



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

*Hematolojik Malignensili Febril Nötropenik
Hastalarda, Kandidemi Tanısının PCR Yöntemi ile
Araştırılması*

Dr. Murat Yaman

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Gönül MUTLU

*“Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından
2004.04.0103.012 numaralı proje ile desteklenmiştir.”*

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir.”

Antalya, 2005

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde ve tezimin her aşamasında emeği geçen, tez dışında da hayata dair karşılaştığım güçlükleri aşmama yardımcı olan, üstün bilgi ve becerileri ile beni yönlendiren, saygıdeğer tez danışmanı hocam Prof. Dr. Gönül Mutlu başta olmak üzere; saygıdeğer hocalarım, Prof. Dr. Tümer Vural, Prof. Dr. Meral Gültekin, Prof. Dr. Dilek Çolak, Doç. Dr. Dilara Ögünç ve Yrd. Doç. Dr. Gözde Öngüt'e, tüm uzman ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Merkez Laboratuvarı ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm çalışanlarına teşekkür ederim.

İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görevli sayın hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim

Ayrıca dahili hematoloji servisinde çalışmamı kolaylaştıran Doç. Dr. Ayşen Timurağaoğlu'na ve Doç. Dr. Rabin Saba'ya teşekkür ederim

Merkezi araştırma laboratuvarında bana güvenerek tezimle ilgili tüm olanakları kullanabilmemi sağlayan başta Prof. Dr. Olcay Yeğin ve Prof. Dr. Uğur Yavuzer hocam olmak üzere, testin optimizasyon aşamasında yardımcı olan Ph.D Biyolog Nilüfer İmir'e ve MSc. Biyolog Mesut Coşkun'a teşekkür ediyorum

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. Moleküler Testler Laboratuvarı'ndaki rotasyonumda, in-house *Candida* PZR yöntemlerini uygulamalı olarak öğrenmemi sağlayarak tezimin laboratuvar temelini sağlamlaştıran sayın hocam, Prof. Dr. Semra Kuştimur ve Doç. Dr. Ayşe Kalkancı'ya teşekkür ediyorum.

Yaşamım boyunca bana verdikleri her türlü destek ve duydukları güven ile her zaman yanımda olan başta annem ve babam olmak üzere, tüm aileme teşekkür ederim

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	vii
Şekiller Dizini.....	viii
Çizelgeler Dizini.....	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇLAR.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe ve Taksonomi	4
2.2. <i>Candida</i> Türlerinin Genel Özellikleri.....	7
2.3. <i>Candida</i> Hücresinin İnce Yapısı	10
2.3.1 Hücre İskeleti.....	10
2.3.2 Hücre Duvarı	10
2.3.3 Hücre Membranı	11
2.4. Patogenez ve Virulans	11
2.4.1. Konağa Ait Faktörler	11
2.4.2 Mantara Ait Faktörler (Virulans Faktörleri)	14
2.5 Risk Grubunda Bulunan Hastalarda <i>Candida</i> İnfeksiyonlarını	18
Kolaylaştıran Faktörler	
2.6. Risk Grubunda Bulunan Hastalarda <i>Candida</i> Türlerinin	19
Epidemiyolojik Dağılımı	
2.7. <i>Candida</i> İnfeksiyonları	19
2.7.1. Yüzeysel Kandidoz Tipleri	21
2.7.2 Derin Kandidoz	23
2.8. Tanı	28
2.8.1. Klinik Örneklerin Direkt İncelenmesi	28
2.8.2 <i>Candida</i> İzolasyonu.....	29
2.8.3 Karbonhidrat Fermantasyon ve Asimilasyon Testleri.....	31
2.8.4 CHROMagar	31
2.8.5 <i>Candidalarda</i> Serolojik Tanı	31
2.8.6. Mantarların Tanısında Moleküler Yöntemler	32
2.8.7 Kandidemi Tanısında PZR`ın kullanımı	34

2.8.8	Çoğaltılan Ürünün Saptanması ve Değerlendirilmesi	39
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	41
3.1.	Gereç	41
3.1.1.	Çalışma Grubu	41
3.1.2.	Klinik örneklerin çalışmaya alınışı ve çalışma prosedürü	41
3.1.3.	Ayıraç ve Gereçler	43
3.2.	Yöntem	44
3.2.1.	PZR Yöntemlerinin Analitik Duyarlılıklarının Tespiti	44
3.2.2.	<i>Candida</i> DNA Ekstraksiyonu	44
3.2.3.	<i>Candida</i> DNA'sının Amplifikasyonu	49
3.3.	Amplifiye <i>Candida</i> DNA'sının Agaroz Jel Elektroforez ile Görüntülenmesi	50
3.3.1.	Elektroforez İşlemleri	50
4.	BULGULAR	57
4.1.	Hasta Profilleri	57
4.2.	PZR ve Optimizasyon	59
4.2.1.	MagNA Pure	59
4.2.2.	Qiagen	61
4.3.	Testlerin Analitik Duyarlılığı	61
4.3.1.	Otomatize MagNA Pure LC (Roche) Protokolü	61
4.3.2.	Modifiye manuel (Lyticase (sigma)+QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)) Protokol	62
4.4.	Hasta Kanlarında PZR	62
4.4.1.	Otomatize MagNA Pure LC (Roche) Protokolü	63
4.4.2.	Modifiye manuel (Lyticase (sigma) + QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)) Protokol	64
4.5.	Kan Kültüründe Üreyen <i>Candida</i> Türleri	66
4.6.	PZR ve Kan kültürü pozitif hastaların primer hastalıkları	67
4.7.	<i>Candida ların</i> kan kültüründe saptanma süresi	67
4.8.	Kan kültürü ve PZR yöntemlerinin sonuçları	67
4.9.	Kan kültürü ve PZR yöntemlerinin süreleri	68
4.10.	Kan kültürü ve PZR yöntemlerinin maliyetleri	69

4.11. Kan Kültür Ve PZR Negatif Hastaların; İdrar, Katater, Dışkı ve Boğaz Kültür Sonuçları	72
4.12. Sistemik kandidiyazis tanısını destekleyen bulguların varlığı	75
4.13. Risk Faktörleri	76
4.13.1. Nötropeni süresi	76
4.13.2. Nötropeni düzeyi	76
5. TARTIŞMA	78
5.1. Hastalar ve Yattığı Klinik Birimler	78
5.2. Hastaların Altta Yatan Primer Tanıları	79
5.3. Risk Faktörleri ve Sistemik Kandidiyaz Tanısını Destekleyen Bulguların Varlığı	79
5.3.1. Nötropeni süresi	80
5.3.2. Nötropeni düzeyi	80
5.4. Kandan İzole edilen <i>Candida</i> Türleri ve İzolasyon Sıklığı	81
5.5. Kandidemi'nin Tanısı	82
5.5.1. Kültür	82
5.5.2. Moleküler yöntemler ve PZR	83
6. SONUÇ	89
ÖZET	91
KAYNAKLAR	93

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NK	Natural Killer: Doğal öldürücü
IL-8	İnterlökin-8
ELISA	Enzyme Linked Immun Assay
IgG	İmmünglobülin G
SDA	Sabouraud Dekstroz Agar
KHT	Kök Hücre Tranplantasyonu
Taq	Thermus aquaticus
ATCC	American Type Culture Collection
IV	İntravenöz
EDTA	Etilen Daimin Tetra Asetik Asit
bp	Baz çifti
TNF	Tümör nekrozis faktör
IL1	İnterlökin 1
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni stimulating faktör
AIDS	Acquired Immun Deficiency Syndrome
SAP	Sekretuvar Aspartik Proteinaz
DM	Diabetes Mellitus
GİS	Gastro İntestinal Sistem
GÜS	Genito Üriner Sistem
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
PAS	Periyodik Asit-Schiff
KOH	Potasyum Hidroksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
PFGE	Pulse Field Gel Electroforesis
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
T_m	Melting Temperature
EtBr	Etidyum Bromürle
TBE	Tris-borate

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1 Kanlı besiyerinde üreyen <i>Candida albicans</i> kolonileri	29
2.2 <i>Candida albicans</i> Germ Tüp Testi	30
3.1. MagNA Pure Cihazı	45
3.2 MagNA pure cihazı ile nükleik asid izolasyon adımları	47
4.1 ile 4.10 arası PZR bant görüntümleri	60-65
Form	
Ek 1: Hasta İzlem Formu	53
Ek 2: Çalışmaya alınan hastaların bölümlere dağılımı, tanıları ve yaşları	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1 Tıbbi önemi olan mantarların taksonomik şeması	6
2.2 <i>Candida</i> türlerinin morfolojik ayırımı	8
2.3 <i>Candida</i> türlerinin asimilasyon ve fermentasyon özellikleri	9
2.4 Yüzeysel ve derin kandidozlarda predispozan faktörler	18
2.5 <i>Candida</i> İnfeksiyonlarının Klinik Formları	20
2.6 Bazı ısıya dayanıklı DNA polimerazlar ve kaynakları	36
3.1 MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Roche) İçeriği	43
3.2 QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) Kit İçeriği	43
3.3 Amplifikasyon Taq PCR Core Kit (Qiagen) Kit içeriği	44
3.4 Reaksiyon karışımı	49
3.5 Termal çevirici cihaz programı	50
4.1 Hastaların yattığı klinik bölümler	57
4.2 Erişkin ve pediatrik, erkek ve kadın hasta yaşlarının; ortalamaları, ortanca değerleri, alt ve üst sınır değerleri	57
4.3 Altta Yatan Primer Hastalıklar	58
4.4 <i>Candida</i> amplifikasyonu için gerekli reagenler ve miktarları	59
4.5 <i>Candida</i> DNA ekstraksiyonunda hazır kitler	66
4.6 PZR ve Kan kültürü pozitif hastaların primer hastalıkları	67
4.7 <i>Candida</i> 'ların kan kültüründe saptanma süresi	67
4.8 Kan kültürü ve PZR yöntemlerinin sonuçlarının karşılaştırılması	68
4.9 Kan kültürü ve PZR yöntemlerinin sürelerinin karşılaştırılması	69
4.10 Kan kültürü ve PZR yöntemlerinin maliyetlerinin karşılaştırılması	70
4.11 Kan kültürü pozitif hastaların diğer kültürlerinde <i>Candida</i> araştırılması	71
4.12 Kan kültürü negatif hastaların diğer kültürlerinde <i>Candida</i> araştırılması	73
4.13 Sistemik kandidiyazis tanısını destekleyen bulguların varlığı	75
4.14 Hastaların Nötropeni Düzeyi ve Süresinin Karşılaştırılması	76
4.15 Risk faktörleri	77
5.1 Hastaların Nötropeni Düzeyi ve Süresinin Karşılaştırılması	80
5.2 <i>Candida</i> DNA ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması	85
5.3 <i>Candida</i> PZR yöntemlerinde analitik duyarlılıkların karşılaştırılması	87

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Candida türleri doğada yaygın, insan; deri, solunum, gastrointestinal ve kadın genital sistem floralarında bulunabilen maya morfolojisinde mantarlardır (1).

Fırsatçı patojenler olup, hazırlayıcı bazı faktörlerin varlığında kandidoz olarak tanımlanan yüzeysel ya da derin; akut ya da kronik; lokal ya da yaygın infeksiyonlara neden olabilirler (2,3).

Bağıışıklık sistemi baskılanmış akut lösemisi olan ve kök hücre transplantasyonu (KHT) yapılan hastalar başta olmak üzere malignensileri nedeni ile sitotoksik kemoterapi alan febril nötropenik hastalarda; *Candidalar*, fırsatçı ve invaziv fungal infeksiyon etkenleri arasında ilk sırada yer alırlar (3).

Kandidemi, nötropenik hastalarda çok korkulan bir risk faktörüdür. Çünkü immun sistemi baskılanmış bu hasta gruplarında ciddi morbidite ve mortaliteye yol açabilen, tedavisi güç ve pahalı infeksiyonlardır (4).

Bağıışıklık sistemi baskılanmış hastalarda tedavi seçeneklerinin daha az başarı şansına sahip olduğu infeksiyonun ilerlemiş düzeyine ulaşıldığı dönemde alınan kan kültürlerinde genellikle *Candida* izole edilebilmektedir.

Oysaki, kandidemilerin erken tanısı ile özellikle hematolojik malignensili hastalarda özgün antifungal tedaviye henüz fungal kitleler büyümeden başlanması yaşam süresini uzatmaktadır (4).

Bu nedenlerle hızlı moleküler yöntemlere gereksinim duyulmaktadır.

Bu çalışmada, hastalardan ateşin yükselmeye başladığı ilk saatlerde antifungal tedaviye henüz başlanmadan alınan venöz kan örneklerinde;

1. PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemini kullanarak erken tanının konulabilmesi için *Candida DNA*'sı araştırmayı,
2. Uygulanan PZR yöntemi nitelik ve nicelik yönüyle konvansiyonel otomatize kan kültürü sistemi ile karşılaştırmayı,

3. PZR ile yapılacak DNA ekstraksiyonundaki başarı PZR sonucunu etkileyeceğinden, farklı iki ekstraksiyon kitinin; birbirleriyle uyumu, analitik duyarlılıkları, süreleri ve maliyetleri, açısından karşılaştırmayı,
4. Kan kültürü ile PZR sonuçlarının sistemik kandidiyaz tanısını destekleyen bulgularla uyumunu,
5. Nötropeni derecesi ile kan kültürü ve PZR pozitifliklerinin uyumunu
6. Kan kültürü ve PZR sonuçlarının sistemik kandidiyaz risk faktörleri ile uyumunun araştırılmasını amaçladık

2. GENEL BİLGİLER

Candida türleri doğada yaygın, insan; deri, solunum, gastrointestinal ve kadın genital sistem floralarında bulunabilen maya morfolojisinde mantarlardır (1).

Doğum sırasında veya doğumdan kısa bir süre sonra yenidoğana bulaşarak normal flora içinde yerlerini alırlar. Fırsatçı patojenler olup, hazırlayıcı bazı faktörlerin varlığında kandidoz olarak tanımlanan yüzeysel ya da derin; akut ya da kronik; lokal ya da yaygın infeksiyonlara neden olabilirler (2,3).

Candida infeksiyonlarının çoğu endojen kaynaklı olmasına rağmen; kontamine sıvılar, biyomedikal aletler, total parenteral beslenme gibi tıbbi girişimlerle ya da sağlık personelinin elinden, insandan insana ekzojen geçişte mümkündür.

Konak savunması baskılanmış hasta popülasyonunun artışı, son yirmibeş yılda; fırsatçı mantar infeksiyonları sıklığını dramatik olarak arttırmıştır (4). Bağışıklık sistemi baskılanmış bu hastaların doğal savunma mekanizmaları yeterli işlev görmediğinden hastalar her an sistemik mantar infeksiyonlarını geliştirme riski taşırlar. Ayrıca bu hastalardaki mantar infeksiyonları sıklıkla şiddetli, hızlı ilerleyen, tanısı geç konan ve tedavisi zor olan infeksiyonlardır (5).

İnvaziv fungal infeksiyonlar (IFI), akut lösemili hastalar ve kök hücre transplant (KHT) hastaları başta olmak üzere malign hastalıkları nedeni ile sitotoksik kemoterapi alan nötroopenik hastalarda morbidite ve mortalitenin en önemli nedenlerinden biridir (6).

Candidalar; bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda, fırsatçı mantar infeksiyonlarına neden olan invaziv fungal etkenler arasında ilk sırada yer alan mantarlardır (6).

2.1. Tarihçe ve Taksonomi

Mantarlar, 1969'da Whittaker tarafından doğadaki canlıları beş evrene ayıran yeni sitemde; bitkiler, hayvanlar, protisler ve monerlerden ayrı bir evren olarak kabul edilmektedirler (7).

Mantar infeksiyonlarına ilişkin bilinen en eski belge M.Ö 2000-1000 arasına tarihlenen Hindu kutsal yazıtında (Samhita) bulunmaktadır ve ayakta misetomadan söz eder. Mayalarla ilgili diğer eski belgeler arasında Hipokrat (MÖ 400-300) 'ın trush biçimindeki kandidozu tartışan metni ile bir Roma'lı ansiklopedist olan Aulus Cornelius Celcus'un halen Vatikan kütüphanesi'nde korunmakta olan sekiz ciltlik De Re Medicinea'sında söz ettiği; ağız kandidiyazı, favus sayılabilir (7).

Ortaçağın sonlarına doğru infeksiyon hastalıklarından söz edilmeye başlanmış, **15-19. yüzyıl** arasında mikoloji ve özellikle tıp mikolojisinde, İtalya'da hekimlerle diğer bilim adamları mikozları ve etiyolojik etkenlerini anlamaya çalışmışlar, tarif etmişler ve tartışmışlardır. Mikolojinin kurucusu sayılan İtalyan botanist P. A. Micheli **1729'da** Nova Plantarum Genera'da mantarlarla ilgili araştırmalarını yayımlamıştır.

E. Fries (1794-1878), 'systema Mycologicum' adlı eseri hazırlayarak bugünkü mantar sistematığının esasını kurmuştur. **1853'de** Robin *Candida albicans*'ı pamukçuklu şahısların lezyonlarında incelemiş ve basit bir kültürünü de elde etmiştir (7).

1861'de Zenker, ilk sistemik kandidoz vakasını bildirmiştir **1875'de** Haussmann, oral ve vaginal pamukçuğun etiyolojik ajanının aynı olduğunu belirtmiş ve infantlara; annenin vaginal lezyonlarından geçtiğini göstermiştir **1890'da** Zopf, kandidozun kullanılan ilk ismi olan moniliazisten esinlenerek mantarı "Monilia albicans" olarak isimlendirmiştir (8).

Yirminci yüzyılın başlarında Castellani, Monilia albicans dışında diğer türlerinde kandidozda etken olabileceğini ileri sürmüş, günümüzde *C guillermontii*, *C krusei*, *C kefyri* ve *C tropicalis* olarak bilinen türleri ilk olarak tanımlamıştır (8)

1954'te Paris'te yapılan 8. Botanik kongresi'nde 'Candida' cins ismi olarak kabul edilmiştir (2). **1963'te** medikal yönden önemli 5 tür tanımlanmıştır. Bunlar;

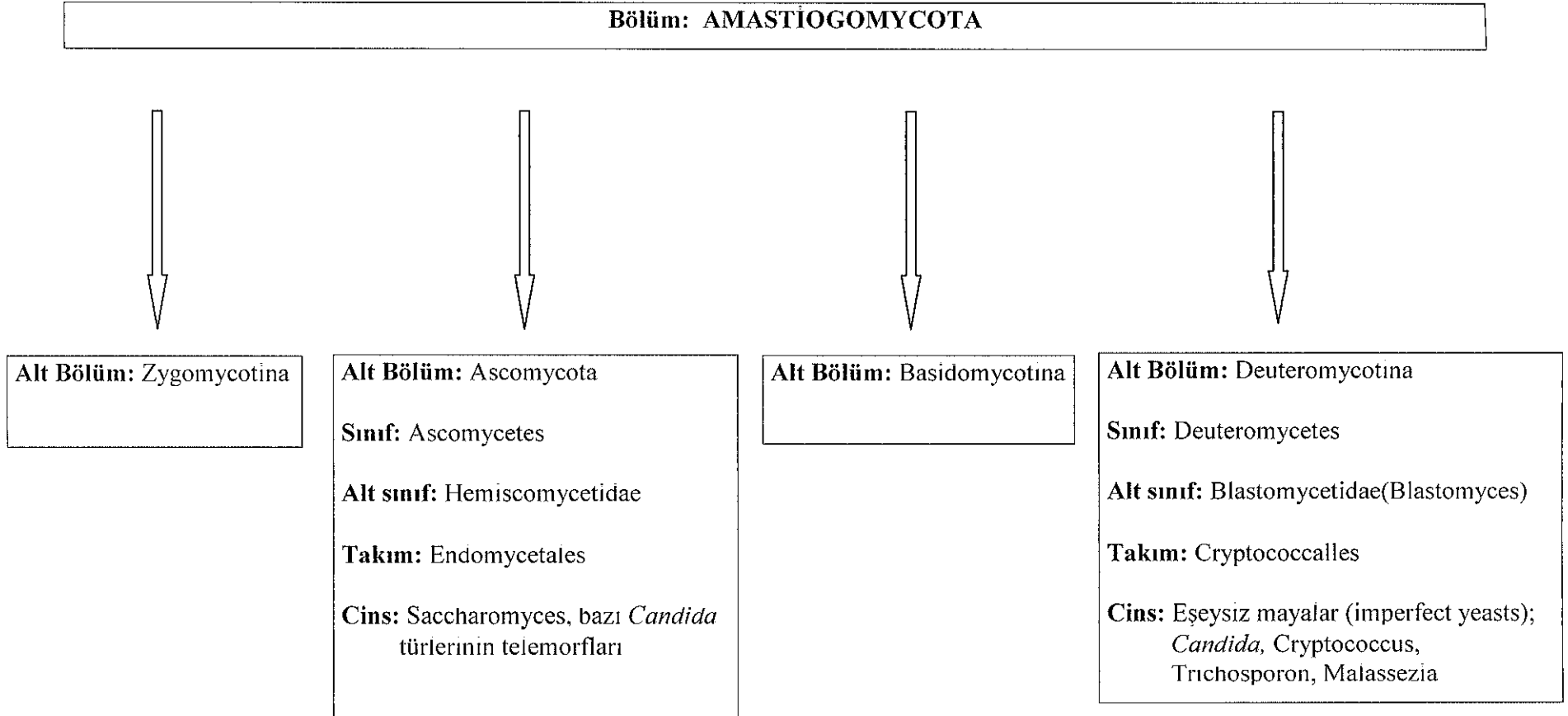
C. albicans, *C. stllatoidea* (günümüzde *C. albicans*'ın sinonimi olarak kabul edilir), *C. Parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guillermontii*'dir (9)

Mantarların isimlendirilmesi International Code of Botanical Nomenclature tarafından yürütülmektedir. Mantarlar; eşeyli üreme biçimleri, yaşam döngüleri, yapıları ve fizyolojik özelliklerine göre sınıflandırılmaktadırlar (10).

Candida genusu heterojen bir yapıya sahiptir. Telemorfik genuslar, *Candidalar*'ın cinsel formları olarak tanımlanmaktadır (2,8).

Tıbbi önemi olan mantarların taksonomik sınıflaması çizelge 2.1.' de gösterilmiştir (11).

Çizelge 2.1. Tıbbi önemi olan mantarların taksonomik şeması



2.2. *Candida* Türlerinin Genel Özellikleri

Candida türleri 3-6 µm büyüklüğünde, ince duvarlı, kapsülsüz, ökaryotik maya formunda mantarlardır. Eşeyli (telemorfik) üreme özelliği gösterebilmesine karşın esas olarak tomurcuklanarak (aseksüel=anamorfik) çoğalırlar. Tomurcuklanarak oluşan yavru hücreye blastokonidya veya blastospor adı verilir. Yavru hücre ana hücrenin aynıdır, ana hücreden ayrılabilir veya ayrılamaz. Dokularda 3 morfolojik şekilde görülür; **maya, yalancı hif ve gerçek hif. Yalancı hif (pseudo hif)**, arka arkaya tomurcuklanan blastokonidyumların birbirinden ayrılmayıp uzayarak ve aralarında boğumlar oluşturarak yaptıkları hücreler zinciridir. **Gerçek hif**, maya hücresinin boğum yapmadan filamantöz uzantılar oluşturmasıdır. *Candida* türlerinin gerçek hif oluşturup oluşturmadıkları germ tüp testi ile saptanabilmektedir. *Candida albicans* ve *Candida dubliensis* germ tüp oluşturabilmektedir (2,8,16)

Sabouraud dekstroz agar (SDA), gibi rutin besiyerlerinde, oda ısısı (22⁰-26⁰C) ve 37⁰C'de kolaylıkla ürerler. Mayaların 37⁰C'de üreme özelliği önemlidir. Çoğu patojen tür 25-37⁰C'de üreyebilirken, patojen olmayan türler genel olarak 37⁰C'de üreyemezler (8)

SDA'da üreyen maya kolonilerinin incelenmesi tür hakkında ön fikir verebilse de *Candida* türlerinin morfolojik özellikleri, mısırunlu Tween 80 agar besiyerinde incelendiğinde daha iyi gözlenir. Mısırunlu Tween 80 agar besince fakir bir ortam olup maya hücreleri bu besiyerinde yedek besin toplayan klamidosporeler oluştururlar (Şekil 2). Klamidosporeler 8-12 µm büyüklüğünde, küresel kalın duvarlı dirençli sporelerdir. *Candida albicans* ve *Candida dubliensis* mısırunlu Tween 80 agar besiyerinde klamidospor oluştururlar ve diğer *Candida* türlerinden ayırt edilirler (2,8,17)

Klinik örneklerden mantarların izolasyonu için en yaygın kullanılan besiyerleri SDA, kanlı beyin-kalp infüzyon (BHI) agardır. Bu besiyerlerine; kloramfenikol + gentamisin veya penisilin + streptomisin veya kloramfenikol + sikloheksimid antibiyotik kombinasyonları eklenerek besiyerleri seçici duruma getirilebilir.

Kloramfenikol + gentamisin ilave edilmiş SDA; geniş antibakteriyel etki spektrumuna sahip olması, güvenli şekilde otoklavlanabilmesi nedeniyle *Candida* türlerinin üretilmesinde en sık tercih edilen besiyeridir (18).

Kolonileri; yumuşak kıvamlı, düzgün yüzeyle ve kirli beyaz renkte genellikle S tipi kolonilerdir (8).

Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin ayırımında kullanılan morfolojik özelliklerinin (Çizelge 2.2) yanı sıra; türlerin kesin tanısı şeker fermentasyon ve asimilasyonu gibi biyokimyasal testlerle konulur (Çizelge 2.3) (1,8)

Çizelge 2.2. *Candida* türlerinin morfolojik ayırımı (8)

<i>Candida</i> Türleri	Germ Tüp	Klamidospor	37 °C'de Üreme	42 °C'de Üreme
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	-	-	+	-
<i>C. glabrata</i>	-	-	+	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	+	-
<i>C. krusei</i>	-	-	+	-
<i>C. guilliermondi</i>	-	-	+	-
<i>C. catenulata</i>	-	+	+d	-
<i>C. dubliensis</i>	+	+	+	-
<i>C. famata</i>	-	-	+	-
<i>C. kefyr</i>	-	-	+	-
<i>C. lambica</i>	-	-	+d	-
<i>C. lipolytica</i>	-	-	+	-
<i>C. lusitaniae</i>	-	-	+	-
<i>C. pelliculosa</i>	-	-	+	-
<i>C. pintolopestisii</i>	-	-	+	-
<i>C. rugosa</i>	-	-	+	-
<i>C. zeynaloides</i>	-	-	-	-

Çizelge 2.3. Candida türlerinin asimilasyon ve fermentasyon özellikleri (1)

Candida Türleri	ASİMİLASYON												FERMANTASYON				
	D	M	S	L	G	M	S	İ	K	R	T	D	D	M	S	L	G
<i>C. albicans</i>	+	+	+d	-	+	-	-	-	+	-	+	-	F	F	-	-	F
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	F	F	F	-	F
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	F	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	F	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	F	-	F	Fd	F
<i>C. catenulata</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	Fd	-	-	-	-
<i>C. dubliensis</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-					
<i>C. famata</i>	+	+	+	+d	+	+	+	-	+	+	+	+d	Fd	-	Fd	-	-
<i>C. kefir</i>	+	-	+	+	+	-	+d	-	+d	+	-d	-	F	-	F	Fd	F
<i>C. lambica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	F	-	-	-	-
<i>C. lipolytica</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. lusitanae</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	F	-	F	-	F
<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+d	-	+	+	+	-	+	-	+	-	F	-	-	-	-
<i>C. pintolopestisii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-
<i>C. rugosa</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+d	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. zeynatoides</i>	+	-	-	-	-d	-	-d	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

D: Dekstroz, M: Maltoz, S: Sukroz, L: Laktoz, G:galaktoz, M:mellebiyoz S: sellebiyoz, İ: Inositol, K: Ksiloz, R: Rafinoz, T:Trehaloz, D:Dulsitol

2.3. *Candida* Hücresinin İnce Yapısı

2.3.1. Hücre İskeleti

Fungal iskelet turgor basıncına karşı koyan ancak, dinamik bir sistemdir. İskelet, hücre duvarı ve hücre membranı ile bağlantılıdır. İskelet komponentlerinden olan mikrotübüller, membranın hareketliliğinde rol alırlar. İskeletin bir diğer bileşeni olan aktin, sitoplazmik akışkanlıktan sorumludur. Miyozin ise, aktinle birlikte organellerin hareketliliğini sağlar.

İskelet komponentlerinin birbirleri ile ilişkileri açısından Ca^{++} , Mg^{++} , H^+ iyonlarının yoğunlukları önemlidir. Bu iyonların hücre içine giriş, çıkışları organellerin hareketliliği ve hifal uzama düzenlenir. İyonlar, ek olarak mitoz, mayoz, tomurcuklanma, septum oluşumu yani morfogenez ve de protein kinaz gibi bazı enzimlerin regülasyonunda da rol alırlar (19).

2.3.2. Hücre Duvarı

Hücre duvarı sert bir yapıda olup, hücreye şekil verir. Osmotik basınca bağlı hücre patlamasına karşı koyar. Çeşitli moleküllerin iç ve dış ortama geçişlerinde rolü vardır. Hücre duvarı, maya hücresinin değişik yüzeylere tutunmasında (adezyon) doğrudan görev alır. Duvar yapısında bazı maddeler antifungal ajanlar için hedef oluştururken, bazıları aynı zamanda immünolojik 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 (19).

Candida albicans'ın maya ve hifal formlarında glukan ve manan içeriği benzerdir fakat, hifal hücrelerde kitin miktarı maya hücrelerine göre üç kat daha fazladır.

Elektron mikroskopik çalışmalara göre, *Candidalar*'ın hücre duvarı en az 5 katmanlıdır. Maya-hif dönüşümü sürecinde bu sayı ve kalınlık değişir. Ayrıca ortamda yüksek yoğunlukta şeker varlığında en dıştaki mannoprotein katman kalınlaşır ve fibriller oluşumları artar.

2.3.3. Hücre Membranı

Hücre membranı taşıdığı ozmoenzimler aracılığı ile moleküllerin iç ve dış ortam geçişinde rol alır. Kitin sentetaz gibi, duvar komponentlerinin sentezinde rolü olan enzimler de mebranda bulunurlar. Ayrıca *C. albicans*'ın morfogenezi (maya hif dönüşümü ve hifal uçtan uzama) için gerekli olan sinyal iletiminde rol alan fosfolipaz C, adenilat siklaz. Proteaz gibi enzimlerde membranda yer alırlar. *Candidalar*'ın hücre membranında; fosfotidil kolin, fosfotidil etonolamin, fosfotidil serin ve fosfotidil inozitol gibi fosfolipidler bulunur (19)

Tüm mantarlarda olduğu gibi, *Candidalar*'ın da hücre mebranında bulunan sterol, membran lipidlerinin % 20 'sini oluşturur. Sterolün % 95'i ergosterol formundadır. Ergosterol, hücre membranına etkili antifungal ilaçlar için en önemli hedeftir (19).

2.4. Patogenez ve Virulans

Candida infeksiyonlarının patogenezinde konağa ve mantara ait faktörler birlikte rol alırlar. *Candida* türlerinin virülans faktörleri; hücre duvar bileşenleri, ekstrasellüler matriks proteinlerine adezyonu sağlayan yüzey integrin benzeri molekülleri, slime yapımı, proteinaz ve fosfolipaz enzimleri, endotoksin benzeri aktivite, moleküler benzeme, hif formu ve çimlenme borusu oluşturma, fenotipik değişimdir. Bu virülans faktörleri *Candida* infeksiyonlarının oluşmasında önemlidir. Ancak, fırsatçı mantar infeksiyonlarında konağa ait faktörler daha ön plana çıkmaktadır (19)

Patogenez

2.4.1. Konağa Ait Faktörler

Candida türleri mukozal yüzeylerde kommensal olarak bulunan mantarlardır. Konağın *Candida* infeksiyonlarına karşı ilk engeli sağlam epiteldir. Deri yaralanmasına neden olan olaylar sağlıklı bireylerde dahi kutanöz kandidoza neden olabilir. Deride çeşitli nedenlerle oluşan hasarlar *Candidalar*'ın çoğalmasına ve invaziv hale gelebilmesine yol açabilmektedir (19).

Altta yatan akut myeloid veya akut lenfoid lösemi gibi hematolojik malignitelerde, malign kemik iliği hücrelerini tümüyle ortadan kaldırmaya yönelik kemoterapi, hastaların nötropenik hale gelmesine neden olmaktadır. Derin ve uzun süreli nötropeni durumunda hastalar, kuşku edilen ya da tanımlanan bakteriyel infeksiyonlara karşı antibiyotik alırlar. Ancak ateş ve diğer infeksiyon belirtileri antibiyotik kullanımına rağmen devam ederse, hastaların sıklıkla sistemik fungal infeksiyonlara karşı da tedavi edilmeleri gerekli hale gelir. Sistemik fungal infeksiyonların ciddi morbidite ve mortaliteye yol açtığı bu hasta grubunda immün sistemin rolü çok önemlidir (20).

***Candida* İnfeksiyonlarında İmmün Sistemin Rolü**

İmmün sistemin invaziv fungal patojenlere karşı koruyucu görev üstlenen ana komponenti **monosit-makrofaj sistemi ve nötrofillerdir**.

Hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda monositler ve doku makrofajları mantar sporlarının yerleşmesi ve miçel oluşumunun önlenmesinde etkili hücrelerdir. Ancak miçelyum yerleşmişse bunların eradikasyonu için nötrofillerin fagositik etkinliklerine ihtiyaç vardır. Makrofajlar, akciğerler gibi invaziv fungal infeksiyonlara karşı risk altında bulunan organlarda değişik mekanizmalarla aktif olarak fungal mikroorganizmaları fagosite eder ve öldürür. Dolaylı olarak antifungal ajanları infeksiyon bölgesine ulaştırabilir. Bunlara ilave olarak tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin 1 (IL1), interlökin 8 (IL8) ve granülosit-makrofaj koloni stimulating faktor (GM-CSF) gibi sitokinleri salgılayarak granülositlerin infeksiyon bölgesine göçüşünü sağlarlar. Özellikle *Candida* ve *Cryptococcus* infeksiyonlarına karşı T lenfositlerine de ihtiyaç duyulabilir.

Monosit- makrofaj sisteminin regülasyonu T lenfositlerden salgılanan (GM-CSF), gamma interferon, IL-4 ve IL-10 gibi sitokinlerle olur.

Candida infeksiyonlarına karşı; yalancı hifleri parçalayabilme, blastosporları fagosite ederek öldürebilme özelliklerinden dolayı polimorf nüveli lökositler, konak savunmasında önemli rol oynamaktadırlar.

Monosit ve eozinofillerin de *Candida* türlerini öldürebilme özellikleri vardır. Trombositlerin de *Candida* türlerine karşı etkileri bulunmaktadır. Bazı *C. albicans* suşlarının trombositlerden salgılanan mikrobisidiyal proteinlere karşı diğer suşlardan daha duyarlı olduğu tavşanlarda yapılan bir çalışmada gösterilmiştir.

Serum ve plazma, antikor içermelerine rağmen tek başlarına *Candida* hücrelerini öldürememektedirler. Myeloperoksidaz, hidrojen peroksit ve süperoksit anyon sistemleri *C. albicans*'in hücre içi öldürülmesinden sorumlu temel sistemlerdir.

Doku makrofajlarının da konak savunmasında rolü bulunmaktadır. Kronik mukokutanöz kandidozlu hastaların lenfositlerinde fonksiyon bozukluklarının saptanması ve AIDS (Acquired Immun Deficiency Syndrome) hastalarının kutanöz kandidoza duyarlı olmaları konak savunmasında lenfositlerin de yer aldığını göstermektedir. Lenfosit yanıtını etkileyen en önemli hücre yapısı manmandır.

Isı stabil ve ısı labil serum opsoninlerinin, *C. albicans*'in nötrofiller tarafından sindirilmesini kolaylaştırması ve immunoglobulin G'nin *C. albicans*'i opsonize etmesi, *Candida* infeksiyonlarında humoral bağışıklığın da önemli olduğunu göstermektedir.

Serum demir bağlayan proteinlerin *Candida*'ların gelişiminde rolü olan demiri bağlayarak büyümesini engellediği bilinmektedir.

Candida blastosporlarının optimal opsonizasyonu için komplemanın gerekliliği ve C3b'nin blastosporlara bağlandığı in-vitro olarak gösterilmiştir. *Candida* tarafından hem klasik hem de alternatif yollar uyarılmakla birlikte daha önemli olan alternatif yoldur.

Candida canlı dokuya girdikten sonra mikroapseler oluşabilir. Dokuda hem maya hem de hif formları bulunur. İlk hücresel yanıt granülositlerle verilir. Histiyositler, dev hücreler ve epitelooid hücreler inflamasyonlu bölgeye ilk gelen hücrelerdir. Sonuçta granülamatöz yangı oluşur.

İmmun sistemi baskılanmış hastalarda, inflamatuvar yanıt en düşük düzeyde olabilir veya hiç izlenmez (20,21,22).

2.4.2 Mantara Ait Faktörler (Virulans Faktörleri)

Hücre Duvarı-Mannoprotein: *Candidalar*'ın virulansında hücre duvar komponentlerinden mannoprotein önemli olup antijen olarak konağa sunulur. Bu komponentler kuvvetli immunomodülatör etkili moleküllerdir. Mannan hücre sel ve humoral yanıtı artırır veya baskılayarak infeksiyonun sürekliliğine neden olur (19).

Yüzey Değişimi ve Hidrofobisite: İn vitro deneylerde besiyerindeki yüksek şeker konsantrasyonuna bağlı olarak hücre yüzey yapılarını değiştirebilen *Candida* kökenleri; adezyon ve virülanslarını artırmaktadırlar. Yüzey değişiminin yüksek konsantrasyonlardaki şekerler tarafından indüklenmesi, in vivo önemli olup karbonhidrattan zengin diyetle beslenen kişilerde oral kandidoz gelişmesini açıklayabilir.

Tomurcuklu hücreden germ tübe geçişte hücre yüzey bileşiminde birçok değişikliklerin olması çeşitli adezinlerin oluşumunu ve aynı zamanda hücre yüzey hidrofobisitesini etkilemektedir. Hidrofobisite, *C. albicans*'ın plastik yüzeylere ve insan epitel hücrelerine bağlanma yeteneği ile uyumludur. Güçlü hidrofobik özellikteki kökenlerin yanak epitel hücrelerine en iyi şekilde bağlandıkları gözlenmiştir (19).

Adezyon: Glikoproteinler ve glikolipidler hücre yüzeyinde yaygın olarak bulunan makromoleküller olup kolonizasyon ve izleyen infeksiyon için konak hücreye tutunması gereken mikroorganizmalar açısından uygun bir reseptör olarak iş görürler.

Candida türlerinin hücre duvar yapısında bulunan mannan, adezyonu kolaylaştırmakta ve hücre sel yanıtı bozarak immun sistemi baskılamaktadır. *Candidalar* 'ın oral, vaginal epitel hücrelerine, fibronektine, endotele, trombosit fibrin pıhtılarına, akrilik ve plastik materyale adezyonu, patogeneizde önemli bir basamaktır. Adezyon; maya hücresi yüzey hidrofobisitesi, mayanın fenotipi, pH,

ısı, hamilelik, diabet ve konak florasında bulunan diğer mikroorganizmalar gibi faktörlerden etkilenmektedir.

Candida albicans'ın çimlenme borusu oluşturması adezyonu kolaylaştırır da adezyon için zorunluluk değildir. *Candida albicans*'ın konak hücre yüzeyine adezyonu karmaşık bir işlem olup bu süreçte birden fazla adezin ve adezyon mekanizmasının iş görmesi olasıdır (19)

Yüzey Adezinleri, Konağın epitel ve endotel hücrelerine tutunmada rolleri olan moleküllerdir.

iC₃b resptörü, Maya hücre yüzeyindeki bu molekül, konak hücre yüzeyindeki arjinin-glisini-asparajin (RGD) tabiatındaki reseptörlere tutunur. Bu molekül, memelilerdeki CR-3 integrin reseptörleri ile benzerlik gösterir. Molekülün, nötrofiller tarafından mayaların fagositozunu engellediği öne sürülmektedir.

C₃d resptörü, Komplemanın C₃d komponenti için reseptör görevi gören ve memelilerdeki CR-2 integrin reseptörü ile benzerliğe sahip bir moleküldür. Glukoz ve mannoz açısından zengin olup, özellikle plastik yüzeylere tutunmada rol alır. **Fibronektin reseptörü**, Konak hücreye tutunmada Ca⁺⁺ iyonlarına bağımlılık gösteren bir moleküldür. *Candida albicans* ve *Candida tropicalis* kökenleri fibronektin resptörleri aracılığı ile subendotelyal ekstra sellüler matris proteinlerine (EMP) tutunur; ayrıca böbrek, karaciğer ve beyindeki hücrelerde bulunan (RGD) peptidlerine bağlanırlar.

Östrojen reseptörü, Üreme hormonlarının vajial epiteldeki glikojeni arttırıcı etkisi ve maya hücrelerindeki östrojen reseptörleri, vajinal kolonizasyonu arttırır

Laminin reaseptörü, Bu reseptörün aracılığı ile *Candidalar*, aortik ve mikrovasküler endotelyal hücrelerdeki ligandlara tutunurlar. Laminin reseptörleri, *C. albicans*'ın sadece germ tüp ve hifal formunda saptanmıştır.

Fibrinojen bağlayan proteinler, Bu reseptörler *C. albicans*'ın germ tüp ve hifal formunda bulunur. Özellikle böbrek ve üretral epitellere tutunmada rol alırlar (19,23).

Slime Yapımı: Slime yapımı *Candidaların* katetere bağlı infeksiyonlarında önemli bir faktördür. Kateterlere adherans ve kolonizasyonda “slime” yapma özelliği, konağa ait fibrin ve fibronektinle birlikte hareket eder. Yapılan çalışmalarda yüksek oranda “slime” üretimi saptanan *C parapsilosis*, bu özelliği nedeniyle biyomedikal aletlere bağlı infeksiyonlarda dikkat çekmektedir. Glukoz içeren solüsyonlarda

C. lipolytica ’nın “slime” yapımını gerçekleştirdiği ve kateter ile ilişkili kandidemi yapabildiği gösterilmiştir (24).

Proteinaz ve Fosfolipaz: *Candida* türlerinin salgıladıkları enzimler, dokulara yayılmasına yardım etmektedir. Bu enzimlerden proteinaz ve fosfolipazın patojenitede önemi daha fazladır.

Proteinaz, İlk olarak Staib tarafından saptanan hücre dışı proteinazı, moleküler yöntemlerin kullanılmaya başlanması ile araştırılmış ve sekretuar aspartik proteinazın (Sap) salgılanmasının on üyeden oluşan SAP adı verilen bir gen ailesi tarafından kontrol edildiği ortaya konmuştur. SAP gen ailesinin *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. dubliniensis* gibi patojen türlerde bulunması, *Saccharomyces cerevisiae* gibi patojen olmayan mayalarda bulunmaması patojenite ile ilgisini göstermektedir. AIDS hastalarının sağaltımında kullanılan HIV-proteaz inhibitörlerinin, Sap enzimlerini inhibe ederek *C. albicans* ’ın adezyonunu azalttığının gösterilmesi ve bu sağaltımı alan AIDS hastalarında orofaringeal kandidoza daha az rastlanması, Sap enzimlerinin önemini vurgulamaktadır. Yapılan bir başka çalışmada, semptomatik AIDS hastalarının oral kavitelelerinden elde edilen *C. albicans* izolatlarının salgıladığı aspartik proteinazın, sağlıklı kişilerden elde edilen izolatların salgıladığı miktardan sekiz kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Sap enziminin temel işlevlerinden biri konak proteinlerini parçalayarak nitrojen sağlamaktır. Bu enzimlerin, konak hücre yüzey yapılarını ve hücreler arası yapıları parçalayarak mikroorganizmanın adezyon ile invazyonunda ve konak immün sistem hücrelerini parçalayarak konak savunmasından kaçışında rol aldığı bildirilmektedir (25).

Fosfolipaz, Fosfolipaz enzimi; konak hücre zarındaki fosfolipitleri hidrolize ederek, hücreye zarar verir. Konak hücre membranının hasarının ardından, konak hücreye invazyon gerçekleşir.

C. albicans'ın maya formunda, hif formuna göre fosfolipaz aktivitesinin daha yüksek olduğu saptanmıştır. Enzim, epiteliyal hücre zarlarında hasar oluşturduğu sırada oluşan hifsel uçların sitoplazmaya girişine neden olmaktadır.

İlk olarak 1960 yılında Costa ve ark., *C. albicans*'ın ekstrasellüleri fosfolipaz enzimi salgıladığı bildirilmiş; ardından 1982 yılında Price ve ark. *C. albicans*'ta fosfolipaz enzimini saptamak amacıyla SDA besiyerine yumurta sarısı ilave ederek plak metodunu gerçekleştirmişlerdir. Yöntem 1984 yılında Samaranayake tarafından modifiye edilmiştir. (26,27)

Patojen *Candida*'larda genellikle % 30-55 oranında enzim üretimi saptanmaktadır. Fosfolipaz enziminin virulanstaki rolünde varlığı kadar miktarda önemlidir. Fosfolipaz aktivitesi en çok *C. albicans*'ta görülmekle birlikte, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* ve *C. krusei*, *C. lusitaniae* ve *C. krusei* türlerinde de saptanmıştır.

Bütün fosfolipazların substratı fosfolipidler olmasına rağmen her biri spesifik bir ester bağımlı parçaladığından A,B,C,D gibi isimlendirmelerle ayrılırlar. *C. albicans*, *C. glabrata*, fosfolipaz B, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*'de, fosfolipaz C varlığı tanımlanmıştır (26).

Fosfolipaz aktivitesini saptamak için günümüzde radyometrik ve kolorimetrik yöntemler geliştirilmektedir (26,27).

Endotoksin Benzeri Aktivite: *C. albicans*'ın hücre duvarında bulunan glikoproteinlerin endotoksin benzeri aktiviteleri vardır. Ancak bu etki, bakteri endotoksinlerinde olduğu kadar güçlü değildir (28).

Hif Formu ve Çimlenme Borusu: Hif şeklinin maya şekline göre dokuya 50 kez daha fazla yapışması, fagositler tarafından sindirilememesi, klinik örneklerden sıklıkla izole edilmesi, plastik yüzeylere yapışmayı sağlayan fibriller yüzey tabakaları oluşturması patogeneze ve virulanstaki rolünü kanıtlayan bulgulardır. Hiflerin ucundan proteinaz enzimi salgılandığı ve mukoza hücrelerinin membran geçirgenliğini değiştirdiği düşünülmektedir. *Candida* hiflerinde maya hücrelerine

göre daha fazla kitin ve yüksek oranda kitin sentetaz aktivitesi saptanmıştır. Kitin sentetaz morfogenezde düzenleyici rol oynamaktadır (29).

Fenotipik Dönüşüm: Mantarın genetik yapısını değiştirmeden gen aktivitesinin ekspresyonunu düzenlemesi koloni morfolojisinde değişikliğe yol açmaktadır. Vaginitli ve sistemik infeksiyonu olan hastalardan yeni izole edilen suşlarda yüksek oranda fenotipik dönüşüm görülmesi, bunun patogeneziyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu değişim büyük olasılıkla mantarın farklı anatomik bölgelere adaptasyonunu sağlayan bir faktördür (30).

2.5. Risk grubunda Bulunan Hastalarda *Candida* İnfeksiyonlarını Kolaylaştıran Faktörler

İmmun sistemi baskılanmış, invaziv tanı ve sağaltım girişimleri yapılan ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar *Candida* infeksiyonları yönünden risk grubuna girmektedirler. Risk grubunda bulunan hastalarda *Candida* infeksiyonlarını kolaylaştıran faktörler Çizelge 2.4.'te belirtilmiştir (5,31).

Çizelge 2.4. Yüzeysel ve derin kandidozlarda predispozan faktörler

•Nötropeni	•Bazı ameliyatlar (organ
•Hematolojik malignite veya solid organ malignitesi	transplantasyonları, kalp veya gastrointestinal kanal ameliyatları)
•Kemoterapi	•Hemodiyaliz
•Uzun süreli ve geniş etki spektrumlu Antibiyotik kullanımı, Kortikosteroidler	•Geniş yanık
•Önceki kolonizasyon	•Diabetes Mellitus,
•Yoğun bakım ünitesinde uzun süre kalma	•AIDS
•Santral venöz kateter, stentler	•Malnutrisyon
•Total parenteral nutrisyon	•Mekanik ventilasyon
	•İdrar sondası

2.6. Risk Grubunda Bulunan Hastalarda *Candida* Türlerinin Epidemiyolojik Dağılımı

C. albicans ve *C. parapsilosis* ekzojen nozokomiyal geçişte ön plana çıkan türlerdir.

C. albicans risk grubunda bulunan hastalardan en çok soyutlanan tür olup, ekzojen ve endojen kaynaklı infeksiyonlara neden olmaktadır

C. parapsilosis nozokomiyal özelliği en fazla olan *Candida* türüdür. Tıbbi girişimler için kullanılan cihazlar ve hiperalimentasyon gibi nedenlerle ekzojen infeksiyonlara neden olur

Yüksek virülanslı bir tür olan *C. tropicalis* ise özellikle gastrointestinal kolonizasyona bağlı invaziv infeksiyonlar yapmaktadır. Bunun yanında, ekzojen kaynaklı infeksiyonlara da neden olur.

C. glabrata'ya bağlı kandidemiler, solit tümörlü hastalar ve onkoloji dışı hastalarda saptanmaktadır. Flukonazol profilaksisi alan hastalarda bu türün kolonizasyonu kolaylaşmaktadır. Kolonizasyon daha çok genitoüriner sistem (GÜS), solunum yolları ve cerrahi yaralarda söz konusu olmaktadır. Ancak düşük virülanslı olması nedeniyle bu türe bağlı invaziv infeksiyon nadir görülür.

C. krusei genellikle GİS'te kolonize olur ve çoğunlukla hematolojik maligniteli hastalarda görülür.

C. lusitanae daha çok immun sistemi baskılanmış hastalarda, solunum yolları ve GÜS'de endojen kaynaklı infeksiyonlar yapar (3,20)

2.7. *Candida* İnfeksiyonları

Candida türleri ile oluşan klinik tablolar yüzeysel ve derin infeksiyonlar olarak iki grupta incelenir (Çizelge 2 5) (8).

Çizelge 2.5. Candida İnfeksiyonlarının Klinik Formları

■ 2.7.1 Yüzeysel Kandidoz Tipleri	
◆ Deri kandidozu	
◆ Kronik mukokutanöz infeksiyon	
◆ Onikomikoz	
◆ Orofaringeal infeksiyon	
◆ Vulvovaginit	
◆ Keratit	
◆ Konjonktivit	
■ 2.7.2. Derin Kandidozlar	
Lokal yerleşim	◆ Özefajit
	◆ Gastrointestinal kandidoz
	◆ Üriner sistem infeksiyonları (sistit, renal abse, pyelit)
	◆ Peritonit / İntraabdominal infeksiyon
Hematojen yolla yayılan infeksiyonlar	◆ Kandidemi
	◆ Kronik yaygın kandidoz (hepatosplenik kandidiyazis)
	◆ Süpüratif Flebit
	◆ Endokardit
	◆ Menenjit
	◆ Endoftalmit
	◆ Artrit
	◆ Osteomyelit

Yüzeysel kandidozlar deri ve mukozaların, derin kandidozlar ise iç organ ve sistemlerin infeksiyonlarıdır.

