

# SİSTEMİK KANDİDA İNFEKSİYONLARININ TANISINDA DİREK BAKI-KÜLTÜR DIŞI YÖNTEMLER\*

Mine YÜCESOY\*, Özlem GÖÇMEZ\*\*

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı\*  
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi 2.Sınıf Öğrencisi\*\*

## ÖZET

*Sistemik Candida infeksiyonlarında izlenen ciddi artış ve bu klinik tabloya bağlı yüksek mortalite, bu konunun üzerinde daha fazla durulması gerektiğini göstermiştir. Yüksek mortalite oranlarının nedenleri arasında hastalığa ait özgül klinik bulguların olmaması ve sistemik kandidozların erken ve özgün tanısındaki zorluklar önemli bir yer tutmaktadır. Bu açıdan sistemik kandidoz tanısı için kullanılan yöntemler ve sonuçları üzerinde durulmuştur. Sistemik kandidozların tanısı beş grupta incelenebilir. Bunlar direkt baki ve kültür, histopatolojik inceleme, antijen ve antikor arama, metabolik ürünlerini arama ve nükleik asit saptama yöntemleridir. Yapılan çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında; tanı için kan ve doku örnekleri kültürü yanında laboratuvarlarda kolay uygulanabilen ve özgüllüğü yüksek olan mannan, enolaz gibi antijenlerin aranmasının uygun olduğu düşünülebilir. Bunun yanında duyarlılığı daha yüksek olan mannan antijen ve antikorunun birlikte aranması önerilebilir. Ayrıca eğer laboratuvar koşulları uygun ise tüm testlerden daha duyarlı ve özgül olan polimeraz zincir reaksiyonu yönteminin tanı konulamayan ya da doğrulanması gereken olgular için kullanılması doğru olacaktır. Anahtar sözcükler: Candida, kandidoz, tanı yöntemleri*

## SUMMARY

*The increase observed in the systemic candidiasis cases and the high mortality of them showed that more emphasis need to be put on this subject. Absence of specific clinical signs and the difficulties in establishing an early and specific diagnosis are among the main reasons for such high mortality. The diagnostic methods for systemic candidiasis can be examined in five groups. These are direct examination and culture, histopathological examination, detection of antigen and antibodies, detection of the metabolites and the investigation of nucleic acids. When the results of the previous studies were considered, it can be thought that easy and specific antigen (such as mannan and enolase) detection tests as well as blood and tissue cultures are appropriate diagnostic methods. The detection of mannan and antimannan antibodies together can also be recommended because of high sensitivity. On the other hand it would be wright to use the most sensitive and specific method, PCR for the cases which can not be diagnosed or for the confirmational purposes if the laboratory conditions are appropriate.*

*Key words: Candida, candidiasis, diagnostic methods*

Geçen yirmi yıl içinde sistemik fungal infeksiyonların insidansında dramatik bir artış izlenmiştir (1,2). Bu duruma paralel olarak Candida türlerinin hastane infeksiyonu etkenleri arasında da önemli bir yer tuttuğu ve A.B.D.'de kan kültürlerinden soyutlanan etkenler arasında dördüncü sırayı aldığı belirtilmiştir (3,4). Yatan hastalardan bağışıklık sistemi baskılanmış olanlar ile cı<sup>3</sup>di cerrahi müdahale geçirenlerde en yaygın hastane infeksiyonlarının Candida kaynaklı olduğu saptanmıştır (5). Gözlenen bu artışın nedenleri arasında; malignite insidansındaki artma, organ transplantasyonundaki gelişmeler, geniş spektrumlu antibiyotiklerin, immunosupresif ilaçların ve santral venöz kateterlerin daha yaygın kullanımı ile HIV

infeksiyonunun hızlı yayılımı sayılmıştır (1,6,7).

Kandidemi tablolarına bağlı mortalite oranları kliniklere bağlı olarak %40 ile %60 arasında değişmektedir (8). Bu kadar yüksek mortalite oranlarının nedenleri arasında sistemik kandida infeksiyonlarının erken ve özgün tanısındaki zorluklar önemli bir yer tutmaktadır. Sistemik kandidozların klinik tanısında karşılaşılan en önemli sorun hastalığa ait, özgül klinik bulguların bulunmamasıdır (9). Bunun yanında biyolojik tanıdaki güçlüklerden biri de Candida türlerinin fırsatçı karakterde olması ve immun sistemi baskılanmış olgularda kolonizasyonun infeksiyonu göstermemesidir. Ayrıca tanıda kullanılan standart ve diğer yöntemlerde de duyarlılık ve

\* Bu yazı 1998-1999 Öğretim yılı Dönem 1 "Özel Çalışma Modülleri" kapsamı içinde yazılmıştır.

özgüllük açısından bazı sorunlar söz konusudur.

