorların araştırıldığı bir çalışmada ise sistemik kandidozlu olgularda bu antikorların kan kültürlerinden daha önce saptandığı ve duyarlılığın %87.5, özgüllüğün ise %95.2 olduğu belirtilmiştir. (78).

C. albicans'ın hücre duvar mannani (HDM), diğer *Candida* türlerinin HDM'ı ile antijenik determinantlar paylaşmaktadır. Anti-HDM düzeylerinin serumda RIA ve EIA ile incelenmesinde, bir sınır ("cut-off") değeri oluşturulduğunda, gözlenen en iyi duyarlılık yaklaşık %65 olmuştur. Ancak hastaların önemli bir kısmında bu test, doku biyopsi tanısı yapılması sonrasına kadar pozitif bulunamamaktadır (28).

Na ve Song (79), doku invazyonu süresince açığa çıktığı varsayılan bir virulans faktörü olan salgısal aspartil proteinaza karşı antikorların saptanması için bir ELISA testi tanımlamışlardır. İnvaziv kandidozlu 33 hastanın retrospektif değerlendirmesinde bu test için duyarlılık ve özgüllük %70 ve %76 olarak belirlenmiş ve invaziv kandidoz tanısı için Sap antijen saptama testlerinden daha az cazip olduğu sonucuna varılmıştır (79) .

İmmünyetmezlikli hastalarda antikor üretiminin olmadığı veya değişken olduğu gerçeği sistemik kandidoz tanısında antikor saptama testlerinin bu hasta popülasyonunda daha az yararlı olduğunu ortaya çıkartmaktadır. Sonuç olarak, antikor testlerinin invaziv kandidoz için riskli immünyetmezlikli hastalarda kullanılmasının uygun olmadığı söylenebilir (28). Bununla birlikte, bu grup hasta için antijen saptanması invaziv kandidoz tanısı için potansiyel olarak daha başarılı bir stratejidir (64).

4.6.2.2. Antijen Saptanan Testler:

1976'dan beri, çok sayıda araştırmacının infekte hasta serumlarında *C. albicans* antijenlerinin saptanması için testler geliştirdikleri çalışmalar rapor edilmiştir (28). Antijen saptayan testler üç tiptir: birincisi HDM antijenlerini saptar, ikincisi HDM dışı *Candida* antijenlerini belirler. Üçüncüsü ise tanımlanmamış bir antijeni saptamak için düşünülür (28).

Mannan, *C. albicans*'ın temel hücre duvar mannopteini olup, tanımlayıcı bir antijendir. Dolaşımdaki mannanı saptamak için RIA, ELISA, lateks aglütinasyon (LA) gibi testler kullanılmaktadır. İnvaziv kandidozlu hastalarda serumda HDM antijeninin saptanmasını önleyen anti-HDM ve diğer HDM-bağlayan proteinler bulunmaktadır. Bu nedenle HDM, serum incelenmeden önce bu bağlayıcı proteinlerin parçalanması ile saptanabilmektedir. Bu antijen ısıya dayanıklı, kaynatmaya, proteinaz ile işlemlenmeye ve asit pH'a dirençlidir Bu nedenle antijen-antikor kompleksleri enzimatik işleme veya EDTA varlığında kaynatma ile ayrılabilir. Ayrıca HDM dolaşımdan hızlıca temizlenir, bu da düşük serum konsantrasyonları ile sonuçlanır ve optimal saptama için çoklu serum örnekleme gerektirir. Mannanemi örnekleme sıklığına, altta yatan hastalığa, immün yetmezliğin derecesine, ilgili *Candida* türlerine, sistemik kandidozun tanımlanmasına, bağlayıcı antikorların titresine, özgüllüğüne ve kullanılan test yöntemine göre sistemik kandidozlu hastaların yaklaşık %31 ile %90'ında görülmektedir (28, 64).

Altta yatan çeşitli hastalığı olan hasta grubunda invaziv kandidoz tanısı için mannan antijeninin tanıdaki değeri incelenmiş, tanımlayıcı duyarlılığın %19 ile %91 ve özgüllüğün %89 ile %95 arasında olduğu bildirilmiştir (28). Düşük duyarlılık LA testinin yüksek saptama sınırından veya mannan antijeninin dolaşımda geçici olması özelliklerinden

kaynaklanabilmektedir. En iyi duyarlılıkların seri halindeki örneklerin haftalık elde edildiği hasta gruplarında görülebildiği bildirilmiştir (75).

HDM dışındaki antijenleri saptamak için geliştirilen testlerin duyarlılığı %55 ile %100 arasında değişmektedir (28).

(1→3)- β -D-Glukan'ın *Zygomycetes* hariç tüm fungusların karakteristik bir hücre duvar bileşeni olması nedeniyle glukanın kan ve diğer steril vücut sıvılarında saptanabilmesi sistemik fungal infeksiyon için iyi bir belirleyici olmaktadır (75). Saeki ve ark. (80)'nın bir çalışmasında *Candida* türleri açısından kan kültürleri pozitif olan hastaların serumlarında "GlucateLL test" ile β -D-Glukan %93'ün üzerinde duyarlılık ve özgüllük ile saptanmıştır. Odabaşı ve ark. (81)'nin bir çalışmasında ise bu test ile kemoterapi alan 100 lösemi hastasının serumunda kandidozu da içine alan invaziv fungal infeksiyonların değerlendirilmesi için β -D-Glukan araştırılmış ve dolaşımdaki seviyeleri invaziv fungal infeksiyon ile korele bulunmuştur (80, 81). β -D-Glukan testleri infeksiyona neden olan fungusu özgün olarak tanımlayamamasına rağmen, sonuçların kısa sürede elde edilebilmesi, bu testleri invaziv fungal infeksiyon için tarama testi olarak cazip hale getirmektedir.

Sistemik *Candida* infeksiyonlarında antijen olarak salgısal aspartik proteinaz (Sap) aranabilmektedir. Sap'ın *C. albicans* ve diğer bazı *Candida* türleri tarafından aktif doku invazyonu süresince üretildiği ve invaziv hastalık ile korele olduğu bildirilmiştir (64). Na ve Song (79) serumda Sap antijeninin etkinliğini saptamak için bir inhibisyon EIA ve bir de antijen "capture" EIA olmak üzere 2 farklı testi karşılaştırmıştır. Bu testlerin duyarlılık ve özgüllükleri antijen "capture" için %94 ile %92 ve inhibisyon EIA için ise %94 ile %96 olarak bulunmuştur. Bu veriler inhibisyon EIA'nın, invaziv *C. albicans* infeksiyonlarının tanısı için kullanılabileceğini göstermiştir.

4.6.2.3. Kombine Testler:

İnvaziv kandidoz tanısı için alternatif bir yaklaşım da antijen ve antikor saptama testlerinin birlikte kullanılmasıdır. Sendid ve ark (82)'nin bir çalışmasında mikolojik ve klinik olarak kandidoz olduğu ispatlanmış 43 hastadan alınan 162 serum örneğinin retrospektif değerlendirmesinde, 2 ticari EIA testi kullanılmıştır: biri *C. albicans* HDM'a karşı antikorları (Platelia Candida antikor test, Bio-Rad Laboratories, France), diğeri ise mannan serum antijenini (Platelia Candida antijen test, Bio-Rad) saptamaktadır. Bu hastaların %40'ının serumlarında mannan, %53'ünde ise antikor saptanabilmiştir. Çalışmada yalnızca antikor testi için duyarlılık ve özgüllük göreceli olarak %53 ve %94 olarak rapor edilmiştir. Oysa bu antikor ve antijen testleri birlikte çalışıldığı zaman, bu değerlerin %80 ve %93 arasında değiştiği ve her iki testin kombine kullanımının invaziv kandidoz tanısı için yalnızca birinin kullanımından çok daha yararlı olduğu bildirilmiştir (82).

Bir diğerk çalışmada ise Yera ve ark. (83) pozitif kan kültür zamanları ile ilişkili olarak invaziv kandidoz tanısı için bu iki testi incelemiş, en azından bir pozitif kan kültürü olan hastalarda, bir veya her iki serolojik testin en az 2 gün içinde hastaların %73'ünde pozitif ve bazı hastalarda kan kültürleri pozitif olmadan 15 gün öncesine kadar pozitif olduğunu bildirmiştir. Sistemik kandidoz için riskli hastaların değerlendirilmesinde her iki serolojik testin eş zamanlı çalışmasının, kan kültür sonuçlarından önce erken tanı sağladığı sonucuna varılmıştır (83).

4.6.2.4. Metabolit Saptayan Testler:

İnvaziv kandidoz, serumda veya idrarda *Candida* türleri (*C. krusei* ve muhtemelen *C. glabrata* hariç) tarafından üretilen bir metabolit olan D-arabinitol'ü saptayarak da tanımlanabilmektedir. Bununla birlikte insan, arabinitolün bir veya her iki formunu üretebilmektedir. Bunun yanında, *Candida* ve kolonize olan diğerk mikroorganizmalar ve konağın beslenme şekli de arabinitolün serum ve idrardaki seviyelerine katkıda bulunmaktadır. Arabinitol, kreatinin gibi yaklaşık olarak aynı etkinlikte böbrekler vasıtasıyla temizlenir ve bu nedenle renal kayıpları olan hastalar daha yüksek arabinitol seviyelerine

sahip olmaktadır. Bu açıdan arabinitolün kreatinine oranı, arabinitol konsantrasyonlarının gözlenmesi ve yorumlanmasında kullanılmaktadır (64).

Walsh ve ark. (84) kanserli hastalardan alınan serum örneklerini enzimatik-kolorimetrik yöntem ile inceledikleri çalışmada, kandidemili hastalar arasında ortalama serum D-arabinitol/kreatinin oranının sağlıklı kan donörlerinden 11 kat fazla olduğu ve bu oranların kandidemili 34 hastanın %85'inde sağaltım yanıtları ile de korele olduğu bildirilmektedir (84).

4.6.3. Deri Testleri

Candida infeksiyonlarında deri testi; *Candida* ekstrelerinin (örneğin, kandidin) deri-içi injeksiyonu ile gerçekleştirilir. Normal sağlıklı kişilerin %94'ünde, 48 saat sonra 10 mm çapında bir endürasyon ortaya çıkar. Bu tip reaksiyonlar geçirilmiş ya da subklinik infeksiyonları gösterir. *Candida* antijenleri ile deri testleri normal yetişkinlerde hep aynı şekilde pozitif olup, bu testler *Candida* infeksiyonuna tanı koymaktan çok, hücrel immünite yeteneğini belirlemek için ve geç tip aşırı duyarlılığın ölçülmesinde kullanılır. Deri testinde; *Candida* antijenlerine yanıt vermeyen kişinin yetersiz immüniteye sahip olduğu varsayılır (58, 85).

