

Deneysel Sistemik Kandidiyaz Modelinde Organ Kültürü ve Patolojik Bulgular

Asuman Birinci¹, Levent Yıldız², Oğuz Aydın², Şahin Özdemir³, Belma Durupınar¹

Özet: *Candida* infeksiyonları sıklıkla otopsi bulguları ile saptanır. Biz bu çalışmada deneysel sistemik kandidiyaz oluşturduk, histopatolojik bulguları araştırdık ve kültür sonuçları ile karşılaştırdık. 56 adet Swiss-albino rata lateral kuyruk veninden *Candida albicans* (ATCC 26555) 0.5 ml LD₅₀ verilerek deneysel sistemik kandidiyaz oluşturuldu. Böbrek, beyin ve karaciğer en ağır infekte olan ve hasar gören organları ve sonuçlar organ kültürleri ile uygunluk göstermekteydi.

Anahtar Sözcükler: Deneysel infeksiyon, kandidiyaz.

Summary: *Organ culture and pathological findings in a model of experimental systemic candidiasis.* *Candida* infections are often detected by autopsy findings. In this study, we searched histopathological findings in an experimental systemic candidiasis model, and compared them to the culture results. Experimental systemic candidiasis was constituted in 56 Swiss-albino rats by from lateral tail vein injecting 0.5 ml LD₅₀ of *Candida albicans* (ATCC 26555). The most severely infected and damaged organs were kidney, brain and liver, and these results correlated with organ cultures.

Key Words: *Experimental infection, candidiasis.*

Giriş

Candida'lar insanda ağız, sindirim yolu, vagina mukozası ve derinin kalıcı mikroflorasının üyesi olup doğada yaygın olarak bulunurlar (1-5). Konağın immün sisteminin bozulması veya floral bölgedeki fizyolojik koşulların değişmesi sonucunda kolonize olarak, fırsatçı mantar infeksiyonlarına neden olabilirler (1,3,6).

Son yıllarda *Candida* infeksiyonlarına klinik ve bilimsel ilginin arttığı görülmektedir. Kanser, immünoşüpresif tedavi, AIDS gibi bağışıklık sistemini bozan durumlar, geniş spektrumlu antibiyotiklerin daha yaygın ve uzun süreli kullanılmaları, kalıcı venöz veya üretral kateterlerin kullanılması, travma veya yanıklar sonucu deri ve mukozanın bütünlüğünün bozulması gibi durumlarda başka *C. albicans* olmak üzere *Candida* türlerinin neden olduğu sistemik kandidiyazın görülme sıklığının artması ve bu infeksiyonlarda morbidite ve mortalite oranının çok yüksek olması bu klinik ilgiye neden olmaktadır. Ek olarak, infeksiyonların erken tanısı için geliştirilmiş yöntemlere, yaygın kandidiyazdaki yüksek ölüm oranını azaltacak koruyucu ve etkin antifungallere, patojen ajanın dokuda yerleşme mekanizması hakkında geniş bilgilere gereksinim olması da bilimsel ilgiyi artırmaktadır. Hastaların sıklıkla birkaç klinik bulgu veya semptomla gelmeleri ve kullanılan mikrobiyolojik tekniklerin etken mikroorganizmayı göstermede zaman zaman

başarısız kalmaları nedeni ile bu infeksiyonların klinik ve laboratuvar tanısı güçlükler gösterir (2-4, 6-11).

Bu çalışmada *Candida* infeksiyonlarına artan ilgi ve kullanılan mikrobiyolojik tekniklerin tanıda başarısız kalmaları dikkate alınarak, deneysel olarak oluşturulan sistemik kandidiyazda, hangi organların ne şekilde etkilendiğinin gösterilmesi ve organ patolojisi ile kültür arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

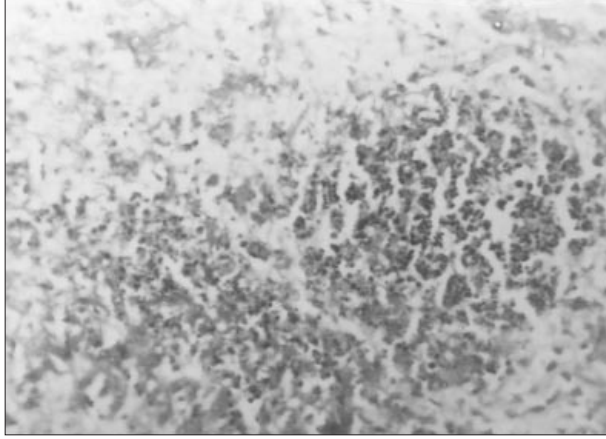
Yöntemler

Deneysel olarak sistemik kandidiyaz oluşturmak amacıyla 56 adet Swiss-albino rata lateral kuyruk veninden, *Candida albicans* ATCC 26555 kökeninden intravenöz 0.5 ml LD₅₀ verildi. Lateral kuyruk veninden intravenöz 0.5 ml steril serum fizyolojik verilen 15 rat ise kontrol grubu olarak kullanıldı.