Sistemik kandida infeksiyonları, özellikle immün yetmezlikli, maligniteli hastalarda görülmesi nedeni ile bu tabloların erken ve doğru tanısı hasta sağlığı açısından büyük önem taşımakta ve hızlı, özgün sağaltım ile mortalite azaltılabilmektedir (10). Yazımız, sistemik kandidoz tanısı için yapılan çalışmaları toplayarak en uygun tanı yönteminin belirlenmesi amacı ile düzenlenmiştir.

Sistemik kandidozların tanısı beş gruba ayrılarak incelenebilir. 1) Direkt bakı ve kültür 2) Histopatolojik inceleme 3) Antijen ve antikor arama 4) Metabolik ürünlerini arama 5) Nükleik asit saptama

**Direkt bakı ve Kültür:** Direkt bakıda dokuda yabancı ve gerçek hiflerin yanında maya hücrelerinin görülmesi invaziv kandidoz için patognomatiktir. Kültür özellikle steril bölgelerden alınan örneklerde, kan, BOS ve biyopsi örneklerinde çok önemlidir. Ancak kültür sonuçları uzun inkübasyon süresine gereksinim duymakta ve her zaman olumlu sonuç vermemektedir. Örneğin hepatosplenik kandidozlu hastaların ancak %50'sinden azında kan kültürü olumluluğu saptanmıştır (11). Yapılan bir başka çalışmada ise invaziv kandidoz olgularının %31.6'sında kan, %47.6'sında kan ve/veya steril bölge kültürleri olumlu olarak saptanmıştır. Kan kültürlerinde en iyi izolasyon lizis santrifügasyon yöntemi ile elde edilmektedir (12). En duyarlı yöntemler olan bifazik ortam veya lizis santrifügasyon yöntemi kullanılması durumunda bile sistemik kandidoz olgularının ancak %50'sinde kan kültür olumluluğu saptanabilmektedir (13,14).

**Histopatolojik inceleme:** Tanıda kullanılan standart bir yöntem olmasına karşın her infekte bölgeden örnek alınamaması bu yöntemi kısıtlamaktadır.

**Antijen ve Antikor Arama:** a) Antijen aranması: Invaziv kandida infeksiyonunun en erken bulgusunun olumlu bir antijen testi olduğu bildirilmiştir (15). Sistemik kandidozlarda çeşitli antijenlerin aranmasının tanıdaki yerini belirlemek amacı ile bir çok araştırma

yapılmıştır. Tanıda denenen antijenler arasında Candida proteinleri ve polisakkaridleri yer alır.

Araştırmalar arasında öncelikle Candida hücre duvarının önemli polisakkaridleri olan glukun ve mannan ile ilgili olanlar dikkati çekmektedir (3,16-18). Glukun arama sonuçları ümit vermekle birlikte, yüksek immunojen özellik gösteren mannan antijeninin saptanması üzerinde daha fazla durulmuştur. Sistemik kandidoz tablolarının tanısında mannan antijenemisinin kullanılabileceği ilk kez Weiner ve Coats-Stephen (19) tarafından ortaya atılmıştır. O dönemden beri bu konunun standardizasyonu ile duyarlılığının yükseltilmesi çalışmaları sürmektedir ancak mannan saptanmasını kısıtlayan iki önemli faktörün söz konusu olduğu bildirilmiştir (3). Bunlardan ilki hastaların serumundan mannanın hızlı temizlenmesidir ki, bu durum hayvan modellerinde de gösterilmiştir (20). Yapılan bir çalışmada invaziv kandidozlu olguların %63.2'sinde bu antijenin düşük düzeyde (<2.0 ng/ml) olduğu saptanmıştır (21). İkinci faktör ise kullanılan yöntemdir çünkü temizleme mekanizmasının etkinliği nedeni ile mannan konsantrasyonu düşük kalarak bazı metodlar ile örneğin lateks agglütinasyon (LA) yöntemi ile saptama sınırının altına düşebilmektedir (15). Bu faktörler yöntemin duyarlılığını azaltmaktadır.

Hastaların serumunda mannan antijeninin aranması için önce poliklonal sonra monoklonal antikorlar kullanılarak LA, enzim immün assay (EIA), radyoimmün assay (RIA) gibi yöntemler uygulanmıştır (15,17,19,21-23). Lateks agglütinasyon yöntemi ile mannan antijeninin saptandığı yöntemlerin Candida'lara bağlı kolonizasyon ile invaziv infeksiyonu ayırabildiği belirtilmiş (22) ve çalışmalarda testin duyarlılığı %28-52.6 arasında; özgüllüğü ise %100 olarak saptanmıştır (3,15,22,23). Öte yandan her hasta için alınan serum sayısına bağlı olarak duyarlılığın arttığı belirtilmiştir (15). Bu konu ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada her hastadan birden fazla örnek alındığında duyarlılığın %40, bir örnek

alındığında ise %11 olarak saptanmıştır (3). Bu da yine antijen sirkülasyonunun geçici olması ile ilişkilidir (3,24). Çalışmalarda EIA yönteminin uygulanması ile mannan antijeninin saptama düzeyi 0.1 ng/ml'ye düşmekte ve bu şekilde duyarlılık %22-100'e yükselmekte; özgüllük ise %92-100 arasında bulunmaktadır (3,21-23,25,26). EIA yönteminin LA'a göre 3-8 kez daha duyarlı olduğu görülmüştür (23). Boughnoux ve arkadaşları (21), uyguladıkları avidin biyotin EIA sistemini kültür ile karşılaştırdıklarında kültürden daha iyi sonuç aldıklarını ve invaziv kandidozlu olguların %84.2'sinde mannan antijenini saptadıklarını belirtmiş ve bu yöntem ile nonspesifik reaksiyonları da elimine ettiklerini bildirmişlerdir .

