

SERDAR SUSEVER

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2006

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**İnvazif mantar infeksiyonlarının
tanımlanmasında
moleküler yöntemlerin önemi; uygulanması
ve geleneksel yöntemler ile karşılaştırılarak
değerlendirilmesi.**

DR. SERDAR SUSEVER

**DANIŞMAN
PROF.DR . YILDIZ YEĞENOĞLU**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI DOKTORA PROGRAMI**

İSTANBUL-2006

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek lisans / Doktora. Tezi olarak kabul edilmiştir.

28 / 06 /2006

Prof.Dr.Emine Kökoğlu
Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program Adı :

Programın seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)

Anabilim Dalı : Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD.

Tez Sahibi : Serdar Susever

Tez Başlığı : İnvazif mantar infeksiyonlarının tanımlanmasında moleküler yöntemlerin önemi; uygulanması ve geleneksel yöntemler ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi.

Sınav Yeri : İstanbul Üniv.İstanbul Tıp Fak., Mikrobiyoloji ve Klinik
Mikrobiyoloji ABD

Sınav Tarihi : 28/06/2006

Tez Sınav Jürisi

- 1.Prof.Dr.Emel Tümbay,Ege Üniv. Ege Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD.
- 2.Prof Dr Emel Bozkaya ,İstanbul Üniv.İstanbul Tıp Fak., Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD.,(Tez izleme Komitesi Üyesi)
3. Prof Dr Yıldız Yeğenoğlu ,İstanbul Üniv., İstanbul Tıp Fak., Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD.(Tez izleme Komitesi Üyesi/Danışman)
4. Prof Dr Bilge Hapçıoğlu ,İstanbul Üniv.,İstanbul Tıp Fak., HalksağlığıABD. (Tez izleme Komitesi Üyesi)
- 5.Doç Dr Mustafa Hasöksüz, İstanbul Üniv., Vetenirlik Fak.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, bu tezdeki bütün bilgilerin akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ad Soyad (İmza)

Serdar Susever

İTHAF

Hocam Prof. Dr. Özdem Anđ 'a ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Prof .Dr.Yıldız Yeğenoğlu 'na teşekkür ederim

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T329/03112003 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

Tüm eğitimim süresince destek ve ilgilerini esirgemeyen, değerli bilgilerinden yararlandığım değerli hocam Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı önceki başkanı emekli öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Özdem Anğ'a;

Bilgi ve Deneyimlerinden yararlandığım Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Emel Bozkaya'ya ;

Tez konumum belirlenmesinde ve tezimin çalışma, yazım aşamasında bilgi ve deneyimleri ile her zaman yardımcı ve yanımda olan değerli hocam Sayın Prof. Dr.Yıldız Yeğenoğlu'na ;

Tez çalışmam sırasında, tüm hafta sonlarını benimle geçiren, deneyimleri ile yardımcı olan Sayın Doç Dr Mustafa Hasöksüz'e;

İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Mikrobiyoloji ABD'nin laboratuvarlarında çalışmama izin vererek tezimin tamamlanmasını olanaqlı kılan Sayın Prof.Dr. Atilla Ilgaz'a, tüm değerli hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma

Bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum değerli hocalarım,Sayın Prof. Dr. Rahmiye Berkiten, Sayın Prof. Dr. Ergene Büğet, Sayın Prof. Dr. Selim Badur, Sayın Prof. Dr Bülent Gürler, Sayın Prof. Dr. Şengül Derbentli, Sayın Prof. Dr. Mine Anğ Küçükler, Sayın Prof Dr. Nezahat Gürler, Sayın Prof. Dr.Çiğdem Bal, Sayın Prof.Dr.Betigül Öngen, Sayın Prof. Dr. Derya Aydın, Sayın Prof. Dr. Şadi Yenen, Sayın Prof. Dr. Ali Ağaçfidan, Sayın Prof. Dr. Ali Öner, Sayın Prof. Dr. Meltem Uzun, Sayın Prof. Dr. Zayre Erturan ve Sayın Doç.Dr.Özden Büyükbaba-Boral'a;

Değerli yardımlarından dolayı Sayın Prof.Dr.Bilge Hapçioğlu.ve Doç.Dr.Halimİşsever'e;

Değerli yardımlarını esirgemeyen Dr. Muammer Kiraz,Dr. Dilek Satana, Araş.Gör.Gonca Erköse ve tüm tıpta uzmanlık öğrencisi arkadaşlarıma;

Yaşamım boyunca her türlü maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	VII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VIII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	X
ABSTRACT.....	XI
ZUSAMMENFASSUNG / RESUME.....	XII
GİRİŞ VE AMAÇ (BÖLÜM 1)	1-3
GENEL BİLGİLER (BÖLÜM 2)	4-39
GEREÇ VE YÖNTEM (BÖLÜM 3)	40-49
BULGULAR (BÖLÜM 4)	50-66
TARTIŞMA (BÖLÜM 5)	67-78
KAYNAKLAR (BÖLÜM 6)	79-89
ETİK KURUL KARARI.....	90
ÖZGEÇMİŞ	91-95

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Mantarların anatomik lokalizasyonlarına (yüzeyel, deri, deri altı ve sistemik) göre yaptıkları hastalıklar.

Tablo 2.2. Klinik örneklerden izole edilen mayaların kültür ve biyokimyasal özellikleri.

Tablo 4.1. İncelenen klinik örneklerin mikroskopi,kültür, genel primer çiftleri ile PCR ve türe özgü primer çiftleri ile multipleks PCR sonuçları

Tablo 4.2. BAL örneklerinin mikroskopi,kültür, genel primer çiftleri ile PCR ve türe özgü primer çiftleri ile multipleks PCR sonuçları

Tablo 4.3.Kan örneklerinin kültür, genel primer çiftleri ile PCR ve türe özgü primer çiftleri ile multipleks PCR sonuçları

Tablo 4.4.Periton diyaliz, plevra, beyin omurilik, perikard sıvılarının ve idrarın mikroskopi, kültür, genel primer çiftleri ile PCR ve türe özgü multipleks PCR sonuçları

Şema 2.1. Klinik örneklerden izole edilen mayaların tanımlanması

ŞEKİL VE RESİMLER LİSTESİ

Şekil 2.1. rDNA gen bölgesi haritası

Şekil 2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu

Resim 4.1. Referans *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus*'un genel primer çiftleri ile PCR sonuçları

Resim 4.2. Referans *Candida tropicalis*'in genel ve türe özgü primer çiftleri ile PCR sonucu

Resim 4.3. Referans *Candida glabrata*'nın türe özgü primer çiftleri ile PCR sonucu

Resim 4.4. Referans *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*'in genel ve türe özgü primer çiftleri ile PCR sonuçları

Resim 4.5. Referans *Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans*'ın türe özgü primer çiftleri ile PCR sonuçları

Resim 4.6. Referans *Aspergillus fumigatus*'un genel ve türe özgü primer çiftleri ile PCR sonuçları

Resim 4.7. Referans *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*'ın multipleks PCR sonuçları

Resim 4.8. Klinik örneklerdeki mantar DNA'sı (genel primer çiftleri ile)

Resim 4.9. Klinik örneklerdeki mantar DNA'sı (türe özgü primer çiftleri ile)

Resim 4.10. Referans *Candida albicans*'ın 10 katlı sulandırımının SDA'da 24 saatlik kültür sonuçları

Resim 4.11. Referans *Candida albicans*'ın 10 katlı sulandırımının genomik DNA izolasyon kiti ve fenol kloroform izoamil alkol yöntemi ile yapılan PCR sonuçları.