4.6.4. Moleküler Yöntemler

Sistemik *Candida* infeksiyonlarının tanısında kullanılabilen kültür dışı yöntemler arasında polimeraz zincir tepkimesi (PZT), kültür-temelli yöntemlerden daha duyarlı olma, çok sayıda fungal cinsi kapsama ve çeşitli örnek tiplerine uygulanabilir olma gibi avantajlara sahiptir (6, 16). Kandan *Candida* DNA'sının araştırılması için gerçekleştirilen PZT uygulamalarında ITS 1-2, 18S, 5.8S, 5S rDNA, lanosterol-14- α -demetilaz (L1A1), mitokondriyal DNA, aktin, kitin sentaz, salgısal aspartik proteinaz, ısı şok protein 90 genleri gibi bir çok bölgeye özgü öncüller kullanılmıştır.

Son yıllarda geliştirilen “real time” PZT yöntemi ile moleküler tanıda duyarlılık daha iyileştirilmeye çalışılmış, kontaminasyon riski minimale indirilmiş ve kantitasyon olanağı sağlanmıştır.

4.7. *Candida* İnfeksiyonlarında Sağaltım

Mukoza ve deri kandidozlarında genellikle topikal nistatin, kristal viole, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol veya mikonazol gibi bir azol türevi uygulanır (25, 26, 57, 58). Yüzeyel kandidozların sağaltımında ayrıca önemli olan; nem, antibiyotik, diabetes mellitus gibi zemin hazırlayıcı faktörlerin ortadan kaldırılması veya kontrol edilmesidir (25, 26).

Kronik mukokutanöz kandidoz ketokonazol ve diğer azollere iyi yanıt vermekte olup, hastalar genetik bir defekte sahip olduğundan sıklıkla yaşam boyu tedavi gerekir (25, 58).

Sistemik kandidoz sağaltımı; organ ilişkisi ve hastanın immün durumuna göre değişmektedir. Sistemik kandidoz amfoterisin B ile, bazen oral flusitozin, flukonazol veya kaspofungin birleşimi ile tedavi edilir (25). Sistemik kandidozlu immünyetmezlikli hastalarda, klasik amfoterisin B'nin etkili olmadığı veya yan etkilerinin tolere edilemeyeceği durumlarda amfoterisin B lipid veya lipozomal formları denenebilmektedir (26, 57).

Antifungal tedavinin önemli bir zorluğu direnç gelişimidir. Nyugen (86) gelişen flukonazol direncinin önemli ölçüde flukonazol kullanımı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada amfoterisin B sağaltımının süresi ile bu ajana karşı duyarlılığın azalması arasında da bir ilişki gösterilmiştir. Flukonazol kullanımının bir diğer sonucu ise *C. albicans* dışı *Candida* türlerinin neden olduğu infeksiyonlardaki artıştır. Bu türler antifungal ajanlara farklı duyarlılıklar gösterirler. *C. glabrata* ve *C. krusei* flukonazole az duyarlı veya dirençlidir. *C. lusitaniae* genellikle amfoterisin B'ye daha az duyarlı, fakat azollere duyarlıdır. Bu nedenle, antifungal ajanların seçiminde klinik tanı ile birlikte etken *Candida* türünün ve ilacın

farmokinetik özelliklerinin de büyük önemi vardır. *Candida* türleri için verilecek sağaltım; flukonazol ve amfoterisin B arasında seçim gerektirmektedir (31, 32, 86).

Mevcut bilgiler temelinde flukonazolün kandidemi, peritonit ve üriner sistem infeksiyonu için seçilecek ilk ilaç olduğu; amfoterisin B'nin flukonazol dirençli *Candida* varlığında veya flukonazolün bulunmadığı vakalarda, amfoterisin B - flusitozin kombinasyonunun ise septik şok, endokarditler ve diğer endovasküler infeksiyonlar, ciddi endoftalmiler veya menenjit olgularında kullanılması gerektiği belirtilmektedir (32).

5. GEREÇ ve YÖNTEMLER

5.1. Suşlar

Candida türlerini belirlemede kullanılan PZT yönteminin saptama sınırlarını belirlemek amacıyla simüle örnekler hazırlandı. Bu hazırlık için *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 1021, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. krusei* ATCC 6258, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 gibi kontrol suşları ile bir *Aspergillus fumigatus* klinik izolatu ve kan kültür örneklerinden soyutlanmış *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *Rhodotorula sp.* olmak üzere maya ve bakteri suşları kullanıldı. Bu izolatlar katı besiyerlerinde üretilmiş olup; maya suşları için %50, bakteri suşları için %10 gliserol içeren beyin kalp infüzyon buyyonunda (BHI) -80°C'de stoklandı. Bu suşlarla simüle örnekler hazırlamak için; sağlıklı gönüllülerden EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri ve 5 günlük inkübasyon sonunda kan kültüründe üreme saptanmayan BACTEC 9240 (plus+ aerobic/FTM, Becton Dickinson, Almanya) kan kültürü şişeleri kullanıldı. Hazırlanan simüle kan örnekleri, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri içinde daha önce bir çalışmada en uygun ısı olarak belirlenen -80°C'de dondurularak saklandı (87).

5.2. Klinik Örnekler

BACTEC 9240 kan kültür sisteminde pozitif üreme sinyali veren, Gram boyamada maya görülen ve katı besiyerlerinde *Candida* türleri üreyen hasta kan örnekleri çalışmaya alındı. Rutin tanımlama yöntemleri uygulanan bu kan kültürleri PZT yöntemi ile de incelendi Ayrıca BACTEC 9240 kan kültür sisteminde pozitif üreme sinyali veren ve katı besiyerlerine yapılan pasajlarında *S. aureus* ve *E. coli* üreyen 2 hastanın kan örneği de aynı PZT yöntemi ile çalışıldı. Çalışmaya alınan bu örneklerden 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine ikişer aktarım yapıldı ve dondurularak -80°C'de saklandı.

5.3. Rutin Tanımlama Yöntemleri

BACTEC 9240 kan kültür sisteminde pozitif üreme sinyali veren, Gram boyamada maya görülüp, kanlı ve çukulata agar plaklarına yapılan pasajlarında maya üreyen kan kültürleri mikoloji laboratuvarında rutin maya tanımlama prosedürleri ile işlemlendi. Bu plaklarda üreyen maya kolonileri saf kültür halinde değil ise, seçilen bir maya kolonisinden SDA'a pasaj yapılarak, saf kültür elde edildi. Bu suşlar sırasıyla çimlenme borusu testi, mısır unu tween 80 agardaki morfolojileri, CHROMagar Candida (CHROMagar, Fransa) besiyerindeki görünümleri ve API 20 C AUX (Biomérieux, Fransa) identifikasyon sistemi ile tanımlandı.

5.4. PZT Yönteminin Optimizasyonu

PZT yöntemi önce DNA eldesinde sorun yaşanmayacağı düşünülerek SDA'da üremiş ve %0.9'luk NaCl'de süspansiyon edilmiş *C. albicans* ATCC 90028 suşuna, daha sonra da tüm simüle ve klinik örnekler uygulandı.

5.4.1. Candida Kolonilerinden DNA Eldesi

C. albicans ATCC 90028 suşunun stoğu açılarak, SDA'a pasajlandı ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Üreyen maya kolonileri ile steril %0.9'luk NaCl solüsyonunda hazırlanan yoğun maya süspansiyonuna DNA eldesi ve PZT yöntemi uygulandı.

5.4.2. PZT Yöntemi ile Pozitiflik Saptama Sınırlarının Belirlenmesi

5.4.2.1. Sağlıklı Gönüllülerden Alınan Kanlardan Hazırlanan Simüle Örneklerde PZT Yöntemi ile Pozitiflik Saptama Sınırının Belirlenmesi:

C. albicans ATCC 90028 suşunun stoğu açılarak, SDA'a pasajlandı ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Üreyen maya kolonileri ile steril %0.9'luk NaCl solüsyonunda McFarland standart 10 (10^8 KOÜ/ml maya) olacak şekilde süspansiyonlar hazırlandı (88). Sağlıklı gönüllülerden EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri ile bu süspansiyonun 10 katlı dilüsyonları yapıldı. Koloni sayım tekniği ile her dilüsyondan 10µl kan örneği, SDA plaklarına ekilerek, 37°C'lik etüvde 48 saat inkübe edildi ve her dilüsyon için koloni sayıları belirlenerek,

doğrulandı. 10^7 - 10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 - 10^2 ve 10^1 KOÜ/ml maya içeren bu simüle örneklerden ard arda 2 kez DNA eldesi yapıldı ve PZT uygulandı.

5.4.2.2. Üreme Saptanmayan BACTEC 9240 Kan Kültürlerinde Hazırlanan Simüle Örneklerde PZT Yöntemi ile Pozitiflik Saptama Sınırının Belirlenmesi:

C. albicans ATCC 90028 suşu SDA'a pasajlandı ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Üreyen maya kolonileri ile steril %0.9'luk NaCl solüsyonunda McFarland standart 10 (10^8 KOÜ/ml maya) olacak şekilde süspansiyon hazırlandı (88). Beş günlük inkübasyon sonunda kan kültüründe üreme saptanmayan BACTEC 9240 kan kültür şişelerinin içeriği ile bu süspansiyonun 10 katlı dilüsyonları yapıldı. Koloni sayım tekniği ile her dilüsyondan 10µl kan örneği, SDA plaklarına ekilerek, 37°C'lik etüvde 48 saat inkübe edildi ve her dilüsyon için koloni sayıları belirlenerek, doğrulandı. 10^7 - 10^6 - 10^5 - 10^4 - 10^3 - 10^2 ve 10^1 KOÜ/ml maya içeren bu simüle örneklerden ard arda 2 kez DNA eldesi yapıldı ve PZT uygulandı.

5.4.3. PZT Yönteminin Farklı Mikroorganizmalarla Hazırlanan Simüle Kan Örnekleri ile Denenmesi

Maya ve küf suşları yukarıda tanımlandığı gibi SDA'da, 37°C ve 30°C'de; bakteri suşları ise kanlı agarda, 35°C'de 48 saat inkübe edildi ve üreyen kolonilerden %0.9'luk NaCl solüsyonunda süspansiyonlar hazırlandı. Bu süspansiyonların sağlıklı gönüllülerden EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri ve üreme saptanmayan BACTEC 9240 kan kültürlerinde *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 1021, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. krusei* ATCC 6258, *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923 gibi kontrol suşları ile *A. fumigatus*, *C. kefir*, *C. guilliermondii* ve *Rhodotorula sp.* için 10^6 KOÜ/ml ve *C. glabrata* ile *C. lusitaniae* izolatları için ise 10^6 ve 10^8 KOÜ/ml olacak şekilde dilüsyonları yapıldı. Koloni sayım tekniği ile bu dilüsyonlardan 10µl kan örneği, SDA veya kanlı agar plaklarına ekilerek, 37°C, 30°C veya 35°C'lik etüvde 48 saat inkübe edildi ve koloni sayıları belirlendi. Farklı mikroorganizmalarla hazırlanan bu simüle örneklerden ekstraksiyon yöntemi ile DNA eldesi ve PZT yapıldı.

5.4.4. DNA Eldesi

SDA'da üretilmiş ve %0.9'luk NaCl'de süspanse edilmiş *C. albicans* ATCC 90028 ile tüm simüle kan örneklerinden DNA eldesi; Loeffler J. ve ark. (88) ile van Burik JA. ve ark.'nın (16) tanımladığı bir yöntem ile birlikte Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Almanya) prosedürü uygulanarak gerçekleştirildi.