Deney sırasında ölen ve deney tamamlandıktan sonra öldürülen ratların karaciğer, dalak, akciğer, beyin ve böbrekleri çıkarıldı. Organların bir yarısını ayrı ayrı homojenizatör içinde 5 ml serum fizyolojik ile homojenize edildi ve 1/1, 1/2 oranında dilüe edildi. Homojenatın 100 µl'si antibiyotikli Sabouraud dekstroz agarına dökme plak yöntemiyle ekildi ve aerop şartlarda 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Gram boyaması yapılarak üreyen kolonilerin *Candida* kolonisi olduğu saptandı. Tiplendirme için germ tüp ve piriç besiyerine ekim yapıldı.

Histopatolojik inceleme: Histopatolojik inceleme amacıyla, çıkarılan organlar (karaciğer, dalak, akciğer, beyin ve böbrek) 24 saat, tamponlanmış nötral formalinde tespit edildi. Fikse dokular rutin doku takip işleminden geçirilerek parafin blokları hazırlandı. Hazırlanan bloklardan 4-6

- (1) Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun
- (2) Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Samsun
- (3) Devlet Hastanesi, Samsun



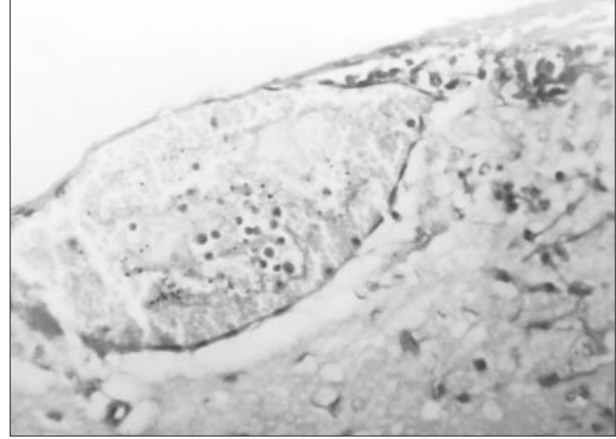
Şekil 1. Mikroapse odaklarında pozitif PAS reaksiyonu oluşturan mantar miçelleri ve sporları.

µm'lik kesitler yapıldı. Kesitler hematoksin-eozin (H&E) ve periyodik asid-Schiff (PAS) ile boyandı ve ışık mikroskopunda her organ için belirlenen değerlendirme kriterlerine göre incelendi. Mikroapse formasyonu, mantar hif ve sporlarının varlığı, mantar hif ve sporlarının vasküler yapılarıdaki varlığı (mantar embolisi) ve granülom oluşumu incelenen tüm organlarda araştırıldı. Bu kriterler dışında nonspesifik bulgular olarak, karaciğer için reaktif hepatit, dalak için hipersplenizm bulguları ve yine tüm organlarda ödem, kanama, konjestiyon ve inflamasyon gibi bulgular değerlendirildi. Lezyonlar açısından deney ve kontrol grupları arasındaki farklar ile gözlenen histopatolojik lezyonların kültür sonuçları ile olan ilişkileri 2 testleri kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

Sonuçlar

Histopatolojik inceleme kriterleri olarak kullanılan ve "non-spesifik bulgular" kapsamında değerlendirilen kanama, konjestiyon, ödem ve inflamasyona dalak, karaciğer ve akciğerlerde gerek kontrol gerekse de deney gruplarında rastlanıyordu. Böbrekler ve beyinde ise daha ağır lezyonlara rastlanıyordu. Nonspesifik bulguların organlara göre dağılımı Tablo 1'de görülmektedir.