Mannan antijeninin yanında, tanı açısından anlamlı olabilecek 47,48 kDa'lık antijenlerin de aranması gündeme gelmiştir. Mathews ve Burnie (27) C.albicans'ın 47 kDa'lık antijenini "dot immunobinding" yöntemi ile aramış ve nötropenili olguların %77'sinde, nötropenisi olmayan hastaların %87'sinde olumlu bulmuştur. Araştırmacılar, bu yöntemle sistemik kandidozlu hastaların deri-mukoza infeksiyonlu olgulardan ayrılabilirdiğini belirtmişlerdir. 48 kDa'luk enolaz antijeninin araştırıldığı çalışmalarda duyarlılık %35-75, özgüllük %90-97.1 arasında saptanmıştır (28,29). Bunların dışında Rebolı (30) "dot immunobinding" yöntemi ile sitoplazmik antijen aramış ve yöntemin duyarlılığını %84.2, özgüllüğünü %94.4 olarak bulmuştur. Nötropenik hastalar için saptanan duyarlılık ise daha yüksektir (%85.7).

Total Candida antijeninin saptandığı testlerde LA yöntemi ile duyarlılık %19-97 arasında değişirken, özgüllük %90-98.3 olarak saptanmıştır (31-34). Duyarlılığın artırılması amacı ile her hastadan birden fazla örneğin alınması önerilmektedir (15). Bir çalışmada riskli olguların haftada bir bu yöntemle taranması denenmiş ancak sistemik kandidoz tanısı, olumlu kan veya doku kültüründen ancak 0.4 gün önce konulabilmiştir. Bu durumda haftalık uygulamanın tanı açısından yarar getirmediği görülmüştür (31).

Ferreira ve arkadaşları (35), sistemik kandidoz tanısı için "western blotting" yöntemi ile idrarda C.albicans antijenlerini aramışlar ve 7 olgunun 5'inde olumlu sonuç almışlardır. Araştırmacılar, sonuç olarak bu yöntemin özgüllüğünün yüksek olduğunu ve sistemik infeksiyon tanısı için olduğu kadar antifungal sağaltımın değerlendirilmesi için de uygun bir yöntem olduğunu bildirmişler. Öte yandan olgulardan idrar toplanmasının invaziv bir işlem olmaması, serumda dolaşan fungal antijenlerin saptanması için gereken antijeni immunkompleksden ayırma işleminin idrar için gerekli olmaması yöntemin diğer avantajlarını oluşturmaktadır. Özgüllüğü gerçekten yüksek olan bu yöntemin rutin laboratuvarında uygulama zorluğu yanında, iki gün kadar bir süre gerektirmesi önemli dezavantajlar olarak görülmektedir.

**b) Antikor aranması:** Sistemik kandidozlu olgularda tanı için bir diğer yaklaşım da mannan, 46,47 kDa'luk sitoplazmik protein antijenleri, enolaz, C.albicans blastokonidya ve çimlenme borusu gibi çeşitli Candida antijenlerine karşı oluşan antikorların saptanmasıdır. Bu antikorlar indirekt floresan antikor (IFAT), indirekt hemagglütinasyon (IHA), RIA ve EIA yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Sistemik kandidoz tanısında antikor aranmasının iki kısıtlayıcı noktası olduğu bildirilmiştir. Bunlardan ilki kolonize hastalarda da yüksek düzey antikor saptanabileceğidir. İkincisi ise özellikle immun yetmezlikli olgularda antikor yanıtının gecikebildiği, azaldığı hatta görülmediğidir (36). Antikor testleri genellikle immun yetmezlikli hastalarda negatif sonuç verdiğinden bu testlerin daha çok tanı için değil de prognozu belirleyici değeri olduğu bildirilmiştir (37).

Total antikorun saptandığı bir çalışmada "dot immunobinding" yöntemi ile sistemik maya infeksiyonlu olguların %69.6'sında olumlu sonuç alınmıştır (7). IHA ile testin duyarlılığı %29.4, özgüllüğü %95.0 olarak saptanmıştır (38). Zoller ve arkadaşlarının (39) yaptıkları çalışmada ise IHA ve IFAT yöntemleri ile invaziv kandidoz olguları, kontrol

grubundan ayrılabilmiştir. Bu yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü IHA için %97 ve %91; IFAT için ise %60 ve %50 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar, yine total somatik antikorun kullanıldığı EIA yöntemi ile duyarlılığı %88.8, özgüllüğü ise %40 olarak saptamıştır.