Candidalar'ın mukokutanöz infeksiyonları çoğunlukla hücresel bağışıklıktaki sorunlara bağlıyken, sistemik formu daha çok nötropeniye bağlıdır.

2.7.1. Yüzeyel Kandidoz Tipleri

Candida türleri toplumda; özellikle nemli kıvrım yerlerinde yüzeyel mikozlara ayrıca onikomikozlara, yenidoğan ve diş protezi kullananlarda oral lezyonlara ve kadınlarda vajinite neden olmaktadır. Ancak bu hastalıklar, önemli morbidite ve mortalite nedeni oluşturmazlar. *Candida* türleri, risk grubunda bulunan hastalarda ise lokal ve sistemik ciddi mikozlara neden olurlar (2,17).

◆ Deri Kandidozu

Derinin daha çok aksilla, memealtı, anüs çevresi, el ve ayak parmak araları gibi sıcak ve nemli kat yerlerinde görülürler (*Candida intertrigo*) Şişmanlık, Diabetes Mellitus, travma veya maserasyon predispozan faktörlerdir. Deri kandidozu hızlı başlar ve deri nemli kaldığı sürece devam eder. Yanma hissi ve kaşıntı en önemli semptomlarıdır. Lezyonlar, yüzeyel erezyonlar şeklinde kızamık ve nemli olup bazılarında veziküller gelişebilir. Sistemik kandidozun deri lezyonları makronodüler lezyonlar şeklinde olup nötropenik hastalarda daha sıktır (17).

◆ Kronik Mukokutanöz İnfeksiyon

Genellikle erken çocukluk döneminde başlayan, müköz membranlarda, kafa derisinde, deride ve tırnaklarda inatçı *Candida* enfeksiyonu ile karakterize olan ve sıklıkla bir endokrinopati; özellikle hipoparatiroidizm ve hiperadrenalizm ile birlikte giden hücresel bir immun yetmezlik sonucu gelişir. Sistemik kandidiyazis ve diğer enfeksiyonlara artmış yakınlık meydana gelmez (17).

◆ Onikomikoz

Candida'ya bağlı tırnak enfeksiyonu ellerde daha sık görülür. Tırnak ile beraber tırnak çevresindeki yumuşak dokusunda infekte olması karakteristiktir (paroniki) Hastalığın oluşumunda nem faktörü çok önemli olduğundan elleri uzun süre suya maruz kalan kişilerde daha sık görülür. Yumuşak doku kızamık, ödemli olup piyojenik bir enfeksiyon görünümü verir. Harap olan tırnak zamanla düşebilir (17)

◆ Orofaringeal Kandidoz

Yüzeyel mikozlar arasında en sık görülen infeksiyon orofaringeal kandidozlardır. Bu infeksiyon özellikle inhale steroid kullanan hastalarda, kanser ve AIDS hastalarında gözlenmektedir. Yutkunma sırasında ağrı ve angüler şelit (dudak köşelerinde çatlakların oluştuğu form) oral kandidoza eşlik eder. Yenidoğanda görülen ağız kandidozunda infeksiyon kaynağı genellikle infekte anne vaginasıdır. Farklı klinik formları vardır.

Akut pseudomembranöz oral kandidiyaz (Pamukçuk): En çok süt emen bebeklerde ve yaşlılarda görülür. Bu yaş gruplarının dışında CD4 pozitif hücre sayısı $<200/mm^3$ olan HIV (+) hastalarda, kanserlilerde ve steroid inhaler kullananlarda ortaya çıkabilir. Dil, yanak mukozası, sert damak ve gingivida ve bazen boğazda beyaz yamalardan oluşan yalancı membran meydana gelir. Yamalarda; dökülen epitel hücreleri, lökositler, mayalar ve bakteriler bulunur. Membran kaldırıldığında kanama olur. AIDS'liler dışındaki gruplarda oral kandidiyazlar genellikle kendini sınırlayıcı niteliktedirler.

Kronik atrofik kandidiyaz: Takma diş stomatiti olarak da bilinir. En çok angüler şelit formunda görülür.

Kronik hiperplastik kandidiyaz: Kandidiyal lökoplakia lezyonlarının %15-20'si malign dönüşüm gösterebilir.

Orofaringeal kandidoz, mukozanın antibiyotiklerle florasının değişmesi ve sitotoksik ilaçlarla zedelenmesi sonucu kolonizasyonu takiben gelişir. Lezyonun ilerlemesi ile özofagus, larinks, trakea ve GİS (Gastro İntestinal Sistem) mukozalarında da lezyonlar görülebilir (17).

◆ Candida Vulvovaginitisi ve Balanit

Candida, vulvovaginitlerin en sık rastlanılan etkenleri arasındadır. Vulvovaginal kandidoz gelişiminde hormonal değişiklikler rol alır. Östrojene bağlı vagende glikojen birikimi veya vagen pH'sının değişmesi nedeniyle mantar kolonizasyonun ve buna bağlı olarak *Candida* vulvovaginitinin artabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle daha çok doğurganlık çağındaki kadınlarda ve özellikle gebelerde gözlenmektedir. Geniş spektrumlu antibiyotik ve doğum kontrol hapı

kullanımı, Diabetes Mellitus önemli predispozan faktörlerdir Hastalarda; irritasyon, kaşıntı ve beyaz süt keşiği kıvamında bir vaginal akıntı görülebilir. Rekürrens önemli bir sorundur. İnfeksiyonun kronikleşme ve tekrarlama özelliğini tetikleyen faktörler; giyim malzemeleri, barsaktaki maya kolonizasyonu ve eşlerdeki kolonizasyon durumudur (17).

◆ **Penil Kandidiyaz (Balanit):** Glans peniste kaşıntı, eritem ve vezikülopüstüler lezyonlar bulunabilir. Erkeklerde en çok Diabetes Mellitus ile bağlantılıdır. Uzun süreli penil katateri olan hastalarda da kronik enfeksiyonlar meydana gelebilir. İnfekte cinsel eşlerin birlikte tedavi görmeleri önemlidir (17).

2.7.2. Derin Kandidoz

Sıklıkla fokal odakdaki kolonizasyonu takiben etkenin kana karışması ile sistemik enfeksiyon gelişir. Dissemine kandidoz daha sık olarak neoplastik hasta grubu içerisinde akut lösemililerde; büyük operasyon geçiren hasta grubu içerisinde organ nakli, kalp ve GİS operasyonu geçirenlerde ve ağır yanıklı hastalarda görülmektedir. Bu tablolarda, böbrek, beyin, miyokard ve göz tutulumu daha sık olmakla beraber; akciğer, GİS, endokrin bezler ve deri tutulumu da gözlenmektedir. İmmun sistemi baskılayıcı sağaltım gören kanser hastalarında karaciğer ve dalak tutulumunda artış izlenmektedir (3,17).

◆ Yaygın Kandidoz ve Kandidemi

Kandidemi; kanıtlanmış organ tutulumu olmaksızın bir ya da daha fazla kan kültüründe *Candida* üremesi demektir. Kandidemi nadir olarak benign gidiş seyreder. Benign kandidemi, ancak tek kan kültüründe üreme olan ve klinik olarak hiçbir risk taşımayan olgularda düşünülmelidir. En sık rastlanılan belirtisi yüksek ateştir (38 °C). Önceleri kandidemi, kontamine kataterle ilişkili ve geçici bir durum olarak değerlendirilirken; *Candida*'ya bağlı mortalitenin % 40 olduğunun belirlenmesi; kandideminin önemini göstermiştir. Dissemine kandidozda *Candida* türleri çeşitli organ ve dokulara giderek yerleşim gösterir. Ciddi organ tutulumu olanların yaklaşık %50'sinde kandidemi saptanmayabilir. Ayrıca kan kültürü pozitif çıkanların hepsinde derin enfeksiyon olduğu iddia edilmezse de kanında

Candida saptanan hastalar, gerek infeksiyonun akut belirtilerini gerekse uzun dönemli sekellerini önlemek üzere, tedavi edilmelidir. Yaygın kandidoz, özellikle duyarlı iki konak grubunu etkiler

- (i) Sitotoksik ilaç tedavisi sonucu granulositopeni gelişen immunkompromize malignite hastaları,
- (ii) (ii) Onkoloji dışı grup olarak tanımlanan kardiyak ya da abdominal cerrahi operasyon geçiren, granulositopenisi olmadığı halde sistemik steroid tedavisi sonucu immun cevapları azalmış hastalar.

Kandidemili olgularının kliniklere göre dağılımına bakıldığında; olguların yaklaşık % 25'i cerrahi yoğun bakım ünitesinden, % 25'i kemik iliği transplantasyon ünitesinden, % 20'si dahili yoğun bakım ünitelerinden, % 10'u hematoloji-onkoloji ünitelerinden ve geri kalan %20'si de diğer kliniklerden bildirilmiştir (17, 33).

Akut Dissemine Kandidiyaz

Fulminan bir infeksiyondur ve genellikle antibakteriyel tedaviye direnç gösteren bir ateş vardır. Nötropenik olan ve olmayan hastalarda görülebilir. En sık rastlanılan komplikasyonlar; menenjit, beyin apsesi, renal apse, miyokardit, endokardit, endoftalmit, kutanöz apselerdir (17,19)

Kronik Dissemine Kandidiyaz

Çoğunlukla lösemili hastaların nötropenik dönemlerinde ortaya çıkar; herhangi bir organ belirtisi olmayabilir, ancak ısrarcı ateş vardır. Nötrofil sayısı normale dönse de ateş ve kilo kaybı devam eder. Karaciğer-dalak büyüyebilir, alkalen fosfotaz genellikle çok yüksek olup, tomografide çoklu lezyonlar görülür (17,19)

◆ Candida Özefajiti

Özefajit, ağızda lezyon bulunmadan da gelişebilmektedir. Özefagusta *Candida* yerleşimini kolaylaştıran faktörler arasında; özellikle tetrasiklin olmak üzere geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, tükürük salgısında yüksek yoğunlukta glukoz olması (örneğin Diabetes Mellitus), hücresel bağışıklık bozuklukları (örneğin

AIDS, lösemi veya kemoterapi sonrası) ve özefajiyal staz (örneğin akalazya veya skleroderma) sayılabilir. Hastalar daha çok odinofaji daha az sıklıkta disfaji yakınmasıyla başvurmaktalardır.

Orofarinks muayenesinde tipik beyaz plaklar görülebilir, fakat plakların görülmemesi özefagus tutulumu olmadığını göstermez. Baryum yutturulması özefagus boyunca yerleşmiş mukozadan kabarık plakları veya yalnızca motor anomalisini gösterebilir ama endoskopi, yüksek özgüllük ve duyarlılıkla tanı koydurmaktadır. Kültür veya histolojide tomurcuklanan sporlar veya hiflerin oluşturduğu kümeler görülebilir (17,19).

◆ Gastrointestinal Kandidoz

GİS'in özofagus dışındaki bölümlerinde, kandidoz en sık kanser hastalarında görülür. Bu hastaların yapılan otopsilerinde, GİS'te özofagustan sonra en sık yerleşimin midede olduğu izlenmiştir. Akut lösemili veya diğer hematolojik maligniteli hastalarda, midede, daha az olarak da duodenum ve barsaklarda ülserasyonlar oluşur. Bu hastalarda *Candida* derin dokulara invaze olabilir, hematojen yolla karaciğer, dalak ve diğer organlara yayılabilir.

Candida türleri yaşlı ve immünsüprese bireylerde kolesistit, biliyer kanal infeksiyonları ve pankreatik abselere neden olabilirler (17,19).

◆ Solunum Sistemi Kandidozu

Ender görülen bir tablodur. Nötropenik hastalarda mikroorganizmanın hematojen yayılımı sonucu; düşük doğum ağırlıklı bebeklerde ise ağız salgısının aspirasyonu sonucu ortaya çıkar. *Candida* türleri solunum sisteminde yüksek oranda kolonize olduklarından, balgam veya endotrakeal kültürlerin tanısal değeri düşüktür. Klinik tablo ve radyolojik bulgular ise spesifik olmadığından yeteri kadar yarar sağlamaz. Tam da en güvenilir yöntem, akciğer dokusunun histolojik olarak incelenmesidir (19).

◆ Üriner Sistem Kandidozu

Candida türleri ile oluşan üriner infeksiyonlar; genellikle uzun süreli üriner kateter takılı kalmasına bağlı mesane kolonizasyonu ile ilişkilidir. Ayrıca perirektal ve genital bölgelerden kontaminasyon sonucunda da kolonizasyon oluşabilir. Diğer risk faktörleri; Diabetes Mellitus ve mesanenin tam boşalmasını engelleyen hastalıklar, geniş spektrumlu antibiyotik veya immunsupressif ilaç kullanımınıdır.

Candida kolonilerinin sayısı, kolonizasyon ve infeksiyon ayırımını yapmak için yeterli bir kriter değildir. Gerçek infeksiyonu değerlendirmek için ilk olarak kateter varsa değiştirilmeli ve idrarın biyokimyasal incelenmesi ile birlikte kültürü tekrarlanmalıdır.

Hastaya genitoüriner girişim uygulanmışsa, hasta üriner obstrüksiyon veya diğer yapısal anomaliler ile yaygın kandidiyazis açısından değerlendirilmelidir. Renal toplayıcı sistemde fungus topu ve alt üriner sistemde infeksiyon gelişebilir (17)

i) Renal Kandidiyazis: Dissemine kandidiyazlı hastaların % 80'inde, genellikle organizmanın hematojen yayılımı sonucu gelişir. Apse oluşumu sıktır. Bazen hif kümeleri pelvis ve üreterleri tıkayarak hidronefroza veya anüriye yol açabilir. *Candida*'ya bağlı pyelonefrit, primer ve sekonder olarak iki şekilde görülen oldukça ciddi bir tablodur. Primer infeksiyonda nefrostomi tüplerinden, stentlerden ve diğer kalıcı aygıtlardan asendan olarak, daha sık görülen sekonder infeksiyonda ise hematojen yayılım sonucu gelişir. Hematojen infeksiyon papiller nekroz, intrarenal ve perinefritik abseler gelişebilir (17)

ii) Alt Üriner İnfeksiyon: Genellikle bir üretral kataterden ya da genital veya GIS'den yayılım sonucu meydana gelir. Diyabetli ya da üriner sisteminde anormallik ve ya hasar bulunanlar risk altındadır. *Candida* türleri, üriner kanalda sistit ve pyelonefrit etkenidirler. *Candida*'ya bağlı sistitte, sık idrara çıkma, acil işeme hissi, dizüri ve suprapubik ağrı görülebilir (17).

◆ Merkezi Sinir Sistemi İnfeksiyonları

Sık rastlanılmayan klinik tablolardır.

i) Candida menenjit: Dissemine kandidiyazisin bir belirtisi olarak ya da bağımsız bir klinik tablo şeklinde gelişebilir. Düşük doğum ağırlıklı bebeklerde veya ventriküloperitoneal şanti bulunan hastalarda, hematojen yayılım sonucu ya da bir travma ile mantarın doğrudan subdural bölgeye inokulasyonuna bağlı olarak ortaya çıkar. Antibiyotiklere yanıt vermeyen menenjitlerde ya da nörolojik belirtilerle ortaya çıkan dissemine kandidiyazisli olgularda mutlaka akla getirilmelidir.

ii) Beyin apsesi ve metastatik ensefalit: Nadir görülen hastalıklardır. Büyük beyin apseleri fokal nörolojik belirtiler verir; hematojen yayılım sonucu oluşan mikroabseler ise nörolojik bozukluklara yol açmayabilirler (17).

◆ **Candida Endokarditi**

Tüm endokardit olgularının % 2'si *Candidalar*'a bağlı olarak gelişir. Enfeksiyon, özellikle protez kalp kapağı olanlarda ve damar içi madde bağımlılarında giderek artış göstermektedir. Özgül tanısal bulguları; büyük vejetasyonlar ve büyük damarların embolizasyonudur (17).

◆ **Myokardit**

Endokarditin bir komplikasyonu olarak apse gelişebilir ya da genellikle hematojen yayılım sonucu gelişen dissemine enfeksiyonun bir belirtisi olarak ortaya çıkabilir. *Candida* miyokarditli olguların %50'si dissemine enfeksiyondan ölmektedirler (17).

◆ **Tromboflebit**

Damar içi araçların varlığı ile bağlantılıdır. Büyük ve çevresel damarlarda kısmi ya da tam tıkanmalar oluşur (17).

◆ **Osteomyelit**

Genellikle hematojen yayılım sonucu ortaya çıkar. Bazen aspirasyon ya da kortizon injeksiyonu sırasında ve daha seyrek olarak bir travma sonrası gelişebilir. Kanser hastalarında ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerde daha fazla görülür (17).

◆ **Artrit**

Hematojen yayılım ile ya da infekte kemikten yayılım sonucu veya travmayı takiben mikroorganizmanın direkt inokülasyonu sonucu oluşur. Genellikle omuz, diz gibi büyük eklemler tutulur ve özgül olmayan pek çok semptomlar da verir.

Prostetik ve romotoid eklemler *Candida* enfeksiyonuna daha yatkındır. Etken sıklıkla *C. albicans* dışı *Candida* türleridir (17).

◆ Endoftalmit

Organizmanın hematogen yayılımını ya da oküleri travmayı takiben ortaya çıkar. Koriyoretinit olarak başlar; maküla tutulabilir; körlük olabilir (17)

2.8. Tanı

Candida enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı, klinik örneklerin incelemesi ve kültürden mantar türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu ile konulur.

Yüzeysel mantar enfeksiyonlarının tanısı için deri ve tırnak kazıntı örnekleri ile mukozalardan alınan sürüntü örnekleri, derin/ sistemik kandidoz tanısında kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), balgam, idrar, doku biyopsi örnekleri ve damar içi katater uçları incelenmektedir (1,2).

2.8.1. Klinik Örneklerin Direkt İncelenmesi

Direkt inceleme için uygun örnekler; deriden veya mukokutanöz lezyonlardan alınan kazıntı örnekleri, derin dokulardan alınan biyopsi örnekleri, santrifüj edilmemiş veya edilmiş idrar, BOS sedimentleridir.

Mikroskopik Tanı: Mantar enfeksiyonlarının saptanmasında çabuk, ucuz ve etkin yöntemlerinden birisi uygun olarak alınan örneğin direkt incelenmesidir.

Örneklerin direkt incelemesinde, lam-lamel arası yaş preparasyon, Giemsa, Wright, Gram, periyodik asit-Schiff (PAS) boyama, potasyum hidroksit (KOH), kalkoflor beyazı-KOH, çini mürekkebi preparasyonu gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Klinik örneklerin nativ mikroskopik incelenmesi sonucu maya hücreleri görülebilir. Hif yapıları, % 15'lik KOH solüsyonu ile 5-19 dakika epitel yapılarının ayrılması ile daha iyi görülür. Floresan mikroskobu ile incelemede kalkoflor beyazı kullanılarak hazırlanmış boyalı preparatlar, nativ preparatlardan daha iyi kontrast oluşturması nedeni ile tanıyı kolaylaştırır (8).

2.8.2. *Candida* İzolasyonu

Kültür

Koloni morfolojisi: Mantarların tanımlanmasında ikinci basamak, kültürdeki koloni morfolojisinin incelenmesidir. Koloni morfolojisi maya mantarlarını küf mantarlarından ayırmada ilk kriterdir. Koloni görünümü, farklı maya türleri arasındaki ayırmada küflerdekenden daha az yardımcıdır. Oysa küf mantarlarında koloni morfolojisi ve bu kolonilerden hazırlanan taze preparasyonun mikroskopik incelenmesi ile dahi tür tanımlaması yapılabilir. *Candida* türleri beyaz-krem rengi, düzgün (Şekil 2.1), tipik maya kokulu koloniler oluştururlar.

Şekil 2.1: SDA besiyerinde üreyen *Candida albicans* kolonileri

(<http://medicalmicrobiologylaboratory2001.htm>)



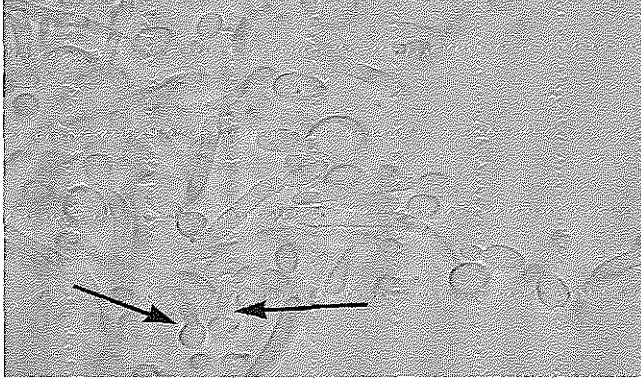
Tek kolonilerden pasajlar yapılarak saf kültürler elde edilir ve identifikasyon işlemlerine geçilir (8).

Candidalarda İdentifikasyon

Germ tüp testi: Bu test insan, dana, fetal dana veya tavşan serumuna şüphe edilen koloninin inokülasyonu ve oluşan süspansiyonun 35-37⁰C'de üç saat inkübe edilmesi ile uygulanır. Çimlenme borusu, maya hücresinden hücrenin genişliğinin

yaklaşık yarısı, boyunun 3-4 katı kadar büyüklükte hif yapısının gelişmesi olarak tanımlanabilir. Gerçek çimlenme borusunda hif yapısı ana hücreden çıkışta darlık göstermez.

Şekil 2.2: *Candida albicans*'in tavşan serumu ile yapılan Germ Tüp Testi, (http://labmed.ucsf.edu/Education/fung_morph/fungal_site/yeastpage)



Oklar germ tüp oluşturmuş *Candida albicanslar*'ı gösteriyor.

C. albicans'in hızlı tanısına olanak tanıyan bu testte *C. tropicalis*'in de hif başlangıçları üretebildiği, ancak bunlarda blastokonidyanın daha geniş olduğu ve hifin blastokonidya ile birleştiği yerde darlık bulunduğu unutulmamalıdır (1,8,13).

Morfolojik Özelliklerinin Araştırılması: *Candida* türlerinin morfolojik özelliklerini belirlemek amacıyla mısır unlu-Tween 80, Corn Meal Agar besiyerleri kullanılır. Bu besiyerlerinde *Candida* türlerinin klamidospor, psödohif, blastokonidyum oluşturma özellikleri saptanır.

Mısır unlu-Tween 80 Agarda klamidospor oluşumunu göstermek için, incelenecek olan koloniden iğne uçlu öze ile az miktarda alınarak besiyerine birbirine paralel kısa çizgiler çizerek ekim yapılır. Ekim alanı steril lamelle kapatıldıktan sonra 22-26 °C'de inkübe edilir. Agarın mikroskopik incelemesinde yalancı hiflerin boyut ve şekilleri, hif boyunca dizilmiş olan blastokonidyalardan organizasyonu ve artrokonidya varlığı araştırılır. Yalancı hif ve blastokonidya varlığı ve artrokonidyanın yokluğu araştırılan koloninin *Candida* cinsine ait olduğunu gösterir. Kalın duvarlı klamidosporlar *C. albicans* için tanı koydurucudur. Ancak türlerin kesin tanısı şeker fermentasyon va asimilasyon deneyleri ile konur (1,8).

Üreaz testi: Mayalarda üreaz enziminin varlığının araştırıldığı üreaz testi, *C. lipolytica* ve *C. krusei*'nin bazı suşları dışında diğer *Candida* türleri üreaz negatiftir (1).

2.8.3. Karbonhidrat fermantasyon ve asimilasyon testleri

Candidaların tanısında önemi olan testlerdir.

Karbonhidrat **fermantasyon** testinde *Candidaların* farklı karbonhidratlardan gaz oluşturup oluşturmadıkları araştırılır. Endojen karbonhidratın hücre duvarı tarafından bağlanması nedeniyle elde edilen yalancı pozitiflikler bu testin dezavantajıdır (1).

Karbonhidrat **asimilasyon** testinde *Candidaların* oksijen varlığında tek karbon kaynağı olarak çeşitli karbonhidratları kullanabilme özelliği araştırılır.

Wickerham ve Burton tarafından geliştirilmiş olan asimilasyon ve fermentasyon testleri, *Candidaların* tanımlaması için altın standart olmakla birlikte, 14 günde sonuç vermesi dezavantajıdır. Daha hızlı sonuç veren "Minitek", "API 20 C", "Uni-Yeast-Tek", "Vitek" ve "Microscan Yest Identification Panel" gibi hazır ticari testler geliştirilmiştir. Ancak ticari testlerin spektrumunda bulunmayan nadir türlerin tanımlanmasında Wickerham-Burton yöntemine gereksinim duyulmaktadır (1,8).

2.8.4. CHROMagar, *Candida* türlerinin ayırımında kullanılan ve farklı türlerin farklı renklerde koloniler oluşturması ile ayırıcı tanının yapılabildiği bir besiyeridir. Bu yöntemle *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* ayırımını yapmak mümkün olmaktadır. Benzer amaçla, özellikle *C. albicans* ayırımında **Biggy agar** (Nickerson's medium) ve **Candida ID agar** da kullanılabilir (33).

2.8.5 *Candidalarda* Serolojik tanı

Çoğunlukla koksidiyoidomikoz, parakoksidiyoidomikoz ve histoplazmoz tanımlarında kullanılmaktadır. Serolojik olarak mantara ait hücre duvarı mannanı, galaktomannan, mannoproteinler, sitoplazmik enolaz gibi antijenik yapılar ve

bunlara karşı gelişen antikorlar ile D-arabinitol gibi bazı metabolik ürünlerin gösterilmesi tanıya yardımcı olabilmektedir.

Antijenlerin taranması: Mantar antijenlerinin konak salgısal cevabından bağımsız olmaları nedeniyle daha avantajlıdır. Ancak testlerin kullanılabilirliği antijenlerin kandan hızla kaybolması nedeniyle kısıtlıdır.

Antikor araştırılması: *Candida* türlerinin serolojik tanısında antikor araştırılmasının, çapraz tepkimeler ve infeksiyon ile kolonizasyon ayırımında yetersizlik nedenleriyle tanı değeri azdır. Özellikle immun sistemi baskılanmış hastalarda zayıf antikor yanıtı nedeniyle sonuçlar yanıltıcıdır (34).