Nonspesifik bulguların dağılımı açısından deney ve kontrol grupları arasında anlamlı fark mevcuttur ($p < 0.001$). İncelenen parankimatöz organlarda apse, likefiye dokuda polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu, hücre kırıntıları ve makrofajların odaksal yoğunlaşmaları şeklinde gözleniyordu. Mantar kolonileri, genellikle tanımlanan bu mikroapse odaklarında mantar miçelleri ve sporları şeklinde gözleniyor ve pozitif PAS reaksiyonu oluşturuyorlardı (Resim 1). Mantar embolileri özellikle venöz damarlarda gözlenmekteydi. Damar lümeninde, sıklıkla şekilli kan elemanları ile



Resim 2. Damar lümeninde mantar miçelleri, damar duvarında nekroz ve inflamasyon.

birleşen mantar miçelleri şeklinde gözlenen mantar embolilerinde, genellikle söz konusu damar duvarında nekroz ve inflamasyon da dikkati çekiyordu (Resim 2). Gözlemlenen diğer bir bulgu olan granülom oluşumunda ise epitelioid histiositler, histiyositik dev hücreler, plazma hücrelerinden oluşan inflamatuvar infiltrasyon ve seyrek de olsa kazaifikasyon nekrozu mevcuttu.

DeneySEL sistemik kandidiyaz oluşturulan deney grubunda sepsisin daha ağır bulguları olan mikroapse oluşumu, mantar kolonilerinin organlardaki varlığı, mantar embolisi ve granülom oluşumu gibi lezyonlar organdan organa değişen oranlarda gözlenirken, kontrol grubunda bu ağır lezyonların hiçbiri gözlenmedi. Ağır lezyonların olduğu organların hepsinin kültürlerinde sayılamayacak kadar çok *Candida* kolonisi saptandı. Deney grubunda ağır bulguların organlara göre dağılımı Tablo 2'de görülmektedir.

Ağır lezyonlar açısından organlar ayrı ayrı değerlendirildiğinde, 10 (%17.9) olgu ile granülom oluşumu sadece böbrekte gözlenirken diğer organlarda bu bulguya rastlanmadı. Mantar embolisi 13 (%23.2) olgu ile yine en sık böbrekte gözlendi. Bunu 11 (%19.6) olgu ile beyin ve 1 (%1.8) olgu ile karaciğer takip ediyordu. Mantar kolonisinin varlığı açısından 27 (%48.2) olgu ile böbrek birinci sırada gelirken bunu 21 (%37.5) olgu ile beyin, 6 (%10.7) olgu ile karaciğer, 4 (%7.1) olgu ile dalak ve 2 (%3.6) olgu ile beyin, 6 (%10.7) olgu ile karaciğer, 4 (%7.1) olgu ile dalak ve 2 (%3.6) olgu ile karaciğer izliyordu. Mikroapse formasyonunun varlığı açısından ise 24 (%42.0) olgu ile yine böbrek ilk sırada yer alırken, bunu 22 (%39.3) olgu ile beyin, 6 (%10.7) olgu ile karaciğer, 4 (%7.1) olgu ile dalak ve 2 (%3.6) olgu ile karaciğer izliyordu.

Orguların ait kültür ve patoloji sonuçları Tablo 3'te toplu olarak verilmiştir.

Tablo 1. Nonspesifik Bulguların Organlara Göre Dağılımı

Organ	Deney (n=56)		Kontrol (n=15)		2	p
	n	(%)	n	(%)		
Karaciğer	49	(87.5)	5	(33.3)	19.06	<0.001
Akciğer	44	(78.6)	3	(20.0)	18.14	<0.001
Dalak	45	(80.4)	2	(13.3)	23.75	<0.001

Tablo 2. Deney Grubunda Ağır Histopatolojik Bulguların Organlara Göre Dağılımı

Organ (n=56)	Granülom		Emboli		Koloni		Apse	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Karaciğer	-	-	1	(1.8)	6	(10.7)	6	(10.7)
Dalak	-	-	-	-	4	(7.1)	4	(7.1)
Böbrek	10	(17.9)	13	(23.2)	27	(48.2)	24	(42.0)
Beyin	-	-	11	(19.6)	21	(37.5)	22	(39.3)
Akciğer	-	-	-	-	2	(3.6)	2	(3.6)

Karaciğerde deney grubunda 49 (%87.5) olguda histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. Bu olguların 40 (%71.4)'ünde kültürde üreme saptanırken, 9 olguda üreme saptanmadı. Kültür ve histopatolojik sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($\chi^2=3.50$, $p>0.05$). Kontrol grubunda ise histopatolojik değişiklikler gösteren 5 (%33.3) olgunun 2 (%13.3)'sinde kültürde üreme saptanırken, 3 olguda üreme saptanmadı. Kültür ve histopatolojik sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($\chi^2=1.66$, $p>0.05$).