5.4.4.1. DNA Ekstraksiyon Yöntemi:

5.4.4.1.1. Kullanılan Çözeltiler:

Eritrosit lizis tamponu; 10 mM Trizma “base” (Sigma T 6066) (pH: 7.6), 5 mM magnezyum klorür (Sigma M 1028), 10 mM sodyum klorür (Appllichem A 2942,0500) ile hazırlandı ve +4°C'de saklandı.

Lökosit lizis tamponu; 10 mM Trizma “base” (pH: 7.6) (Sigma T 6066) , 10 mM EDTA (pH: 8.0) (Appllichem A 5097,0250), 50 mM sodyum klorür (Appllichem A 2942,0500) %0.2'lik sodyum dodesil sülfat (SDS) (Appllichem A 2263,0100) ve 200 µg/ml proteinaz K'dan (Appllichem A 3830,0025) oluşmaktadır. 10 mM Tris (pH:7.6), 10 mM EDTA (pH: 8.0), 50 mM sodyum klorür ve %0.2'lik SDS ile tampon hazırlandı ve +4°C'de saklandı. Uygulama sırasında her örnek için önceden hazırlanmış 1ml tampon ve hemen ardından konsantrasyonu 200 µg/ml proteinaz K olacak şekilde 4000µg/ml'lik proteinaz K'dan 50µl kullanıldı.

Hücre duvarı lizis tamponu; 100 µl'sinde 2U litikaz (Sigma L 2524) bulunan lizis tampon 50 mM Tris (pH: 7.6) (Sigma T 6066), 1 mM EDTA (Appllichem A 5097,0250), %0.2'lik β-merkaptolanol'den (Appllichem A1108,0100) oluşmaktadır. 50 mM Tris (pH: 7.6), 1 mM EDTA, %0.2'lik β-merkaptolanol ile tampon hazırlandı ve +4°C'de saklandı. Uygulama sırasında her örnek için önceden hazırlanmış 500 µl tampon ve hemen ardından 5U/µl'lik litikazdan 2 µl kullanıldı.

5.4.4.1.2. Yöntem:

Üçyüz mikrolitre kan örneği 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 300 µl kan örneğine, 900 µl eritrosit lizis tamponu eklendi. Yatay çalkalayıcıda oda ısısında 10 dakika inkübe edildikten sonra 8,000×g'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Çökelti üzerine tekrar 900 µl eritrosit lizis tamponu eklenip, aynı işlem tekrarlandı. Elde edilen çökelti üzerine 1 ml lökosit lizis tamponu ve hemen ardından 50 µl 4000 µg/ml'lik proteinaz K eklendi ve çökelti iyice ezildi. Örnek 65°C'de 45 dakika kuru ısı bloğunda inkübe edildi, 8,000×g'de 15 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Maya hücre duvarı çökelti üzerine 500 µl lizis tamponu ve 2 µl 5U/µl'lik litikaz eklenerek parçalandı. Örnek 37°C'de 45 dakika inkübe edildi, 8,000×g'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Bu aşamadan sonra; MN Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Almanya)'in doku örnekleri için önerdiği standart prosedür doğrultusundaki uygulama basamakları ile devam edildi. Bu amaçla kit prosedürü ön-lizis basamağı ile başlatıldı; 180µl tampon T1 ve 25µl proteinaz K solusyonu kalan çökelti üzerine eklendi, vortekslendi ve örnekler, 56°C'de su banyosunda ("shaking" inkübatör) 1 saat inkübe edildi. Vortekslenen örneklere 200µl tampon B3 eklendi, tekrar vortekslendi ve 70°C'de 10 dk. inkübe edilerek lizis işlemi tamamlandı. Örneğe 210µl etanol (%96-100) eklendi ve vortekslendi. Örnek 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş olan NucleoSpin Tissue kolona dolduruldu ve 11,000×g'de 1 dakika santrifüjlendi. Sıvının toplandığı toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpü içine yerleştirildi. Bu işlem ile DNA'nın silika membrana bağlanması sağlandı. 500µl tampon BW eklendi ve 11,000×g'de 1 dakika santrifüjlendi. Sıvının toplandığı toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpü içine yerleştirildi. Kolona 600µl tampon B5 eklendi, 11,000×g'de 1 dakika santrifüjlendi ve yine sıvının toplandığı toplama tüpü atıldı, böylece silika membranını yıkama işlemi gerçekleştirildi ve kolon yeni bir toplama tüpü içine yerleştirildi. Silika membranı kurutmak için 11,000×g'de 1 dakika santrifüj uygulandı. Kolon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Yüksek ürün ve konsantrasyonda DNA eldesi için silika membran üzerine önceden ısıtılmış (70°C) 50µl elüsyon tamponu BE eklendi, oda ısısında 1 dakika inkübe edildi ve 11,000×g'de 1 dakika santrifüjlendi; aynı işlem tekrarlandı. Böylece DNA eldesi 100µl hacimde tamamlandı.

5.4.5. PZT Uygulaması

Elde edilen DNA'lar Holmes AR. ve ark. (89) tarafından önerilen ve 5S rDNA bölgesinden seçilmiş sentetik oligonükleotit öncüllerin kullanıldığı PZT yöntemi ile çoğaltıldı.

5.4.5.1. PZT için Kullanılan Malzemeler:

Tamponlar:

0.5 M Na₂EDTA (pH: 8.0); 186.1 gr disodyum etilen diamin tetra asetat-2 H₂O, 800 ml suda eritildi. NaOH pelletleri kullanılarak pH'sı 8.0'e ayarlandı ve hacim, su ile 1 litreye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

10X TBE; 108 gr Trizma "base" (Sigma T 6066), 55 gr borik asit (Sigma B 6768) 900 ml suda çözüldü. 40 ml 0.5 M Na₂EDTA (Sigma E 5134) (pH: 8.0) eklendi ve hacim, su ile 1 litreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

TE Tamponu (pH: 8.0); 2.5 ml 1 M Trizma "base" (Sigma T 6066) (pH: 8.0), 0.5 ml 0.5 M Na₂EDTA (Sigma E 5134) (pH: 8.0) karıştırılıp, hacim 250 ml'ye tamamlandı. Karışım otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

Jel Yükleme Tamponu (6X);

0.25 gr bromfenol mavisi (Sigma B 5525), 0.25 gr "xylene cyanole" FF (Sigma X 4126) ve 29.5 ml gliserol (Riedel-de Haën 15524) (~%86-88'lik) karıştırılıp, karışım steril distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

10X "Taq Buffer" [(NH₄)₂SO₄'lı] (MBI Fermentas EPO 402)

25 mM MgCl₂ (MBI Fermentas EPO 402)

"Taq Polimeraz" [5U/μl] (MBI Fermentas EPO 402)

dNTP (Intron Biotechnology) Karışımı: Her biri 10 mM olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'den eşit hacimde karıştırılarak hazırlandı. 50 µl'lik PZT için son konsantrasyonu 200µM olacak miktarda (1ml) kullanıldı.

Öncüller:

PZT için; PCon 1 (5'- AGT TTC GCG TAT GGT CTC CC -3') ve PCon 2 (5'- GTT GCG GCC ATA TCT AGC AG -3') öncülleri kullanıldı. Her öncül 1 ml TE'de sulandırıldı ve bu ana dilüsyondan steril distile su ile 50 pmol/µl ve 10 pmol/µl'lik stoklar hazırlanarak-20°C'de saklandı.

DNA Ladder: PZT ile elde edilen DNA ürününün tanımlanması için MBI Fermentas pBR322 DNA/Bsu RI (HaeIII) Marker, üretici firma tarafından önerilen şekilde hazırlanarak kullanıldı.

Agaroz: (Sigma A 5093)

Etidyum Bromür: (Appllichem A 1152,0100) (%1'lik solusyon)

5.4.5.2. PZT Karışımı ve Isı Döngü Programı:

Reaksiyon için Kalkancı A. ve ark. (19)'nın önerdiği PZT karışımı optimize edilerek; 5 µl 10X buffer, 5 µl 25 mM'lık MgCl₂, 1'er µl 10 pmol'lük PCon 1 ve PCon 2 öncülleri, 1 µl 10mM'lık d NTP karışımı, 0.5µl 5U/µl'lik Taq polimeraz enzimi, 26.5 µl steril distile su ve 10 µl kalıp DNA olmak üzere toplam 50 µl'lik karışım 0.2 µl'lik mikrosantrifüj tüplerinde ve buz üzerinde hazırlandı.

Isı döngü programı

94°C'de 3 dakika ön denatürasyon

94°C'de 30 saniye denatürasyon

60°C'de 45 saniye birleşme

72°C'de 1 dakika uzama

} 30 döngü

72°C'de 5 dakika son uzama
+4°C'de elektroforez uygulamasına kadar saklandı.

5.4.5.3. Sonuçların Değerlendirilmesi:

TBE tamponu ile %2'lik agaroz jel hazırlandı, içine %5 oranında etidyum bromür solusyonu eklendi ve karışım jel kalıbına döküldü. 10 µl PZT ürünü, 2 µl yükleme tamponu ile karıştırıldı. 3µl DNA ladder ve ürünlerin 10 µl'si jel kuyucuklarına yüklendi. Elektroforez tankı 1X TBE tamponu ile doldurularak, jele bu tank içinde 120 V'da 40 dakika elektroforez yapıldı. Sonuçlar ultraviyole aydınlatıcıda incelendi ve bilgisayarlı görüntüleme cihazında (Syngene GeneSnap, Synoptics Ltd., USA) görüntülendi. 105 baz çiftlik (bp) ürün varlığı pozitif olarak değerlendirildi.

5.4.6. Klinik Kan Kültür Örneklerinden DNA Eldesi ve PZT

BACTEC 9240 kan kültür sisteminde pozitif üreme sinyali veren, Gram boyamada maya görülen, katı besiyerlerinde *Candida* türleri üreyen 23 hasta kan örneği ve BACTEC 9240 kan kültür sisteminde pozitif üreme sinyali veren, üreyen bakterinin bakteriyoloji laboratuvarında rutin tanımlama yöntemleri ile *S. aureus* ve *E. coli* olarak tanımlandığı iki hasta kan kültür örneğinden belirtilen ekstraksiyon yöntemi kullanılarak DNA eldesi yapıldı ve PZT çalışıldı.

6. BULGULAR

6.1. PZT Yönteminin Optimizasyonu

6.1.1. Candida Kolonileri ile Elde Edilen Sonuçlar

Tanımlanan ekstraksiyon yöntemi ile DNA eldesi yapılan farklı zamanlarda hazırlanmış iki *C. albicans* ATCC 90028 süspansiyonunun PZT sonuçlarında, 5S rDNA bölgesine ait 105 bp'lik ürün varlığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 1'de görülmektedir.