2.8.6. Mantarların Tanısında Moleküler Yöntemler

Tanısal Mikrobiyolojinin temel hedefi, spesifik patojenin mümkün olan en kısa sürede saptanması ve tanımlanması yolu ile hasta tedavisinde gelişme sağlamaktır.

Moleküler tanısal uygulamalar mikroorganizmaların kültür ortamlarında biyolojik olarak üretilmelerinin yerini alarak süratle mikroorganizmaların varlığının genotipik belirlenmelerini sağlamaktadırlar.

Özellikle etkenin yavaş üreme gösterdiği veya üretilemediği durumlar ile serolojik tanının gerçekleştirilemediği immun yanıtsızlık durumlarında moleküler tanı yöntemleri bir zorunluluk olarak ortaya çıkmaktadır (35).

Hibridizasyon Yöntemleri

Denatüre olmuş çift iplikli DNA veya DNA'nın tek ipliklerinin tekrar farklı orjinli ipliklerle biraraya getirilmesine hibridizasyon adı verilmektedir. Birçok moleküler teknikle hibrid oluşturulabilmektedir (örneğin **Southern blot**, **Dot-blot hibridizasyon** yöntemleri ile özgül DNA dizileri kantitatif olarak belirlenebilir).

Problarla hedef yapının belirlenmesi bir hibridizasyon yöntemidir. **Nükleik asit prob teknolojisinde;** enfeksiyon ajanlarının özel grupları için spesifik genomik zincirler seçilir, klonlanır, sentezlenir ve prob olarak kullanılır. Problar enzim, antijen ve kemiluminesan veya radyoizotoplarla işaretlidir ve kolayca otomatik sistemlerle belirlenebilir. Klinik örnekte problar DNA veya RNA ile hibridize olur. Nükleik asit problar, hedef nükleik asidin komplementer yapısına yüksek

duyarlılıkla bağlanabilir, organizmaları tanımlayabilir ve daha fazla olarak tür düzeyini belirleyebilir.

Problar özellikle mikroorganizmaların primer kültürde identifikasyonu veya Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ürünlerini belirlemek için tasarlanmıştır.

Candida türlerini, Cryptococcus neoformans ve Aspergillus türlerini tanımlamak için PZR amplifikasyonu ile türe spesifik internal transcribed- spacer (ITS) oligonükleik problar kullanarak mililtrede 2-10 hücrenin belirlenebileceği gösterilmiştir.

In situ hibridizasyon, tüm hücrelerde veya mikroskopik preparatlar için fikse edilmiş doku örnekleri için kullanılır. Kan kültürlerinde bakteriler kadar mayaların hızlı tanımlanmasında floresan In situ hibridizasyonun uygun olduğu bildirilmektedir.

Benzer olarak genotipik tiplendirmelerde kullanılan **Pulse Field Gel Electroforesis (PFGE)**, **restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)** ve **polymerase chain reaction fingerprinting** yöntemiyle salgın suşlarını belirlemede de özgül problar kullanılmaktadır.

Klinik örneklerden patojenleri belirlemede prob yönteminin duyarlılığı düşük olduğundan dolayı nükleik asit çoğaltma yöntemleri geliştirilmiştir (35,36).

Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri

Kültürde geç ve zor üreyen mikroorganizmalar için DNA çoğaltma yöntemlerinin kullanılması bu güçlüklerin çözülmesinde önemli bir gelişim olmuştur.

Nükleik asit çoğaltma yöntemleri içinde ilk geliştirilen ve halen rutin ve araştırma laboratuvarları içinde kullanılan yöntem, PZR'dır (35).

PZR: İlk kez 1985 yılında bilim dünyasına sunulduğundan itibaren PZR; hem araştırmada hem klinik laboratuvarlarda tanıda yeni bir dönem açmıştır. ABD'de Cetus Corporation'da çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilmiştir. Bu buluşundan dolayı K.Mullis, 1993 yılı Nobel Kimya ödülüne hak kazanmıştır. Metod, özetle nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılmasıdır (37).

2.8.7 Kandidemi Tanısında Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun Kullanımı

Mantar infeksiyonunun tanısı için PZR yöntemi 1990'lı yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Bu yıllardan itibaren PZR tekniğinin duyarlılığı ve özgüllüğü araştırılmaya başlanmıştır. *Candida* PZR tekniğinin uygulandığı çalışmalarda, 1 ml kanda $1-10^3$ CFU/ml *Candida* hücrelerini saptayabilecek duyarlılıkta olduğu bildirilmiştir.

Az sayıda mantar hücrelerini saptayabilme, mikroorganizma hücrelerine ihtiyaç duymama ve az miktarda örnekle çalışabilme gibi özellikleri moleküler teknikler içerisinde PZR'ı ön plana çıkarmıştır (35).

PZR elamanları: PZR, çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerlerin bağlanması ve uzaması esasına dayanan in vitro bir yöntemdir. Yöntem termostabil DNA polimerazları ve farklı sıcaklık derecelerini istenilen süre için otomatik olarak ayarlayabilen bir PZR aletinde (termal çevirici) uygulanır.

PZR yönteminde, çoğaltılacak hedef gen bölgesine ilave olarak kullanılacak altı temel madde; **özgül oligonükleotid primerler, dNTP karışımı** (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), **tampon, MgCl₂, Taq (Thermus aquaticus) DNA polimeraz** ve **su**'dur.

PZR için kontamine olmayan bir çevrenin sağlanması gereklidir. Bunun için steril solüsyonların ve aerosollere dirençli pipetlerin ve filtreli pipet uçlarının kullanılması önemlidir. PZR tekniği çok yüksek bir duyarlılığa sahip olduğundan kontaminasyon sıklıkla karşılaşılan bir problemdir. Bu nedenle çalışma ortamında sadece PZR uygulamalarının yapılacağı izole odaların ve biyogüvenlik kabinlerinin bulunması gereklidir (38).

Oligonükleotid Primerler: Hedef DNA bölgesini çoğaltmak için genellikle 20-30 nükleotid uzunluğunda primerler kullanılmaktadır. Daha uzun primerler kullanıldığında özgüllükte bir yükselme olmadığı gibi gereksiz yere maliyet artışı olmaktadır. Daha kısa primerler kullanıldığında ise istenmeyen bölgelere bağlanma meydana gelebilmekte ve özgül olmayan çoğaltma ürünleri ortaya çıkabilmektedir. Primerlerin mümkün ise ortalama olarak dört bazın her birinden

eşit sayıda içermesi ve tekrarlayan, sadece pürin veya primidin içeren dizilerden kaçınılması gereklidir.

Ayrıca primerlerin kendi kendilerine ve birbirleri üzerlerine bağlanabilirliğinin olmamasına dikkat edilmelidir. İki primerin ayrılma bağlanma sıcaklıkları (melting temperature - T_m) birbirine mümkün olduğunca yakın seçilmelidir (39, 40, 41).

DNA Polimeraz: PZR tekniğinde ısıya dayanıklı DNA polimerazların kullanılmaya başlanması, PZR'in araştırma ve klinik laboratuvarlarda rutin bir teknik haline gelmesine neden olmuştur. Isıya dayanıklı enzimler kullanılmaya başlanmadan önce sadece ısıya duyarlı olan DNA polimerazlar kullanılabilmekteydi. Bu enzimler, PZR döngülerinde 94 °C'ye her çıkıldığında aktivitelerini kaybettiklerinden her PZR döngüsünde reaksiyon karışımına eklenmeleri gerekiyordu. Pratik olmayan ve özgül PZR ürünü oluşumunu engelleyebilen bu durum ısıya dayanıklı DNA polimerazların gerekliliğini ortaya koymuştur. Bunu için ilk olarak *Thermus aquaticus* adlı sıcak sularda yaşayan bir bakterinin ısıya dayanıklı olan DNA polimerazı (Taq DNA polimerazı) izole edilmiştir. Bunu birçok ısıya dayanıklı DNA polimeraz izolasyonu izlemiştir.

PZR'da kullanılan bazı ısıya dayanıklı DNA polimerazlar Çizelge.2.6.'da gösterilmiştir. Taq DNA polimerazının optimum çalışma sıcaklığının 72 °C civarında olduğu belirlenmiştir.

Taq DNA polimerazın kullanılmaya başlanması ile hem her döngüden sonra reaksiyon karışımına yeniden polimeraz eklenmesine gerek kalmamış, hem de primerlerin özgül bölgelerine bağlandıktan sonra 37 °C gibi düşük bir sıcaklığa inilmediği için, istenmeyen yerler bağlanmaları engellenmiştir.

DNA polimerazlar, orijinal ana DNA zincirlerinden bir tanesi kalıp olarak kullanılarak yeni bir tamamlayıcı DNA zinciri oluşturulurken, monomer deoksिनükleotid trifosfatlardan uzun polinükleotid zincirlerin sentezini katalize eden enzimlerdir. Polimerizasyon her zaman deoksिनükleotid trifosfatın 5' α -fosfatından gelişen DNA zincirinin 3' terminal hidroksil grubuna doğru işlediğinden DNA sentezi her zaman 5' uçtan 3' uca doğru devam eder (42).

Çizelge 2.6. Bazı ısıya dayanıklı DNA polimerazlar ve kaynakları (42)

DNA polimeraz	Doğal/ Rekombinant	Kaynak
Taq	Doğal	<i>Thermus aquaticus</i>
Amplitaq®	Rekombinant	<i>Thermus aquaticus</i>
Hot Tub™	Doğal	<i>Thermus flavus</i>
Pfu	Doğal	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Vent™	Rekombinant	<i>Thermococcus litoralis</i>
Deep Vent™	Rekombinant	<i>Pyrococcus GB-D</i>
Tth	Rekombinant	<i>Thermus aquaticus</i>
UITma™	Rekombinant	<i>Thermotoga maritima</i>

Deoksinüklosid trifosfatlar (dNTPs): Saf deoksinükleosid trifosfatların dördünün ayrı ayrı bir arada bulunduğu stok solüsyonlar mevcuttur. Stok solüsyonlarını çoğunun pH'sı NaOH ile 7.5'e ayarlanmıştır. PCR için genel olarak 100 µM dNTP konsantrasyonu gerekli olmakla birlikte daha düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 µM) Taq DNA polimeraz daha iyi çalışmaktadır. Bununla birlikte optimal dNTP konsantrasyonları MgCl₂ konsantrasyonuna, reaksiyon durumuna, primer konsantrasyonuna, çoğaltılan ürünün uzunluğuna ve PZR döngü sayısına bağlıdır. Bazı PZR'ların optimizasyonunu sağlamak için en uygun dNTP konsantrasyonunun ampirik olarak belirlenmesi gerekebilmektedir (41).

Tamponlar: PZR'da DNA polimerazın daha iyi çalışmasını sağlayan birçok tampon bulunmaktadır. Genel olarak 1988 yılında Saiki ve arkadaşlarının tanımlamış olduğu tampon ve buna benzer tamponlar kullanılmaktadır. Bu tampon final konsantrasyonu olarak 10mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, %0,01 jelatin, %0,01 NP40 ve % 0,001 Tween 20 içermektedir (43).

MgCl₂: Mg⁺² iyonu, DNA polimeraz enziminin çalışmasını sağlayan önemli bir kofaktördür. MgCl₂ son reaksiyon karışımındaki konsantrasyonu farklı oranlarda olabilmektedir. Bu nedenle en uygun olan MgCl₂ konsantrasyonunu belirlemek

için 0,5-5,0 mM aralığındaki $MgCl_2$ konsantrasyonlarının denenmesi gereklidir. Mg^{+2} iyonları, polimerizasyon sırasında dNTP'lerin yeni yapılmakta olan zincire eklenmesi için çok önemlidir. Ayrıca polimeraz aktivitesini stimüle ettikleri gibi çift zincirli DNA'nın ayrılma-bağlanma sıcaklığını artırır ve primerlerin kalıp DNA'ya bağlanmalarını kolaylaştırır. $MgCl_2$ konsantrasyonunun PZR ürünü ve özgüllük üzerine çok önemli etkileri vardır. 1.0- 1.5 mM $MgCl_2$ konsantrasyonu genellikle ideal olmakla birlikte, bazı durumlarda, farklı Mg^{+2} miktarları gerekli olabilmektedir (43).

Sıcaklık döngüleri: PZR tekniği; çoğaltılması istenen DNA örneğinin, DNA replikasyonu için gereken maddelerle birlikte üç basamaktan oluşan (denatürasyon, primerlerin bağlanması, uzama) siklusların belirli sayılarda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım bir PZR siklusunu oluşturur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir (Sırası ile 94-98 ° C; 37-65 ° C; 72 ° C). PZR karışımlarını içeren tüpler otomatik olarak programlanabilen makinalarda (termal çevirici) sıra ile bu sıcaklıklarda istenilen sürelerde tutulur.

Genellikle DNA zincirleri 94° C- 98° C 'de denatüre olduğu için hangi primer kullanılıyor olursa olsun ve hangi DNA çoğaltılırsa çoğaltılsın denatürasyon için bu sıcaklık aralığı kullanılır. Primerlerin birleşmesi için kullanılan sıcaklık primerin nükleotid içeriğine göre değişir ve primerlerin ayrılma-bağlanma sıcaklıklarına göre belirlenir. Polimerizasyon sıcaklığı ise enzimin en iyi çalıştığı sıcaklıkta

(taq polimeraz için 72° C'de) tutulur. Bu sıcaklıklarda denatürasyon, primer birleşmesi ve polimerizasyon için gereken süre aslında birkaç saniyedir. Ancak termal çevirici içerisinde tüplerdeki karışımların tamamının bu sıcaklıklara ulaşması biraz süre gerektirebilir. İnce çepirli tüplerin kullanılması bu sürelerin kısaltılmasını sağlayabilir. PZR reaksiyonlarına ilk başlarken ortamdaki bütün DNA'ların tamamının denatürasyonu için biraz uzunca bir süre gerekebilir. Program sonunda

72 °C'de 3 dakika daha tutulması yarım kalan zincirlerin tamamlanmasını sağlar.

Her döngüde özgül DNA parçası iki katına çıkar. Yeni sentezlenen DNA da bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanıldığı için DNA parçaları geometrik olarak artar. Bu geometrik birikim ile birkaç saat içinde özgül hedef parçanın milyonlarca parçası oluşmaktadır (43).

PZR'a Dayalı Tanı Yöntemleri Oluşturmak İçin Stratejiler

PZR'a dayalı tanı yöntemleri oluştururken duyarlılık ve özgüllüğü optimize etmek için çeşitli faktörlerin uygulanması gereklidir.

Hedef

Tanısal PZR'ın özgüllüğü çoğaltım için uygun bir hedef dizisi seçilerek sağlanabilmektedir. Özgüllük, hedef dizi ve farklı cins veya türlerin DNA dizileri arasındaki homoloji derecesine bakılarak belirlenir. Örneğin, tüm mantarlarda ortak olan bir genin fazlaca korunmuş olan bir bölgesinin PZR protokolünde hedef dizi olarak seçilmesi bir enfeksiyonun bakteriyal veya mantar kaynaklı olduğunu göstermek için uygundur. Bu strateji, birçok grup tarafından, çoğaltım için hedef dizi olarak fungal ribozomal RNA(rRNA) içindeki oldukça korunmuş bölgeler veya üniversal bölgeler seçilerek uygulanmıştır. Mantar DNA kaynağının cinse mi ait olduğunu yoksa türe mi ait olduğunu saptamak için çeşitli PZR çoğaltım ürünü saptama yöntemleri kullanılabilir. rRNA genlerinin diğer bir avantajıda PZR duyarlılığını arttıran yüksek kopya sayısı oluşturabilmeleridir (43).

1990 yılında Buchman ve arkadaşları tarafından sitokrom P450_{L1A1} (lanosterol-14 α - demethylase) genini kodlayan bir mantar DNA dizisi primer olarak seçilmiştir (44).

1994 yılında Makimura grubu tıbbi önemi olan 25 adet mantarın 78 türünü mantarların 18 S rRNA genlerinde korunmuş bölgeleri kullanarak çoğaltan bir PZR yöntemi geliştirmişlerdir (45).

1994 yılında Holmes ve arkadaşları, çeşitli *Candida* türlerini içeren kan örneklerinden ekstrakte edilen *Candida* DNA'sının tesbiti için; tüm *Candida* türleri arasında ortak olan 5s rRNA gen dizisini kodlayan PCon 1ve PCon 2 primerlerini dizayn ederek 105 bp'lik bir bölgeyi başarı ile çoğaltmışlar ve agaroz jelde yürüterek göstermişlerdir (46).

1998 yılında Van Burik ve arkadaşları medikal olarak önemli mantarları saptamaya yönelik küçük subünit rRNA gen dizisini tamamlayan bir çift primer dizisi dizayn etmişlerdir (47).

Örnek Seçimi ve Hazırlama

Tanısal PZR potokolü geliştirirken klinik örnek seçimi ve DNA ekstraksiyon yöntemi çok önemlidir. *Candida* infeksiyonlarının tanısında çoğu PZR potokolü klinik olarak önemli olan mantarların kandan tesbitini yani kan örneklerinin çalışmasını kapsamaktadır. Kan ve serum kısmen non invaziv yöntemlerle sağlanabilmeleri nedeniyle sistemik mantar infeksiyonlarının tanısında potansiyel olarak kullanışlı örneklerdir.

Tam kan ile *Candida* DNA'sı pozitif bulunan örneklerin ancak % 50'sinin serumda *Candida* DNA'sı saptanabilmiştir (32).

Kullanılan DNA ekstraksiyon yönteminin özellikle iki hedefi olmalıdır; (i) minimal kayıpla mantar DNA'sını etkin olarak saflaştırılabilmektedir, (ii) örnekten PZR inhibitörlerini kaldırabilmelidir. DNA ekstraksiyonu sırasında önemli bir aşama olan *Candida* hücre duvarının parçalanması zordur. Enzimatik ve mekanik yöntemlerle parçalanabilmektedir. Lyticase ve Novozym 234 DNA ekstraksiyonuna yardımcı olan sindirici enzimlerdir. Mekanik olarak cam boncuklarla parçalanma da kullanılmaktadır.

Hücre lizisi ile açığa çıkan proteinlerin DNA'dan ayrıştırılmasında, hazır kitlerin kullanılması ile daha iyi bir ekstrakte DNA ürünü sağlanabilmektedir (QIAamp DNA mini kit (Qiagen), MagNA Pure LC DNA (Roche) Isolation Kit). Hazır kitler, diğer yöntemlere nazaran zaman tasarrufu sağladıkları gibi fenol ve kloroform kullanımını ortadan kaldırmaktadır. Ancak uygulanan potokole önemli bir ek mali külfet getirmektedir (48).

2.8.8 Çoğaltılan Ürünün Saptanması ve Değerlendirilmesi

PZR ürünlerini göstermek için kullanılan yöntem duyarlılık ve özgüllüğü arttırabilmektedir. Amplifiye edilen DNA veya RNA'nın tesbitinde kullanılan birçok metod vardır. Moleküler tanı tekniğine uygun olan tesbit metodunun seçilmesi;

- i) Hedef veya prob amplifikasyonuna.

- ii) Nükleik asidin RNA veya DNA olmasına,
- iii) Baz dizisinin heterojenliğine,
- iv) Amplifiye ürünlerdeki nadir baz dizi varyantlarının saptanmasına,
- v) Primer veya problardaki doğal dizilimler dışında yeni baz dizilerinin oluşumuna bağlıdır.

Bu özellikler göz önünde bulundurularak seçilebilecek görüntüleme yöntemleri şunlardır:

A. Jel elektroforezi

B. Hibridizasyon (Floresan Rezonans Enerji Transferi (FRET) temeline dayalı TaqMan, Molecular beacon, LightCycler ve Ampliflor teknikleri)

C. Kalorimetrik mikrotitre plak sistemleri

D. Kemilüminesans işaretleme

E. Oligomer bağlanma yöntemi ile amplifikasyonunun gösterilmesi

F. Matriks hibridizasyon ve DNA 'chip ' teknolojisi.

Jel elektroforezi; Çoğaltılan nükleik asitlerin gösterilmesinde kullanılan geleneksel metod agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezini takiben etidyum bromürle (EtBr) boyanan jeldeki bantların gözlenmesidir. EtBr, elektroforezden sonra DNA profillerinin tanınmasını sağlar. EtBr sadece çift ipçikli DNA'ya bağlanabildiği için tek ipçikli DNA veya RNA tesbitinde kullanılamamaktadır.

Tek ve çift ipçikli DNA ve RNA tesbitinde ' Cyber green' (CG) boyaları da kullanılabilir (49).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışma Grubu

Planlanan çalışmada; Bir yıl süresince (01/01/2004-01/01/2005 tarihleri arasında) Akdeniz Üniversitesi Hastanesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı (ABD) bünyesindeki Hematoloji Bilim Dalı (BD), Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD Hematoloji-Onkoloji BD'ı servislerinde ve Kök Hücre Transplantasyon (KHT) ünitesinde yatan ve ilgili birimlerce malignite tanısı konan; kandidemi ön tanılı toplam 78 hastamızın, günlük lökosit sayıları ve ateşleri izlenerek prospektif olarak febril nötropenik dönemleri saptandı. Nötrofil düzeyi $500/\text{mm}^3$ 'ün altında olan ya da $500-1000/\text{mm}^3$ arasında olduğu halde 48 saat içinde $500/\text{mm}^3$ 'ün altına düşmesi beklenen hastalarda, oral veya aksiler bölgelerden ölçülen ateşin $38.3\text{ }^\circ\text{C}$ 'nin üzerine çıkması yada bir saat süreyle $38.0-38.2\text{ }^\circ\text{C}$ arası sıcaklık ölçümü febril nötropeni (nötropenik ateş) olarak tanımlandı (50).

78 hastanın tümü tarafımızdan bilgilendirilip onayları alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi. Projemizin bir örneği, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi **Daimi Etik Kurulu'na** sunulularak etik kurul onayı alındı.

Çalışmaya alınan hastalara ait bilgi formu örneği, ekte sunulmuştur (**ek 1**). Bu formda; hastanın nötropeni düzeyi, sistemik kandidiyazını destekleyen bulguların varlığı, risk faktörleri, kandidüri hikayesi sorgulanmıştır.

Hastaların bölümlere dağılımları, yaşları ve primer hastalıkları ekte sunulmuştur (**ek 2**).

Candida DNA'sının kandan izole edilmesinde; duyarlılık, özgüllük, maliyet ve uygulanabilirlik özellikleri göz önüne bulundurularak Loeffler ve ark.'nın geliştirdikleri otomatize Magna Pure LC ve manuel Qiagen kitlerinin kullanıldığı protokol çalışmaları dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir (51).

3.1.2 Klinik örneklerin çalışmaya alınışı ve çalışma prosedürü

Ateşin yükselmeye başladığı ilk saatlerde antifungal tedaviye başlanmadan önceki steril şartlara uyularak alınan kan örnekleri; PZR için EDTA'lı (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) tüplere ve kan kültürleri için soybean casein broth

içeren kan kültür şişelerine (Yetişkin hastalar için; Plus Aerobic/F – pediatrik hastalar için; pēds plus/F Becton Dickinson) inoküle edilmiştir. EDTA'lı tüplere alınan 3-5 ml hacmindeki kan örnekleri, RNA ve DNA'dan arındırılmış filtreli pipet uçları kullanılarak endorflara aktarıldı ve *Candida* DNA'sının saflaştırılması işlemi yapıncaya kadar -70 °C'de muhafaza edildi.

Kan kültür şişeleri, Bactec 9240 (BD Bactec-Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Cockeysville, Md) kan kültür cihazına yerleştirildi. Üreme sinyali alınıncaya kadar cihaz içinde bir hafta süre ile inkübe edildi. Üreme sinyali alınan kan kültür şişeleri; cihazdan çıkarıldı, kanlı agar ve SDA (Saburoud Dekstroz Agar)'a ekimi yapıldı ve sonrasında 24 saat 37 °C etüvde inkübe edildi. Ayrıca febril nötropenik atak geçiren hastalarda, kan kültürleri ve EDTA'lı tüplere alınan kanlarla eş zamanlı olarak; idrar, katater, dışkı ve boğaz örnekleri de alındı ve kültürleri yapılarak kolonizasyon olasılığı değerlendirildi. Bu amaçla; SDA besiyerine ekim yapıldı ve 24 saat 37 °C etüvde inkübe edildi. Üreme gözlenmeyen kolonilerin inkübasyonu bir haftaya kadar uzatıldı. Bu sürede, kan kültürleri ve kolonizasyonu değerlendirmek için alınan kültürlerde (idrara, katater, dışkı ve boğaz) üreme tespit edilen kolonilerin tür ayrımı için; mikroskopik inceleme neticesi ile maya morfolojisinde gözlenen *Candida*'lara germ tüp testi uygulandı. Germ tüp yapan *Candida*'ların fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri incelenerek tür düzeyinde tanımlanması yapıldı.

Germ tüp yapmayan *Candida*'ların tür ayrımı için, fermentasyon ve asimilasyon reaksiyonlarına dayalı sonuç veren ID 32C (BioMérieux) kiti ile Mini API (BioMérieux) tam otomatize cihazında tür tanımlaması yapıldı.

Üniversite hastanemiz, Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda; *Candida* DNA'sının saflaştırılması, çoğaltılması ve görüntülenmesi işlemleri gerçekleştirilmiştir. Üniversite hastanemiz Merkez Laboratuvarı bünyesindeki Bakterioloji rutin laboratuvar'ında da kültür yöntemleri ile *Candida*'ların izolasyonu ve tanımlanması yapıldı.

3.1.3. Ayıraç ve Gereçler

Ekstraksiyon

Çizelge 3.1. MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Roche) İçeriği

Yıkama tamponu I 100 ml 2 şişe	Magnetic Glass Particles (MGPs) Suspension 6 cam şişe
Yıkama tamponu II 60 ml 2 şişe	Bacteria Lysis Buffer 100 ml 1 şişe
Yıkama tamponu I 100 ml 1 şişe	Proteinase K (liyofilize toz) 6 cam şişe
Lysis/Binding Buffer 100 ml 1 şişe	Elution Buffer 100 ml 1 şişe

Liyofilize toz halindeki proteinaz kullanılmadan önce, 1.2 ml elution buffer liyofilize proteinaz K içeren cam şişeye eklendi.