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

PCR: Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)

ITS: Internal transcribed spacer (İç kopya alanı)

r DNA: Ribosomal DNA (Ribozomal DNA)

ETS: External transcribed spacer (Dış kopya alanı)

IGS: Intergenic spacer (İç alan)

RFLP: Restriction fragment length polymorphism (Restriksiyon parçaları
uzunluk polimorfizm)

RAPD: Random amplified polymorphic DNA (Rastgele çoğaltılan
polimorfik DNA)

MEE: Multilocus enzyme electrophoresis (Çok yerleşimli enzim
elektroforezi)

SSCP: Single strand conformation polymorphism (Tek sarmal yapıda
polimorfizm)

SAP: Secreted aspartyl proteinase (Salgısal aspartik proteinaz)

ÖZET

Susever S (2006). İnvazif mantar infeksiyonlarının tanımlanmasında moleküler yöntemlerin önemi; uygulanması ve geleneksel yöntemler ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2006.

Anahtar Kelimeler: Polimeraz zincir reaksiyonu, multipleks PCR, Candida türleri, Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T329/03112003 no'lu proje olarak desteklemiştir.

Son yıllarda mantar infeksiyonlarının öneminin artmasından dolayı etken olan mantarların tanısı, tür tayini, tiplendirilmesi ve antifungal dirençlilikle ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. İnfeksiyon etkeni olan/olabilen gerçek ve fırsatçı patojen mantarların tanımlanmasında, doğrudan mikroskopik inceleme ve kültür günümüzde halen altın standart yöntemler olma değerini korumaktadır. Ancak gerek zaman alıcı olması, gerekse her zaman olumlu sonuç vermemeleri, bazı mantarlar açısından zor uygulanabilir ve yorumlanabilir olması nedeniyle bu yöntemlerin yanı sıra; daha hızlı olan, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek yeni tanı yöntemlerine gereksinim duyulmuştur. Çalışmada, moleküler yöntemler kullanılarak bazı mantar infeksiyon ve etkenlerinin tür düzeyinde tanılarının, yapılabilmesi amaçlanmıştır. Çalışma boyunca geleneksel yöntemler de paralel olarak uygulanmış ve deneylerin bitiminde her iki yöntem karşılaştırılarak yorumlanmıştır. Mantar DNA'sını elde etmek için klasik fenol- kloroform-izoamilalkol ve ticari DNA ekstraksiyon kiti kullanılmış, ticari kit ile DNA'nın elde edilmesi 6-7 saatte tamamlanırken, bu süre fenol kloroform izoamilalkol yönteminde yaklaşık 9-10 saat olarak belirlenmiştir. Çalışmada, mantarların ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, 5,8S rDNA ve 28S rDNA bölgelerinden seçilen genel ve türe özgü primerler kullanılmıştır. Genel primer ile 550bp'de mantarlara, türe özgü primerlerin kullanılması ile: 273bp'de *C.albicans*, 320bp'de *C.parapsilosis*, 423bp'de *C.glabrata*, 357bp'de *C.tropicalis*, 385bp'de *A.fumigatus* ve 136bp'de *C.neoformans*'a ait bant saptanmıştır. Mikroskopi, kültür ve PCR olumlu yedi (%19.4); mikroskopi olumsuz, PCR olumlu 16 (%44.4), mikroskopi olumsuz kültür ve PCR olumlu altı (%16), örnek belirlenmiştir. Hiçbir örneğin PCR'ı olumsuz, kültür ve mikroskopisi olumlu bulunmamıştır. 50 immünsupressif hastaya ait klinik örneklerin 27(%54)'sinde multipleks PCR yöntemi ile, 17(%34)'sinde de kültürel yöntemler ile olumlu yanıt alınmıştır. Anamnezlerinde örneklerin gönderildiği dönemde antifungal tedavi altında oldukları belirtilen ve kültür sonucu olumsuz olarak saptanan 10(%20) hastanın tümü multipleks PCR testi ile olumlu yanıt vermiştir. Çalışmada Kappa istatistiksel analiz testi yardımı ile kültür ve PCR uyumu 0,61(p<0,001), mikroskopi PCR uyumu ise 0,24 (p<0,001) olarak saptanmıştır.Uygulanan PCR yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %69,7 olarak belirlenmiştir.Sonuç olarak geleneksel yöntemleri gözardı etmeden ortam koşulları ve klinik tablo esas alınarak; gerekli testlerin gereken zamanlarda uygulanması; verilerin klinik, histopatolojik ve görüntüleme teknikleri ile birleştirilip doğru yorumlanabilmesi kanısına varılmıştır.

ABSTRACT

Susever S. The significance and application of molecular methods for description of invasive fungal infections and evaluation and comparison of the test results with conventional methods. İstanbul. 2006. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Microbiology and Clinical Microbiology

Key Words: Polymerase chain reaction, multiplex PCR, *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*

This study was supported by The Research Support Unit of İstanbul University as the project no T329/03112003.