Total antijenler ile yapılan antikor arama testleri tanı açısından ancak suboptimal duyarlılık ve özgüllük göstermişlerdir (40). Ancak spesifik antijenlere özgü antikorların arandığı yöntemler daha umut verici olarak gözükmektedir. Matthews ve arkadaşları (41) 47 kDa antijenine karşı antikor varlığını araştırmış ve bu antikorların invaziv infeksiyon ile korele olduğu sonucuna varmıştır. Benzer şekilde invaziv infeksiyon esnasında sitoplazmik antijenlerin salınması nedeni ile bu antijenlere karşı oluşan antikorların sistemik kandidoz ile kolonizasyonu ayırabileceği düşünülmüştür. Zöller ve arkadaşları (39) 47 kDa, 47 kDa ile 45 kDa ve somatik antijen ekstratlarını kullanarak EIA ile antikor aradıkları araştırmada her üç yöntemin de invaziv kandidozlu olgular ile sağlıklı bireyleri ayırabildiğini ancak bu iki grubu en iyi olarak 47 kDa-29 kDa antijenlerin kullanıldığı EIA yöntemi ile ayırd edebildiklerini bildirmişlerdir. Bu metodun duyarlılığı %81.5, özgüllüğü %97 olarak saptanmıştır. Greenfield ve arkadaşları (42) 54 kDa major sitoplazmik antijenini kullandıklarında duyarlılığı %25, özgüllüğü %98.7 olarak saptarken; Fisher ve arkadaşları (43) sonikat antijen kullandıkları EIA yönteminin duyarlılığını %92, spesifikliğini %90 olarak belirlemişlerdir.

Van Deventer ve arkadaşları (44), immun yetmezlikli ve immun yetmezliği olmayan invaziv kandidozlu olgularda antienolaz antikorlarını araştırmışlar ve duyarlılık ile özgüllüğü immun yetmezlikli grupta %50, %86; immun yetmezliği olmayan grupta ise %53 ile %78 olarak saptamışlardır. Öte yandan bu testin, kolonizasyonu, sistemik infeksiyondan ayırabilen tek antikor arama yöntemi olduğu da bildirilmiştir.

Gutierrez ve arkadaşları (29) enolaz ve mannan antijeni ile antiblastokonidya IgG ve IgM antikorlarını IFAT ile araştırdığı bir çalışmada sistemik kandidoz tanısı açısından en anlamlı olarak blastokonidyalara karşı oluşan IgM tipi antikorların saptanmasını bulmuştur. IgG tipi antikor saptamanın duyarlılığı %80, özgüllüğü %81.4 olarak bulunurken; IgM antikorlarının saptanmasının duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak belirlenmiştir.

Özellikle immun yetmezlikli olgulardaki infeksiyonların tanısı için *C.albicans* çimlenme borusuna karşı oluşan antikorların saptanması ortaya atılmıştır (36,45). Garcia-Ruiz ve arkadaşları (36) bu antikorların sistemik kandidozlu olgularda kan kültürlerinden daha önce saptandığını ve duyarlılığın %87.5, özgüllüğün ise %95.2 olduğunu belirtmişlerdir. Bu araştırmadaki bir diğer önemli nokta da doku örnekleri ile invaziv kandidoz tanılı ancak kan kültürü negatif olgularda, çimlenme borusu antikorlarının saptanmış olmasıdır. Bu durumda hematolojik malignitesi olan infekte hastalarda tanının desteklenmesi ve sağaltımın düzenlenmesi için bu antikorların önemli olduğu ortaya çıkmıştır (36). Ayrıca bu yöntemin immun yetmezliğe neden olan HIV infeksiyonu, kemik iliği transplantasyonu gibi olgularda da kullanılabileceği bildirilmiştir (45).

*Candida* hücre duvarının major immunojeni olan mannanın insanlarda antikor oluşumunu indüklediği ve hastaların serumlarında dolaştığı bildirilmiştir (46). Puygauthier-Toubas ve arkadaşları (47) ko-immunoelektrodifüzyon yöntemi ile derin kandidozu olan 53 olgunun 98 serum örneğinin 95'inde yüksek, 2'sinde düşük titrede, sağlıklı 102 kişinin 40'ında düşük, 2'sinde yüksek titrede antimannan antikorlarını saptamış ve derin kandidoz tanısında antimannan antikorlarının kantitatif belirlenmesinin duyarlı ve özgül olduğu sonucuna varmışlardır. Jones (48) ise 50 infekte olgunun tümünde antimannan antikorlarını bulmuştur. Sendid ve arkadaşları (3), EIA yöntemi ile antimannan antikorlarını aramışlar ve duyarlılığı %53,

özgüllüğü %94 olarak bulmuşlardır. Ancak antijen ve antikorun birlikte aranması durumunda duyarlılık %80'e, özgüllük ise %93'e yükselmiştir. Antijenemi ve antikor yanıtı *C.albicans*'ın izolasyonundan sırasıyla 2-6 ve 3-7 gün önce olduğu saptanmıştır. Bu çalışma sadece *C.albicans* ile infekte hastaları kapsamakla birlikte, diğer *Candida* türleri ile infekte olgularla yapılan preliner çalışmalarda da umut verici sonuçlar alınmıştır. Burada birlikte kullanılan antijen ve antikor yöntemlerinin hastanın immun durumuna bağlı olmaksızın yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması nedeni ile bu iki testin birlikte kullanımının sistemik kandidozun rutin tanısı için uygun olabileceği sonucuna varılmıştır.