[sinem_ozet_tez_sekil 1.jpg dosyası]

Şekil 1. *Candida* koloni örnekleri ile elde edilen PZT ürünlerinin jel görüntüsü

1. DNA Ladder, **2.** *C. albicans* ATCC 90028 süspansiyonu (I.), **3.** *C. albicans* ATCC 90028 süspansiyonu (II.), **4.** Negatif kontrol

6.1.2. PZT Yöntemi ile Pozitiflik Saptama Sınırlarının Belirlenmesi ile İlgili Sonuçlar

6.1.2.1. Sağlıklı Gönüllülerden Alınan Kanlardan Hazırlanan Simüle Örneklerde Saptama Sınırının Belirlenmesi Sonuçları:

C. albicans ATCC 90028 suşundan sağlıklı gönüllülerden alınan kanlarda on katlı seri dilüsyonlar hazırlanarak yapılan ve iki kez tekrarlanan çalışmada PZT'nin en düşük saptama

sınırı 10^2 KOÜ/ml *Candida* olarak belirlendi. On katlı seri dilüsyonlara uygulanan PZT sonrası elde edilen görüntüler Şekil 2’de izlenmektedir.

[sinem_ozar_tez_sekil 2.jpg dosyası]

Şekil 2. Sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinde PZT saptama sınırını belirlemek için uygulanan PZT sonrası elde edilen jel görüntüsü

1. DNA Ladder, **2.** 10^7 , **3.** 10^6 , **4.** 10^5 , **5.** 10^4 , **6.** 10^3 , **7.** 10^2 , **8.** 10^1 KOÜ/ml *C. albicans* ATCC 90028 **9.** Negatif kontrol

6.1.2.2. Üreme Saptanmayan BACTEC 9240 Kan Kültürlerinde Hazırlanan Simüle Örneklerde Saptama Sınırının Belirlenmesi Sonuçları:

C. albicans ATCC 90028 suşundan BACTEC 9240 kan kültürlerinde on katlı seri dilüsyonlar hazırlanarak yapılan ve iki kez tekrarlanan çalışmada PZT’nin en düşük saptama sınırı 10^3 KOÜ/ml *Candida* olarak belirlendi. Bu amaçla uygulanan PZT sonrası belirlenen jel görüntüleri Şekil 3’de izlenmektedir.

[sinem_ozet_tez_sekil 3 + sekil 6.jpg dosyası]

Şekil 3. BACTEC 9240 kan kültürlerindeki örneklerde PZT saptama sınırını belirlemek için yapılan PZT sonrası jel görüntüsü

1. DNA Ladder, 2. 10^7 , 3. 10^6 , 4. 10^5 , 5. 10^4 , 6. 10^3 , 7. 10^2 , 8. 10^1 KOÜ/ml *C. albicans* ATCC 90028 9. Negatif kontrol

6.1.3. PZT Yönteminin Farklı Mikroorganizmalarla Hazırlanan Simüle Kan Örneklerine Uygulanması Sonuçları

6.1.3.1. Sağlıklı Gönüllülerden Alınan Kanlardan Farklı Mikroorganizmalarla Hazırlanan Simüle Örneklerde PZT Sonuçları:

C. albicans ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 1021, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. krusei* ATCC 6258, *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923 gibi kontrol suşları ile *A. fumigatus*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. kefir* ve *Rhodotorula sp.* suşlarından 10^6 KOÜ/ml maya olacak şekilde hazırlanan simüle örnekler PZT yöntemi ile değerlendirildi. *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 1021, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. krusei* ATCC 6258, *C. guilliermondii* ve *C. kefir* suşlarından hazırlanan simüle örnekler için 5S rDNA bölgesine ait 105 bp'lik ürünün varlığını gösteren bandın iyi, C.

glabrata ve *C. lusitaniae* suşları için çok zayıf olduğu gözlemlendi (Şekil 4) Bu nedenle *C. glabrata* ve *C. lusitaniae* suşlarından 10^8 KOÜ/ml maya olacak şekilde yeni örnekler hazırlandı ve tekrar PZT uygulandı. Bu kez örnekler için 5S rDNA bölgesine ait 105 bp'lik ürünün varlığını gösteren bandın diğerine göre nispeten daha iyi ancak yine de zayıf olduğu gözlemlendi (Şekil 6). *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *A. fumigatus* ve *Rhodotorula sp.* suşlarından hazırlanan örnekler ise *Candida* DNA'sı açısından negatif bulundu. Ayrıca sağlıklı gönüllüden alınmış, mikroorganizma eklenmemiş bir kan örneği de PZT'de negatif olarak değerlendirildi. Bu suşların PZT ürünleri ile elde edilen jel görüntüsü Şekil 4'de görülmektedir.

[sinem_ozar_tez_sekil 4.jpg dosyası]

Şekil 4. Farklı mikroorganizmalarla hazırlanan simüle örnekler ile elde edilen PZT sonuçları (I.)

1. DNA Ladder, **2.** *C. albicans* ATCC 90028, **3.** *C. krusei* ATCC 6258, **4.** *C. tropicalis* ATCC 1021, **5.** *C. parapsilosis* ATCC 90018, **6.** *C. glabrata*, **7.** *C. lusitaniae*, **8.** *C. guilliermondii*, **9.** *C. kefyr*, **10.** *Rhodotorula sp.*, **11.** *A. fumigatus*, **12.** *E. coli* ATCC 35218, **13.** *S. aureus* ATCC 25923, **14.** Sağlıklı gönüllüden alınmış mikroorganizma eklenmemiş kan örneği.

6.1.3.2. Üreme Saptanmayan BACTEC 9240 Kan Kültürlerinde Farklı Mikroorganizmalarla Hazırlanan Simüle Örneklerde PZT Sonuçları:

C. albicans ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 1021, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. krusei* ATCC 6258, *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923 ile *A. fumigatus*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae* *C. guilliermondii*, *C. kefyra* ve *Rhodotorula sp.* suşlarından 10^6 KOÜ/ml maya olacak şekilde hazırlanan simüle örnekler PZT yöntemi ile değerlendirildi. *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 1021, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. krusei* ATCC 6258, *C. guilliermondii* ve *C. kefyra* suşlarından hazırlanan örnekler için 5S rDNA bölgesine ait 105 bp'lik ürünün varlığını gösteren bandın iyi, *C. glabrata* ve *C. lusitaniae* suşları için diğerine benzer şekilde çok zayıf olduğu gözlemlendi (Şekil 5) Bu nedenle *C. glabrata* ve *C. lusitaniae* suşlarından 10^8 KOÜ/ml maya olacak şekilde yeni örnekler hazırlandı ve tekrar PZT uygulandı. Bu örnekler için 5S rDNA bölgesine ait 105 bp'lik ürünün varlığını gösteren bandın izlendiği ancak yine de zayıf olduğu gözlemlendi (Şekil 6). *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *A. fumigatus* ve *Rhodotorula sp.* suşlarından hazırlanan örneklerde ise *Candida* DNA'sı saptanmadı. Ayrıca, üreme saptanmamış, mikroorganizma eklenmemiş bir kan kültür örneği de PZT yöntemi ile negatif bulundu. PZT sonuçları ile elde edilen jel görüntüleri Şekil 5'de gösterilmiştir.

[sinem_ozet_tez_sekil 5.jpg dosyası]

Şekil 5. Farklı mikroorganizmalarla hazırlanan simüle örnekler ile elde edilen PZT sonuçları (II.)

1. DNA Ladder, **2.** *C. albicans* ATCC 90028, **3.** *C. krusei* ATCC 6258, **4.** *C. tropicalis* ATCC 1021, **5.** *C. parapsilosis* ATCC 90018, **6.** *C. glabrata*, **7.** *C. lusitaniae*, **8.** *C. guilliermondii*, **9.** *C. kefyr*, **10.** *Rhodotorula sp.*, **11.** *A. fumigatus*, **12.** *E. coli* ATCC 35218, **13.** *S. aureus* ATCC 25923, **14.** Üreme saptanmamış, mikroorganizma eklenmemiş kan kültür örneği

[sinem_ozet_tez_sekil 3 + sekil 6.jpg dosyası]

Şekil 6. 10^8 KOÜ/ml konsantrasyonda *C. glabrata* ve *C. lusitaniae* eklenmiş örnek sonuçları

1. Negatif kontrol **2.** DNA Ladder, **3.** Sağlıklı gönüllüden alınan kanda *C. glabrata* ile hazırlanan simüle örnek, **4.** Üreme saptanmayan BACTEC 9240 kan kültüründe *C. glabrata* ile hazırlanan örnek, **5.** Sağlıklı gönüllüden alınan kanda *C. lusitaniae* ile hazırlanan simüle örnek, **6.** Üreme saptanmayan BACTEC 9240 kan kültüründe *C. lusitaniae* ile hazırlanan örnek

6.1.4. Klinik Kan Kültür Örneklerinden Elde Edilen Sonuçlar

6.1.4.1. Tanımlama Sonuçları

BACTEC 9240 kan kültür sisteminde pozitif üreme sinyali veren, Gram boyamada maya görülüp, katı besiyerlerine yapılan pasajlarında *Candida* türleri üreyen örneklerden elde edilen suşların tanımlanması sonucunda, 14'ü *C. albicans*, 6'ı *C. parapsilosis*, 2'i *C. glabrata* ve 1'i *C. tropicalis* olarak belirlendi.

6.1.4.2. PZT Sonuçları

Tanımlanan ekstraksiyon yöntemi ile çalışılan 23 klinik kan kültür örneğinden elde edilen ekstraktlar ile yapılan PZT sonucunda, tüm örneklerde 5S rDNA bölgesine ait 105 bp'lik ürün varlığı gözlemlendi. Çalışmaya alınan *S. aureus* ve *E. coli* klinik kan kültür örnekleri ise negatif bulundu. PZT ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 7 ve 8'de izlenmektedir.

[sinem_ozet_tez_sekil 7.jpg dosyası]

Şekil 7. Klinik kan kültür örneklerinin PZT sonuçları (I.)

1. DNA Ladder, 2. *C. albicans**, 3. *C. glabrata**, 4. *C. albicans*, 5. *C. parapsilosis*, 6. *C. parapsilosis*, 7. *C. glabrata*, 8. *C. albicans*, 9. *C. albicans*, 10. *C. parapsilosis**, 11. *C. parapsilosis**, 12. *C. albicans*, 13. *C. parapsilosis**, 14. *C. albicans*

[*'lılar preparatında maya görüldüğü, diğerleri ise besiyerinde *Candida* üremesi olduğu zaman alınan kan kültür örnekleridir.]

[sinem_ozet_tez_sekil 8.jpg dosyası]

Şekil 8. Klinik kan kültür örneklerinin PZT sonuçları (II.)

1. DNA Ladder, **2.** *C. albicans*, **3.** *C. parapsilosis**, **4.** *C. albicans*, **5.** *C. albicans*, **6.** *C. albicans*, **7.** *C. albicans*, **8.** *C. albicans*, **9.** *C. albicans*, **10.** *C. albicans*, **11.** *C. tropicalis*, **12.** *E. coli*, **13.** *S. aureus*, **14.** Negatif kontrol

[*'lılar preparatında maya görüldüğü, diğerleri ise besiyerinde *Candida* üremesi olduğu zaman alınan kan kültür örnekleridir.]

6.2. Süre/Maliyet Belirlenmesi

Uyguladığımız PZT yöntemi ekstraksiyon süresi de katıldığında yaklaşık 7 saat sürmektedir. PZT malzemelerini düşünerek yöntem için belirlediğimiz yaklaşık maliyet 8 YTL'dir.