Since the importance of the fungal infections are increased in last years, studies related to the typing, identification and the antifungal resistance of the causitive agents have been speed up. In the determination of true or opportunistic pathogens as a causitive agent, direct microscopy and culture techniques are still gold standart but interpretation and application of these techniques are difficult for some fungi and they are not time consuming. Because of these reasons, the new and rapid techniques which have had high sensitivity and specificity are needed. In this study the causitive agents of the fungal infections were identified in species level by using the molecular techniques and results were compared with the conventional methods. For the isolation of fungal DNA, classical phenol-chloroform-isoamilalcohol procedure (9-10 hours) and commercial DNA extraction kit (6-7 hours) were used, and general and species specific primers from ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, 5,8S rDNA and 28S rDNA regions were choosen. In PCR results, a 550bp band was observed as universal primers. Species-specific primers for *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.neoformans* and *A.fumigatus* were occurred 273bp, 320bp, 423bp, 357bp, 136bp and 385bp band on gel, respectively. It was found that all of the samples were positive by microscopy, culture and PCR in 7 samples (19.4%), the number of samples with microscopy negative but PCR positive were 16 (44.4%) and the number of samples with microscopy negative but culture and PCR positive were 6 (16%). There were no samples that PCR negative but microscopy and culture positive. 27(54%) and 17 (34%) clinical samples taken from 50 immunosuppressive patients were positive when tested by multiplex PCR and cultural methods, respectively. 10(20%) samples taken from patients under the antifungal therapy were negative by cultural methods, but they were positive when tested by multiplex PCR. In this study, the agreement between the culture - PCR and microscopy - PCR when calculated with a Kappa statistic was 0.61 ($p<001$) and 0.24 ($p<0001$), respectively. The sensitivity and specificity of PCR compared with cultural methods were 100% and 69.7%, respectively. In conclusion, not only conventional methods and clinical symptoms but also rapid-sensitive and histopathological test results should combine for the best description of fungal infections.

ZUSAMMENFASSUNG / RESUME

Die Wichtigkeit und Anwendung von molekularbiologischer Methoden in der Diagnose von invasiven Pilzinfektionen und die Bewertung durch den Vergleich mit traditionellen Untersuchungsverfahren. İstanbul Universität, Institut für Gesundheitswissenschaft. Doktor Arbeit . İstanbul 2006.

Schlüsselwörter: Polymerase-Ketten-Reaktion, multiplex PCR, Candida spezies, Cryptococcus neoformans, Aspergillus fumigatus.

Diese Arbeit wurde von der Abteilung für wissenschaftliche Forschungsprojekte der Universität İstanbul untertützt. Projekt Nummer: T329/03112003

Da die Bedeutung von Pilzinfektionen in den letzten Jahren gestiegen ist, haben sich die Forschungen über die Bestimmung der Pilzerreger, ihrer Identifizierung, Typisierung und antimykotischer Resistenz beschleunigt. Für die Bestimmung von den primär und fakultativ pathogenen Pilzen die die Ursache von der Infektion sind/sein könnten gelten direkte mikroskopische Untersuchungen und Kultur heute immer noch als der goldene Standard. Weil diese Methoden viel Zeit in Anspruch nehmen, nicht immer positiv sind, bei manchen Pilzen schwer anzuwenden und zu bewerten sind, werden neben ihnen schnellere, spezifischere und sensitivere neue Methoden gebraucht. Ziel der vorliegenden Arbeit war molekulare biologische Methoden anzuwenden um Pilzinfektionen und deren Erreger zu identifizieren. Im Laufe dieser Forschung wurden traditionelle Untersuchungsverfahren parallel mitgearbeitet und am Ende der Versuche wurden die zwei Methoden verglichen und bewertet. Für die Isolierung der Pilz-DNA wurde die klassische fenol-chloroform-isoamylalkohol Methode und ein kommerzielles DNA Extraktions-kit verwendet. Die DNA-Extraktion mit dem kommerziellen Kit dauerte 6-7 Stunden und mit der fenol-chloroform-isoamylalkohol Methode 9-10 Stunden. Bei der Arbeit wurden generelle und spezifische Sonden der folgenden Bereiche der Pilze angewandt: ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, 5,8S rDNA und 28S rDNA. Mit den generellen primären wurden Banden bei 550bp, mit den spezifischen Primären wurden folgende Banden: 273bp bei *C. albicans*, 320bp bei *C. parapsilosis*, 423bp bei *C. glabrata*, 357bp bei *C. tropicalis*, 385bp bei *A. fumigatus* und 136bp bei *C. neoformans* gefunden. Sieben (19,4%) Proben waren mikroskopisch, kulturell und mit PCR positiv, 16 (44,4%) waren mikroskopisch negativ und PCR positiv, 6 (16%) waren mikroskopisch negativ, kulturell positiv und PCR positiv. Von den Proben die von 50 immungeschwachten Patienten entnommen wurden, gaben 27 (54%) mit der multiplex-PCR Methode ein positives Ergebnis und bei 17 (34%) war die Kultur positiv. Bei allen 10 (20%) Patienten die angegeben hatten, daß sie bei der Entnahme der Probe antimykotische Therapie genommen hatten, war die Kultur negativ und das PCR-Resultat positiv. Bei dieser Arbeit wurde mit der Hilfe des Kappa-Analyse-Testes das Zusammenpassen von Kultur und PCR 0,61% ($p < 0,001$) ausgewährt. Die Sensitivität der PCR Methode war 100%, die Spezifität war 69,7%. Als Ergebnis sind wir dazu gekommen, daß die traditionellen Methoden nicht vernachlässigt werden sollten und dabei die vorhandenen Bedingungen und das klinische Bild beachtet werden sollte, die nötigen Verfahren in der nötigen Zeit durchgeführt werden sollten und die Ergebnisse mit klinischen, histopathologischen und Röntgen-Befunden zusammengefaßt werden sollten.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda mantar infeksiyonlarının öneminin artmasından dolayı etken olan mantarların tanısı, tür tayini, tiplendirilmesi ve antifungal dirençlilikle ilgili çalışmalar hız kazanmıştır. Ağır klinik tablo geliştirmiş veya cerrahi girişim uygulanan hastalar açısından, tanı ve tedavi yaklaşımlarındaki gelişmeler, gerçek patojen ya da fırsatçı mantarlara bağlı yaşamı tehdit edici infeksiyonların artışı da beraberinde getirmiştir. Özellikle immünsupressif hastalarda tanı ve tedavinin erken dönemde gerçekleşebilmesi yüksek mortalite hızını düşürmek açısından çok önemlidir. İnvaziv mantar hastalıklarının etkenlerinin tanımlanmasında, doğrudan mikroskopik inceleme ve kültür günümüzde halen altın standart yöntemler olma değerini korumaktadır. Ancak gerek zaman alıcı olması, gerekse her zaman olumlu sonuç vermemeleri, bazı mantarlar açısından zor uygulanabilir ve yorumlanabilir olması nedeniyle, bu yöntemlerin yanı sıra; daha hızlı, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek yeni tanı yöntemleri geliştirilmektedir. Son yıllarda DNA çoğaltma yöntemlerinin gelişimi bu güçlüklerin çözümlenmesinde önemli bir adım olarak dikkatleri çekmektedir (22,48,70,71,84).