Akciğerde deney grubunda 44 (%78.6) olguda histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. Bu olguların 34 (%60.7)'ünde kültürde üreme saptanırken, 10 olguda üreme saptanmadı. Kültür ve histopatolojik sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($\chi^2=0.24$, $p>0.05$). Kontrol grubunda ise 3 (%33.3) olguda histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. 2 (%13.3) olguda kültürde üreme saptanırken, 1 olguda üreme saptanmadı. Kültür ve histopatolojik sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0.05$).

Dalakta deney grubunda 45 (%80.4) olguda histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. Bu olguların 35 (%62.5)'inde kültürde üreme saptanırken, 10 olguda üreme saptanmadı. Kültür ve histopatolojik sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($\chi^2=3.54$, $p>0.05$). Kontrol grubunda ise 2 (%33.3) olguda histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. Her 2 (%13.3) olguda kültürde üreme saptandı.

Böbrekte deney grubunda 34 (%60.7) olguda histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. Bu olguların hepsinde kültürde üreme saptanırken, histopatolojik değişiklikler gözlenmeyen 4 olguda da kültürde üreme saptandı. Kültür ve histo-

patolojik sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($\chi^2=0.35$, $p>0.05$). Kontrol grubunda ise hiçbir olguda histopatolojik değişiklik gözlenmedi, fakat 2 (%13.3) olguda kültürde üreme saptandı.

Beyinde deney grubunda 30 (%53.6) olguda histopatolojik değişiklikler gözlemlendi. Bu olguların hepsinde kültürde üreme saptanırken, histopatolojik değişiklikler gözlenmeyen 4 olguda da kültürde üreme saptandı. Kültür ve histopatolojik sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($\chi^2=0.33$, $p>0.05$).

İrdeleme

Geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı, immün sistemi değişik nedenlerle baskılanmış hasta oranlarındaki artış gibi nedenlerle, tanısı konvansiyonel yöntemler ile çok güç konulan sistemik kandidiyaz insidansı her geçen gün biraz daha artmaktadır (12,13). Tanısı çoğu zaman ancak otopsi bulguları ile konulan kandidiyaz olgularında histopatolojik değişikliklerin neler olduğu ve hangi organları ağırlıklı olarak etkilediği önemlidir.

Çalışmamızda ağır lezyonlar olarak tanımladığımız apse oluşumu, mantar kolonizasyonu ve embolisi ile granülom oluşumuna beyin, böbrek ve karaciğer gibi vital organlarda değişen oran ve ağırlıklar ile rastladık. Apseler oluşumu genellikle mikroapseler boyutlarında olmak üzere olgularda en çok gözlediğimiz bulgu olarak karşımıza çıkarken, etkenin PAS reaksiyonu kullanılarak bu odaklarda gösterilmesi genellikle mümkün olmuştur. Apseler oluşumunda tümör nekroz faktörü (TNF) ve interlökin 1 (IL-1)'in doku likefaksiyonunu körüklemek suretiyle etkili

Tablo 2. Deney ve Kontrol Gruplarının Kültür ve Patoloji Sonuçları

Organ	Kültür-Pozitif				Patoloji			
	Deney (n=56)		Kontrol (n=15)		Deney (n=56)		Kontrol (n=15)	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Karaciğer	40	(71.4)	2	(13.3)	49	(87.5)	5	(33.3)
Akciğer	34	(60.7)	2	(13.3)	44	(78.6)	3	(20.0)
Dalak	35	(62.5)	2	(13.3)	45	(80.4)	2	(13.3)
Böbrek	38	(67.8)	2	(13.3)	34	(60.7)	-	-
Beyin	34	(60.7)	2	(13.3)	30	(53.6)	-	-

olduğu ileri sürülmektedir (14). Mantar embolisi özellikle böbrek ve beyin gibi kanlanması yüksek organlarda belirginleşen bir bulgu olarak ortaya çıkmaktadır. Duvarı anatomik yapısı gereği daha zayıf olan venöz yapılar bu durumdan daha sık etkilenmektedir. Embolik damar duvarlarının inflame ve nekrotik oluşu etkenin vasküler yapıyı direkt olarak invaze ettiğinin bir bulgusu olarak kabul edilebilir. Çalışmamızda granülom oluşumuna sadece böbrekte ve sınırlı ölçüde rastlanmış olması da ilgi çekicidir. Ancak granülom oluşumu değerlendirilirken bunun dolu reaksiyonları içerisinde genellikle zaman ve konak immünitesi ile ilişkili bir reaksiyon olduğu göz önünde tutulmalıdır.