Kit içeriği oda ısısında (15 - 25 °C) bir yıl bozulmadan muhafaza edilebilir.

Çizelge 3.2. QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) Kit İçeriği

250 adet spin kolon	750 adet 2 ml tüp
54 ml AL buffer	50 ml ATL buffer
95 ml AW1 buffer	110 ml AE buffer
66 ml AW2 buffer	6 ml proteinase K

Proteinase K, kullanıma hazırdır (Proteinase K - 20 °C'de bir yıl bozulmadan muhafaza edilebilir).

1. AL buffer: Kullanımdan önce çalkalandı.
2. AW1 buffer: İlk kullanımdan önce konsantre buffer içine 125 ml ethanol (% 96-100) eklendi.
3. AW2 buffer: İlk kullanımdan önce konsantre buffer içine 160 ml Ethanol (% 96-100) eklendi.

Her üç buffer da oda ısısında (15-25 °C) bir yıl bozulmadan muhafaza edilebilir.

Çizelge 3.3. Amplifikasyon Taq PCR Core Kit (Qiagen) Kit içeriği

Taq DNA Polimeraz	250 U (5 Units/ μ l)
Qiagen PCR buffer, 10 X	1.2 ml
Q solution, 5 X	2.0 ml
MgCl ₂ 25 mM	1.2 ml
dNTP Mix (herbirinden 10 mM)	200 μ l

Kit içeriğindeki maddeler -20° C' de saklanmalıdır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. PZR Yöntemlerinin Analitik Duyarlılıklarının Tespiti

Pozitif Kontrol: Çalışmamızda Amerikan kültür koleksiyonundan (ATCC) sağlanan *C.albicans*'ın ATCC 90028 standart suşu, pozitif kontrol olarak kullanıldı. Suş SDA'da 35° C'de 24 saat inkübe edilerek besiyerinde üretildi. Kültürden elde edilen *Candida* ile, fosfat tampon içerisinde (0.5 McFarland'da 10^6 *Candida* hücresi denk gelecek bulanıklıkta (52)) densimat (BioMérieux) cihazında McFarland değeri okutuldu. Kan bankasından sağlanan sağlıklı insan EDTA'lı kanı içerisinde 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 *Candida*/ml olacak şekilde süspansiyonları yapılarak dilüe edildi. Farklı dilüsyonlardaki bu süspansiyonlarla testin analitik duyarlılığı tespit edildi.

Negatif Kontrol: Negatif kontrol için steril deiyonize su ve kan bankasından temin edilen sağlıklı insan EDTA'lı kanı olmak üzere iki kontrol kullanıldı.

3.2.2. *Candida* DNA Ekstraksiyonu

Candida DNA ekstraksiyonu için 2 farklı ticari kit ile çalışma planlandı.

- I. Otomatize MagNA Pure LC cihazı (Roche) aracılığı ile MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) ve
- II. Manuel (Lyticase + QIAamp DNA Mini Kit- Qiagen) Ekstraksiyon

I.Otomatize MagNA Pure LC Protokolü ile Ekstraksiyon

MagNA Pure Cihazının Tanıtımı

MagNA Pure LC tam otomatize bir ekstraksiyon cihazıdır. Cihaz bir bilgisayara bağlıdır ve bu bilgisayara yüklenen programlar doğrultusunda ekstraksiyon işlemini kapalı devre olarak gerçekleştirmektedir. Cihaz bünyesinde farklı işlevlerin gerçekleştirildiği bölümlere ayrılmıştır. Ayrıca cihazın çalışması sırasında dikkati çeken özelliği, içinde farklı birimlerden oluşan hareketli bir robotik kola sahip olmasıdır.

Üretici firma tarafından önerilen ekstraksiyon işlemine uygun, Part of Software 3.0 programının bilgisayara yüklenmesinin ardından yüklenen program doğrultusunda; hareket eden kol ile, cihazın içindeki farklı bölümlerde pipetleme, yıkama, magnetik alan oluşturulması ve kaldırılması, elde edilen DNA'nın elution buffer içinde saklanması gibi işlemler gerçekleştirilebilmekte ve hasta örnekleri ile direkt temas kurulabilmektedir.

Şekil 3.1. MagNA Pure Cihazı



(http://www.roche.com/pl_07751_medium.jpg internet sitesinden aynen alıntı.)

EDTA'lı tüp içine alınan kan örneklerinde; MagNA Pure LC cihazında, MagNA Pure LC DNA izolasyon Kit III (Roche Diagnostics) prosedürüne uygun olarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi.

MagNA Pure LC cihazındaki işlemlerden önce dışarıda yapılması gerekli çalışmalar: EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden 100 µl'si, 1.5 ml endorf

tüplere aktarıldı. Üzerine 130 µl Bacteri Lysis eklendi ve 65° C'de 10 dakika inkübe edildi. Sonra bu karışıma 20 µl Proteinaz K eklendi ve 95 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Sonra ependorf tüplerindeki sıvı MagNA Pure LC sample kartuşuna çalışma listesine uygun olarak otomatik pipet aracılığı ile transfer edildi.

MagNA Pure cihazının çalışması: Cihaz, çalışma kitine uygun olarak bilgisayara yüklenen program doğrultusunda, reagenlerin ve sarf malzemelerin miktarını ve cihaz içi lokalizasyonunu bağlı bulunduğu bilgisayarın ekranında göstermektedir.

Cihazın cam dış kapağı açılarak reagenler ve sarf malzemeler cihaz üzerinde kendilerine ayrılan uygun bölümlere yerleştirildikten sonra hasta örneklerini içeren sample kartuş bilgisayar ekranında gösterilen uygun bölgeye yerleştirilir. Cihazın dış cam kapağı kapatılır ve bilgisayar üzerinden çalıştırılır. Cihaz, önce sarf malzemelerin yerini ve miktarını robotik kolda yer alan optik okuyucusu ile kontrol eder. Eksikse uyarı verir, değilse robotik kol aracılığı ile önce pipet uçlarını alır ve reagenleri uygun birimlere dağıtarak çalışmaya başlar. Bu sırada bilgisayar ekranından çalışmanın aşamaları ve testin ne zaman sonlanacağı görülebilmektedir.

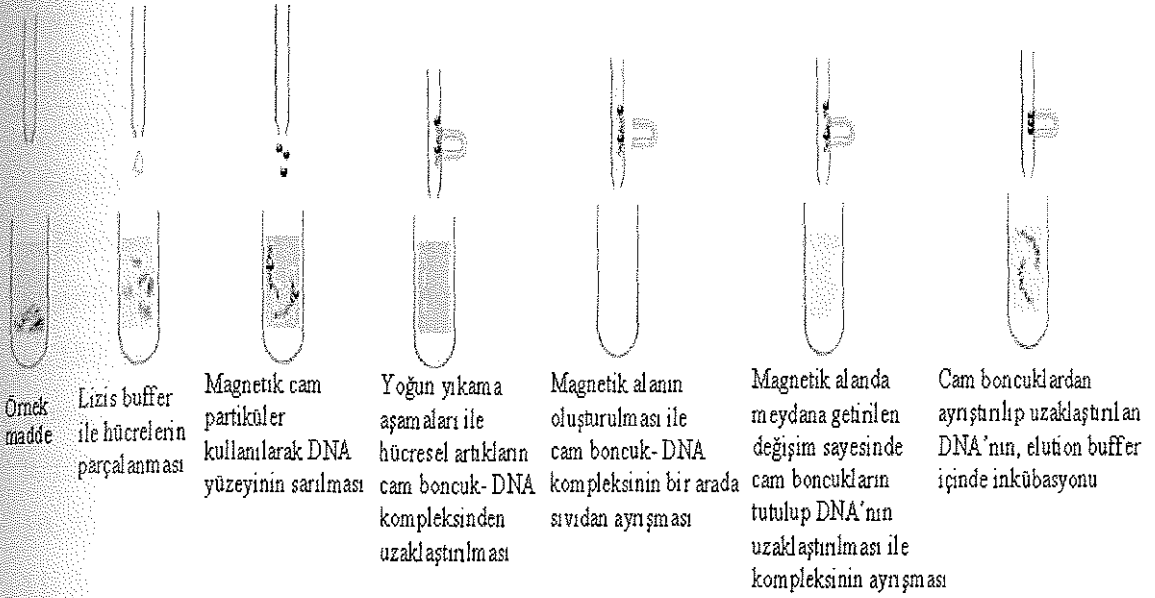
Cihaz kapalı devre sistemi içerisinde; lizis solüsyonu kullanarak kalan eritrositleri ve lökositleri lizis edecektir.

Açığa çıkan DNA'nın yüzeyi magnetik cam partikülleri kullanılarak sarılacaktır. Oluşturulacak magnetik alanın etkisi ile DNA-cam partikülleri karışımı sıvıdan çekilerek uzaklaştırılacaktır.

Magnetik alan devam ederken yoğun yıkama işlemleri ile DNA-cam partikülleri dışındaki hücresel artıklar temizlenecektir.

Daha sonra magnetik alanda meydana getirilen değişikliklerle sadece cam partiküller tutulacaktır. Cam partiküllerden ayrıştırılan DNA ise 200 µl elution buffer içinde, cihazdaki son bölmede muhafaza edilecektir (Şekil 3.2).

Şekil 3.2 MagNA pure cihazı ile nükleik asid izolasyon adımları



I. Kandan Mantar Genomik DNA'sının modifiye manuel (Lyticase + QIAamp DNA Mini Kit-Qiagen)ekstraksiyon protokolü ile saflaştırılması.

İşlem basamakları; Flahaut ve ark.'nın (53) modifiye manuel *Candida* DNA ekstraksiyonu ile Loeffler ve ark.'nın (54) standart manuel *Candida* DNA ekstraksiyon uygulamaları göz önüne alınarak gerçekleştirildi.

1. EDTA'lı tüp içerisine alınmış 3 ml kan örnekleri, 15 ml'lik propilen santrifüj tüplerine aktarıldı.
2. Üzerine 9 ml'lik eritrosit parçalama tamponu eklenerek 10-15 dakika buzda inkübe edildi.
3. İnkübasyon sonrası 10 dakika 3,000 devirde santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve eritrosit parçalama tamponundan itibaren (2 ve 3) işlemler tekrar edildi.

4. Ardından 1 ml Lökosit parçalama tamponu ilave edilerek ve 65° C'de 45 dakika inkübe edildi.

Sonra 10 dakika 5,000 devirde santrifüj yapıldı ve santrifüj sonrası süpernatant atıldı.

5. 200 µl NaOH (50 mM) 10 dakika 95 °C' de inkübe edildi.

Sonra 10 dakika 5,000 devirde santrifüj yapıldı ve santrifüj sonrası süpernatant atıldı.

6. 500 µl Lyticase solüsyonu eklenerek 37 °C' de 30 dakika muamele edildi ve sferoblast yapı oluşturuldu.

7. Elde edilen solüsyon mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 10 dakika 14,000 devirde santrifüj yapıldı ve santrifüj sonrası süpernatant atıldı.

8. 180 µl **ATL buffer** ve 20 µl **Proteinase K** solüsyonunu pellete eklendi ve sonra 15 dakika 55 °C' de inkübe edildi.

9. Elde edilen solüsyonun 200 µl' si mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

10. 200 µl **AL buffer** eklendi ve sonra 15 saniye vortekslendi.

11. 56 °C' de kuru ısı bloğunda 10 dakika inkübe edildi.

12. Kısa bir santrifüj ile kapakta biriken sıvı aşağıya indirildi.

13. 200 µl Ethanol (% 96-100) örneğe eklendi ve 15 saniye vortekslendi.

14. Kısa bir santrifüj ile kapakta biriken sıvıyı aşağıya indirildi.

15. Dikkatli bir şekilde 2 ml koleksiyon tüplerine aktarma işlemi için, otomatik pipetle tüpteki tüm sıvı alınarak koleksiyon tüpüne yerleştirilmiş spin kolonlara transfer edildi.

Tüpün kapağı kapatılarak 6.000 x g (8.000 rpm) 'de 1 dakika santrifüj edildi.

Altındaki koleksiyon tüpü atılarak yenisi ile değiştirildi.

16. Spin kolona 500 µl **AW1 buffer** ekleyip 6.000 x g- (8.000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi ve altındaki koleksiyon tüpü atılarak yenisi ile değiştirildi.

17. Spin kolona 500 µl **AW2 buffer** eklendi en yüksek hızda (20.000 x g- 14.000 rpm) 3 dakika santrifüj edildi.

Altındaki koleksiyon tüpü atılarak yenisi ile değiştirildi.

18. Spin kolonu 1.5 ml' lik ependorf tüpe yerleştirildi. 200 µl AE buffer ekleyip oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. 6.000 x g (8.000 rpm)' de 1 dakika santrifüj edildi.

Sonuç olarak; 200 µl DNA ekstraktı elde edilerek amplifikasyona hazır hale getirilmiş oldu.

3.2.3. *Candida* DNA'sının Amplifikasyonu

Modifiye manuel (Lyticase + QIAamp DNA Mini Kit) ekstraksiyon ile otomatize MagNA Pure LC ekstraksiyon protokolünün uygulanması sonucu elde edilen *Candida* DNA'larının amplifikasyonu için Taq PCR Core Kit (Qiagen) kullanılmıştır.

Elde edilen DNA'lardan örnek başına 10 µl alındı ve Taq PCR Core Kit (Qiagen) kullanılarak reaksiyon karışımı (Çizelge 3.4) oluşturuldu.

Sentetik oligonükleotid primerler Pcon 1 (5'-AGT TTC GCG TAT GGT CTC CC-3') ve Pcon 2 (5'-GTT GCG GCC ATA TCT AGC AC-3') *Candida* türleri arasında ortak olan 5s rDNA bölgesinden seçildi (54).

Oluşturulan reaksiyon karışımı (Çizelge 3.4) termal çevirici cihazına (Techne-Genius) Çizelge 3.5'de belirtilen program doğrultusunda yüklendi ve *Candida* DNA'sı çoğaltıldı.

Çizelge 3.4: Reaksiyon karışımı

Amplifikasyon İçeriği	Örnek Başına (µl)
10X buffer	3
Q solüsyonu 5X	6
dNTP miks (10mM)	0.3
Primer-1 (100 pm)	0.3
Primer-2 (100 pm)	0.3
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.4
d H ₂ O	9.7
Örnek DNA	10
Toplam hacim (µl)	30

Çizelge 3.5: Termal çevirici cihaz programı

Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
1	94	1 dakika
30	94	30 saniye
	58	45 saniye
	72	1 dakika
1	72	1 dakika

3.3. Amplifiye Candida DNA'sının Agaroz Jel Elektroforez ile Görüntülenmesi

Amplifikasyon ürünleri; % 2'lik TBE (Tris-borate) agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak yürütüldü ve etidyum bromid ile boyandıktan sonra yürüyen DNA bantları UV-transluminatörde görüntülendi ve incelendi.

3.3.1. Elektroforez İşlemleri

Jelin Hazırlanması

10X TBE (Tris borate) stok solüsyonu hazırlamak için gereken kimyasal maddeler: Tris, Boric asid, 0.5 M Na₂ EDTA (disodyum etilendiamintetraasetat) (pH 8.0), distile deiyonize su (Kimyasal maddeler ve oluşturulacak 10 X TBE stok solüsyonu oda sıcaklığında muhafaza edilebilir).

1. 0.5 M Na₂ EDTA (pH 8.0) solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyondan 40 ml 0.5 M hazırlamak için: Na₂ EDTA (MW= 372.24), 7,4448 g hassas terazide tartıldı. Tartılan Na₂ EDTA üzerine, distile su eklenerek toplam hacim 40 ml'ye tamamlandı, magnetik karıştırıcıda ve oda ısısında karıştırıldı. Aynı anda solüsyonun pH değerini 8.0 yapmak için, pH değeri pH metre ile kontrol edilerek azar azar NaOH pelletinden eklendi. Elde edilen solüsyon alikotlandı ve otoklavlanarak sterilize edildi.

2. 108 g Tris ve 55 g Borik asid hassas terazide tartıldı. Distile suda eklenerek toplam hacim 900 ml'ye tamamlandı. Çözdürme işlemini kolaylaştırmak için

magnetik karıştırıcıda ve oda ısısında karıştırıldı. 40 ml 0.5 M Na₂ EDTA (pH 8.0) eklendi ve toplam hacim distile su eklenerek 1 litre'ye tamamlandı.

3. 1X TBE çalışma solüsyonu hazırlamak için 10X TBE stok solüsyonu, hacimsel olarak 10'da bir oranında distile su ile dilue edildi.

4. % 2'lik agaroz jel için; 100 ml 1X TBE solüsyonu için 2 g agaroz, hassas terazide tartıldı. Agarozun üzerine, 100 ml 1X TBE solüsyonu eklendi. Mikrodalga fırında medium ısı ayarında 2-3 dakika ısıtıldı. Sonra 1 dakika kadar soğuması beklendi.

Jelin Tablaya Dökümü

Jel tablasının iç yüzeyi ve tarakların uçları önceki elektroforez işlemlerinden arta kalan jel artıkları yönünden incelenerek kirlilik varsa temizlendi. Tarakların uçları kontrol edilerek düzgün bir şekilde Jel tablasına yerleştirildi. Su terazisi ile jel tablasının denge ayarı yapıldı. Hazırlanan % 2 agaroz içeren sıvı haldeki karışım, jel tablasına ara vermeden ve hava kabarcığı oluşturmadan hızlıca döküldü. Jelin soğuyarak katılaşması beklendi. Taraklar jele zarar vermeden dikkatlice çıkarıldı. Jelde oluşan kuyucuklar kontrol edildi.

Elektroforez tankına, tank üzerinde işaretle belirtilen yere kadar 1X TBE çalışma solüsyonundan eklendi. Katılaşmış jel, jel tablasıyla birlikte DNA'nın pozitif kutba hareket edeceği göz önünde bulundurularak, 1X TBE çalışma solüsyonu içeren elektroforez tankına uygun pozisyonda altında hava kabarcığı olmayacak şekilde yerleştirildi.

Jele Amplifikasyon Ürünlerinin Yüklenmesi

Her çalışma örneği için, bir parça parafilm üzerine 10 µl amplifikasyon ürünü ile 2 µl gel loading solüsyonu (5X) ayrı ayrı kondu. Jeldeki kuyucuklara yükleme yapmadan önce pipetleme ile DNA ve gel loading solüsyonu parafilm üzerinde karıştırıldı, sonra bu karışım pipetlenerek jel üzerindeki uygun kuyucuğa inoküle edildi. Her elektroforez işleminde, ml'de 0.5 mg DNA içeren kullanıma hazır marker (DNA Ladder- MBI Fermantes)'da jeldeki uygun kuyucuğa yüklendi.

Elektroforez tankına elektrik akımı taşıyacak kablolar + ve - uçları dikkate alınarak doğru akım üreten güç kaynağına (BIO-RAD, Power PAC 300) bağlandı.

Güç kaynağı jelin büyüklüğüne göre 70 ya da 120 Volta, süre olarak da 30 ya da 45 dakikaya ayarlandı. (Cihaz çalıştırıldığında + ve - kutup bölgelerinden hava kabarcıklarının çıkışı gözlemlenmelidir.)

Yürütme işlemi sonucunda; jel üzerinde negatif (-) kontroller ile birlikte 105 bp'lik *Candida* DNA ürünü elde edilen pozitif (+) kontroller ve oluşacak kandidemili hastalara ait *Candida* DNA bantlarının analizi, oda sıcaklığında UV transilluminatör cihazında (Alpha Inotech Tranluminator) değerlendirildi (55,56).

Ek 1: Hasta İzlem Formu

Hasta ad-soyad:

Dosya no:

İstem no:

Yatış tarihi:

Cinsiyet:

Yaş:

Tel. no:

Doğum yeri:

Adres:

Klinik birim:

Yatış nedeni:

Primer hastalık (altta yatan hastalık):

Oral veya aksiler Ateş: °C

Nötropeni düzeyi

2000 – 1000 / μ l	1000 – 500 / μ l	< 500 / μ l

Sistemik kandidiyazis tanısını destekleyen bulguları

	Var	Yok	Süre
Geniş spektrumlu antibiyotiklere cevap vermeyen inatçı ateş			
Pyelonefrit			
Peritonit			
Endoftalmit			
Artrit			
Pneumoni			
Menenjit			
Makronodüler cilt lezyonları			

Risk faktörleri

	Var	Yok
Santral venöz katater		
Üriner katater		
Böbrek yetmezliği / (Diyaliz Hemodiyaliz / Periton diyalizi)		
Parenteral hiperalimentasyon		
Abdominal / Kardiyak cerrahi girişim		
Organ transplantasyonu		
Yanık		
Diabetes Mellitus (DM) ; Tip I DM / Tip II DM		
Kandidürü hikayesi		
Kortikosteroid kullanımı		
Çoklu Antibiyotik kullanımı		

Ek 2: Çalışmaya alınan hastaların bölümlere dağılımı, tanıları ve yaşları

Hasta	Olgu no	Bölüm	Yaş	Tanı
A.D	1	Dahiliye/ Hematoloji	67	AML
E.A	2	Dahiliye/ Hematoloji	62	MM
M.S	3	Dahiliye/ Hematoloji	25	ALL
H.M	4	Dahiliye/ Hematoloji	44	ALL
S.Ç	5	Dahiliye/ Hematoloji	65	NHL
S.S	6	Kemik İliği Transplantasyon	22	ALL
H.P	7	Dahiliye/ Hematoloji	72	AML
İ.C.B.	8	Kemik İliği Transplantasyon	12	ALL
N.T	9	Dahiliye/ Hematoloji	73	HL
İ.Ç	10	Kemik İliği Transplantasyon	2	Thalasemi major
A.S.S	11	Kemik İliği Transplantasyon	27	ALL
M.S.Ö	12	Kemik İliği Transplantasyon	7	Thalasemi major
M.V.	13	Kemik İliği Transplantasyon	42	NHL
D.A	14	Kemik İliği Transplantasyon	14	ALL
R.K	15	Kemik İliği Transplantasyon	18	ALL
B.R	16	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	7	NHL
N.A	17	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	5	ALL
M.E.Ç	18	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	1	ALL
F.A	19	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	4	AML
P.A	20	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	22	ALL
M.Y	21	Dahiliye/ Hematoloji	21	AML
D.Ç	22	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	6	ALL
A.Y	23	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	10	ALL
B.Ş.K	24	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	5	ALL
A.E	25	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	7	ALL
N.A	26	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	3	AML
S.G	27	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji		NHL
B.B.Y	28	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	9	A.ANEMİ

Hasta	Olgu no	Bölüm	Yaş	Tanı
A.O	29	Dahiliye/ Hematoloji	62	NHL
F.B	30	Pediatric/Hematoloji- Onkoloji	3	Burkit Lenfoma
S.B	31	Pediatric/Hematoloji- Onkoloji	16	ALL
H.K	32	Dahiliye/ Hematoloji	23	NHL
A.K	33	Dahiliye/ Hematoloji	71	AML
H.T	34	Dahiliye/ Hematoloji	49	AML
S.Ö	35	Dahiliye/ Hematoloji	37	ALL
H.T	36	Dahiliye/ Hematoloji	48	KML
F.A	37	Dahiliye/ Hematoloji	53	MM
S.Ü	38	Pediatric/Hematoloji- Onkoloji	3	Nöroblastom
E.T	39	Dahiliye/ Hematoloji	26	AML
M.A	40	Dahiliye/ Hematoloji	59	AML
O.B	41	Dahiliye/ Hematoloji	24	AML
İ.G	42	Dahiliye/ Hematoloji	65	HL
H.A	43	Dahiliye/ Hematoloji	45	AML
D.T	44	Dahiliye/ Hematoloji	63	NHL
H.B	45	Dahiliye/ Hematoloji	54	HB
S.Ç	46	Dahiliye/ Hematoloji	36	HL
E.Ş	47	Dahiliye/ Hematoloji	19	AML
D.T	48	Dahiliye/ Hematoloji	37	NHL
B.G	49	Pediatric/Hematoloji- Onkoloji	9	NHL
D.Ö	50	Dahiliye/ Hematoloji	49	HL
R.Z	51	Dahiliye/ Hematoloji	26	AML
R.K	52	Dahiliye/ Hematoloji	19	HL
T.B	53	Dahiliye/ Hematoloji	32	MDS
A.Ş	54	Dahiliye/ Hematoloji	18	HL
Z.S	55	Dahiliye/ Hematoloji	78	KLL
S.K	56	Dahiliye/ Hematoloji	58	AML
F.S	57	Dahiliye/ Hematoloji	27	A. ANEMİ

Hasta	Olgu no	Bölüm	Yaş	Tanı
İ.T	58	Dahiliye/ Hematoloji	41	AML
Ş.G	59	Dahiliye/ Hematoloji	25	A. ANEMİ
H.A	60	Dahiliye/ Hematoloji	39	NHL
A.İ.Ö	61	Dahiliye/ Hematoloji	33	ALL
S.Ü	62	Dahiliye/ Hematoloji	31	MM
T.Ö	63	Dahiliye/ Hematoloji	30	NHL
Z.M	64	Dahiliye/ Hematoloji	58	AML
A.Ü	65	Dahiliye/ Hematoloji	80	MDS
G.B	66	Dahiliye/ Hematoloji	43	HL
Ş.Ö	67	Dahiliye/ Hematoloji	67	AML
M.A.T	68	Dahiliye/ Hematoloji	71	NHL
H.E	69	Dahiliye/ Hematoloji	57	AML
R.B	70	Dahiliye/ Hematoloji	39	AML
M.K	71	Dahiliye/ Hematoloji	23	AML
C.S	72	Dahiliye/ Hematoloji	63	HL
M.K	73	Dahiliye/ Hematoloji	51	MM
A.B	74	Dahiliye/ Hematoloji	73	MDS
S.T	75	Dahiliye/ Hematoloji	46	HL
A.G	76	Dahiliye/ Hematoloji	25	ALL
H.B	77	Dahiliye/ Hematoloji	44	AML
M.K	78	Dahiliye/ Hematoloji	75	AML

4. BULGULAR

4.1. Hasta Profilleri

Çalışmaya alınan; 54'ü Dahiliye / Hematoloji, 16'sı Pediatri / Hematoloji-Onkoloji servislerinde ve sekizi Kök Hücre Transplantasyon (KHT) ünitesinde yatan toplam 78 hastanın 47'si erkek (% 60.3) ve 31'i kadın (% 39.7) idi (Çizelge 4.1, 2).