Mantar infeksiyonlarının moleküler tanısı ya doğrudan hasta örneği ya da kültür ortamından gerçekleştirilebilir. Moleküler tanının ilk basamağında öncelikle, hastada varlığından kuşku duyulan mantar hastalığının kanıtlanması, ikinci aşamada ise infeksiyon etkeni olan mantarın tür düzeyinde tanımlanması amaçlanmıştır. Mantarların tanımlanmasında en yaygın olarak kullanılan iki DNA bölgesi, küçük ve büyük ribozomal alt-üniteleri arasında yer alan türe özgü internal transcribed spacer (ITS) ve büyük ribozomal alt-ünitesinin(26S) D1/D2 bölgeleridir. Bu bölgeler tür düzeyinde farklılıklar gösteren yeterli zincir heterojenliğini içermektedir; dolayısı ile tür tanısı ve mutasyonel değişikliklerin ortaya konması için daha uygundur. Genel olarak, nükleotid değişkenliği aynı cinslere ait türler arasında %1'den daha az iken farklı cinslere ait türler arasında bu oran daha fazladır. Mantarların genotiplendirme çalışmalarında, protein kodlayan intron bölgeler ve ribozomal DNA (rDNA) gibi protein kodlamayan gen bölgeleri hedef olarak kullanılır (48,70,71,84).

Son 10 yılda, patojenik mantarların filogenetikleri üzerine yapılan araştırmalarda büyük bir artış olmuştur (33). Ribozomal dizi, mitokondrial ve diğer nükleer DNA zincirlerinin analizleri birçok mantar türünün genetik özelliği

ve türler arasındaki genetik ilişkinin düzeyini belirlemek için kullanılmaktadır. Filogenetik araştırmalar sayesinde, birçok anamorfik (eşeysiz üreyen) ve Ascomycota veya Basidiomycota gibi telemorfik (eşeyli üreyen) özelliklere de sahip organizmalar arasında yakın genetik ilişki bulunduğunun ortaya koyulması (32), çok sayıda patojenik ve saprofit mantar gruplarına ait DNA yapılarının uluslararası veri tabanlarına girilmesi ve filogenetik ilişkinin daha iyi anlaşılması; mantar hastalıklarının hızlı DNA-tabanlı testlerle tanımlanmasına büyük katkılar sağlamıştır.

Bu amaçla yapılan çalışmalarda en çok tercih edilen genomik alanlar ITS'nin yanısıra mitokondriyal sitokrom b, filogenetik yönden bilgi sağlayıcı genetik moleküller (large subunit rDNA), P450L1A1 dimetilaz ve aktin bölgeleri olmuş bu bağlamda restriksiyon parçaları uzunluk polimorfizm (RFLP), ilk uygulanan yöntemlerden biri olma niteliğini kazanmıştır. Bu yöntem, mantar genomunun restriksiyon profillerini belirlemede kullanılır. Yöntemin uygulanmasında sırası ile gerçekleştirilen işlemler dizisinde öncelikli olarak restriksiyon enzimleriyle mantar DNA'sı kesilir ve kesilen DNA bölgeleri agaroz jel elektroforezi yardımıyla büyüklüklerine göre ayrılarak Southern blot ile agaroz jelden nitrosellüloz ya da naylon membrana aktarılır. Son olarak da membrana bağlı olan nükleik asitler, incelenen gen bölgesine özgü olan işaretli prob ile hibridize edilir. Restriksiyon enzimlerinin tanıdığı bölgeler türden türe değişkenlik gösterdiğinden aynı türe ait mikroorganizmalar benzer bantları içerirken, değişik türlere ait mikroorganizmalar farklı bantlar oluştururlar. (14,25,70,71) 1987 yılında Scherer ve Stevens tekrarlayan ribozomal DNA içeren (RNA kodlayan genler) RFLP temelli çalışmalarında çeşitli *Candida* türlerini idantifiye etmişlerdir (72).

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) yöntemi 1990-1991 yıllarında Williams, Welsh ve Mc Clelland tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde, DNA'nın amplifikasyonu sırasında kalıp DNA'ya hibridize olan 9-10 baz sıralı rastgele (ten-mer oligonükleotid) primerler kullanılır. Genom veya ilgili DNA dizini ön bilgisinin gerekli olmayışı bu yöntemin avantajı olarak kabul edilebilir. Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde gerçekleşmiş olan mutasyonlar bant polimorfizminin ortaya çıkmasına neden olur. Sonuç olarak agaroz jel üzerinde tipik bantlar ortaya çıkar. Bu yöntem *Candida* ve *Aspergillus* türlerinin epidemiyolojik tiplendirilmelerinde de kullanılmıştır (6,9,44,87,89).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan; yeni ve önemli bir yöntemdir. Günümüzde kullanımı giderek yaygınlaşan bu yöntem yardımı ile, klinik örnekten etkenin saptanması, izole edilen suşun ve alttiplerin tanımlanması mümkün olmaktadır; çift iplikli kalıp DNA molekülündeki hedef gen bölgesine özgü iki oligonükleotid primerin bağlanarak (annealing) uzaması (extension) ve çoğalması (30-40 döngü) testin esasını oluşturur, ortaya çıkan ürün agaroz jel üzerinde kolaylıkla görüntülenebilir (5,6,14,22,44, 47).

PCR yönteminde birden fazla türe özgü primer çiftinin kullanılması sonucunda multipleks PCR testi geliştirilmiştir. Bu teknikte, ilk aşamada geniş özgüllüğü olan DNA ürünü (örneğin, ITS bölgesi) çoğaltılır ve daha sonra bu ürün türe-özü primerler ile reaksiyona sokulup, DNA ürünleri jel üzerinde farklı bantlar oluşturur (98). Elde edilen ürün, sadece söz konusu tür açısından amaçlanan hedefe özeldir.

Chang ve arkadaşları kan kültüründen multipleks PCR yöntemi ile iki çift primer kullanarak *C.glabrata* (482 ve 483bp), *C.guilliermondii* (248bp), *C.parapsilosis* (229bp), *C.albicans* (218 veya 219 ve 110bp), *C.tropicalis* (218 bp), *C.neoformans* (201bp) ve *C.krusei*'yi (182bp) tanımlamışlardır (18).

Luo ve arkadaşları ise 'multipleks PCR' yöntemi ile iki ayrı panel altında primer çifti kullanarak *A.fumigatus* (385bp), *C.albicans* (273bp), *C.glabrata* (423bp), *C.parapsilosis* (320ve 300bp), *C.tropicalis* (357bp) ve *C.neoformans*'ı (136bp) saptamışlardır (59).