Çalışmamızda kültür ve histopatolojik sonuçlar karşılaştırılmış, aralarında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Ağır histopatolojik lezyonların olduğu olguların hepsinde, kültürde üreme saptanmıştır. Ancak sadece non-spesifik bulguların olduğu bazı olgularda kültürde üreme saptanmamıştır. Ayrıca beyin ve böbrekte 4 olguda kültürde üreme pozitifken, histopatolojik değişiklik saptanmamıştır. Non-spesifik histopatolojik değişiklikler gösteren ve kültürde üremesi olan olguların ise kontaminasyon olduğu düşünülmüştür.

Deneysel *Candida* sepsisi çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar gerek lezyonların tipi gerekse de organ tutulumları açısından literatürdeki bulgular ile paralellik göstermektedir (13,15-17). Tanısal güçlükleri olan *Candida* sepsislerinde organ biyopsileri, doku değişiklikleri ve etkenin gösterilmesinde yeterli olmakla birlikte invazif bir yöntem olması nedeniyle her zaman uygulanabilir olması tartışmalıdır.

Kaynaklar

- Hector FR, Yee E, Colins SM. Use of DBA/2N mice in of systemic candidiasis and pulmonary and systemic aspergillo-sis. *Infect Immun* 1990;58: 1476-8
- Pavliak V, Sandula J, Tomsikaua A, et al. Determination of antibodies to candida albicans cell wall components by immunodiffusion, elisa and its rapid modification. *Mycoses* 1988;31: 426-32
- Fader CR, Nunez D, Unbehagen J, et al. Experimental candidiasis after thermal injury. *Infect Immun* 1985;49:780-4
- Çerikçioğlu N. Kandida infeksiyonlarının patogenezi. In: Willke A, Ünal S, Doğanay M, eds. 7. *Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi* (11-15 Eylül 1994, Ürgüp) Program ve Kongre Tutanakları. İstanbul: Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği, 1994:103-10
- Erbakan N. *Derinin Mantar Hastalıkları*. Ankara: Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1989
- Nelson DR, Shibata N, Podzorski PR, et al. Candida mannan: chemistry, supression of cell-mediated immunity and possible mechanism of action. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:1-19
- Becker MJ, Marcus S, Tullock J, et al. Use of chitin-syntesis inhibitor nikkomycin to treat disseminated candidiasis in mice. *J Infect Dis* 1988;157:212-3
- Kahn WF, Jones MJ. Latex agglutination test for detection of Candida antigens in sera of patients with invasive candidiasis. *J Infect Dis* 1986;153:579-85
- Pirinççiler M. *Maya Mantarlarının Tiplendirilmesi ve Antifungal Duyarlılığı*. Uzmanlık Tezi. Samsun: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1995
- Kohn S, Mitsutake K, Maesaki S, et al. An evaluation of serodiagnostic tests in patients with candidemia: beta-glycan, mannan, Candida antigen by Cand-Tec and D-arabinitol. *Microbiol Immunol* 1993;37:207-12
- Gutierrez J, Maroto C, Pedrola G, et al. Circulating Candida antigens and antibodies: useful markers of candidemia. *J Clin Microbiol* 1993;31: 2550-2
- Brandt G, Wuensche N. Contribution to the relevance of post-mortal histological demonstration of fungi in tissue. *Mycosen* 1979;22:60-4
- File TM, Marino OA, Flowers FP. Necrotic skin lesion associated with disseminated candidiasis. *Arch Dermatol* 1979; 115:214-5
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic Basis of Disease*. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1995
- Joseph C, Parker JR, Mc Closkey JJ, Knauffer KA. Pathologic fetures of human candidiasis. *Am J Clin Pathol* 1976;65:991-1000
- Joseph C Jr, Cleary TJ, Kogure K. The effect of transient candidemia on the brain. *Surg Neurol* 1979;11:44-8
- Meister H, Heymer B, Schaefer H, Hafarkomp O. Role of Candida albicans in granulomatous tissue reactions. *J Infect Dis* 1977;135:235-42