Serumda antijen-antikor aramak amacıyla yapılan çalışmaların çoğunda kendi hazırladıkları sistemler kullanılmıştır. Ticari olarak satılan ve total *Candida* antikoru arayan ve indirekt hemagglütinasyon yöntemine dayalı iki kit bulunmaktadır. Bunlardan birisi Roche firması diğeri ise *Candidose* olup, Fumoze Laboratuvarları tarafından pazarlanmaktadır. Öte yandan çeşitli *Candida* antijenlerinin arandığı üç adet hazır kit bulunmaktadır. Bunlar mannan antijenini arayan ve lateks agglütinasyon yöntemi olan *Pastorex Candida* (Sanofi Diagnostics, Pasteur), total antijeni arayan ve yine lateks agglütinasyon yöntemi olan *Cand-Tec* (Ramco Laboratories Inc.) ve 48 kDa protein antijenini arayan ve bir lipozom immunoassay yöntemi olan *Directigen* (Becton Dickinson) dir.

**Metabolik ürünlerini arama:** Tıbbi açıdan önemli birçok *Candida* türünün in vitro koşullarda arabinitolün D enantiomeri, zıt olarak omurgalıların metabolik yollarının ise sadece arabinitol L enantiomerini oluşturduğu bildirilmiştir (49). Switchenko ve arkadaşları (49), invaziv kandidoz tanısı için D-arabinitolü (DA) arayan enzimatik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemin basit, spesifik ve gaz kromatografisi sonuçları ile korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. Renal disfonksiyonlu olgularda DA/kreatinin oranına bakılması da bir diğer yaklaşım

olabilmektedir. Walsh ve arkadaşları (50), kandidemili kanser hastalarının %74'ünde, fungemisi olmayan derin doku kandidozu olan olguların ise %40'ında yükselmiş DA/kreatinin oranları saptamışlardır. Spektroflorometrik kromatografi yöntemi ile D arabinitolün ve ayrıca D-arabinitol/kreatinin oranlarının araştırıldığı bir çalışmada, invaziv kandidoz ve perifer kolonizasyonlu olguların sonuçları arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır (22).

*Candida* türlerinin önemli metaboliti olan D-arabinitol ve insan serumunda bulunan L-arabinitol idrarda da çıkmaktadır. Christensson ve arkadaşları (51) gaz kromatografisi yöntemi ile kanserli olgularda D/L arabinitol düzeylerini aramışlar ve bu yöntemin kanserli immun yetmezlikli olgularda invaziv kandidoz tanısı için duyarlı bir yöntem olduğunu ve ilk kan kültürü pozitifliğinden 3-31 gün (ortalama 12 gün) önce pozitifleştiğini ve bu oranda erken bir yükselmenin antifungal sağaltım için bir baz alınabileceğini bildirmişlerdir.

Bu konu ile ilgili bir diğer yaklaşım da plazmada yükselmiş 1,3-beta-D-glukan düzeylerinin amobosit lizat yöntemi ile saptanmasıdır. Bu yöntemin fungal infeksiyonu saptanmış olgulardaki duyarlılığı %90'dır (52).

**Nükleik asit saptama:** Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi nükleik asit saptama yöntemleri mikrobik identifikasyon ve tanı için önemli bir yöntem olmuştur. Özellikle sistemik kandidozun erken dönemlerinde kan kültürlerinin negatif olarak saptanması ve antifungal sağaltımın ne kadar erken başlanırsa o kadar yararlı olacağı düşünülürse bu konuda PZR gibi daha duyarlı yöntemlere ihtiyaç duyulduğu açıktır. Şu anki yöntemlerden daha duyarlı olan ve birçok örneğe uygulanabilen fungal nükleik asitlerin saptanmasının optimal bir tanı yaklaşımı olarak kabul edilebileceği düşünülmektedir (53). Öte yandan PZR, en azından kan kültürü kadar duyarlı olup, kolonize hayvanlarda negatif sonuç verecek kadar da özgüdür (54).

Kan (54), *Candida* aktin geninin 158bp'lik kısmını primerler ile çoğaltmış ve P32 işaretli prob ile hibridizasyon yapmıştır. Bu yöntem ile kan kültürü *Candida* açısından olumlu olan 14 hastanın 11'i (%79) pozitif bulunmuştur.