Multipleks PCR yöntemi, aynı klinik tabloya neden olan mikroorganizmalar veya başka, öngörülmemiş bir mikroorganizmaya bağlı yalancı pozitifliği de ortadan kaldırmaktadır (44). Bu yöntem ile sekiz saat gibi kısa bir sürede ve aynı deney boyunca birden fazla mantarın tür düzeyinde tanısını yapabilmek mümkün olmaktadır (44).

Çalışmada, moleküler yöntemler kullanılarak mantar infeksiyonlarının ve etken olan mantarların tür düzeyinde tanılarının; yapılabilmesi amaçlanmıştır. Çalışma boyunca geleneksel yöntemlerin de paralel olarak uygulanması ve deneylerin bitiminde her iki yöntemin karşılaştırılarak yorumlanması planlanmıştır.

2. Genel Bilgiler

Mikoloji kelimesi Yunanca mykes (mantar) ve logos (bilim) kelimelerinin birleşmesi sonucunda oluşmuştur. Mantar infeksiyonları mikoz olarak adlandırılır (2,93).

Mantar infeksiyonlarına ait bilinen en eski bilgi Hindu kutsal yazıtında (Samhita, M.Ö. 2000-1000) bulunmaktadır. M.Ö 400-300 yıllarında Hipokrat'ın thrush olarak adlandırdığı ağızdaki Candida infeksiyonuna ait bilgiler; A.C.Celsus'un sekiz ciltlik "De re medicina" adlı eserinde yer almış ve ilk mikoz olguları olarak sunulmuştur. G. Bauhin (1560-1624) "Pinax Theatri Botanici" adlı eserinde 100 kadar mantarın özelliğini bildirmiştir. Mantarlarla ilgili gerçek anlamda ilk sistematik çalışmalar ise XVII.yüzyılda Antonie van Leeuwenhoek'un (1632-1723) mikroskobu keşfi ile gerçekleşmiştir. Mikolojinin kurucusu olarak kabul edilen İtalyan botanist P.A. Micheli 1729'da "Nova Plantarum Genera" adlı eserinde mantarlar ile ilgili değerli araştırmalarını yayınlamıştır. E.Fries (1794-1878), mantar sistematığının esasını "Systema Mycologicum" adlı eserinde sunmuş, A.Bassi 1835'de ipekböceklerinin muskardin hastalığında sonraları "Beauveria bassiana" olarak adlandırılan bir küf mantarının etken olabileceğinden söz etmiştir (2,10,52,86,95,96).

Mantarlar doğada bolca bulunur ve 250000 kadar tür içerirler, ancak 150-200 civarında gerçek ve fırsatçı patojen türünün insanlar için hastalık yapıcı özelliği bildirilmiştir. Mantarlar bitkilerden farklı olup prokaryotlardan daha yüksek organizasyon gösteren ökaryot mikroorganizmalardır. Boyut olarak bakterilerden daha büyüktürler (mayalar 3-10µm, küfler morfolojilerinden dolayı kesin olarak bilinmemekle beraber mayalardan büyük). Nükleusları bir zarla çevrili olup birden fazla kromozoma ve nukleolusa sahiptir. Sitoplazma zarlarında sterol bulunur, sitoplazmalarında mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı içerirler ve ribozomları 80S'tir. Mantarların hücre duvarları glukan, mannan, kitin ve kitozan açısından zengindir. Klorofil içermezler, heterotrofturlar, aerop ve fakültatif anaerop özellikli olabilirler, ototrof ve zorunlu anaerop olan bir mantar türü henüz bilinmemektedir. Bazı mantarlar dimorfizm (çift biçimlilik) gösterirler; hem maya, hem de küf şeklinde olabilirler. Mantar hastalıklarının tedavisinde antifungaller kullanılır. Mantarlardan fermentasyon

işleminde, steroid ve antibiyotik yapımında, bitkilerde hormon olarak ve peynirlerin olgunlaştırılmasında yararlanır. İnsan ve hayvanlarda mikoza, bitkilerde çürüme ve hastalıklara, mikotoksinleri ile zehirlenmeye, allerjik yanıtlara ve cansız maddelerde bozulmalara neden olma, zararları arasında sayılabilir (38,40,52,69,80,93).

Mantar sporları

A- Mantarlar, ortam koşullarına dirençli ve havada kolaylıkla yayılabilme özelliğine sahip olan sporları aracılığıyla ürerler. Bu sporlar eşeyli (meyoz/ telemorfik) ve eşeysiz (mitoz/ anamorfik) çoğalma sonucunda meydana gelirler (14,93).

B- Eşeysiz üreme (14,93)

Mitoz bölünme temeline dayanır. Artrokonidya, blastokonidya, klamidokonidya, konidyospor ve sporanjiospor eşeysiz spor çeşitleridir .

Artrokonidya; Dikdörtgen ya da fıçı görünümünde olup, özellikle bölmeli hif yapan mantarlar tarafından sıklıkla hifin parçalanması sonucunda meydana gelir.

Blastokonidya; Ana hücreden bir tomurcuk şeklinde oluşan çıkıntıdır.

Klamidokonidya; Sitoplazmanın yoğunlaşması ile oluşmuş, ısı ve kuruluğa dirençli kalın duvarlı sporlardır.Hiflerin uçlarında yer aldığında "terminal", ortasında bulunduğunda "interkalar", yan kısımlarında bulunduğunda ise "sesil" klamidokonidya olarak isimlendirilirler.

Konidyospor; Hiflerin ucunda bulunan serbest sporlar olup; oluşturuldukları hiflere farklı şekillerde bağlanırlar. Çok hücreli ve büyük ise makrokonidyum; tek hücreli ise mikrokonidyum adını alır, bazen de boncuk görünümünde dizilim gösterir.

Sporanjiospor; Sporanjiyofor olarak tanımlanan bölmesiz hiflerin ucundaki ince duvarlı sporanjium denen keseler içinde yer alan hücrelerdir.

B- Eşeyli Üreme (14,93)

Meyoz bölünme temeline dayanır. Zigospor, askospor, bazidyospor ve oospor eşeyli spor çeşitleridir.

Zigospor; Uygun iki hifin ucundaki özgün hücreler yanyana geldiğinde, aradaki bölmelerin kaybolması ve hücrelerin birleşmesi (füzyon) sonucu oluşmuş kalın çeperli yeni hücrelerdir.

Askospor; Askus içinde yer alan; anteridyum ve askogonyumun birleşip bütünleşmesi sonucunda oluşmuş (2-8 adet) sporlardır.

Bazidyospor; Uygun iki hücrenin birleşmesi sonucunda; hiflerin ucundaki bazidiyum üzerinden çıkan dört sapın her biri üzerine yerleşmiş sporlardır.

Oospor; Anteridyum ve oogonyumun köprüler aracılığı ile birleşerek oluşturdukları kalın duvarlı yeni sporlardır.