Çizelge 4.1. Hastaların yattığı klinik bölümler

Klinik Bölümler	Sayı (n)	%
Dahiliye / Hematoloji	54	69.2
Pediatri / Hematoloji-Onkoloji	16	20.5
KHT	8	10.3
Toplam	78	100

KHT ünitesinde yatan sekiz hastanın; dördü Pediatri / Hematoloji-Onkoloji (% 50) ve dördü Dahiliye / Hematoloji bölümlerince (% 50) takip edilmekteydi. Pediatrik dört hastanın biri kız üçü erkekti. Erişkin dört hasta ise erkekti.

Çizelge 4.2: Erişkin ve pediatrik, erkek ve kadın hasta yaşlarının; ortalamaları, ortanca değerleri, alt ve üst sınır değerleri.

	n	%	Yaş Ortalamaları (Yaş ± SD)	Ortanca Değerleri	Alt ve Üst Sınır Değerleri
Erişkin Erkek	37	62.7	43.2 ± 18.45	39	18 - 75
Erişkin Kadın	22	37.3	47.81 ± 18.19	48.5	19 - 80
Pediatrik Erkek	10	52.6	6.8 ± 3.34	7.5	1 - 12
Pediatrik Kız	9	47.4	7.0 ± 4.57	6.0	3 - 16

Erişkin erkeklerin yaş ortalamaları (yaş ± SD) 43.2 ± 18.45, Erişkin kadınların yaş ortalamaları (yaş ± SD) 47.81 ± 18.19, pediatrik erkeklerin yaş ortalamaları (yaş ± SD) 6.8 ± 3.34 ve pediatrik kızların yaş ortalamaları ise (yaş ± SD) 7.0 ± 4.57 olarak saptandı.

Hastaların yaşlarının alt ve üst sınır değerleri erişkin hastalarda 18 ile 80 pediatrik hastalarda ise bir ile 16 arasında değişmekte idi (Çizelge 4.2).

AML, Dahiliye/ Hematoloji servisindeki 54 hastanın 20'sinde (% 37); ALL ise, Pediatri/Hematoloji-Onkoloji servisindeki 16 hastanın altısında (% 37.5) ve KHT ünitesindeki sekiz hastanın beşinde (% 62.5) en sık saptanan primer tanıları (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3: Altta Yatan Primer Hastalıklar

Primer Tanı	Dahiliye/Hematoloji		Pediatri/Hem.- Onk.		KHT	
	n	%	n	%	n	%
AML	20	37	2	12.5		
ALL	5	9.25	6	37.5	5	62.5
NHL	8	14.81	3	18.75	1	12.5
HL	10	18.50				
MM	4	7.40				
A.A	2	3.70	1	6.25		
MDS	3	5.55				
T. Major					2	25
B.lenfoma			1	6.25		
KLL	1	1.85				
KML	1	1.85				
N.Blastom			1	6.25		
Toplam	54	100	16	100	8	100

4.2. PZR ve Optimizasyon

4.2.1. MagNA Pure

Candida PZR yönteminin optimizasyonu için; standart *Candida* suşu (*C.albicans*'ın ATCC 90028) sağlıklı insan EDTA'lı kanına inoküle edilerek 10^1 - 10^5 CFU/ml olacak şekilde seri dilüsyonları yapıldı ve standart *Candida* DNA'sı otomatize MagNA Pure cihazında, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) ile ekstrakte edildi.

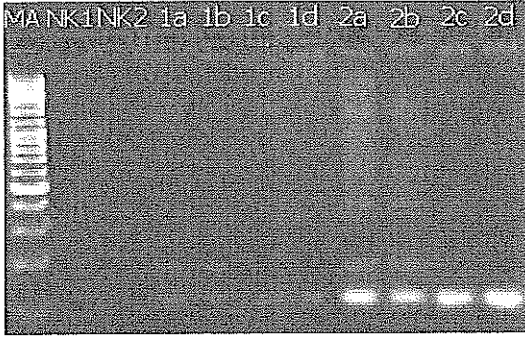
Ekstrakte edilen 10^1 ve 10^5 CFU/ml *Candida* DNA'sı ile toplam hacmi 30 μ l olan amplifikasyon içeriği; çizelge 4.4'de gösterilen miktarlarda düzenlendi. Amplifikasyon için Taq PCR Core Kit (Qiagen) kullanıldı.

Çizelge 4.4: *Candida* amplifikasyonu için gerekli reagenler ve miktarları

Amplifikasyon İçeriği	10^1 CFU / ml İçeren Amplifiye <i>Candida</i> DNA'sı				10^5 CFU / ml İçeren Amplifiye <i>Candida</i> DNA'sı			
	1a (μ l)	1b (μ l)	1c (μ l)	1d (μ l)	2a (μ l)	2b (μ l)	2c (μ l)	2d (μ l)
10x Buffer	3	3	3	3	3	3	3	3
Q solüsyonu 5x	6	6	6	6	6	6	6	6
MgCl ₂ (25 mM)	1.8	1.8	-	-	1.8	1.8	-	-
dNTP (10mM)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Primer-1 (100 pm)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Primer-2 (100 pm)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Taq DNA Polimeraz	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
dH ₂ O	7.9	11.9	9.7	13.7	7.9	11.9	9.7	13.7
Örnek DNA	10	6	10	6	10	6	10	6
Toplam Hacim (μ l)	30	30	30	30	30	30	30	30

Amplifikasyon işleminin bitmesini takiben ürünler, agaroz gelde yürütüldü ve etidyum bromid ile boyandıktan 105 bp büyüklüğündeki DNA bantları UV-transluminatörde görüntülendi ve incelendi (Şekil 4.1).

Şekil 4.1: PZR bant görüntüleri



MA: Moleküler Ağırlık Belirteci (100 bp)

NK1: Negatif kontrol- Steril apirojenik distile su

NK2: Negatif kontrol- Sağlıklı EDTA'lı insan kanı

1a,1b, 1c, 1d: 10^1 CFU/ml *Candida* DNA'sı bulunan amplifikasyon içeriğine (Çizelge 4.4) ait sütunlar

2a, 2b, 2c, 2d: 10^5 CFU/ml *Candida* DNA'sı bulunan amplifikasyon içeriğine (Çizelge 4.4) ait sütunlar

Agaroz gelde gözlenen DNA bantları incelendiğinde (şekil 4.1);

- i) Negatif kontrollere ait sütunda ve testte kontaminasyonun olmadığı sonucuna varıldı.
- ii) Uygulanan PZR yönteminin, mililitrede 10^1 CFU *Candida* DNA'sını tesbit edebilecek analitik duyarlılıkta olduğu saptandı.
- iii) $MgCl_2$ kullanılmayan (1c, 1d, 2c ve 2d) sütunlarda artefakt gözlenmedi ve daha net olarak değerlendirildi.
- iv) Örnek DNA'sını daha iyi temsil etmesi ve artefaktın gözlenmemesi nedeniyle 1c ve 2c sütunlarındaki amplifikasyon içerikleri net optimizasyon verisi olarak değerlendirildi.

4.2.2. Qiagen

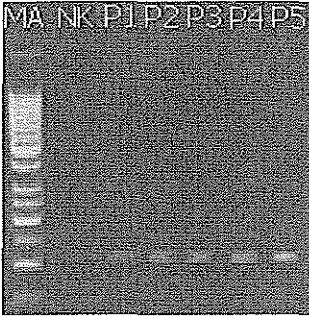
Otomatize MagNA Pure LC protokolünü uygulayarak elde ettiğimiz net optimizasyon verilerinin gösterildiği çizelge 4'deki 1c ve 2c sütunlarındaki yer alan amplifikasyon içerikleri, Manuel (Lyticase (Sigma) + QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)) protokol ile ekstrakte edilen standart *Candida* suşunun (*C.albicans*'ın ATCC 90028) $10^1 - 10^5$ CFU / ml dilüsyonlarında uygulandı (şekil 4.3).

4.3. Testlerin Analitik Duyarlılığı

4.3.1. Otomatize MagNA Pure LC (Roche) Protokolü

MagNA Pure cihazında, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Roche) ile yapılan otomatize ekstraksiyon ve ardından uygulanan PZR yöntemi ile ml'de 10^1 CFU'ya kadar olan *Candida* DNA'sı tesbit edilmiştir (şekil 4.2).

Şekil 4.2: PZR bant görünümleri



NK: Negatif kontrol (EDTA'lı Sağlıklı insan kanı)

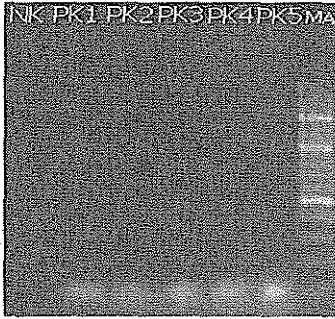
MA: Moleküler Ağırlık Belirteci (100 bp)

P1, P2, P3, P4, P5: Pozitif kontrolün sırasıyla $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$ CFU/ml dilüsyonları

4.3.2. Modifiye manuel (Lyticase (sigma)+QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)) Protokol

Modifiye edilen manuel (Lyticase (Sigma)+QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)) ekstraksiyon protokolü ile yapılan ekstraksiyon ve ardından uygulanan PZR yöntemi ile ml'de 10^1 'e kadar olan *Candida* DNA'sı tesbit edilmiştir (şekil 4.3).

Şekil 4.3: PZR bant görünümleri



NK: Negatif kontrol (EDTA'lı Sağlıklı insan kanı)

MA: Moleküler Ağırlık Belirteci (100 bp)

PK1, PK2, PK3, PK4, PK5: Pozitif kontrolün sırasıyla 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 CFU/ml dilüsyonları

4.4. Hasta Kanlarında PZR

Çalışmaya alınan, toplam 78 hastanın EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri farklı iki ekstraksiyon kiti ile çalışıldı (QIAamp DNA mini kit, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit).

Her iki yöntemle ekstrakte edilen *Candida*'ların DNA'ları ortak bir amplifikasyon kiti (Taq PCR Core Kit – Qiagen) yardımı ile PZR yöntemi uygulanarak termal çeviricide çoğaltıldı.

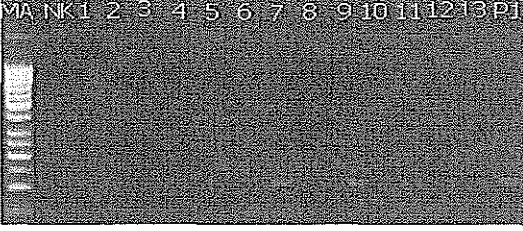
Amplifiye ürünler Et. Br. İçeren agaroz gelde yürütüldü. 105 bp büyüklüğündeki *Candida* DNA bantları UV ışık altında araştırılarak görüntülendi (Şekil 4.3 ve 4.4).

Candida DNA'sı pozitif saptanan yedi hastaya ait (7, 9, 30, 31, 38, 44, 49 numaralı hastalar) agaroz jel görüntüleri şekil 3, 4, 5, 6' da görülmektedir.

4.4.1. Otomatize MagNA Pure LC (Roche) Protokolü

Otomatize MagNA Pure LC cihazında, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) kullanılarak *Candida* DNA'sı amplifiye edilen hastalar (şekil 4. 3, 4, 5, 6).

Şekil 4.4: PZR bant görünümleri



MA: Moleküler Ağırlık Belirteci (100 bp)

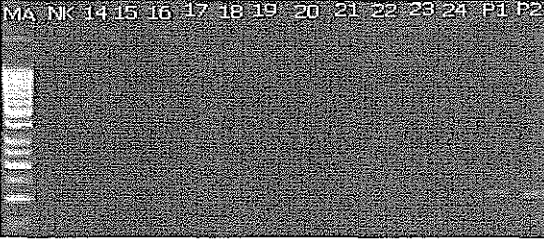
NK: Negatif kontrol- Sağlıklı EDTA'lı insan kanı

1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13: *Candida* DNA'sı negatif olan hastalar

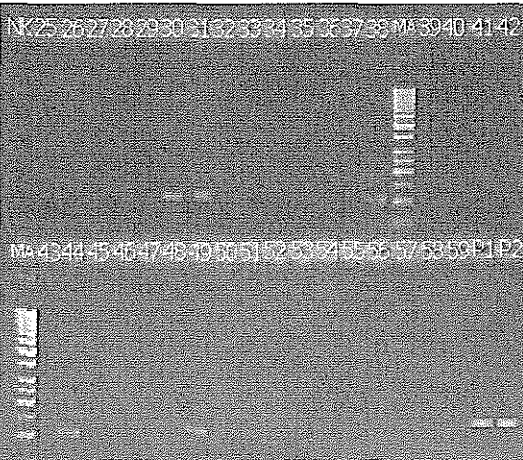
7, 9: *Candida* DNA'sı pozitif olan hastalar

P1 : Pozitif kontrol 10^1 CFU/ml

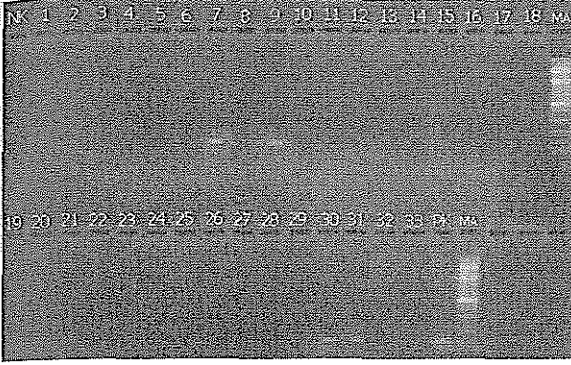
Şekil 4.5: PZR bant görünümleri



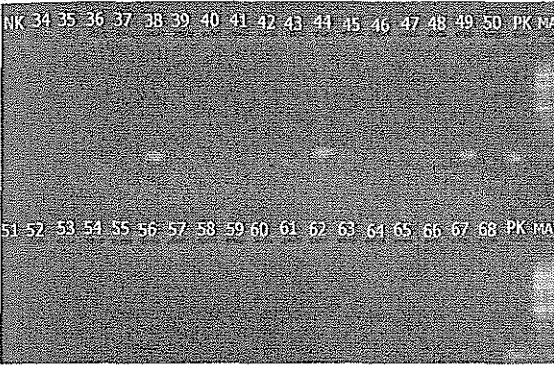
Şekil 4.6: PZR bant görünümleri



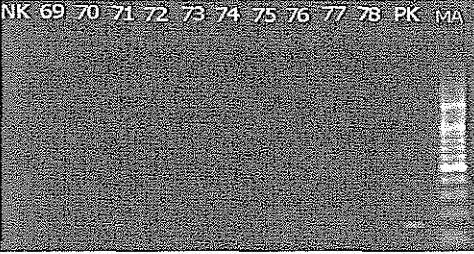
Şekil 4.8: PZR bant görüntüleri



Şekil 4.9: PZR bant görüntüleri



Şekil 4.10: PZR bant görüntüleri



NK: Negatif kontrol- Sağlıklı EDTA'lı insan kanı

MA: Moleküler Ağırlık Belirteci (100 bp)

1, 2, 3, 4, 5, 6, 8,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 7, 77, 78: *Candida* DNA'sı negatif olan hastalar

7, 9, 30, 31, 38, 44, 49: *Candida* DNA'sı pozitif olan hastalar

PK: Pozitif kontrol 10^1 CFU/ml

Farklı iki ekstraksiyon kitinin kullanılmasının ardından her iki kitinde

birbirleriyle tam uyumlu olarak 7, 9, 30, 31, 38, 44, 49 numaralı toplam yedi hastanın *Candida* DNA'sını ekstrakte ettiği gösterilmiştir (Şekil 4. 7, 8, 9,10).

Çizelge 4.5: *Candida* DNA ekstraksiyonunda, modifiye manuel (Lyticase + QIAamp DNA mini kit-Qiagen) ve otomatize MagNA Pure LC (Roche) protokollerinin; gerekli kan hacmi, ekstraksiyon süresi, analitik duyarlılık ve maliyet parametrelerinin karşılaştırılması.

Parametreler	Modifiye manuel (Lyticase + QIAamp DNA Mini Kit) ekstraksiyon protokolü	Otomatize MagNA Pure LC ekstraksiyon protokolü
Gerekli kan hacmi	3 ml	100 µl
Sekiz hasta için ortalama ekstraksiyon süresi (saat)	4	2
Testin analitik duyarlılığı (CFU/ ml)	10	10
Bir örneğin ekstraksiyon maliyeti (YTL)	15	12.00 *

*MagNA Pure cihazının yönetim programı; en az sekiz örneğin çalışmasına göre kurgulandığından sarf ve kit malzemelerini sekiz örneğe yönelik harcamaktadır. Bu nedenle, maliyet değerlendirilmesi yapılırken bu farklılık göz önünde bulundurulmalıdır.

4.5. Kan Kültüründe Üreyen *Candida* Türleri

Çalışmaya alınan toplam 78 hastadan yedisinin (% 9) kan kültürlerinde *Candida* üremesi olmuştur.

Üreyen *Candida* türleri tiplendirilmiş ve pozitif yedi hastanın tümünde *C.albicans* saptanan tür olarak bulunmuştur.

4.6. PZR ve Kan kültürü pozitif hastaların primer hastalıkları

PZR ve Kan kültürü pozitif; 30, 31, 38, 49 olgu no'lu pediatrik hematoloji-onkoloji servisinde yatan dört hastanın sıra ile primer tanıları Burkitt L., ALL, N.blastom ve NHL iken 7, 9, 44 olgu no'lu üç dahiliye hematoloji hastasının ise sıra ile primer tanıları ise AML, HL ve NHL idi (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6: PZR ve Kan kültürü pozitif hastaların primer hastalıkları

	PZR ve Kan Kültürü Pozitif Hastalar (Olgu No)						
	7	9	30	31	38	44	49
Primer Tanılar	AML	HL	Burkit L.	ALL	N.blastom	NHL	NHL

4.7. *Candida*'ların kan kültüründe saptanma süresi

Kan kültürü pozitif yedi hastanın, Bactec 9240 (Becton Dickinson Diagnostic) kan kültür cihazında kan kültürlerinin ortalama üreme sinyali (Süre \pm SD) 72 ± 5 saat 12 dakikada alınmıştır. Pasaj, gram boyama, ve germ tüp testi için 24 saat harcanmıştır. *Candida*'ların tür tayini için harcanan toplam süre 96 saattir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7: *Candida*'ların kan kültüründe saptanma süresi

	Süre (Saat)
Kan Kültüründe Üreme Sinyali	72
Pasaj, Gram Boyama ve Germ Tüp Testi	24
Toplam Süre (Saat)	96

4.8. Kan kültürü ve PZR yöntemlerinin sonuçları

PZR yöntemi ile *Candida* DNA'sı saptanan hastalar, kan kültürlerinde de *Candida* üremesi olan hastalar idi (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8: Kan kültürü ve PZR yöntemlerinin sonuçlarının karşılaştırılması

Yöntemler	Sonuç					
	Pozitif		Negatif		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Kan Kültürü	7	9	71	91	78	100
PZR	7	9	71	91	78	100

Kan kültürü ile PZR yöntemi arasında tam uyumluluk saptanmıştır.

4.9. Kan kültürü ve PZR yöntemlerinin süreleri

Otomatize MagNA Pure LC protokolü (Roche) ile ekstraksiyon iki saat*, Manuel (Lyticase (Sigma) + QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)) ekstraksiyon protokolünün kullanıldığı ekstraksiyon ise dört saat sürmüştür.

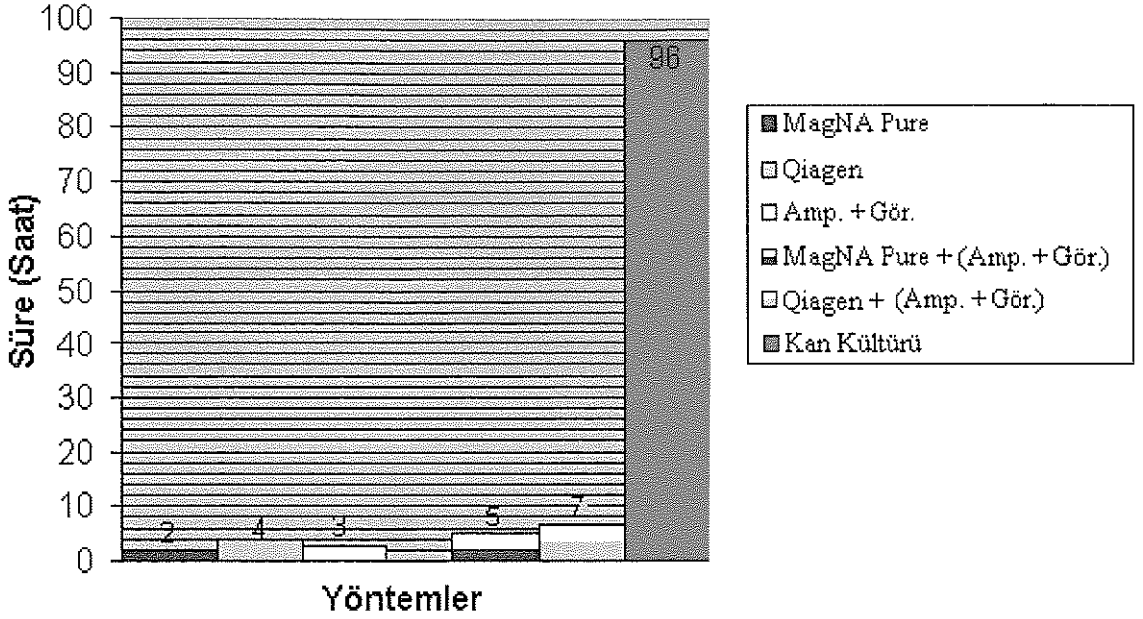
*MagNA Pure LC cihazının yönetim programı; en az sekiz örneğin çalışmasına göre kurgulandığından, süre dikkate alındığında bu özellik göz önünde bulundurulmalıdır (Bu süreye cihaz dışında yapılması gereken işlemler dahildir).

Her iki ekstraksiyonun gerçekleştirilmesinin ardından uygulanan Taq PCR Core kit (Qiagen) ile amplifikasyon iki saat 20 dakika ve agaroz gelde yürütme sonrasında UV transluminatörde görüntüleme işlemleri 40 dakika olmak üzere, amplifikasyon + görüntüleme üç saat sürmektedir.

İki saat süren Otomatize MagNA Pure LC ekstraksiyon protokolü ve üç saat süren amplifikasyon + görüntüleme ile DNA bantlarının değerlendirilmesi toplam beş saatlik süre sonunda gerçekleştirilmiştir.

Dört saat süren modifiye manuel (Lyticase + QIAamp DNA Mini Kit) ekstraksiyon protokolü ve üç saat süren amplifikasyon + görüntüleme ile DNA bantlarının değerlendirilmesi toplam yedi saatlik süre sonunda gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9: Kan kültürü ve PZR yöntemlerinin sürelerinin karşılaştırılması



4.10. Kan kültürü ve PZR yöntemlerinin maliyetleri

Bir örnek için;

- i) MagNA Pure LC protokolü ile ekstraksiyon (Roche) 12 YTL* ardından Taq PZR Core Kit (Qiagen) ile amplifikasyon ve amplifiye ürünün Et.Br. içeren agaroz jelde yürütülmesi ve UV Transluminatör altında görüntülemesi 4 YTL olmak üzere toplam 16 YTL' dir.

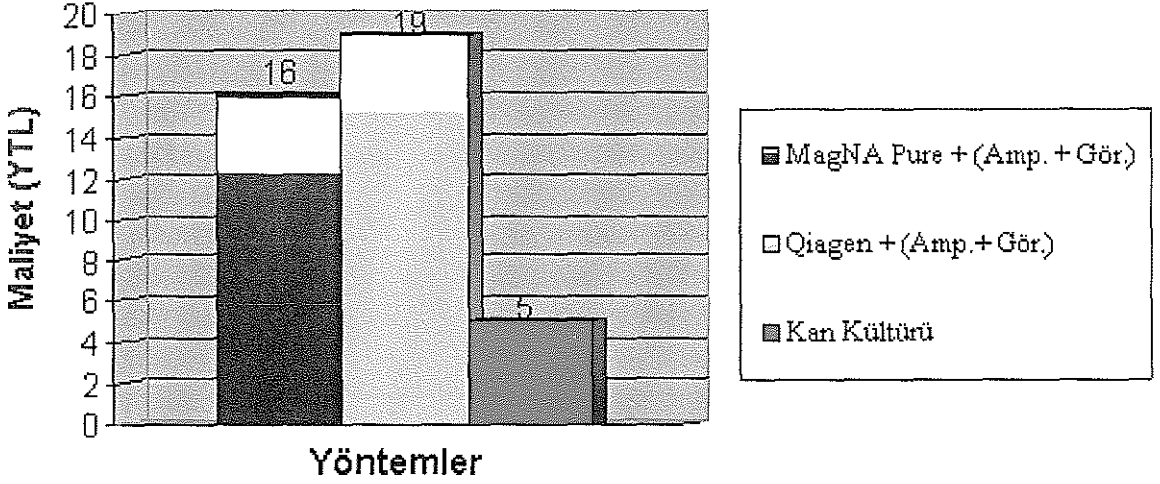
*MagNA Pure cihazının yönetim programı; en az sekiz örneğin çalışmasına göre kurgulandığından sarf ve kit malzemelerini sekiz örneğe yönelik harcamaktadır.