Morace ve arkadaşları (55), P450 lanosterol 14 alfa-demetilaz geninin 350bp'lik segmentine özgü primerler kullanarak PZR ve ardından uygun bir restriksiyon enzim analizi yöntemi ile kandidemilere, kan kültüründen daha erken ve duyarlı olarak tanı koyabilmişlerdir. Duyarlılığı 5 KOÜ(koloni oluşturan ünite)/ml olan bu yöntemle 14 sistemik kandidozlu olgunun 13'ü (%92.8) için olumlu sonuç alınmıştır. Aynı geni hedef alan nested PZR yöntemi ile Bunchman ve arkadaşları (56) klinik örneklerde duyarlılığı %76, özgüllüğü %95 olarak bulmuşlardır.

rRNA bölgesinin küçük bir alt birimini kodlayan genin bir DNA fragmanı çoğaltılarak yapılan PZR yöntemi ile akut invaziv kandidoz tavşan modelinde 10-50 KOÜ/100uL DNA saptanabilmıştır (57). Ancak "nested" PZR kullanımı bu saptama sınırını 10 misli arttırmıştır. Aynı çalışmada lizis santrifüjasyon yönteminin duyarlılığının (%37.5), PZR'ninkinden (%25) yüksek olduğu ancak "nested PZR"den düşük olduğu bildirilmiştir. Lizis santrifüjasyon ile birlikte "nested" PZR kullanımı duyarlılık oranını %62.5'a yükseltmiştir. Bu durumda PZR'nin tanıda tamamlayıcı bir yöntem olarak kullanılması önerilmektedir (57).

*C.albicans* mitokondrial DNA'sından köken alan EO3 kısmının 1.8kb'lik fragmanı hedef olarak kullanılarak PZR ile kandan etkenin saptanabilmesi için 104-105 hücrenin gerektiği bildirilmiştir. Bu durum, presipitasyon esnasında kandan *C.albicans* hücrelerinin kaybedilmesi ve PZR 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 (125bp) kullanılarak, bu sorunlar düzeltilmiştir (58).

Einsele ve arkadaşları (59) 18S rRNA sekanslarını kullandıkları PZR ve türe özgü prob'lar ile kanda 1 KOÜ/ml kan miktarına dek *Candida* türlerini saptayabilmiş ve tanımlayabilmiştir. Bu yöntem ile sistemik kandidozlu olgularda duyarlılık %100, özgüllük %98 olarak bildirilmiş ve bu metodu sistemik kandidozun erken tanısı ve antifungal sağaltımın yönlendirilmesinde değerli olduğu sonucuna varılmıştır.

Van Burik ve arkadaşları (53), rRNA alt ünitesinin 580bp'lik gen sekansını saptayan PZR'yi kullandıktan sonra bunu diğoksijenin işaretli prob ile hibridize ederek invaziv tablolarda olumlu, kolonize olgularda ve sağlıklılarda olumsuz sonuçlar almışlardır. Bu yöntemin saptayabildiği en düşük sınır 4 KOÜ/ml kan'dır. Ayrıca aspartik proteinaz genine özgü primerlerin kullanıldığı bir başka PZR yöntemi de 1-4 KOÜ/ml kan miktarında mayayı saptayabilmektedir. Klinik örneklerde yapılan çalışmalarda bu yöntemin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %98 olarak bulunmuştur (60).

PZR yönteminde uygun olan örneğin saptanması amacı ile yapılan bir çalışmada kültür negatif 40 sistemik kandidozlu olgunun serum örneklerinin %27'sinde, tam kan örneklerinin ise %7'sinde olumlu sonuç alınmış ( $p<0.05$ ) ve sistemik kandidoz tanısı için yapılan PZR'de örnek olarak serumun seçilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır (61).

Loeffler ve arkadaşları (62), PZR işleminin cam kapillerlerde yapıldığı ve floresan rezonans enerji transferi ve "light cycler" sistemi tekniğini kullanan kantitatif bir PZR yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemin fungal DNA yükünü de belirlediği ve duyarlılığının 5KOÜ/ml kan olması yanında tekrarlanabilirliğinin %96-99 arasında olduğu, ayrıca da PZR sonrası analizde tüpün açılması söz konusu olmadığından kontaminasyon riskinin minimuma indirildiği belirtilmiştir. Ayrıca kanda olduğu kadar, invaziv kandidozun erken bir belirtisi olan kandidüri

tablolarında da idrarda Candida aranması için PZR kullanılabilirdiği gösterilmiştir (63).

Kan kültür şişelerinde üreyen Candida türünün hızlı identifikasyonu için ise PZR sonrası EIA yöntemi geliştirilmiştir (64). 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.