Sınıflandırma (14)

Günümüzde tıpsal açıdan önemli mantarlar şöyle sınıflandırılmıştır.

Domain (alan): Eukaryota

Kingdom (alem): Fungi

Division (bölüm): Chytridiomycota

Division (bölüm): Zygomycota

Division (bölüm): Ascomycota

Division (bölüm): Basidiomycota

Anamorfik mantarlar

Chytridiomycota:

İlkel mantarlardır. Bu bölümde yaklaşık 100 cins ve 1000 türü içeren, hiçbiri insanda patojenite göstermeyen mantarlar yer alır. Türlerinin çoğu su ortamında yaşar ve meyoz sonucunda oluşan hareketli sporları zoospor adını alır.

Zygomycota:

Bu bölümde yer alan mantarların miçelyumu bölmesizdir. Yaklaşık 175 cins ve 1000 türü içerirler.

Order (takım): Entomophthorales

Genus (cins): Basidiobolus

Genus (cins): Conidiobolus

Order (takım): Mucorales

Genus (cins): Absidia

Genus (cins): Mucor

Genus (cins): Rhizomucor

Genus (cins): Rhizopus

Genus (cins): Cunninghamella

Genus (cins): Syncephalastrum

Genus (cins): Apophysomyces

Genus (cins): Saksenaea

Genus (cins): Mortierella

Genus (cins): Cokeromyces

Hareketsiz sporanjiosporlar sporanjium içinde yer almıştır. Eşeyli üreme sonucunda kalın duvarlı zigospor oluşarak haploid miçelyum gelişir.

Ascomycota:

Yaklaşık olarak en az 3200 cins ve 32000 türden ibarettir. Eşeysiz üreme sonucunda konidyajenöz hücrelerden konidya; eşeyli üreme sonucunda ise askus içindeki askosporlar oluşur.

Genus (cins): Ajellomyces (dimorfik sistemik özellikli patojen mantarların telemorfu)

(Anamorfik cinsleri: Blastomyces, Emmonsia, Histoplasma)

Genus (cins): Pseudallescheria boydii (telemorfik)

(Anamorfik cins: Scedosporium)

Genus (cins): Ascomycetes mayalar (telemorfik)

(Anamorfik cins: Candida)

Basidiomycota:

Yaklaşık olarak 22.000 türü içerir. Miçelyumu bölmelidir. Eşeysiz üreme sonucunda bazı türlerinin Ascomycota'da olduğu gibi konidya oluşturduğu bilinmektedir. Eşeyli üreme sonrasında bazidiyum üzerinde bazidiyospor oluşumu gözlenir.

Bu bölümde yer alan ve tıbben önemli olan az sayıdaki bazidiyomiçetes mayalar; Cryptococcus, Malassezia ve Trichosporon; filamentöz bazidiyomiçetes ise Schizophyllum'dur.

Anamorfik mantarlar'ın sınıflandırılması (önceki adı: fungi imperfecti, deuteromycota) (14).

Eşeyli (telemorfik) fazı görülmeyen veya tanımlanamayan; çoğunun Ascomycota, bazılarının da Basidiomycota bölümünde bir eşeyli şeklinin olabileceği varsayılan mantarlar bu bölümde yer alırlar.

Class (sınıf): Hyphomycetes

Miçelyum septalıdır. Konidya; ya doğrudan hif üzerinde veya konidyofor ucundadır. Bu sınıfta tıbben önemli olan Aspergillus, Cladophialophora, Fusarium, Microsporum, Phialophora, Scedosporium ve Trichophyton gibi çok sayıda mantar cinsi yer almıştır.

Class (sınıf): Coelomycetes

Miçelyum septalıdır. Konidya; ya uç kısmı açık olan yuvarlak piknidya, ya da düz, yassı görümlü aservuli'de üretilir. Bu sınıfın; Lasiodiplodia ve Pyrenochaeta gibi çok az sayıda birkaç üyesi tıbben önemlidir.

Class (sınıf): Blastomycetes

Genus (cins): Candida

Tallus (mantar vücudu)'un içeriği serbest tomurcuklu hücreler veya yalancı miçelyumdur. Bu sınıfta yer alan mantarların idantifikasyonlarında

morfolojilerinden ziyade fizyolojik özelliklerinden yararlanılır. Siyah mayaların çoğu gerçek miçelyuma sahip olduğu için hyphomycetes sınıfında yer alır.

Mantarların bir kısmı gerçek patojen, diğer bir kısmı ise fırsatçı patojen özellik gösterir. Fırsatçı patojen veya saprofit olarak tanımlanan mantarlar; karsinom, obezite, diabetes mellitus, yaşlılık, kötü ekonomik koşullar, gebelik, kemoterapi, yoğun sitotoksik, steroid ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, radyasyon, hücrel immün yetmezlikler, nötropeni, ciddi yanıklar, narkotik bağımlılığı, tedavi amaçlı kullanılan yeni protezlerin ve parenteral beslenmenin geniş çapta uygulanması, invazif girişimler v.b. vücut direncini azaltan koşullarda hastalıklara neden olurlar. İnsanda hastalık oluşturan mantarlar; doğal ortamları, anatomik lokalizasyonları ve üreme özellikleri esas alınarak incelenirler. Doğal ortamlarına göre; antropofilik (insandan bulaşan), zoofilik (hayvandan bulaşan) ve jeofilik (topraktan bulaşan) türler olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Anatomik lokalizasyonlarına göre ise yüzeysel, sistemik ve deri altı yerleşim gösterirler (30,40,93) (tablo 2.1.).

Tablo 2.1. Mantarların anatomik lokalizasyonlarına (yüzeysel, deri, deri altı ve sistemik) göre yaptıkları hastalıklar(30,93)

Anatomik lokalizasyon	Etken mantar	Mikoz	
Yüzeysel	Malassezia furfur Exophiala werneckii Trichosporon beigellii Piedraia hortae	Pitriyazis versikolor Tinea nigra Ak piedra Kara piedra	
Deri (kutanöz)	Microsporum, Trichophyton türleri, Epidermophyton floccosum, Candida albicans ve diğer Candida türleri	Dermatofitoz Kandidoz	
Deri altı	Sporothrix schenckii Phialophora verrucosum Fonsecaea pedrosoi Pseudallescheria boydii Madurella mycetomatis Alternaria, Scedosporium, Curvularia Lacazia loboi	Sporotrikoz Kromoblastomikoz Kromoblastomikoz Miçetoma Miçetoma Feohifomikoz Lobomikoz	
Sistemik	(Gerçek patojen mantarlar ile)	Coccidioides immitis Histoplasma capsulatum Blastomyces dermatitidis Paracoccidioides dermatitidis	Koksidyoidomikoz Histoplazmoz Blastomikoz Parakoksidyoidomikoz
	(Fırsatçı patojen mantarlar ile)	Candida albicans ve diğer Candida türleri Cryptococcus neoformans Aspergillus fumigatus ve diğer Aspergillus türleri Mucor, Rhizomucor, Rhizopus, Absidia türleri ve diğer Zygomycetes Fusarium Geotrichum Trichosporon Pneumocystis jiroveci	Sistemik kandidoz Kriptokokkoz Aspergilloz Mukormikoz (zigomikoz) Fusaryoz Geotrikoz Trikosporonoz Pnömosistoz