Bu nedenle, maliyet değerlendirilmesi yapılırken bu farklılık göz önünde bulundurulmalıdır.

- ii) Modifiye manuel (Lyticase (Sigma) + QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)) protokol ile ekstraksiyon 15 YTL ardından Taq PZR Core Kit (Qiagen) ile amplifikasyon ve amplifiye ürünün Et.Br. içeren agaroz jelde yürütülmesi ve UV Transluminatör altında görüntülemesi 4 YTL olmak üzere toplam 19 YTL' dir.

- iii) Kan kültürü Yöntemi ile konvansiyonel olarak *Candida* varlığının gösterilmesi 5 YTL'dir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10: Kan kültürü ve PZR yöntemlerinin maliyetlerinin karşılaştırılması



Çizelge 4.11: Kan kültürü pozitif hastaların diğer idrar, katater, dışkı ve boğaz kültürlerinde *Candida* araştırılması

Olgu No	Yaş	Bölüm	Kan	İdrar	Katater	Dışkı	Boğaz
7	72	Dahiliye/Hematoloji	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>			
9	73	Dahiliye/Hematoloji	<i>C.albicans</i>			<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>
30	3	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	<i>C.albicans</i>			<i>C.albicans</i>	
31	16	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>			<i>C.albicans</i>
38	3	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>
44	63	Dahiliye/ Hematoloji	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>		
49	9	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji	<i>C.albicans</i>				

PZR pozitif ve kan kültüründe *C.albicans* üreyen yedi hastadan; dördü Pediatri/Hematoloji- Onkoloji, üçü Dahiliye/Hematoloji bölümünde yatmaktaydı.

Pediatri/Hematoloji- Onkoloji bölümünde yatan dört hastanın üçü erkek biri kız hasta idi ve yaş ortalamaları (yaş \pm SD) 9.33 ± 5.31 , Dahiliye/Hematoloji bölümünde yatan üç hastanın ise ikisi kadın biri erkek hasta idi ve yaş ortalamaları (yaş \pm SD) 69.33 ± 4.49 olarak saptandı.

Kan kültüründe *C.albicans* üreyen yedi hastadan iki'sinin; idrar, katater ve dışkısında; üç hastanın ise boğaz kültürlerinde, *C.albicans* üremiştir.

Kan kültüründe üreme olan hastaların; iki'sinde sadece idrarda, birinde dışkıda, bir hastada dışkı ve boğazda, bir hastada idrar ve boğazda, bir hastada katater ve boğazda üreme olmuştur. İdrar, katater, dışkı ve boğaz kültüründe birlikte üreme görülmemiştir (Çizelge 4.11).

4.11. Kan kültür ve PZR negatif hastaların; idrar, katater, dışkı ve boğaz kültür sonuçları

71 hastanın 50'sinin kültürlerinde *Candida* üremesi gözlemlenmedi. 21 hastanın ise en az bir kültüründe *Candida* üreme gözlenmiştir (Çizelge 4.12).

21 hastadan; beş hastanın idrar, beş hastanın katater, yedi hastanın dışkı ve üç hastanın boğaz kültürlerinde *Candida* üremesi olmuştur.

Türlere dağılım Çizelge 4.12' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12: Kan kültürü negatif olan hastaların; idrar, katater, dışkı ve boğaz kültürlerinde üreyen *Candida*'lar

Olgu No	Bölüm	İdrar	Katater	Dışkı	Boğaz
1	Dahiliye/Hematoloji			<i>C.albicans</i>	
4	Dahiliye/Hematoloji				<i>C.parapsilosis</i>
5	Dahiliye/Hematoloji	<i>C.albicans</i>			
8	KHT				
11	KHT	<i>C.parapsilosis</i>			
16	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji		<i>C.glabrata</i>		
19	Pediyatri/Hematoloji- Onkoloji			<i>C.tropicalis</i>	
21	Dahiliye/Hematoloji		<i>C.parapsilosis</i>		
34	Dahiliye/Hematoloji			<i>C.albicans</i>	
37	Dahiliye/Hematoloji			<i>C.parapsilosis</i>	
39	Dahiliye/Hematoloji				
43	Dahiliye/Hematoloji	<i>C.tropicalis</i>			
46	Dahiliye/Hematoloji			<i>C.parapsilosis</i>	
54	Dahiliye/Hematoloji			<i>C.albicans</i>	

Olgu No	Bölüm	İdrar	Katater	Dışkı	Boğaz
59	Dahiliye/Hematoloji		<i>C.parapsilosis</i>		
60	Dahiliye/Hematoloji			<i>C.albicans</i>	
64	Dahiliye/Hematoloji	<i>C.albicans</i>	<i>C.albicans</i>		
66	Dahiliye/Hematoloji	<i>C.tropicalis</i>			
68	Dahiliye/Hematoloji		<i>C.albicans</i>		
73	Dahiliye/Hematoloji				<i>C.albicans</i>
74	Dahiliye/Hematoloji				<i>C.tropicalis</i>

Bir hastanın idrar ve katater kültürlerinde aynı anda *C.albicans* üremesi olmuştur. İdrar, katater dışkı ve boğaz kültürlerinde birlikte üreme görülmemiştir.

4.12. Sistemik kandidiyazis tanısını destekleyen bulguların varlığı

Candida DNA'sı saptanan ve kan kültürlerinden yapılan izolasyon değerlendirilğinde *C.albicans* ürediği saptanan yedi hastada sistemik kandidiyazis tanısını destekleyen bulguların varlığı araştırılmıştır (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13: Sistemik kandidiyazis tanısını destekleyen bulguların varlığı

Bulgular	PZR ve Kan Kültürü Pozitif Hastalar (Olgu No)							Süre (Gün)
	7 H.P	9 N.T	30 F.B	31 S.B	38 S.Ü	44 D.T	49 B.G	
Geniş Spektrumlu Antibiyotiklere Cevap Vermeyen İnateç Ateş	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var	5
Pneumoni	Var	Var		Var		Var		5
Artrit						Var		6
Menenjit								
Pyelonefrit								
Peritonit								
Endoftalmit								
Makronodüler Cilt Lezyonları	Var							7

Yedi hastanın tümünden, çoklu antibiyotik tedavisine rağmen düşmeyen ve ortalama 4 gün süren ateş öyküsü alındı.

Dört hastada 5 gün önce başlayan pnömoni, bir hastada altı gün önce başlayan artrit, bir hastada yedi gündür süren makronodüler cilt lezyonları mevcuttu.

Üç hastada; ateş ve pnömoni, bir hastada; ateş, artrit ve pnömoni, iki hastada; ateş ve pnömoni birlikte mevcuttu. Üç hastada ise ateş dışında bir bulgu mevcut değildi (Çizelge 4.13).

4.13. Risk Faktörleri

4.13.1. Nötropeni süresi

Çalışmamızda kan kültüründe *C.albicans* üreyen ve kan örneklerinde *Candida* PZR'ı pozitif yedi hastamızın; tümünün median nötropeni süresi dokuz gündü. *Candida* PZR'ı negatif ve kan kültüründe *C.albicans* üremeyen toplam 71 hastamızın ise median nötropeni süresi yedi gündü. Nötropeni süresi, kan kültürü ve PZR sonucu pozitif saptananların kan kültürü ve PZR sonucu negatif saptanan hastalara göre daha uzun olması istatistiksel anlamlı fark (Fisher's kesin ki-kare testi) olduğunu göstermiştir (p= 0.000044) (Çizelge 4.14).

4.13.2. Nötropeni düzeyi

Kan kültüründe *C.albicans* üreyen ve kan örneklerinde *Candida* PZR'ı pozitif yedi hastamızın nötropeni düzeyi <500 / μ l idi. *Candida* PZR'ı negatif ve kan kültüründe *C.albicans* üremeyen toplam 71 hastamızın 14'ünün nötropeni düzeyi <500/ μ l idi. Kan kültürü ve PZR sonucu pozitif saptanan ile kan kültürü ve PZR sonucu negatif saptanan hastaların arasındaki nötropeni düzeyinin istatistiksel (Mann-Whitney U testi) anlamlı farklı olduğu saptanmıştır (p= 0.001) (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14: Hastaların Nötropeni Düzeyi ve Süresinin Karşılaştırılması

	Nötropeni süresi (gün) (median)	Nötropeni Düzeyi (μ l)	
		1000-500	< 500
PZR ve Kan Kültürü Pozitif Hastalar	9	-	7
PZR ve Kan Kültürü Negatif Hastalar	7	57	14
P değeri	0.001	-	0.000044

PZR yöntemi ile *Candida* DNA'sı saptanan ve kan kültürlerinde *C.albicans* üreyen hastaların risk faktörleri incelendiğinde; hastaların tümünde kortikosteroid ve çoklu antibiyotik kullanımı mevcuttu (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15: Risk faktörleri

	PZR ve Kan Kültürü Pozitif Hastalar (Olgu No)						
	7 H.P	9 N.T	30 F.B	31 S.B	38 S.Ü	44 D.T	49 B.G
Çoklu Antibiyotik Kullanımı	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var
Üriner Katater	Var					Var	Var
Diabetes Mellitus (DM)		Var					
<i>Kandidürü</i> Hikayesi	Var			Var			
Santral Venöz Katater		Var					
Böbrek Yetmezliği / Diyaliz		Var					
Kortikosteroid Kullanımı	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var
Abdominal/Kardiyak Cerrahi Girişim							
Yanık							
Parenteral Hiperalimentasyon		Var					

Üç hastada üriner katater, iki hastada kandidüri hikayesi, bir hastada DM, bir hastada santral venöz katater, bir hastada böbrek yetmezliği (diyaliz), bir hastada parenteral hiperalimentasyon mevcuttu.

Üriner kataterli bir hastada kandidüri hikayesi de mevcuttu. Bir hastada DM, santral venöz katater, böbrek yetmezliği (diyaliz), parenteral hiperalimentasyon birlikte mevcuttu.

Bir hastada sadece kandidüri hikayesi, iki hastada ise sadece üriner katater mevcuttu.

Kan kültür ve PZR pozitif hastalar ile kan kültür ve PZR negatif hastalar arasında risk faktörleri açısından istatistiksel fark yoktu ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA

İnvaziv fungal infeksiyonlar içinde en sık rastlanamı kandidemilerdir. Kandidemi, nötropenik hastalarda çok korkulan bir risk faktörüdür. Çünkü immun sistemi baskılanmış bu hasta gruplarında ciddi morbidite ve mortaliteye yol açabilen, tedavisi güç ve pahalı infeksiyonlardır (57).

Bağışıklık sistemi baskılanmış akut lösemisi olan ve KHT yapılan hastalar başta olmak üzere malignensileri nedeni ile sitotoksik kemoterapi alan febril nötropenik hastalarda; *Candidalar*, fırsatçı ve invaziv fungal infeksiyon etkenleri arasında ilk sırada yer alırlar (58,59).

5.1. Hastalar ve Yattığı Klinik Birimler

01 Ocak 2004 - 31 Aralık 2004 tarihleri arasında planlanmış olan tez projesi ile çalışmamıza dahil ettiğimiz hasta grupları, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi dahiliye/hematoloji, pediatrik hematoloji-onkoloji servislerinde ve KHT ünitesinde yatan; ilgili birimlerce önceden primer tanıları konan, febril nötropeni tanısı alarak tedavileri sürdürülen, 78 hastadan oluşmakta idi.

Çalışmamızda PZR pozitif saptanan ve kan kültüründe *Candida* üremesi olan yedi hastanın (% 9); dördü pediatrik hematoloji- onkoloji, üçü dahiliye hematoloji servisinde yatmaktaydı. KHT ünitesinde yatan sekiz hastanın ise alınan kan kültüründe *Candida* üremesi olmadı ve kan örneklerinde *Candida* PZR sonucu negatifti.

Kandidemi infeksiyonlarının insidansı merkezden merkeze hatta aynı merkez içinde bile farklılıklar göstermekle birlikte hematolojik maligniteli hastalar ve KHT alıcılarında ve % 10-25 arasında değişen sıklıkta görülmektedir (60).

“Akdeniz Üniversitesi Hastanesinde Yatan Hastaların Kan Kültürlerinden İzole Edilen Funguslar” başlıklı sunumuzda, 2004 yılında hastanenin farklı birimlerinde yatan 53 hastanın kan kültürlerinden *Candida* türleri izole edilmiştir. Bu 53 hastanın yedisi (% 13.2) dahiliye hematoloji ve pediatrik hematoloji-onkoloji servislerinde yatmaktaydı (61).

Martin D. ve ark.'nın Fransa'da yaptıkları 1998- 2001 yıllarını kapsayan üç yıllık çalışmalarında; 190 kandidemili hastanın kliniklere dağılımı incelenerek % 32'sinin Dahiliye, % 23'ünün Hematoloji, % 23'ünün Cerrahi ve % 23'ünün yoğun bakım servislerinde yattığı bildirilmiştir (62).

Akdeniz Ünivesitesi Hastanesi'nde Ocak 2001 ve Aralık 2002 yıllarını kapsayan iki yıllık retrospektif bir çalışmamızda, kandidemili olguların bölümlere göre dağılımı incelenmiş ve hematoloji-onkoloji bölümünde yatan kandidemili hastaların diğer bölümlerde yatan kandidemili hastalara göre daha fazla olduğu ($p<0.05$) saptanmıştır (63).

5.2. Hastaların Altta Yatan Primer Tanıları

Çalışmamızda pediatrik hematoloji-onkoloji servisinde yatan dört hastanın primer tanıları Burkitt Lenfoma, ALL, Nöroblastom ve NHL iken, üç dahiliye hematoloji hastasının ise primer tanıları ise AML, HL ve NHL idi.

Yurdumuzdan Işık N. ve ark.'nın yaptıkları bağışık sistemi baskılanmış, lösemili pediatrik olgulardaki çalışmalarında 50 febril nötropenik olgudan ikisinin kan kültüründe (% 8) *Candida spp.* saptanmıştır. Bu iki olgudan birisinin kan kültürlerinde *C. krusei* diğerinin kan kültüründe ise *C. albicans* ile *C. krusei* birlikte izole edilmiştir. Çalışmalarında olgularından ilkinin primer tanısı ALL diğerinin ise Fankoni AA olduğu belirtilmiştir (64).

Pagano L. ve ark.'nın hematolojik malignitesi olan kandidemili febril nötropenik hastaları incelediği çalışmalarında, primer en sık görülen tanının AML olduğu bildirilmiştir (65).

5.3. Risk Faktörleri ve Sistemik Kandidiyaz Tanısını Destekleyen Bulguların Varlığı

Febril nötropenik maligniteli hastalarda kandidemi riskini arttıran başlıca faktörler; uzamış ve derin nötropeni, altta yatan hastalığın hematolojik malignite olması ve immunsupresif tedavi gibi immunolojik faktörlerin yanı sıra, mukokutanöz yüzeylerin kolonizasyonu ve ciddi mukoza hasarı, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, katater uygulanması, kortikosteroid tedavisi ve parenteral

beslenme gibi immunolojik olmayan faktörlerinde kandidemi oluşumunda önemli katkıları vardır. Bunlar arasında nötropeni en önemli faktördür (66).

5.3.1 Nötropeni süresi

Çalışmamızda kan kültüründe *C.albicans* üreyen ve kan örneklerinde *Candida* PZR'ı pozitif yedi hastamızın; tümünün median nötropeni süresi dokuz gündü. *Candida* PZR'ı negatif ve kan kültüründe *C.albicans* üremeyen toplam 71 hastamızın ise median nötropeni süresi yedi gündü. Bu iki grup arasında, nötropeni süresinin kan kültürü ve PZR sonucu pozitif saptanan grupta daha uzun olması istatistiksel olarak anlamlıydı ($p= 0.000044$) (Çizelge 1).

Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde 15 yılda takip edilen hematolojik malignensili hastalarda febril nötropeni ataklarının araştırıldığı bir çalışmada, median nötropeni süresi 7.5 gün olarak bulunmuştur (67).

5.3.2 Nötropeni düzeyi

Kan kültüründe *C.albicans* üreyen ve kan örneklerinde *Candida* PZR'ı pozitif yedi hastamızın tümünün (%100) nötropeni düzeyi $<500 /\mu\text{l}$ idi. *Candida* PZR'ı negatif ve kan kültüründe *C.albicans* üremeyen toplam 71 hastamızın 14'ünün (%19.7) nötropeni düzeyi $<500/ \mu\text{l}$ idi. Bu iki grup arasında, nötropeni düzeyinin istatistiksel anlamlı farklı olduğu saptanmıştır ($p= 0.001$) (Çizelge 5.1).

Mark J. Dinubile ve ark. çalışmalarında hematolojik malignensili hastaların büyük bir çoğunluğunda (%77.8) nötropeni düzeyinin $<500/ \mu\text{l}$ olduğunu bildirmişlerdir (60).

Çizelge 5.1: Hastaların Nötropeni Düzeyi ve Süresinin Karşılaştırılması

	Kan Kültürü ve PZR Pozitif (n=7)	Kan Kültürü ve PZR Negatif (n=71)	P değeri
Nötropeni süresi (median)	9	7	0.001
Nötropeni düzeyi ($<500/\mu$)	7	14	0.000044

Hastalarımızın sistemik kandidiyaz tanısını destekleyen bulgularının varlığını incelediğimizde; tümünün dört günü aşan, geniş spektrumlu antibiyotik kullanılmasına rağmen düşmeyen ateşleri mevcuttu. Pnömonisi olan dört, artriti olan bir ve makronodüler cilt lezyonları olan bir olgumuz mevcuttu.

Hastalarımızın altta yatan risk faktörlerini irdelediğimizde ise tümünde çoklu antibiyotik kullanımı ve kortikosteroid kullanımı mevcuttu. Üç hastada üriner katater, iki hastada kandidüri hikayesi, bir hastada DM, bir hastada santral venöz katater, bir hastada böbrek yetmezliği (diyaliz), bir hastada parenteral hiperalbuminasyon mevcuttu.

5.4. Kandan İzole edilen *Candida* türleri ve izolasyon sıklığı

Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonuna (EORTC) bağlı İnvaziv Fungal İnfeksiyon (IFIG) grubu tarafından yapılan çok merkezli bir prospektif çalışmada; 90 solid, 159 hematolojik olmak üzere toplam 249 kandidemili kanser hastasında en sık izole edilen *Candida* türü *C.albicans* (% 55) olarak saptanmıştır (68).

Ege Üniv.'de hematolojik malignite tanılı febril nütropenik hastalar arasında yapılan bir çalışmada *C.albicans* (% 54) en sık izole edilen *Candida* türü idi (69).

Pagano L. ve ark.'nın hematolojik malignitesi olan kandidemili febril nütropenik hastaların incelendiği çalışmalarında kandidemi etkenleri içerisinde en sık izole edilen türün *C. albicans* olduğu (% 41) bildirilmiştir (65).

Ö.Güzel ve ark.'nın Gazi Üniv. Tıp Fakültesi'ndeki çalışmalarında "Hematolojik Maligniteli Hastalardan İzole Edilen Mikroorganizmaların Dağılımı" başlıklı sunularında kan kültürlerinde *Candida spp.* izolasyon sıklığı % 9,6 olarak bulunmuştur (70).

A.B.D'de Mark J. Dinubile ve ark.'nın, hematolojik malignensili kandidemili hastalarda yapılan bir çalışmalarında ise çalışmamızdan farklı olarak en sık non-albicans *Candida* türleri (%70) izole edilmiştir. *C.albicans*'in izolasyon sıklığı ise % 30 olarak saptanmıştır (60).

Çalışmamıza alınan malignensili ve febril nötropenik 78 hastanın yedisinin (% 9) kan örneklerinde PZR yöntemi ile *Candida* DNA'sı pozitif olarak gösterilmiş ve aynı yedi hastanın kan kültüründen *C.albicans* izole edilmiştir.

5.5. Kandidemi'nin Tanısı

İnvaziv *Candida* infeksiyonlarının tanısı, mantarın kültür ile izolasyonu, antijen ve antikorların serolojik olarak araştırılması, invaze dokunun histopatolojik olarak incelenmesi ve/veya radyolojik olarak görüntülenmesi, *Candida* nükleik asitlerinin moleküler yöntemler kullanılarak gösterilmesi ile konmaktadır. Hastalığın klinik tanısı özgül klinik belirtiler ve semptomların olmayışı nedeni ile güçtür. Ancak, kan kültürlerinde *Candida* üremesi ve moleküler yöntemlerle *Candida DNA'sının* varlığının ispatlanması invaziv kandidiyazisi kabul ettirecek verilerdir (71).

5.5.1. Kültür

Dissemine kandidiyaziste Mikrobiyolojik doğrulama, kan kültürlerinin biyopsi ve otopsi ile ispatlanmış derin kandidiyazis vakalarında % 50'lere varan oranlarda negatif oluşu ve geç infeksiyonlarda pozitifleşmesi nedeni ile zordur (71).

Febril nötropenik hastaların kan kültürlerinde inkübasyonunun ardından klasik yöntemler ile *Candida spp.* var demek için gereken ortalama süre 4-5 gün arasındadır. Lizis santrifügasyon yöntemi gibi yeni geliştirilen teknikler sayesinde kan kültürünün duyarlılığı yükseltilmiştir. Ancak bu yöntemde yüksek oranda yanlış pozitiflik problemi ile karşılaşmıştır. Bu nedenlerle kandideminin erken tanısı kan kültürü gibi konvansiyonel yöntemlerle geç olmaktadır (71).

Geçen süre zarfında hastaya uygulanan ampirik antibiyotikler ve profilaktik dozda uygulanan antifungal ilaçlar ile kandideminin etkin tedavisi gecikmektedir.

Febril nötropenik hastaların ampirik olarak çoklu antibiyotik tedavi alması endojen floranın dengesini değiştirmekte, kolonizasyon ve derin dokulara ilerlemeyi kan yoluyla yayılım izlemektedir.

Başıklık sistemi baskılanmış hastalarda tedavi seçeneklerinin daha az başarı şansına sahip olduğu infeksiyonun ilerlemiş düzeyine ulaşıldığı dönemde alınan kan kültürlerinde genellikle *Candida* izole edilebilmektedir.

Oysaki, kandidemilerin erken tanısı ile özellikle hematolojik malignensili hastalarda özgün antifungal tedaviye henüz fungal kitleler büyümeden başlanması yaşam süresini uzatmaktadır. Bu nedenlerle hızlı moleküler yöntemlere gereksinim duyulmaktadır.

5.5.2 Moleküler yöntemler ve PZR

Moleküler tanısal uygulamalar mikroorganizmaların kültür ortamlarında biyolojik olarak üretilmelerinin yerini alarak süratle mikroorganizmaların genotipik belirlenmelerini sağlamaktadırlar. *Candidalar*'ın yavaş üreme gösterdiği veya üretilmediği durumlar ile serolojik tanının gerçekleştirilemediği immun yanıtsızlık durumlarında moleküler tanı yöntemleri bir zorunluluk olarak ortaya çıkmaktadır.

Maaroufi Y. ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada kandideminin PZR temelli tanısının geleneksel kan kültürlerinden daha duyarlı (% 100), özgün (% 97) ve tekrarlanabilir (% 96-99) olduğunu göstermişlerdir (72).

Kalkancı A. ve ark.'nın yaptıkları çalışmada 32 nötropenik hastanın kan örneklerinde *Candida* türlerinin gösterilmesi için türe özgül primerlerin (Pcon 1, Pcon 2) kullandığı bir PZR protokolü ile incelenmiştir. 32 hastadan dördü (% 12.5) PZR ile pozitif iken kan kültürü ile bu dört hastadan sadece bir tanesi pozitif olarak saptanmış ve sonuç olarak PZR yönteminin, kandan *Candida* türlerinin gösterilmesinde çok duyarlı bir teknik olduğu ve kandidemi kuşkulu olguların tanısında kullanılmasının, yararlı olacağı vurgulanmıştır (73).

Candida DNA'sının ekstraksiyonu

Kandan *Candida* DNA'sının ekstraksiyonu için geliştirilmiş, in house yöntemler ve birçok ticari kit bulunmaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız ekstraksiyon kitleri ile birlikte Löffler ve ark.'nın (74) kullandıkları in house yöntem ve hazır ekstraksiyon kiti; duyarlılık, süre ve maliyet açısından karşılaştırılmış ve çizelge 2'de gösterilmiştir.

Çalışmamızda toplam 78 hastanın EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri farklı iki ekstraksiyon kiti ile çalışıldı (QIAamp DNA mini kit, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit).

Kullandığımız her iki ekstraksiyon kiti ile saflaştırılan ve standart PZR (sPZR) yöntemiyle amplifiye edilen *Candida* DNA'sının analitik duyarlılıkları araştırmacıların benzer ekstraksiyon kitlerini kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (çizelge 5.2).

Çizelge 5.2: Kan örneklerinden *Candida* DNA ekstraksiyon yöntemlerinin karşılaştırılması.

Kaynak	Ekstraksiyon yöntemi	PZR yöntemi	Duyarlılık (CFU/ml)	Süre (Saat)	Maliyet
Çalışmamız, (2005)	Modifiye manuel (Lyticase + OIAamp)	sPZR	10	4	12 (YTL)
	MagNA Pure LC		10	2	15 (YTL)
Loffler ve ark. (1997) (74)	İn-house	sPZR	1-10	8	140 (YKR)*
	OIAmp Tissue		1-10	4	3.5 (YTL)*
	Gene Releaser		10	3. 15'	2.5 (YTL)*
	Puregene D 6000		100	5	1.2 (YTL)*
	Dynabeads		100	4	1.5 (YTL)*
	DNAzol		1000	4	1.4 (YTL)*
Loffler ve ark. (2002) (54)	Standart manuel (Lyticase + OIAamp)	RT-PZR	10	7	7 (YTL)
	MagNA Pure LC		1-10	3	5.6 (YTL)

Modifiye manuel (Lyticase + OIAamp) yöntemi ile yapılan ekstraksiyon süresi dört saat iken MagNA Pure LC ekstraksiyon yöntemi ile iki saatti ve diğer ekstraksiyon yönteminden %100 daha kısa sürede tamamlanıyordu.