İnvaziv kandidoz tanısı için altın standart bir yöntemin söz konusu olmaması birçok yeni tekniğin geliştirilmesi ve araştırılmasına neden olmuştur. Yapılan çalışmaların sonuçları göz önüne alındığında; sistemik kandidoz tanısı için kan ve diğer doku

örnekleri kültürü yanında laboratuvarlarda kolay uygulanabilen ve özgüllüğü yüksek olan mannan, enolaz gibi antijenlerin aranmasının uygun olduğu düşünülebilir. Bunun yanında özellikle mannan antikoru ve antijeninin birlikte aranması durumunun duyarlılığı da yükseltmesi nedeni ile kuşku olgulara bu iki testin birlikte uygulanması önerilebilir. Ayrıca eğer laboratuvar imkanı ve koşulları uygun ise tüm testlerden daha duyarlı ve özgül olan PZR yönteminin kullanılması doğru olacaktır ancak günümüz koşulları içinde bu yöntemin rutin tanı testi olması zordur. Bu açıdan diğer yöntemler ile tanı konulamayan yada doğrulanması gereken olgulara PZR uygulanması uygun bir yaklaşım olacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Karlowsky JA, Zhanel GG, Klym KA, Hoban DJ, Kabani AM. Candidemia in a Canadian tertiary care hospital from 1976 to 1996. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 28:5-9.
2. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial bloodstream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31:327-332.
3. 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.
4. Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. *Clin Infect Dis* 1995; 20:1526-1530.
5. Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989 National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Med* 1991; 16: 865-895.
6. Beck-Sague CM, Jarvis WR. 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.
7. Nicolle LE, Rotstein C, Bourgault AM, St-Germain G, Garber G. The Canadian Infectious Diseases Society Invasive Fungal Registry. Invasive fungal infections in Canada from 1992 to 1994. *Can J Infect Dis* 1998; 9:347-352.
8. Wenzel RP. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 1995; 20:1531-1534.
9. Armstrong D. Problems in management of opportunistic fungal diseases. *Rev Infect Dis* 1989; 11:1591-1599.
10. Fraser VJ, Jones M, Dunkel J, Storfor S, Medoff G, Dunagan WC. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clin Infect Dis* 1992;15:414-421.
11. Thaler M, Pastakia B, Shawker TH, O'Leary T, Pizzo PA. Hepatic candidiasis in cancer patients: the evolving picture of the syndrome. *Ann Intern Med* 1988; 108:88-100.
12. Tümbay E. *Candida* türleri. In: Ustaçelebi Ş, Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Tümbay E, Mete Ö, eds. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, 1.baskı. Ankara:Güneş Kitabevi, 1999:1081-1086.
13. Berenguer J, Buck M, Witebsky F, Stock F, Pizzo PA, Walsh TJ. Lysis-centrifugation blood cultures in the detection of tissue-proven invasive candidiasis:

- disseminated versus single-organ infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993;17:103-109.
14. Telenti A, Roberts GD. Fungal blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989;8:825-831.
  15. Herent P, Stynen D, Hernando F, Fruit J, Poulain D. Retrospective evaluation of two latex agglutination tests for detection of circulating antigens during invasive candidosis. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2158-2164.
  16. Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, et al. An evaluation of serodiagnostic tests in patients with candidemia: beta-glucan, mannan, candida antigen by Cand-Tec and D-arabinitol. *Microbiol Immunol* 1993; 37:207-212.
  17. Mitsutake K, Miyazaki T, Tashiro T, et al. Enolase antigen, mannan antigen, Cand-Tec antigen, and beta-glucan in patients with candidemia. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1918-1921.
  18. Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, et al. Plasma (1-3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33:3115-3118.
  19. Weiner MH, Coats-Stephen M. Immunodiagnosis of systemic candidiasis: mannan antigenemia detected by radioimmunoassay in experimental and human infections. *J Infect Dis* 1979; 140:989-993.
  20. Kappe R, Müller J. Rapid clearance of *Candida albicans* mannan antigens by liver and spleen in contrast to prolonged circulation of *Cryptococcus neoformans* antigens. *J Clin Microbiol* 1991; 29:1665-1669.
  21. Nakamura A, Ishikawa N, Suzuki H. Diagnosis of invasive candidiasis by detection of mannan antigen by using the avidin-biotin enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2363-2367.
  22. Bougnoux M, Hill C, Moissenet D, et al. Comparison of antibody, antigen, and metabolite assays for hospitalized patients with disseminated or peripheral candidiasis. *J Clin Microbiol* 1990; 28:905-909.
  23. Fujita SC, Hashimoto T. Detection of serum *Candida* antigens by enzyme-linked immunosorbent assay and a latex agglutination test with anti-*Candida albicans* and anti-*Candida krusei* antibodies. *J Clin Microbiol* 1992; 30:3132-3137.
  24. Reiss E, Morrison CJ. Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6:311-323.
  25. De Repentigny L, Reiss E. Current trends in immunodiagnosis of candidiasis and aspergillosis. *Rev Infect Dis* 1984;6:301-312.
  26. De Repentigny L, Marr LD, Keller JW. Comparison of enzyme immunoassay and gas-liquid chromatography for the rapid diagnosis of invasive candidiasis in cancer patients. *J Clin Microbiol* 1985; 21:972-979.
  27. Matthews R, Burnie J. Diagnosis of systemic candidiasis by an enzyme-linked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-kilodalton antigen. *J Clin Microbiol* 1988; 26:459-463.
  28. Walsh T, Hathorn JW, Sobel JD. Detection of circulating *Candida* enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis. *N Engl J Med* 1991; 324:1026-1031.
  29. 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.
  30. Reboli AC. Diagnosis of invasive candidiasis by a dot immunobinding assay for *Candida* antigen detection. *J Clin Microbiol* 1993; 31:518-523.
  31. Escuro RS, Jacobs M, Gerson SL, Machicao AR, Lazarus HM. Prospective evaluation of a *Candida* antigen detection test for invasive candidiasis in immunocompromised adult patients with cancer. *Am J Med* 1989; 87:621-627.
  32. Burnie JP, Williams J. Evaluation of Ramco latex agglutination test in the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur J Clin Microbiol* 1985; 4:98-101.
  33. Fung J, Donta S, Tilton R. *Candida* detection system (Cand Tec) to differentiate between *Candida albicans* colonization and disease. *J Clin Microbiol* 1986; 24:542-547.
  34. Gentry LO, Wilkinson ID, Lea AS, Price MF. Latex agglutination test for detection of *Candida* antigen in patients with disseminated disease. *Eur J Clin Microbiol* 1983; 2:122-128.
  35. Ferreira RP, Yu B, Niki Y, Armstrong D. Detection of *Candida* antigenuria in disseminated candidiasis by immunoblotting. *J Clin Microbiol* 1990; 28:1075-1078.
  36. Garcia-Ruiz JC, Anilla 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 hematologic malignancies. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3284-3287.
  37. Matthews RC. Early diagnosis of systemic candidal