Üreme özellikleri ve morfolojilerine dayanarak mantarlar, maya ve küf olmak üzere iki grupta incelenir. Bazı mantarların ise hem küf hem de maya şekilleri [(difazik, dimorfik):37°C ve %10CO₂ varlığında maya, 25-26°C'de küf] vardır. Küf şeklindeki mantarların esas yapı birimi hif olarak adlandırılan çok hücreli filamentöz kolonilerdir. Hiflerin bir araya gelerek oluşturdukları topluluğa miçel adı verilir. Bazı küflerde hifler enine olarak bölünmüştür. Bu bölmeler septum adını alır. Septumlara sahip olan küfler septumlu (bölmeli), olmayanlar ise septumsuz (bölmesiz) hifli olarak adlandırılır. Bölmesiz hiflerin çapı 10-15 µm olup, 2-5 µm çaplı bölmeli hiflerden daha geniştir. Miçeller; beslenme işlevi gören vejetatif miçelyum ve çoğunlukla üreme elemanlarını (eşeyli spor, eşeysiz konidya) taşıyan havasal (aeryal) ya da üreme (reproduktif) miçelyumu olmak üzere iki çeşittir. Raket, nodüler, taraksı, spiral, favus şamdani ve köksü (rizoid) yapıdaki hifler mantar türlerine göre değişiklik gösterip, mikroskopik incelemede tanıya yardımcı olurlar (38,40,52,69,80,93).

Maya şeklindeki mantarlar tek hücreli olup, yuvarlak veya oval (2-8 X 3-15 µm), bazen de silindirik şekilde olabilir ve Gram pozitif özellik gösterirler. Mayalar basitçe tomurcuklanarak üreyen mikroorganizmalardır. Tomurcuklanma sonucu oluşan yavru hücre (blastokonidya) ana hücre büyüklüğüne eriştiğinde kopar ve ana hücrenin aynısı olan yeni bir hücre meydana gelir. Bazen kopma olayı tam anlamı ile gerçekleşmeyebilir ve oluşan yeni hücreler birbirlerine yapışık kalarak zincir görüntüsü verirler; bu yapı yalancı hif (psödohif) ya da yalancı miçelyum (psödomiçelyum) olarak adlandırılır. Mayalar hücre duvarlarında glikoz, mannoz, az miktarda protein, lipit ve kitin; sitoplazmalarında ise hücre çekirdeğinin yanı sıra yağ, protein, karbonhidrat tanecikleri ve olgunlaşmış hücrelerde vakuol içerirler (38,40,46,52,69,80,93,97).

Fizyoloji

Mantarlar; klorofil içermeyen, absorpsiyonla beslenen ve türlerinin çoğu zorunlu veya fakültatif anaerop olan mikroorganizmalardır. Gelişmeleri için organik azot kaynağına gereksinim duyarlar (kemoheterotrof). Absorpsiyon ile beslendiklerinden (nişasta ve keratini hücre duvarından dışarı çıkan enzimleri ile sindirir) içinde buldukları ortamda suyun olması gerekir. Çoğu mantarlar %95-100 nemli ortamda daha iyi ürerler. Besiyerindeki nemliliğin azalması

mantar sporlarının gelişimine yol açar. Patojen mantarların sporları kuruluğa çok dirençli olup, yıllarca bu şekilde yaşamsal işlevlerini sürdürebilirler. Bu özelliklerin sürdürülmesini sağlayan diğer önemli bir faktör ısıdır. Mantarların çoğu mezofilik özellikli olup 22-37°C'de iyi üreyebilmekle birlikte geniş bir ısı yelpazesinde çoğalabilme yeteneğine ve psikrofil, azidofil ve halofilik özelliklere sahiptir. Mantarların çoğu düşük ısılara dirençlidir ve fizyolojik fonksiyonlarının devamı için minimum ısının 0°C olması gerektiği bildirilmiştir. Solunumları sırasında yüksek bitkiler ve hayvanlar gibi aerop solunum yaparlar. Çoğu, basit besiyerlerinde ve ölü organik maddeler üzerinde bile kolaylıkla üreyebilir. Geç ve güç üreyen mantarların kültürden izolasyonları için esansiyel tuzlar, basit şekerler, proteinler, vitaminler ve kanın da eklendiği zengin besiyerleri gerekebilir. Asit pH'ı yağlar, optimal pH 6-6.5 arasındadır (38,40,52,69,80, 86,93).

Virülans Faktörleri

Dimorfik mantarlar ve dermatofitler sağlıklı bireylerde hastalık oluştururken; *Candida*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium* v.b fırsatçı mantar cinsleri, aslında avirulan olmakla birlikte derin dokulara da yayılıp ölümcül olabileme özelliğine sahiptir. Mantarların patogenezinde çeşitli virülans faktörleri rol oynar ve bu faktörler sayesinde konak hücre membranlarının bütünlüğü, dolayısı ile işlevleri bozularak hücre ölümü ve invazyon gerçekleşir. Mantarların tek bir virülans faktörü ile patojenite kazanmadığı ve patogenezinde çeşitli özelliklerin rol oynadığı bildirilmektedir. *Candida*'ların aderansını sağlayan yüzey karbonhidrat yapıları; mannan, β -glukan ve kitin olup, mannannın antijenik özelliğinden serolojik testlerde yararlanır. Mantarlar, adezin kodlayan genlerin yardımıyla makrofaja bağlanıp infeksiyon sürecini başlatırlar. ALS, INT1, HWP1 genleri *C.albicans*'ta adezyon moleküllerini kodlar. Besiyerindeki şeker konsantrasyonuna göre yüzeyel kompozisyonlarının değişmesi mantarların adezyon ve virülanslarının da artmasına neden olur. Germ tüp (hif) oluşturduklarında, mukoza membranının geçirgenliği değişir. *C. albicans*'ın patojen morfoloji hif şeklinde olup, mukokutanöz ve disemine kandidozdan sorumludur. Tomurcuklu hücrelerden, germ tüpe geçiş sırasında yüzey bileşenlerinde meydana gelen değişiklikler, çeşitli adezinlerin oluşmasını ve hücre yüzey hidrofobitesinin etkilenmesini sağlar. Hidrofobite, *C.albicans*'ın

plastik yüzeyler ve insan epitel hücrelerine bağlanması ile uyumludur (50,67,82,86).