7. TARTIŞMA

Kandidemilerin tanısında altın standart olarak kabul edilen kan kültürü kemoterapinin bir sonucu olarak üremenin inhibisyonu, organizmaların kana aralıklı olarak geçmeleri ve rutin ya da fungus'a özel kan kültürlerinin güvenilir olmaması veya bu ortamlarda *Candida*'nın yavaş üremesi gibi sebeplerden dolayı olguların sadece %58'inde pozitif olarak bulunmaktadır (11, 13, 14, 15). Oysa ki kandidemi tablolarının hızlı ve güvenilir tanısı hem uygun sağaltıma başlanması açısından hem de mortalite oranını azaltmak açısından büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle tanıda PZT gibi moleküler yöntemlerin kullanılması gündeme gelmiştir.

Pratikte PZT için önerilen en yaygın örnek tam kan olup, genellikle heparin veya EDTA gibi uygun bir antikoagulan içeren tüpe inoküle edilmekte ve DNA ekstraksiyonu öncesinde eritrosit ve lökositler lize edilmektedir. Kanın, ticari kan kültür şişelerinde 3 saatten fazla inkübe edilmesi durumunda, PZT yapılabileceği bildirilmiştir. Bu inkübasyon muhtemelen kandaki potansiyel PZT inhibitörlerinin etkilerini dilüe etmekte ve mantarın doğal amplifikasyonunu sağlamaktadır (60). Yapılan çalışmalarda BACTEC 9240 kan kültür sisteminde üreme saptanması için gerekli zamanın inokulum miktarı, tür ve besiyerine bağlı olarak değiştiği, inokulum miktarı arttıkça saptama zamanının kısaldığı ve *Candida* türleri (*C. glabrata* hariç) için genellikle aerobik besiyerlerinin daha verimli olduğu bildirilmiştir. Hovarth ve ark. (91) 10^3 KOÜ *Candida* olacak şekilde hazırladıkları simüle kan kültür şişelerinin BACTEC 9240 kan kültür sisteminde 35°C'de inkübasyonu ile *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* gibi *Candida* türleri için ortalama üreme saptama zamanının kabaca 24 saat olduğunu bildirmişlerdir (90, 91).

Bizim çalışmamızda da BACTEC 9240 kan kültür sisteminde inkübasyon sırasında pozitif üreme sinyali veren hasta kan örnekleri ile yapılan PZT sonuçları *Candida* türleri açısından olumlu bulunmuştur.

Kan ürünleri arasında serum, elde edilmesi kolay bir örnek olmasına rağmen, dolaşımdaki lökositlerin fungal hücreleri fagosite ettiği bilinmektedir. Bu nedenle tam kan veya plazma örneklerinden daha yüksek DNA ürünleri elde edilmektedir. Kan için farklı DNA

ekstraksiyon protokolleri tanımlanmakla birlikte, genellikle tümü (i) ya ticari ya da “in-house” ajanlar ve yöntemler kullanılarak kan hücrelerinin lizisi (ii) fungal hücre duvarının parçalanması, (iii) hücre membranının lizisi ile DNA'nın açığa çıkarılması ve (iv) DNA'nın pürifikasyonu basamaklarından oluşmaktadır. Tam kanda hücre materyalinin lizisi genellikle kombine ısı-alkali muamelesi ile gerçekleşmekte ve fungal hücre duvarını parçalamak için “zimolaz”, “litikaz”, “mureinaz” veya β -1,3-glukanaz gibi enzimler kullanılmaktadır. Fungal sferoblast oluşumu ozmotik duyarlılığı arttırmakta olup, hücre membran lizisi bir veya daha fazla EDTA ve SDS veya proteinaz K muamelesi ile gerçekleştirilmektedir. DNA ekstraksiyonu için standart fenol-kloroform prosedürleri de kullanılmıştır, fakat bu prosedürler güvenilir olmasına rağmen, zaman alıcıdır. Ticari DNA ekstraksiyon kitlerinin süreyi kısalttığı bildirilmiştir (60).

Ticari olarak mevcut beş ekstraksiyon kiti ve manuel uygulanan ısı-alkali-enzimatik ekstraksiyon yönteminin duyarlılık, zaman ve maliyet açısından karşılaştırıldığı bir çalışmada, tüm ticari kitlerin DNA ekstraksiyonu için harcanan süreyi kısalttığı, ancak maliyeti arttırdığı görülmüştür. Bu ticari kitler arasında QIAmpTissue kitin (Qiagen, Los Angeles, Calif.) manuel yöntem ile aynı duyarlılık (1-10 hücre/ ml) ve saflıkta fungal DNA açığa çıkardığı ve 95 kan örneği için PZT sonuçlarının %99 uyumlu olduğu bildirilmiştir (88).

Çalışmamızda uyguladığımız ekstraksiyon yöntemi de, EDTA, SDS, proteinaz K ve litikaz enzimi içeren tampon solüsyonlar ile muamele ve takiben ısı uygulaması basamaklarını içermektedir. Bu yöntemde manuel olarak kan hücrelerinin lizisi ve fungal hücre duvarının parçalanması sağlandıktan sonra, MN Nucleospin Tissue Kit kullanılarak *Candida* türlerinden DNA eldesi tamamlanmıştır. Uygulanan yöntem ile gerek koloniden gerekse kandan ekstraksiyon aşamasında bir sorun yaşanmamıştır.

Kandan *Candida* DNA'sının araştırılması için gerçekleştirilen PZT uygulamalarında ITS 1-2, 18S, 5.8S, 5S rDNA, lanosterol-14- α -demetilaz (L1A1), mitokondriyal DNA, aktin, kitin sentaz, salgısal aspartik proteinaz, ısı şok protein 90 genleri gibi bir çok bölgeye özgü öncüller kullanılmıştır.

Hedef olarak tek veya çoklu kopya gen sekanslarının seçimi PZT'nin duyarlılığını belirlemede önemli bir parametredir. Çoklu-kopya gen hedefleri, saptanan hedef molekülün sayısının çok olması nedeniyle daha yüksek duyarlılığa sahiptir. Türe özgü "probe"lar tasarlanarak, bu genler içinde değişik sekansların seçici olarak saptanması da olasıdır. Tek-kopya genleri hedefleyen testler yüksek oranda türe özgüdür, ancak az sayıda organizmayı saptamaya yetecek kadar duyarlı olmayabileceği bildirilmiştir (60).

Çoklu-kopya gen hedeflerinden ribozomal DNA (rDNA) geni tüm fungusların haploid genomunda en azından 50-100 kopya halindedir. Bunlar küçük alt birim (SSU) rDNA (18S) geni, 5.8S geni, ve büyük alt ünite (LSU) rDNA (28S) genidir. 18S ve 5.8S ile 5.8S ve 28S alt üniteleri arasındakiler ITS1 ve ITS2 şeklinde "intergenic transcribed" bölgelerdir (ITS). Bu gruptan bağımsız olarak, ikinci tekrar eden ünite "nontranscribed" bölgelerle kuşatılmış 5S rDNA genidir. Farklı funguslar arasında rDNA genleri oldukça korunmuştur, "internal transcribed spacer" (ITS) veya "intergenic spacer" (IGS) bölgeler ise oldukça değişkendir. *C. albicans* genomunda en azından ilişkili dokuz üyeden oluşan kandidal- SAP ailesi, PZT ile *C. albicans*'ın saptanması için hedef olarak kullanılabilen diğer bir çoklu-kopya genidir. *Candida* türlerinin tek-kopya gen hedefleri; aktin, kitin sentaz, ısı şok protein 90 ve lanosterol-14- α -demetilaz (L1A1) genlerini içermektedir (60).

Araştırmamızda da gerek korunmuş ve tekrarlayan bölge olması gerekse çoklu kopya gen hedeflerinden oluşması sonucu daha duyarlı olabileceği düşünülerek ve de sonrasında tür tanımlaması için bir restriksiyon enzim analizi (REA) yapılabilmesi amacıyla 5S rDNA bölgesinden PCon1 ve PCon 2 öncülleri seçilmiştir.

Kalkancı ve ark. (19) nötropenik 32 hastadan alınan kan örneklerinde 5S rDNA bölgesinden seçilen PCon 1 ve PCon 2 öncüllerini kullanan PZT yöntemi ile *Candida* türlerine ait DNA araştırmışlar ve 32 hastanın dördünde (%12.5) pozitif sonuç bulmuşlardır. PZT ile pozitif olan bu 4 hastanın sadece birinde BACTEC otomatize kan kültür sistemi ile yapılan kan kültürlerinde pozitif sonuç elde edilmiştir. Ardışık 4 örneği PZT ile pozitif bulunan tek olgunun üç kan kültüründen PZT ile eş zamanlı bir tanesinde *Candida sp.* izole edilmiştir. Çalışmacılar bu yöntemin kandidemi tanısı için duyarlılığı yüksek, hızlı sonuç verebilen,

sağaltım takibinde kullanılabilen bir yöntem olarak özellikle nötropenik hasta grubunda rutin kullanılabilceği sonucuna varmışlardır (19).

Holmes ve ark. (89) simüle kan örneklerinde *Candida* hücrelerini saptamak için 5S rDNA genine özgü aynı öncüller (PCon 1 ve PCon 2) ile birlikte *C. albicans* NTS genine özgü PSpA1 ve PSpA2 öncüllerini ortak bir PZT karışımında kullanmışlar ve *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* ve *C. glabrata* içeren tüm simüle kan örneklerinde 105 bp, ancak *C. albicans* ile hazırlanan simüle kan örneğinde biri 5S rDNA genine özgü 105 bp'lik, diğeri hem 5S hem de NTS sekansını içeren az miktarda 1,015 bp'lik olmak üzere iki PZT ürünü elde etmişlerdir. Bu testin kan örneklerinden hem maya, hem de *C. albicans* varlığını saptayabildiği bildirilmektedir (89).

Aynı öncüller kullanılarak 5S rDNA bölgesinden 105 bp'lik ürünün elde edildiği çalışmamızda, uyguladığımız PZT yönteminin *Candida* türleri ile hazırlanmış simüle örneklerde olumlu, diğeri mikroorganizmalar ile hazırlananlarda ise olumsuz olduğu ve *C. albicans* ile hazırlanmış kan örneklerinde saptama sınırının 10^2 - 10^3 KOÜ/ml olduğu belirlenmiştir. Bu bulgularımız Holmes ve ark. 'nın (89) aynı öncülleri kullanarak elde ettiği sonuçlar ile paralel doğrultudadır.

Morace ve ark. (92) ise P-450 lanosterol 14 α -demetilaz geninin 350-bp'lik segmentine özgü öncüller (P450₁ ve P450₂) kullanarak PZT ve REA yöntemi ile hematolojik maligniteli, nötropenik, ateşli ve geniş spektrumlu antibiyotiklere yanıt vermeyen 72 hastanın kan örneklerinde *Candida* DNA'sını araştırmışlardır. Sadece dördü kültür pozitif olan 31 hasta PZT-REA ile olumlu bulunmuştur. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlardan bu yöntemin kandidemi tanısında kan kültürlerine göre daha kısa sürede sonuç alınabildiği ve daha duyarlı olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Duyarlılığı 5 KOÜ/ml olan bu yöntemde sistemik kandidoz tanısı almış 14 olgunun 13'ü (%92.8) için olumlu sonuç alınmıştır (92).