- infection. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31:809-812.
38. Yücesoy M, Tükel S, Yuluğ N. Anticandidal antibodies in healthy individuals and patients with candidosis. *İnfeksiyon Dergisi* 1996; 10:271-273.
  39. 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.
  40. Jones MJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3:32-45.
  41. Matthews RC, Burnie JP, Tabaqchali S. Immunoblot analysis of serological response in systemic candidosis. *Lancet* 1984; ii:1415-1418.
  42. Greenfield RA, Bussey MJ, Stephens JL, Jones JM. Serial enzyme-linked immunosorbent assays for antibody to *Candida* antigens during induction chemotherapy for acute leucemia. *J Infect Dis* 1983; 148:275-283.
  43. Fisher JF, Trinchler RC, Agel JF, et al. Disseminated candidiasis: a comparison of two immunologic techniques in the diagnosis. *Am J Med Sci* 1985; 290:135-142.
  44. Van Deventer AJM, Van Vliet HJA, Hop WCJ, Goessens WHF. Diagnostic value of anti-*Candida* endolase antibodies. *J Clin Microbiol* 1994; 32:17-23.
  45. Villalba R, Gonzales AI, Linares MJ, Casal M, Torres A. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tube as a possible aid in diagnosing systemic candidiasis in bone marrow transplant patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12:347-349.
  46. Martinez JP, Gil ML, Lopez-Ribot JL, Chaffin WL. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1996; 11:121-141.
  47. Puygauthier-Toubas D, Paillet S, Marx-Chemla C, et al. Value and limitations of anti-mannan antibodies research by co-immunoelectrodiffusion in the diagnosis of deep candidiasis. *Pathol Biol* 1991; 39:200-204.
  48. Jones JM. Quantitation of antibody against cell wall mannan and a major cytoplasmic antigen of *Candida* in rabbits, mice and humans. *Infect Immun* 1980; 30:78-89.
  49. Switchenko AC, Miyada CG, Goodman TC, et al. An automated enzymatic method for measurement of D-arabinitol, a metabolite of pathogenic *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994; 32:92-97.
  50. Walsh TJ, Merz WG, Lee JW. Diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis by rapid enzymatic detection of serum D-arabinitol. *Am J Med* 1995; 99:164-172.
  51. Christensson B, Wiebe T, Pehrson C, Larsson L. Diagnosis of invasive candidiasis in neutropenic children with cancer by determination of D-arabinitol/L-arabinitol ratios in urine. *J Clin Microbiol* 1997; 35:636-640.
  52. Obayashi T, Yoshida M, Mori T. Plasma (1-3)- $\beta$ -D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 1995; 345:17-20.
  53. Van Burik J, Myerson D, Schreckhise R, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1169-1175.
  54. Kan VL. Polymerase chain reaction for the diagnosis of candidemia. *J Infect Dis* 1993; 168:779-783.
  55. Morace G, Paganò L, Sanguinetti M, et al. PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1871-1875.
  56. Buchman TG, Rossier M, Merz WG, 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.
  57. Polanco A, Mellado E, Castilla C, et al. Detection of *Candida albicans* in blood by PCR in a rabbit animal model of disseminated candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34:177-183.
  58. 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.
  59. Einsele H, Hebart H, Roller G, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1353-1360.
  60. Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bille J, Rossier 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.
  61. Bounoux ME, Dupont C, Mateo J, et al. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J Clin Microbiol* 1999;

- 37:925-930.
62. Loeffler J, Henke N, Hebart H, et al. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol* 2000; 38:586-590.
63. 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.
64. 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.