Diğer ekstraksiyon yöntemleri; İn-house, OIAmp Tissue, Gene Releaser, Puregene D 6000, Dynabeads, DNAzol ile yapılan ekstraksiyonların süresi 3 ile 8 saat arasında değişmekteydi.

Çalışmamızda kullandığımız MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III ekstraksiyon kiti, Löffler ve ark.'nın 2002 yılında kullandıkları kitin geliştirilmiş formu idi ve ekstraksiyon süresi bu araştırmacılarınkinden daha kısa idi.

MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III, modifiye manuel (Lyticase + QIAamp DNA Mini Kit-Qiagen) ekstraksiyon kitine göre kısa sürede sonuçlanması ve otomatize sistem oluşu nedeni ile daha uygulanabilir bulunmuştur.

Çalışmamızın maliyeti modifiye manuel (Lyticase + QIAamp DNA Mini Kit-Qiagen) ekstraksiyon kiti için birim maliyeti 12 YTL iken MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III için birim maliyeti 15 YTL dir. Ancak yurt dışı yayınlarda ekstraksiyon maliyetlerinin daha ekonomik olduğu gözlenmiştir.

Amplifikasyon ve görüntüleme

Candida infeksiyonlarının tanısı için ilk PZR yöntemlerinden biri Crampin ve ark. (1993) tarafından yayımlanmıştır (76). Çoğaltım için hedef olarak *C.albicans*'ın heat shock protein 90 (HSP 90) gen kodu seçilmiştir. Duyarlık 1 ml örnekte 100 CFU/ml olarak saptanmıştır (çizelge 3).

PZR yöntemlerinde seçilen hedef bölge, görüntüleme teknikleri, analitik duyarlılıklar, kaynaklar ve zamanları ile birlikte çizelge 3'de gösterilmiştir. Çalışmamızda 5 s rRNA gen bölgesi hedef alınarak yapılan sPZR sonucu amplifiye ürünler Et-Br boyalı agaroz jelde değerlendirilmiş ve analitik duyarlılığımız 10 CFU/ml olarak saptanmıştır (çizelge 3).

Kullandığımız ekstraksiyon, amplifikasyon ve görüntüleme yöntemiyle aynı yöntemi kullanan diğer araştırmacıların ulaştıkları analitik duyarlılık düzeyine yakın seviyede bulunmuştur (çizelge 2).

Çizelge 5.3: Candida PZR yöntemlerinde seçilen hedef bölge, görüntüleme teknikleri ne analitik duyarlılıkların karşılaştırılması.

Kaynak	Hedef	Metod	Görüntüleme	Analitik duyarlılık
Çalışmamız; (2005)	5S rRNA	sPZR	EtBr boyalı agaroz gel	10 CFU/ml
1. Crampin ve ark. (1993) (75)	HSP 90	sPZR	EtBr boyalı agaroz gel	100 CFU/ml
2. Buergener ve ark. (1994) (76)	SitP 450	nPZR	Southern Blotting	20 CFU/ml
3. Holmes ve ark. (1994) (46)	5 S rRNA	sPZR	EtBr boyalı agaroz gel	15 ± 5 CFU/ml
4. Wildfeuer ve ark. (1996) (77)	SitP 450	nPZR	EtBr boyalı agaroz gel	10 CFU/ml
5. Einsele ve ark. (1997) (78)	18 S rRNA	sPZR, moleküler prob	Southern Blotting	1 CFU/ml
6. Flahaut ve ark. (1997) (53)	SAP	sPZR	EtBr boyalı agaroz gel ELISA	10 CFU/ml 1 CFU/ml
7. Loeffler ve ark. (1998) (79)	18 S rRNA	sPZR	ELISA	5 CFU/ml
8. Loeffler ve ark. (2000) (80)	18 S rRNA	sPZR	EtBr boyalı agaroz gel	10 CFU/ml
9. Wahyuningsih ve ark. (2000) (81)	5.8 S rRNA	sPZR	EtBr boyalı agaroz gel EIA	10 CFU/ml 1 CFU/ml
10. Dendis ve ark. (2002) (82)	5.8 S rRNA	nPZR	EtBr boyalı agaroz gel	3 CFU/ml
11. Ahmad ve ark. (2002) (55)	5.8 S rRNA	snPZR	EtBr boyalı agaroz gel	1 CFU/ml
12. Loeffler ve ark. (2002) (54)	18 S rRNA	R.T PZR		10 CFU/ml
13. Maaroufi ve ark. (2003) (83)	5.8 S rRNA	R.T PZR		5 CFU/ml

Flahaut ve ark.'nın (53) yaptıkları bir çalışmada *Candida* DNA'sının araştırılmasına yönelik, modifiye Qiagen *Candida* DNA ekstraksiyon protokol uygulaması ile (OIAamp Tissue kit kullanılarak) *Candida* DNA'sı saflaştırılmıştır. Ardından, *C.albicans* sekretuar aspartik proteinase (SAP) gen bölgesinin hedef alındığı PZR yöntemi ile *Candida* DNA'sı çoğaltılmıştır. Sonrasında EtBr ile boyalı agaroz gel ve ELISA metodları ile amplifiye *Candida* DNA'sı görüntülenmiştir. EtBr ile boyalı agaroz gel görüntüleme yönteminde *Candida* DNA'sının alt saptanma limiti 10 CFU/ml iken ELISA ile 1 CFU/ml olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızdan daha alt analitik duyarlılıkların (<10 CFU/ml) saptandığı *Candida* PZR çalışmalarında; nPZR, snPZR yada RT-PZR yöntemleri kullanılmış ayrıca ELISA yöntemi ile gerçekleştirilen görüntüleme tekniklerinin daha alt limitleri saptayabildiği gözlenmiştir.

Kandidemi tanısında kan kültürü pozitifliğini duyarlılık ve özgüllük yönünden gold standart kabul edersek PZR'ın pozitif olduğu tüm hastalarda kan kültürü pozitif bulunmuş iken PZR'ın negatif olduğu tüm hastalarda kan kültürü negatif olarak saptanmıştır.

6. SONUÇ

1. Çalışmaya aldığımız Febril nötropenik hastaların yedisinin (% 9) kan kültürlerinde *Candida* üredi.
2. Üreyen *Candidalar*'ın tümü *C.albicans* idi.
3. Üreme olan febril nötropenik hastalar'ın altısının (% 85.7) altta yatan primer tanısı hematolojik malignite iken birinin (% 12.5) altta yatan primer tanısı solid malignite (Nöroblastom) idi.
4. Febril Nötropenik hastaların % 9'unda PZR ile *Candida* DNA'sı saptandı.
5. *Candida* DNA'sı saptanan hastaların tümünün kan kültürlerinde *C.albicans* üredi.
6. Kan kültürü ve PZR'ı pozitif olan hastaların tümünün nötropeni düzeyi $< 500/\mu\text{l}$ olup kan kültürü ve PZR'ı negatif hastaların ise 14'ünün (% 19.7) nötropeni düzeyi $< 500/\mu\text{l}$ idi. . Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p= 0.000044$).
7. Kan kültürü ve PZR'ı pozitif olan hastaların median nötropeni süreleri dokuz gün olarak tesbit edilmiş iken kan kültürü ve PZR'ı negatif olan hastaların median nötropeni süreleri yedi gündü. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($p= 0.001$).
8. Kullandığımız iki ekstraksiyon yöntemi (MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III-Roche, modifiye manuel (Lyticase + QIAamp DNA Mini Kit-Qiagen)) ile ekstrakte edilen *Candida* DNA'sının analitik duyarlılığında fark yoktu (10 CFU/ml).
9. 5 s rRNA gen bölgesi hedef alınarak yapılan amplifikasyon ile ml'de 10 CFU içeren *Candida* DNA'sı Et-Br ile boyalı agaroz jelde görüntülendi .
10. Ancak MagNA Pure LC sistemi, modifiye manuel (Lyticase + QIAamp DNA Mini Kit-Qiagen'e göre % 100 zaman tasarrufu sağlaması ndeni ile tercih edilmelidir.
11. Kan kültürü maliyeti tiplendirme hariç, beş YTL'dir. PZR yöntemine göre

bir miktar daha ucuz olmasına rağmen, dissemine kandidiyaziste kan kültürü yöntemi ile 96 saatte alınan sonuç geç olmaktadır. Erken tanı tedavinin başarı şansını arttıracaktır.

12. PZR yöntemi ile ekstraksiyon 2 saat, amplifikasyon ve görüntüleme 3 saat olmak üzere toplam 5 saat gibi kısa bir sürede kandidemi tanısına gidilebilmektedir.

Sonuç olarak; Özellikle mortalite riskinin yüksek olduğu hematolojik malignensili ve immun sistemi baskılanmış febril nütropenik olgularda, kandidemiden şüphe duyulduğunda, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek ve hızla tanıya giden *Candida* PZR yapılmasının zorunlu olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: PZR, Kandidemi, Hematolojik malignite, Febril nütropeni.

ÖZET

Candida türleri bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda, fırsatçı mantar infeksiyonlarına neden olan invaziv fungal etkenler arasında ilk sırada yer alırlar.

Bağışıklık sistemi baskılanmış hematolojik malignensili nötropenik hastalarda, kandidemi tanısının konmasında PZR hızlı ve duyarlı oluşu nedeni ile tercih edilmektedir. Kandideminin erken tanısı kan kültürü gibi konvansiyonel yöntemlerle geç olmaktadır.

Çalışmamızda; bir yıl süresince Akdeniz Üniversitesi Hastanesi İç Hastalıkları ABD bünyesindeki Hematoloji BD, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD Hematoloji-Onkoloji BD'ı servislerinde ve KHT ünitesinde yatan ve ilgili birimlerce malignite tanısı konan; kandidemi ön tanılı toplam 78 hastamızın, günlük lökosit sayıları ve ateşleri izlenerek prospektif olarak febril nötropenik dönemleri saptandı.

Hastalardan ateşin yükselmeye başladığı ilk saatlerde antifungal tedaviye henüz başlanmadan alınan venöz kan örneklerinde; PZR yöntemini kullanarak erken tanının konulabilmesi için *Candida DNA*'sı araştırıldı. Uygulanan PZR yöntemi nitelik ve nicelik yönüyle konvansiyonel otomatize kan kültürü sistemi ile karşılaştırıldı. Nötropeni derecesi ile kan kültürü ve PZR pozitifliklerinin uyumu belirlendi.

Bu incelemelerin sonucunda, çalışmaya alınan toplam 78 malignensili febril nötropenik hastanın yedisinin (% 9) tam kan örneğinden PZR yöntemi ile *Candida DNA*'sı tesbit edilmiştir ve aynı hastaların kan kültüründen *Candida* izolasyonu gerçekleştirilmiştir. *Candida* PZR'ın negatif olduğu 71 hastanın ise kan kültüründe *Candida* izole edilmemiştir.

Kan kültürü ve PZR'ı pozitif olan hastaların tümünün nötropeni düzeyi $< 500/\mu\text{l}$ olup median nötropeni süreleri dokuz gün olarak tesbit edilmiş iken kan kültürü ve PZR'ı negatif hastaların ise 14'ünün (% 19.7) nötropeni düzeyi $< 500/\mu\text{l}$ idi ve median nötropeni süreleri yedi gündü. Kan kültürü ve PZR'ı pozitif olan hastalar ile kan kültürü ve PZR'ı negatif hastaların nötropeni düzeyi arasındaki fark istatistiksel

olarak anlamlı idi ($p= 0.000044$). Yine bu iki grup arasında median nütropeni süreleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı olarak saptandı ($p= 0.001$).

Kan kültürü maliyeti tiplendirme hariç, beş YTL'dir. PZR yöntemine göre bir miktar daha ucuz olmasına rağmen, dissemine kandidiyaziste kan kültürü yöntemi ile 96 saatte alınan sonuç geç olmaktadır.

Kandidemililerin erken tanısı ile hematolojik malignensili hastalarda özgün antifungal tedaviye henüz fungal kitleler büyümeden başlanması yaşam süresini uzatmaktadır.

Özellikle altta yatan hematolojik malignensisi olan ve uzun süredir çoklu antibiyotik kullanmasına rağmen ateşi düşmeyen febril nütropenik hastalarda, mortalite riskinin yüksek olduğu bilinen kandidemiden şüphe duyulduğunda; çok özgül, duyarlı ve hızlı tanısal sonuç veren *Candida* PZR 'ın uygulanmasının zorunlu olduğunu düşünmekteyiz.

Pfaller MA, Tenover FC, Archer G, Archer G, Archer G (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8. Edition. American Society for Microbiology, Washington, 2003 ; 1653-1685

12. Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. Medical mycology. Zinsser Microbiology. 20th ed. Connecticut: Appleton and Lange. 1992;1071-1157.

13. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Mycology. The Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Philadelphia: JB Lippincott – Raven pub, p:983-1069, 1997

14. Mitchell T. Medical mycology. In: Brooks GF, Butel JS, Morse SA eds. Medical Microbiology. 21th ed. Connecticut: Appleton and Lange. 1998;583-616.

15. İnci R. Mantarların yapıları, üreme özellikleri ve sınıflanması. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (editörler). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara, Güneş Kitabevi. 1999;1015-1021

16. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Laboratory Methods in Basic Mycology. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Mosby, St. Louis, 2002: 711-797.

17. Edwards JE, JR : Candida species. In: Principles and Practise of Infectious Diseases, Vol. 2, 5.edition (Eds: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R). Philadelphia, Churchill Livingston Inc. , p: 2656-2669 2000 .

18. Yıldırım ŞT. Mantar infeksiyonlarında laboratuvar tanısı. Ustaçelebi Ş. (ed): Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş kitabevi, Ankara, 1999: 1129-1144.

19. Ayşe Wilke Topçu, Nilgün Çeltikçioğlu. Candida türleri. Wilke Topçu. (ed): İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 2001:1797-1808.

20. Meunier, F., M. Aoun, and N. Bitar. *Candidemia* in immunocompromised patients. Clin. Infect. Dis. 1992.14 (Suppl. 1): S120-S125

21. Warnock DW and MD Richardson. 1991. Fungal infection in the compromised patient. 2nd edition. John Wiley & Sons

22. Edwards JE. *Candida* species. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Pennsylvania: Churchill Livingstone. 2000;2656-2674.

23. Hostetter MK. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:29-42.
24. Yücesoy M. *Candida* türlerinin virülans faktörleri ve konağa ait faktörler. *Dokuz Eylül Üniv Tıp Fak Derg* 1999;13:377-388.
25. Zepelin MB, Meyer I, Thomssen, R, Würzner R, Sanglard D, Telenti A. HIV-Protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *J Invest Dermatol* 1999;113:747-751.
26. Ghannoum MA : Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13(1): 122-143, 2000
27. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO : Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20(1): 7-14, 1982
28. Vartivarian SE. Virulence properties and nonimmune pathogenetic mechanisms of fungi. *Clin Infect Dis* 1992;14(Suppl 1):S30-36.
29. De Bernardis F, Molinari A, Boccanera M, Stringaro A, Robert R. Modulation of cell surface-associated mannoprotein antigen expression in experimental candidal vaginitis. *Infect Immun* 1994;62:509-519.
30. Dilara Öğünç Mantarlarda Virülans Faktörleri 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi 3-6 Mayıs 2005- Konya Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 49 s.11 Ed.: İnci Tuncer, Duygu Fındık ve Uğur Arslan.
31. Anaissie E. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: Experience at a cancer center and review. *Clin Infect Dis* 1992;14(Suppl 1):S43-53.
32. Reiss E, Morrisson CJ: Nonculture Methods for diagnosis disseminated candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 6(4) : 311-323,1993
33. Mine Yücesoy and Serhat Marol Performance of CHROMAGAR *Candida* and BIGGY agar for identification of yeast species Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Clinical Microbiology, Izmir, Turkey *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2003, 2:8
34. Ayşe Kalkancı Mikozların Serolojik Tanısında Yenilikler 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi 3-6 Mayıs 2005- Konya Türk

Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 49 s.21 Ed.: İnci Tuncer, Duygu Fındık ve Uğur Arslan.

35. M. Ali Saraçlı Mikoizların Moleküler Tanısı: Neredeyiz? 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi 3-6 Mayıs 2005- Konya. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 49 s.33 Ed.: İnci Tuncer, Duygu Fındık ve Uğur Arslan.

36. A.Nedret Koç Mantarlarda Moleküler Tanı Yöntemleri 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi 19-21 Haziran 2001- Ankara. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 39 s.105 Ed.:Semra Kuştimur, Ayse Kalakancı.

37. PCR <http://nobelprize.org/chemistry/laureates/1993>

38. Durmaz Rıza Uygulamalı Moleküler Biyoloji Nobel Tıp Kitabevleri Adana 2001: 15-43

39. Tiryaki D. DNA teknolojisinde Gelişmeler. XXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kongre Kitabı, Antalya, 1994:S. 305-306

40. Kocagöz T. Enfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılan moleküler yöntemler. 9. Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Kitabı, Antalya. 1999: S. 15-17

41. Tamponlar, <http://www.mcb.uct.ac.za/pcrconcn.htm>

42. DNA polymerase <http://wine1.sb.fsu.edu/bch5425/lect23/lect23.htm>

43. Diane James, Sharon J Reid and Edward P Rybicki. Molecular Biology Techniques Manual Standard PCR Protocol Third Edition Ed: Vernon E Coyne, M Copyright Ed. Rybicki , January 1994, February 2001

44. Buchman TG, Rossier M, Merz WG, Charache P. Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part I. Rapid identification of *Candida albicans* by in vitro amplification of a fungus-specific gene. Surgery. 1990 Aug;108(2):338-46; discussion 346-7.

45. Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H. Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. J Med Microbiol. 1994 May;40(5):358-64.

46. Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, et al. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. J Clin Microbiol 1994;32: 228-231
47. 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 May;36(5):1169-75.
48. Siew Fah Yeo and Brian Wong Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections Clin. Microbiology Reviews, July 2002, p. 465-484, Vol. 15, No. 3
49. İ. Halil Özerol Uygulamalı Moleküler Biyoloji Nobel Tıp Kitabevleri Adana 2001: 57
50. 5. Febril Nötropeni Çalışma Grubu Febril Nötropenik Hastalarda Tanı ve tedavi Klavuzu Flora 2004;9(1):5-28
51. Loeffler, J et al. Extraction of fungal DNA from cultures and blood using the QIAmp Tissue Kit. Qiagen News 1996;4: 16-17
52. J. Löffler, H. Hebart, U. Schumacher, H. Reitze, H. Einsele Comparison of Different Methods for Extraction of DNA of Fungal Pathogens from Cultures and Blood. J Clin Microbiol 1997;35: 3311-3312
53. M. Flahaut, D. Sanglard, M. Monod, J. Bille, and M. Rossier Rapid Detection of *Candida albicans* in Clinical Samples by DNA Amplification of Common Regions from *C. albicans*-Secreted Aspartic Proteinase Genes J. Clin. Microbiol., February 1, 1998; 36(2): 395 - 401.
54. Loeffler J., Schmidt K., Hebart H, Schumacher U. and Einsele H. Automated Extraction of genomic DNA from medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system J Clin Microbiol 2002;40: 2240-2243
55. Ahmad S, Mustafa AS, Khan Z, Al-Rifaiy AI, Khan ZU. PCR-enzyme immunoassay of rDNA in the diagnosis of candidemia and comparison with amplicon detection by agarose gel electrophoresis. Int J Med Microbiol. 2004 Jul;294(1):45-51.
56. Agaroz jel www.arbl.cvmb.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/gels

57. Richardson MD, Kokki MH. Diagnosis and Prevention of Fungal Infection in the Immunocompromised host: Clinical and Laboratory aspects. Clin Microbiol 1997;35:3311-3312
58. Wey SB, Mori M, Pfaller MA, et el. Hospital acquired *candidemia*: the attributable mortality and excess length of stay. Arch intern Med 1988;148:2642-5
59. De Marie S. New developments in the diagnosis and management of invasive fungal infections. Haematologica. 2000 Jan;85(1):88-93. Review.
60. Dinubile MJ, Hille D, Sable CA, Kartsonis NA. Invasive candidiasis in cancer patients: observations from a randomized clinical trial. J Infect. 2005 Jun;50(5):443-9.
61. Yaman M., Ögünç D., Öngüt G. Mutlu G. Akdeniz Üniversitesi Hastanesinde Yatan Hastaların Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida*'lar. İnci Tuncer, Duygu Fındık, Uğur Arslan (eds) 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi 3-6 Mayıs 2005 Konya Tutanaklar. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın No 49 s. 169
62. Martin D, Persat F, Piens MA, Picot S. *Candida* species distribution in bloodstream cultures in Lyon, France, 1998-2001. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005 May;24(5):329-33.
63. Yaman M., Mutlu G., Ataman Ş. ve ark. *Kandidemili* Hastalarda *Candida* Türlerinin ve Antifungal Duyarlılıkların Yıllık Değişimlerinin ve Predispozan Faktörlerin Araştırılması. Yeğenoğlu Y., Erdoğan Z. (eds) 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi 27-30 Mayıs 2003 Bodrum Tutanaklar. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayın No 39 s.374
64. Işık N., Mills K. Using PCR and Real-Time PCR (LightCycler) for Diagnosis and Follow up of Invasive Fungal Infections in Turkish Journal of Haematology 2003, Volume 20, Number 2, Page(s) 63-68

65. L. Pagano, L. Melillo , B. Martino , D. D' Antonio, L. Mele Hepatosplenic Candidiasis (HSC) in Patients with Hematological malignancies (HM). Results of a Multicenter Study The Hematology Journal Volume I, Supplement I, June 2001 Abstracts for the 6th Annual Meeting of the European Hematology Association, 21-24 June 2001, Frankfurt, Germany
66. M.Ruhnke, A.Böhme, D. Buchheidt, K. Donhuijsen, H.Einsele et all. Diagnosis of invasive fungal infections in hematology and oncology Ann Hematol (2003) 82(suppl 2): S 141-S148
67. Celkan T., Yıldız I., Apak H., Özkan A., Karaman S. Cerrahpaşa Tıp Fakülesi Pediatrik Hematoloji-Onkoloji Bilim Dalında 15 Yılda Takip Edilen Febril Nötropeni Atakları 6. Febril Nötropeni Simpozyumu Febril Nötropeni Çalışma Grubu 24-27 Şubat 2005-Ankara s. 246-P016
68. Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, Collette L, Martino P, Vandercam B, Doyen C, Lebeau B, Spence D, Krcmery V, De Pauw B, Meunier F. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Clin Infect Dis. 1999 May;28(5):1071-9.
69. Arda B., Pullukçu H., Aydemir Ş., Yamazhan T., Dönmez A., Ulusoy S. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Bir Yıllık Dönemde izlenen Mikrobiyolojik Kanıtlı Febril Nötropeni Ataklarının Retrospektif Değerlendirilmesi 6. Febril Nötropeni Simpozyumu Febril Nötropeni Çalışma Grubu 24-27 Şubat 2005-Ankara s. 169-P040
70. Ö.Güzel, Ç.Erol, Z.Akı, G.T.Sucak, E. Şenol Hematolojik Maligniteli Hastalardan İzole Edilen Mikroorganizmaların Dağılımı 6. Febril Nötropeni Simpozyumu Febril Nötropeni Çalışma Grubu 24-27 Şubat 2005-Ankara s. 153-P023
71. Arjuna N.B Ellepola and Christine J. Morrison Laboratory Diagnosis of Invasive Candidiasis The Journal of Microbiology, February 2005, p.65-84

72. Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, 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 Jul;41(7):3293-8.
73. Kalkancı A., Kustimur S., Günes İ., Oflu B. Nötropenik Hastalarda İnvaziv *Candida* İnfeksiyonunun Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Tanısı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti 70. Yıl Bilimsel Toplantısı 24-27 Aralık 2001
74. Löffler 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 Dec;35(12):3311-2.
75. A. C. Crampin and R. C. Matthews Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP 90 gene fragment *The Journal of Medical Microbiology*, Vol 39, Issue 3 233-238, Copyright © 1993 by Society for General Microbiology.
76. Burgener-Kairuz, P., J. P. Zuber, P. Jaunin, T. G. Buchman, J. Bille, and M. Rossier. 1994. Rapid detection and identification of *Candida albicans* and *Torulopsis (Candida) glabrata* in clinical specimens by species-specific nested PCR amplification of a cytochrome P-450 lanosterol-alpha-demethylase (L1A1) gene fragment. *J. Clin. Microbiol.* 32:1902-1907.
77. Wildfeuer A, Schlenk R, Friedrich W. Detection of *Candida albicans* DNA with a yeast-specific primer system by polymerase chain reaction. *Mycoses.* 1996 Sep- Oct;39(9-10):341-344
78. Einsele, H., H. Hebart, G. Roller, J. Löffler, I. Rothenhofer, C. A. Müller, R. A. Bowden, J. A. van Burik, D. Engelhard, L. Kanz, and U. Schumacher. 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J. Clin. Microbiol.* 35:1353-1360
79. Loeffler, J., H. Hebart, S. Sepe, U. Schumacher, T. Klingebiel, and H. Einsele. 1998. Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system. *Med. Mycol.* 36:275-279.

80. Loeffler, J., H. Hebart, S. Sepe, U. Schumacher, H. Reitze, and H. Einsele. Comparison of Different Methods for Extraction of DNA of Fungal Pathogenes From Cultures and Blood J. Clin. Microbiol. Dec. 1997, p. 3311-3312
81. Wahyuningsih R., Freisleben H. J., Sonntag H. G. and Schnitzler P. Simple and Rapid of *Candida albicans* DNA in Serum by PCR for Diagnosis of Invasive Candidiasis J. Clin. Microbiol, Aug, 2000, p. 3016-3021.
82. M. Dendis, R. Horváth, J. Michálek, M. Grijalva, M. Barto and J. Benedík PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia J. Clin. Microbiol. Dec. 2003, p. 1191-1195.
83. Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, 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 Jul;41(7):3293-8.

UNIVERSITÄT
KUTUBPHANE