Morace ve ark. 'nın (93) yaptıkları bir diğeri çalışmada aynı öncüller kullanılarak bu PZT yaklaşımının duyarlılığı 200 fg DNA olarak belirlenmiş ve sonrasında REA yapılarak tür tanımlamasına geçilmiştir. Bu nedenle bu tekniğin doğrudan klinik örneklerden *Candida* DNA'sının saptanması ve tanımlanması için yararlı olduğu düşünülmüştür. Bu araştırmada

ayrıca kültürde maya saptanmasını maskeleyen *P. aeruginosa* üreyen bir hastadan *C. albicans* DNA'sı da saptanabilmiştir. Yine aynı geni hedef alan “nested” PZT yöntemi ile Bunchman ve ark. (94) klinik örneklerde duyarlılığı %76, özgüllüğü %95 olarak bulmuşlardır (93, 94).

Bir başka çalışmada *C. albicans* r RNA'sının 18S bölgesine özgü öncüllerin kullanıldığı PZT ve türe özgü “probe”larla hibridizasyon yöntemi uygulanarak duyarlılık 10-15 *C. albicans*/100 µl kan olarak belirlenmiştir. Bu yöntemin duyarlılığının yanında, gastrointestinal olarak kolonize farelerin kan örneklerinin negatif, invaziv kandidoz oluşturulan farelerin kan örneklerinin ise pozitif olması nedeni ile bu yöntemin hedef özgünlüğünün de söz konusu olduğu bildirilmiştir (95).

Einsele ve ark. (96) fungal patojenlerin saptanması için 18S rRNA geninin oldukça korunmuş bir sekansını çoğaltan bir PZT yöntemi geliştirmişler ve de PZT ve hibridizasyon ile *Candida* ve *Aspergillus* türleri için bu yöntemin duyarlılığını 1 KOÜ/ml olarak belirtmişlerdir. Çalışmacılar bu yöntem ile immün yetmezlikli hastalarda klinik olarak önemli fungal patojenlerin kolayca saptanabileceği sonucuna varmışlardır (96).

Talluri ve ark. (13) kandidemili olguların ve kandidemi oluşturulmuş hayvanların kan örneklerinde aktin genine özgü öncüller kullanarak PZT ile kan ve idrar örneklerinde *C. albicans* araştırmışlardır. Çalışmacılar kandidüri gelişmiş ve kan kültürlerinde *Candida* üremesi görülmeyen kritik hastalarda kandideminin erken tanısında PZT'nin önemini belirlemişlerdir (13).

Kan ve ark. (97) ise *Candida* aktin geninin 158-bp'lik segmentini çoğaltan bir PZT ve P 32 işaretli “probe” ile hibridizasyon yöntemi uygulayarak sistemik kandidoz oluşturulmuş farelerde PZT yönteminin kan kültürlerinden daha duyarlı ve kolonize hayvanlarda negatif olacak şekilde özgün olduğunu göstermiştir. Ayrıca, kan kültürü pozitif olan 14 hastadan 11'inin serum örneklerinde de *Candida* DNA'sını saptanmıştır (97).

Van Burik ve ark. (16) kan ve kemik iliği alıcılarının kan örneklerinde fungus türlerinin saptanmasında kullanılabilen ve en düşük saptama sınırı 4 KOÜ/ml olan bir rRNA alt ünitesinin 580 bp'lik gen sekansını saptayan PZT yöntemi kullanmıştır. Panfungal öncüllerle

amplifikasyon ve digoksinin-ışaretili bir “probe” ile hibridizasyon yapılan bu çalışmada invaziv olgularda olumlu, kolonize olgularda ve sağlıklılarda olumsuz sonuçlar alınmıştır (16).

Bir diğler çalışmada akut sistemik kandidoz tavşan modelinde lizis santrifügasyon kan kültür yöntemi ile rRNA bölgesinin küçük alt birimini kodlayan genin bir DNA fragmanı çoğaltılarak yapılan PZT yöntemi karşılaştırılmıştır. *C. albicans* ile hazırlanan simüle örneklerde 10-50 KOÜ/100µl DNA saptanabilmiştir. Ancak “nested” PZT kullanımı bu saptama sınırını 10 kat arttırmıştır. Aynı çalışmada lizis santrifügasyon yönteminin duyarlılığının (%37.5), PZT’ninkinden (%25) yüksek, ancak “nested” PZT’den düşük olduğu bildirilmiştir. Lizis santrifügasyon ile birlikte “nested” PZT kullanımı duyarlılık oranını %62.5’e yükseltmiştir. Bu durumda PZT’nin tanıda tanımlayıcı bir yöntem olarak kullanılması önerilmektedir (6).

C. albicans mitokondriyal DNA’sından köken alan EO3 kısmının 1.8 kb’lik fragmanı hedef olarak kullanılarak PZT ile kandan etkenin saptanabilmesi için 10^4 - 10^5 hücrenin gerektiği bildirilmiştir. Bu durum presipitasyon esnasında kandan *C. albicans* hücrelerinin kaybedilmesi ve PZT için uzun bir DNA hedefinin kullanılmasına bağlanmıştır. Ancak DNA kalıbı hazırlanırken *C. albicans* hücrelerinin taşıyıcı *C. tropicalis* hücreleri ile kopresipitasyonu ve EO3 bölgesinde daha kısa bir sekans (125 bp) kullanılarak, bu sorunlar düzeltilmiş ve 100µl kan örneğinde yaklaşık üç hücre saptanabilmiştir (17).

Aspartik proteinaz genine özgü primerlerin kullanıldığı bir PZT yöntemi ile yapılan araştırmada kanda 1-4 KOÜ/ml maya saptanabilmiştir. Klinik örneklerde yapılan çalışmalarda ise bu yöntemin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %98 olarak bulunmuştur (98).

Bir diğler araştırmada kan kültür şişelerinde üreyen *Candida* türlerinin hızlı identifikasyonu için PZT sonrası EIA yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem ile yapılan çalışmada 73 kan kültür şişesindeki tüm *Candida* türleri 3-5 saat gibi kısa bir sürede ve hiç yalancı pozitif sonuç olmadan, duyarlılığı 1 hücre/2µl örnek olacak şekilde saptanmıştır (99).

C. albicans'ın kitin sentaz geninden birini (CHS 1) hedefleyen PZT yönteminde *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* gibi yenidoğan kandidemilerinin % 90'ından sorumlu olan dört tür için farklı büyüklüklerde amplikonlar ürettiği tanımlanan bir primer çifti kullanılmış, türe özgü "probe"lar ile saptama sınırı 10 KOÜ/ml kan olarak belirlenmiştir. 27 kan örneğinde kan kültürü ve PZT'nin karşılaştırıldığı çalışmada, 26'sı kültür ile uyumlu bulunmuştur. Sonuçlar *Candida* ile mukozal kolonizasyonlu kemik iliği alıcıları ve *Candida* infeksiyonu açısından hiçbir belirti göstermeyen yüksek riskli yeni doğanlarda negatif bulunmuş olup, çalışmacılar yöntemin bu vakalarda kan kültürüne göre daha duyarlı olduğunu ve hızlı bir tür tanımlaması avantajı sunduğunu belirtmişlerdir (100).

İnsan serum örneklerinden *C. albicans* DNA'sının saptanması amacıyla yapılan bir çalışmada ITS genine özgü öncüller ve biyotinlenmiş hibridizasyon "probe"ları ile yürütülen PZT-DNA enzim immün assay (DEIA) yönteminin kan kültüründen daha duyarlı olduğu ve invaziv kandidoz açısından riskli hastaların tanımlanmasında değerli olduğu bildirilmiştir (12).

Klinik kan örneklerinde TaqMan prensibi temelinde *C. albicans* rDNA geninin kantitasyonu için hızlı ve tekrarlanabilir bir PZT yöntemi geliştirilmiştir. Biri *C. albicans* türüne özgü, diğeri *Candida* cinsine özgü iki "probe"un kullanıldığı bu "real-time" PZT testinin en düşük saptama sınırı *C. albicans* için 5 KOÜ/ml kan olarak belirlenmiş olup, testin kan kültür sonuçlarına kıyasla duyarlılığının %100 ve özgüllüğünün %97 olduğu bildirilmiştir. Bu testin klinik kan örneklerinde *C. albicans*'ın kantitasyonu ve identifikasyonu için iyi bir alternatif olduğu düşünülmektedir (101).

Loeffler ve ark. (102) PZT işleminin cam kapillerlerde yapıldığı ve floresan rezonans enerji transferi ve "light cyclers" sistemi tekniğini kullanan kantitatif bir "real time" PZT yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemin fungal DNA yükünü belirlediği ve duyarlılığının 5 KOÜ/ml kan olması yanında tekrarlanabilirliğinin %96-99 arasında olduğu, ayrıca kontaminasyon riskini de minimuma indirdiği belirtilmiştir (102).

Bir başka çalışmada fungal patojenlerin tanısı için ITS2 bölgesini hedefleyen PZT-REA yöntemi geliştirilmiş ve bu yöntemin uygulanabilirliği kanser ve nötropenik çocuklarda

araştırılmıştır. Yöntemin duyarlılığı simüle örneklerde 3 *C. albicans*/ml olarak belirlenmiştir. Çalışmacılar bu yöntemin, ilk 4 saatte fungal DNA'nın varlığını saptaması ve ek olarak tür tanısı için de 4 saat gerektirmesi gibi nedenlerle klinik örneklerde fungal patojenlerin hızlı ve duyarlı tanısını sağladığı sonucuna ulaşmışlardır (18).

Serum örneklerinde *Candida* türlerinin saptanması için universal dış öncüller ve *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* gibi sık karşılaşılan dört tür için ITS2 bölgesinden seçilen ve 350-410 bp'lik fragmanlar üreten türe özgü öncüller kullanılarak "seminested" PZT (sn PZT) yöntemi geliştirilmiştir. Simüle serum örneklerinde sn PZT'nin *Candida* saptama duyarlılığı yaklaşık 1 organizma/ml olarak belirlenmiştir. Kültür ile kandidemi olduğu saptanmış hastalarda sn PZT sonuçları kan kültür sonuçları ile hem pozitiflik, hem de tür saptanması açısından uyumlu bulunmuştur. Ayrıca bu PZT yöntemi birden fazla *Candida* türünden kaynaklanan beş kandidemi olgusunu, kan kültürü ile saptanan üç olguya kıyasla daha avantajlı olarak tanımlamıştır. Çalışmacılar sn PZT'nin serum örneklerinde *Candida* türlerinin saptanması için kültürden daha duyarlı ve özgül olduğunu bildirmektedir (14).

Bir diğer çalışmada kandidemi gelişimi açısından riskli hastaların kan örneklerinde universal funguslara özgü bir öncül çifti kullanılarak çoğaltılan PZT ürünleri sekanslanarak tür tayini yapılmıştır. 225 hastadan alınan kan örneklerinden PZT yöntemi ile 500-600 bp'lik ürün varlığı gözlenen 49 hastanın PZT ürünleri DNA sekanslama ile tanımlanmıştır. 31 hastada, PZT ve kan kültürleri kandidemi tanısı açısından uyumlu olup, ancak 26'sında (%83.3) DNA sekanslama ile tanımlanan *Candida* türleri kan kültürü ile belirlenenler ile aynıdır. En az bir kan kültürü pozitif olan hastalarda testin duyarlılığı %72.1 ve özgüllüğü %91.2 olup, *C. albicans* ile hazırlanan simüle örneklerde PZT yönteminin en düşük saptama sınırı 10 hücre/ml olarak belirlenmiştir (103).

Belirtilen çalışmalarda da görüldüğü gibi farklı öncüllerin kullanıldığı PZT ile birlikte REA, hibridizasyon gibi yöntemler uygulandığında veya "nested" PZT ya da "real time" PZT kullanıldığında yöntemin saptama sınırı daha da düşük miktarlarda olmaktadır. Araştırmamızda uyguladığımız PZT yönteminin simüle örneklerde saptama sınırı 10^2 - 10^3 KOÜ/ml olarak belirlenmiş olup, erken tanı açısından bu sınırın daha da düşürülmesi için

amacıyla ek çalışmalar ve PZT yönteminden sonra *Candida* türlerini tanımlamaya yönelik REA, hibridizasyon gibi ek testlerin yapılması planlanmaktadır. Yönteme identifikasyon basamağının eklenmesi yöntemi daha değerli kılacaktır. Bununla birlikte yöntemimizin sadece *C. albicans*'ı değil, tüm *Candida* türlerinin varlığını saptayabilmesi önemlidir. Saptama sınırlarını belirlemeyi amaçladığımız testlerde *C. glabrata* ve *C. lusitaniae* ile zayıf bantlar elde edilmiştir. Daha yoğun süspansiyonlar hazırlandığında bantlar nispeten daha iyi olarak izlenmiştir. Bu durumun bu *Candida* türlerinin hücrelerinin küçük olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ancak *C. glabrata* üreyen kan kültür örneklerine PZT uygulandığında jel görüntülerinde bantlar net olarak seçilebilmiştir.

Uygulanan yöntem yaklaşık 7 saatte tamamlanmakta olup, bu süre üreme sinyali alındıktan sonra kan kültüründen yapılan pasajlarda *Candida* üremesi için gereken 24-48 saate göre kısa kalmaktadır. Bu durum yöntemin kandidemi olgularına erken tanı olanağı sağlayabileceği düşünülerek bir avantaj olarak kabul edilebilir.

Uyguladığımız PZT yöntemi *Candida* türleri ile hazırlanan tüm örneklerde pozitif sonuç vermiştir. Yöntem çok sayıda *Candida* türünü kapsamaması açısından da avantajlı gibi gözükmektedir. *Aspergillus*, *Rhodotorula* gibi mantar türleri ve *E. coli*, *S. aureus* gibi bakteri türleri ile hazırlanan simüle örneklerde negatif sonuç alınması yöntemin yalancı pozitifliğinin bu mikroorganizmalar ile izlenmeyeceğini göstermektedir.

Çalışmamız sadece simüle örnekler ve pozitif bulunan BACTEC 9240 kan kültür örnekleri ile gerçekleştirilmiş, kliniklerdeki kuşkulu olgulardan kan örnekleri sağlanamadığından çalışmamıştır. Ancak yöntemin kandidemi kuşkulu olguların kan örnekleri ile de çalışılması uygun olacaktır. Bununla birlikte kullanılan yöntemin BACTEC 9240 kan kültür örneklerine uygulanabilmiş olması, kan alma sorunu olabilecek kandidemi olgularına uygulama kolaylığı yaratabilecektir.

BACTEC 9240 kan kültür sisteminde üreme sinyali veren ve kültüründe *Candida* üremesi saptanan az sayıda (23) kan kültür örneği çalışılabildiğinden, çalışmamızda yöntem duyarlılık ve özgüllük açısından değerlendirilememiştir. Ancak PZT sonuçlarında 105 bp'lik

ürün varlığı olan gözlenen 23 kan kültür örneği bu açıdan altın standart kabul edilen kan kültürü ile uyumlu bulunmuştur.

Uyguladığımız PZT yönteminin hasta başına maliyeti 8 YTL olup, bu para hastaya uygulanacak yanlış ya da gereksiz antifungal sağaltım ve hastane masrafları göz önüne alındığında çok düşük kalmaktadır.

Sonuç olarak; kandidemi kuşkulu olgulardan alınan gerek kan gerekse BACTEC kan kültür örneklerinde 5S rDNA genine özgü PCon 1 ve PCon 2 öncüllerinin kullanıldığı PZT yöntemi ile daha kısa sürede *Candida* DNA'sının saptanabileceği belirlenmiştir.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda sağlıklı gönüllülerden EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri ile kan kültüründe üreme saptanmayan BACTEC 9240 kan kültür şişelerinde hazırlanan simüle örneklerde 5S rDNA bölgesini hedefleyen PZT ile 105 bp'lik bantlar elde edilmiştir.

Ayrıca BACTEC 9240 kan kültür sisteminde üreme sinyali veren ve daha sonra *Candida* üremesi saptanan 23 BACTEC örneğinde de 105 bp'lik bant izlenmiştir. Yöntem bu açıdan altın standart kabul edilen kan kültürü ile uyum göstermekte olup, PZT'nin kültürde üremeye göre daha kısa sürede tamamlanabilmesi bir avantaj olarak kabul edilebilir.

Yapılan PZT yönteminin simüle örneklerde saptama sınırı 10^2-10^3 KOÜ/ml olarak belirlenmiş olup, erken tanı açısından bu sınırın daha da düşürülmesi için ek çalışmalar ve PZT ürününde tanımlama amacıyla REA yapılması planlanmaktadır.

Çalışmamız sadece simüle örnekler ve pozitif bulunan BACTEC örnekleri ile gerçekleştirilmiş olup, kliniklerdeki kuşkulu olgulardan kan örnekleri sağlanamadığından çalışmamıştır. Yöntemin kandidemi kuşkulu olguların kan örnekleri ile de çalışılması uygun olacaktır.

Sonuç olarak; kandidemi kuşkulu olgulardan alınan gerek kan gerekse BACTEC kan kültür örneklerinde 5S rDNA genine özgü PCon 1 ve PCon 2 öncüllerinin kullanıldığı PZT yöntemi ile daha kısa sürede *Candida* DNA'sının saptanabileceği belirlenmiştir.

9. KAYNAKLAR

1. Beck-Sargue CM, Jarvis WR and the National Nosocomial Infections Surveillance System
Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. J Infect Dis 1993;167:1247-1251.
2. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev 1996;9:499-511.
3. Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. Clin Infect Dis 1995;20:1526-1530.
4. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, et al. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. Clin Infect Dis 1999;29:239-244.
5. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY program. J Clin Microbiol 1998;36:1886-1889.
6. Polanco A, Mellado E, Castilla C, Rodriguez-Tudela JL. Detection of *Candida albicans* in blood by PCR in a rabbit animal model of disseminated candidiasis. Diagn Microbiol Infect Dis 1999;34:177-183.
7. Edward JE. Invasive *Candida* infections. N Engl J Med 1991;324:1060-1062.
8. Reiss E and Morisson CJ. Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. Clin Microbiol Rev 1993;6:311-323.
9. Eggimann P, Garbio J, and Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. Lancet Infect Dis 2003;3:685-687.

- 10.** Pittet D, Li N, Woolson RF, Wenzel RP. Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: A 6-year validated, population-based model. *Clin Infect Dis* 1997;24:1068-1078.
- 11.** Berenguer J, Buick M, Stock F, Pizza PA, Walsh TJ. Lysis-centrifugation blood cultures in detection of tissue-proven invasive candidiasis; disseminated versus single organ infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;17:103-109.
- 12.** Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *J Clin Microbiol* 2000;38:3016-3021.
- 13.** Talluri G, Mangone C, Freyle J, Shirazian D, Lehman H, Wise GJ. Polymerase chain reaction used to detect candidemia in patients with candiduria. *Urology* 1998;51:501-505.
- 14.** Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol* 2002;40:2483-2489.
- 15.** Brawner DL, Anderson GL, and Yuen KY. Serotype prevalence of *Candida albicans* from blood culture isolates. *J Clin Microbiol* 1992;30:149-153.
- 16.** Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol* 1998;36:1169-1175.
- 17.** Miyakawa Y, Mabuchi T, Fukazawa Y. New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:3344-3347.
- 18.** Dendis M, Horvath R, Michalek J, Ruzicka F, Grijalva M, Bartos M, Benedik J. PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:1191-1202.

19. Kalkancı A, Kuştimur S, Güneş İ, Otlu B. Nötropenik hastalarda invazif *Candida* enfeksiyonunun polimeraz zincir reaksiyonu ile tanısı. *İnfeksiyon Dergisi* 2003;17:171-174.
20. Vincent JL, Anaissie E, Briining H, et al. Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgical patients under intensive care. *Intensive Care Med* 1998;24:206-216.
21. John E, Edwards JR. *Candida* species. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practise of Infectious Diseases*. Fifth edition. Pennsylvania, Churchill Livingstone; 2000 p.2656-2674.
22. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiology*. Fourth edition. Singapore, McGraw-Hill Companies; 1999 p.818-820.
23. Ghannoum MA, Abu Elteen KH. Pathogenity determinants of *Candida*. *Mycoses* 1990; 33: 265-282.
24. Fromtling RA, Rhodes JC, Dixon DM. Taxonomy, Classification, and Morphology of Fungi. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Eighth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press; 2003 p.1653-1658.
25. Mitchell, TG. *Medical Mycology*. In: Brooks GF, Butel JS, Morse SA, editors. *Medical Microbiology*. Twenty third edition. Singapore, McGraw-Hill Companies; 2004 p.623-659.
26. Tümbay E. *Candida* türleri. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö editör. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara, Öncü Basımevi-Güneş Kitabevi; 1999 p.1081-1086.

27. Topçu AW, Çerikçioğlu N. *Candida* türleri. In:Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editörler. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul, Nobel Matbaacılık; 2002 p.1797-1808.

28. Jones JM. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. Clin Microbiol Rev 1990;3:32-45.

29. Hazen KC, Howell Susan A. Fungi - *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance. In:Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. Eighth.edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press; 2003 p.693-1711.

30. Larone DH. Yeast and yeast like organisms. Medically Important Fungi A guide to identification. Fourth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press; 2002 p.109-143.

31. Bennett John E. Candidiasis. In: Braunwald E, Fauci, AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo, DL, Jameson JL, editors. Principles and Practise of Infectious Disease. Harrison's 15th. Edition. Singapore, McGraw-Hill Companies; 2001 p.1176-1177.

32. Marie SD. New developments in the diagnosis and management of invasive fungal infections. Haematologica 2000;85:88-93.

33. Pabuççuoğlu HU. Mikozlar - Patogenez ve Patoloji. İzmir, Güven&Nobel Tıp Kitabevi; 1999 p.63-75.

34. Kuştımur S. *Candida*'da Virulans Faktörleri. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı: p.145-150, 4-6 Mayıs 1999, İzmir.

35. Yang Y-L. Virulence factors of *Candida* species. J Microbiol Immunol Infect, 2003;36:223-228.
36. Hostetter MK. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. Clin Microbiol Rev 1994;7:29-42.
37. Calderone RA, Gow NAR. Host recognition by *Candida* species. In:Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology press, 2002:67-86.
38. Mavor AL, Thewes S, Hube B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: Epidemiology, Infection Process and Virulence Attributes. Current Drug Targets 2005;6:863-874.
39. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiol 2001;9:327-335.
40. Arıkan S. Mantarlarda pleomorfizm. 3 Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi. 27-30 Mayıs 2003, Bodrum, p. 77-83.
41. Vargas K, Messer SA, Pfaller M etal. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus positive individuals prior to first thrush episode. J Clin Microbiol 2000;38:3593-3607.
42. Soll DR. Phenotypic Switching. In:Calderone RA, ed. *Candida* and candididasis. First edition. Washington DC, ASM Pres; 2002:123-142.

- 43.** Cassane A, De Bernardis F, Mondello F, Ceddia T, Agatensi L . Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *J Infect Dis* 1987;156:777-783.
- 44.** Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ N. Sağlıklı bireylerden ve oral kandidiazisli olgulardan izole edilen *Candida albicans* türlerinde proteinaz aktivitesinin incelenmesi. *Mikrobiyol Bül* 2001;35:443-450.
- 45.** Pichova I, Pavlickova L, Dastal J, et al. Secreted aspartic proteinases of *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem* 2001; 268:2669-2672.
- 46.** Hube B, Naglik J. Extracellular hydrolases. In:Calderone RA, ed. *Candida* and candidiasis. First edition. Washington DC, ASM Pres; 2002:107-122.
- 47.** Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 2001;147:1997-2005.
- 48.** Kothavade RJ, Panthaki MH. Evaluation of phospholipases activity of *Candida albicans* and its correlation with pathogenicity in mice. *J Med Microbiol* 1998;47:99-102.
- 49.** Fu Y, İbrahim AS, Fonzi W, Zhou X, Ramos CF, Ghannoum MA. Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology* 1997;143:331-340.
- 50.** Douglas LJ. *Candida* biofilm and their role in infection. *TRENDS in Microbiology* 2003;11:30-36.

- 51.** Yüce A, Yücesoy M, Yuluğ N. *Candida albicans* suşlarında “slime” üretimi. İnfeksiyon Dergisi 1996;10:267-269.
- 52.** Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 1994;32:452-456.
- 53.** Ashman RB, Papa dimitriou JM. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. Microbiol Rev 1995;59:646-672.
- 54.** Howard DH. Acquisition transport and storage of iron by pathogenic fungi. Clin Microbiol Rev 1999;12:394-404.
- 55.** Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical Microbiology. Fourth edition. USA, Mosby-Year Book;2002 p.664-667.
- 56.** Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth edition. Philadelphia. Lippincott Co; 2006 p.1151-1237
- 57.** Boyd RF. Basic Medical Microbiology. Fifth edition. USA. Little, Brown and Company; 1995 p.485-487.
- 58.** Levinson W, Jawets E, editors. &Immunology. Sixth edition. Singapore. Lange Medical Book/McGraw-Hill Companies; 2000 p.283-297.

- 59.** Kern ME, Blevins KS. Medical Microbiology A self-instructional text. Second edition. Philadelphia. F.A. Davis Company; 1997 p.158-160.
- 60.** Chen S CA, Halliday CL, Meyer W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. Med Mycol 2002;40:333-357.
- 61.** Uzun Ö. Nozokomiyal hematojen kandidiyaz. *CANDIDA* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyum Kitabı: p.117-124, 21-22 Haziran 2002, Eskişehir.
- 62.** Karaaslan A. Mantarlar ve İnceleme Yöntemleri. Tevfik Cengiz, editör. Mikrobiyoloji Pratik El Kitabı. 3. baskı. Antıp A.Ş. Yayını; 2001 p.183-193.
- 63.** Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Eleventh edition. USA, Mosby Inc.; 2002 p.711-797.
- 64.** Ellepola A NB and Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol 2005;43:65-84.
- 65.** Hospenthal DR, Beckius ML, Floyd KL, Horvath, Murray CK Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*. Annals of Clin Microbiol and Antimicrobial 2006;5:1-5.
- 66.** Yucesoy M, Oztek AO, Marol S. Comparison of three differential media for the presumptive identification of yeasts. Clin Microbiol Infect 2005;11: 245–247.

- 67.** Letscher-Bru V, Meyer M-H, Galois A-C, Waller J, Candolfi E. Prospective evaluation of the new chromogenic medium Candida ID, in comparison with Candiselect, for isolation of molds and isolation and presumptive identification of yeast species. *J Clin Microbiol* 2002;40:1508–1510.
- 68.** Willinger B, Hillowoth C, Selitsch B, Manafi M. Performance of Candida ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar *Candida*. *J Clin Microbiol* 2001;39:3793–3795.
- 69.** Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Eleventh edition. USA, Mosby Inc.; 2002 p.865-883
- 70.** Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Fifth edition. Philadelphia. Lippincott Co; 2006 p.97 -110.
- 71.** Bile J, Edson RS, Roberts GD. Clinical evaluation of the lysis centrifugation blood culture system for the detection of fungemia and comparison with a conventional biphasic broth blood culture system. *J Clin Microbiol* 1984;19:126-128.
- 72.** Creger J. Lack of utility of the lysis-centrifugation blood culture method for detection of fungemia in immunocompromised cancer patients. *J Clin Microbiol* 1998;36:290-293.
- 73.** O'hara CM, Weinstein MP, Miller JM. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. In: Murray PR, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC. Eighth edition. American Society for Microbiology Press; 2003 p.185-207.

74. Horvath LL, George BJ, Murray CK, Harrison LS, Hospenthal DR. Direct comparison of the BACTEC 9240 and BacT/Alert 3D automated blood culture systems for *Candida* growth detection. J Clin Microbiol 2004;42:115-118.
75. Erjavec Z, Verweij PE. Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. Drug Resistance Updates 2002;5:3-10.
76. Zöller L, Kramer I, Kappe R, Sonntag HG. Enzyme immunoassays for invasive *Candida* infections: reactivity of somatic antigens of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1991;29:1860-1867.
77. Gutierrez J, Maroto C, Piedrola G, Martin E, Perez JA. Circulating *Candida* antigens and antibodies: useful markers of candidemia. J Clin Microbiol 1993; 31:2550-2552.
78. Garcia-Ruiz JC, Arilla MC, Regulez P, Quindos G, Alvarez A, Ponton J. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in patients with hematological malignancies. J Clin Microbiol 1997;35:3284-3287.
79. Na BK, Song CY. Use of monoclonal antibody in diagnosis of candidiasis caused by *C. albicans*: detection of circulating aspartyl proteinases antigen. Clin Diagn Lab Immunol 1999;6:924-929.
80. Saeki F, Ridge RJ, Finkelman MA, Ketchum PA, Rex JH. Application of a glucan-specific limulus amoebocyte lysate serum assay for diagnosis of invasive fungal infections. Abstr. J-84, p.386. Abstr. 41st ICAAC.

- 81.** Odabasi Z, Mattiuzzi G, Ostrosky-Zeichner L, Estey E, Kantarjian H, Rex JH. Detection of (1→3)-β-D-Glukan in the serum of leukemia patients with invasive fungal infections. Abstr. M-902, p.396. Abstr. 42nd ICAAC.
- 82.** Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. J Clin Microbiol 1999;37:1510-1517.
- 83.** Yera H, Sendid B, Francois N, Camus D, Poulain D. Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. Eur J Clin Microbiol 2001;20:864-870.
- 84.** Walsh TJ, Merz WG, Lee JW, Schaufele R, Sein T, Whitcomb PO, Ruddel M, Burns W, Wingard JR, Switchenko AC. Diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis by rapid enzymatic detection of serum D-arabinitol. Am J Med 1995; 99:164-172.
- 85.** Çerikçioğlu N. Mantar infeksiyonlarında seroloji ve deri testleri. Ustaçelebi Ş, editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Öncü Basımevi; 1999 p.1145-1153.
- 86.** Nyugen MH, Peacock JE, Morris AJ. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. Am J Med 1996; 100:617-623.
- 87.** Vilken T. Kan kültürlerinde üreyen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un multiplex polimeraz zincie tepkimesi yöntemiyle hızlı tanısı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi; 2005.

- 88.** Loeffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparison of different methods for extraction of DNA of Fungal Pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol* 1997;35:3311-3312.
- 89.** Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, Jenkinson HF. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *J Clin Microbiol*, 1994;32:228-231.
- 90.** George BJ, Hovarth LL, Hospenthal DR. Effect of inoculum size on detection of *Candida* growth by the BACTEC 9240 automated blood culture system using aerobic and anaerobic media. *J Clin Microbiol* 2005;43:433-435.
- 91.** Hovarth LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Detection of simulated candidemia by the BACTEC 9240 system with Plus Aerobic/F and Plus Anaerobic/F blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2003;41:4714-4715.
- 92.** Morace G, Pagano L, Sanguinetti M, Posteraro B, Mele L, Equitani F, D'amore G, Leone G, Fadda G. PCR-Restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol*, 1999;37:1871-1875.
- 93.** Morace G, Sanguinetti M, Posteraro B, Cascio GL, Fadda G. Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR-Restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol*, 1997;35:667-672.
- 94.** Buchman TG, Roisser M, MerzWG, Charache P. Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part 1. Rapid identification of *Candida albicans* by in vitro amplification of a fungus-specific gene. *Surgery* 1990;108:338-347.
- 95.** van Deventer AJM, Goessens WHF, van Belkum A, van Vliet HJA, van Etten EWM, Verbrugh HA. Improved detection of *Candida albicans* by PCR in blood of neutropenic mice with systemic candidiasis. *J Clin Microbiol*, 1995;33:625-628.

- 96.** Einsele H, Hebart H, Roller G, et al. Detection and identification fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol*, 1997;35:1353-1360.
- 97.** Kan VL. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J Infect Dis*, 1993;168:779-783.
- 98.** Flahaut M, Sabnglard D, Monod M, Bile J, Roissier M. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C. albicans*-secreted aspartic proteinase genes. *J Clin Microbiol* 1998;36:395-401.
- 99.** Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1454-1459.
- 100.** Jordan JA. PCR identification of four medically important *Candida* species using a single primer pair. *J Clin Microbiol* 1994;32:2962-2967.
- 101.** Maarufi Y, Heymans C, De Bruyne J-M, Duchateau V, Rodriguez-Villalobos H, Aoun M, Crokaert F. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-Based PCR Assay. *J Clin Microbiol* 2003; 41:3293-3298.
- 102.** Loeffler J, Henke N, Hebart H. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol* 2000;38:586-590.
- 103.** Moreira-Oliveira M S, Mikami Y, Miyaji M, Imai T, Schreiber A Z, Moretti M L. Diagnosis of candidemia by polymerase chain reaction and blood culture: prospective study in a high-risk population and identification of variables associated with development of candidemia. *Eur J Clin Infect Dis* 2005;24:721-726.