Candida'ların da içinde yer aldığı çeşitli mantarlar, infeksiyon sırasında hücre ve dokularda harabiyet oluşturan, genelde enzim yapısında olan maddeler oluştururlar. Salgisal aspartik proteinaz (SAP) ve fosfolipaz Candida patogeneğinde en önemli olan enzimler arasında yer alırlar. Aspartik proteinaz ailesini kodlayan birçok gen bildirilmiştir. SAP gen ekspresyonu mikroorganizmanın mayadan hife geçişi ve fenotipik değişim ile ilgilidir. SAP1, SAP2, SAP3 ve apra genleri proteinaz salınımını kontrol eder. Apra; diğer enzimlerin proteolitik aktivitelerini düzenlerken; SAP2 ve SAP3 virülansı artırmada önemli olan özgül proteinaz enzim yapımını sağlar. Örneğin C.albicans'ın WO-1 kökeni opak hücrelerde SAP1 ve SAP3 enzim aktivitesi gösterirken, aynı kökendeki beyaz hücreler SAP2 enzim aktivitesi ile ilgilidir. SAP4, SAP5, SAP6'nın nötral pH'da aktive olduğu, bu nedenle de bu genlerce kodlanan proteinazların, tükrük pH'sının nötral olmasından dolayı, oral kandidoz patogeneğinde önemli rol oynadıkları bildirilmiştir. Membran lipitlerinden fosfoliseritleri hidrolize eden enzimler fosfolipazlar'dır. Bu enzimlerin aktivasyonu ile fosfolipidlerden lizofosfolipidler meydana gelir ve biyolojik membran bütünlüğünü bozarlar. A,B,C,D ve lizofosfolipaz olmak üzere beş türü bilinmektedir. Bazı mantarlar, plastik yüzeylere yapışmalarına ve kolonizasyona neden olan slime faktörünü oluştururlar. Yukarıda sayılan major virülans faktörlerinin yanı sıra hemolizin, siderofor ve esteraz yapımının da infeksiyon gelişimindeki etkisi bildirilmiştir. C.albicans'ın maya fazında endotoksin benzeri (glikoprotein ve kandidotoksin) olan yüksek ve şok oluşturan veya öldürücü aktivite gösteren düşük molekül ağırlıklı maddeler bulunur (50,86) .

C.neoformans'ın CAP10 ve CAP64 genleri kapsül sentezinde rol oynar ve sadece fagositozdan korunmayı değil, hücrel ve hümorale immün yanıt süpresyonunu da sağlarlar; diğer bir virülans faktörünün ise melanin olduğu bilinmektedir (66).

Dermatofitler; alkale fosfataz, esteraz, lipaz, arilamidaz, tripsin, alfagalaktosidaz, glukosidaz, proteaz, elastaz, keratinaz ve fosfolipaz gibi enzimleri, DNAaz aktiviteleri, penetrasyon, adezyon yetenekleri ile invazyona

neden olurlar; hücre duvarlarında yer alan mannanın immunsüpresyondan sorumlu olduğu bildirilmektedir (51).

H.capsulatum'un maya şekli, 7.8 kDa ağırlığındaki kalsiyum bağlayan protein (CBPI) sayesinde makrofajlarda canlı kalır (66).

Patojenik olabilen Aspergillus trüplerinden virülansı sağlayan elastaz ve kollagenaz gibi ekstrasellüler proteinazlar elde edilmiştir (52). A.fumigatus'un konidyasındaki mavi-yeşil pigmentin ve serin proteinaz enziminin virülansa yol açtığı ve gliotoksinin konakta immunsupresyona neden olduğu saptanmıştır (41,52,68).

Bazı filamentöz mantarlar, besinler üzerinde üreyerek mikotoksin adı verilen sekonder toksik metabolitler (aflatoksin, okratoksin A, patulin,sitrinin v.b.) üretir ve mikotoksikoza neden olurlar (4).

Candida cinsi:

Candida cinsinden mantarlar insan deri ve mukozasının yanısıra gastrointestinal sisteminde normal florasında yer alırlar. Sağlıklı bireylerin %30-50'sinin ağız ve gastrointestinal sistemin de bulunurlar (92). Candida infeksiyonları genelde endojen kaynaklıdır. Florada bulunan mikroorganizmaların kolonizasyonunu takiben infeksiyon başlar. Candida türlerinin oluşturduğu infeksiyona kandidoz veya kandidiyaz adı verilir. Kandidozlar; deri ve mukozaları tutan yüzeysel kandidoz, iç organlar ve sistemlerin infeksiyonu sonucu oluşan derin veya sistemik kandidoz olmak üzere iki çeşittir. Candida türleri, kan infeksiyonlarından dördüncü sırada yer alan patojen mikroorganizma olarak soyutlanır ve tüm hastane kan infeksiyonlarının %8-10'unu oluşturur; kandidemiden dolayı mortalitenin %38-75 civarında olduğu belirlenmiştir (30,38,40,52,69,80,93).

Galen ve Pepy 1665 yılında küçük çocuklarda pamukçuğu tanımlamış, Rosen von Rosenstein, 1771 yılında pamukçuğun yeni doğanların bir hastalığı olduğunu bildirmiştir. Veron, 1835 yılında özofegal kandidozu ve hastalığın doğum nedeniyle vajinadan bulaştığını, Langenbeck 1839'da tifüslü bir hastanın pamukçuk lezyonlarından etken olan mantarı göstermiştir. Wilkinson, 1849'de vajinal kandidozu tanımlamış, Haussemann ise 1875 yılında vajinal kandidoz ile

pamukçuk arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. 1853 yılında Robin, bu maya mantarını *Oidium albicans* olarak adlandırmış ve özellikle terminal dönemdeki hastalarda sistemik enfeksiyona neden olduğunu vurgulamıştır. 1890 yılında Schmorl dissemine kandidozu, 1904 yılında Dubendorfer *Candida*'ların etken olduğu tırnak enfeksiyonlarını (onikomikoz), Castellani 1910 yılında *Candida tropicalis* ve *Candida krusei*'yi, 1911'de *Candida pseudotropicalis*'i, 1912'de *Candida guilliermondii*'yi ve bronkopulmoner kandidozu bildirmiş, 1928 yılında Conner, *Candida*'lardan kaynaklanan osteomyelit olgularına değinmiştir. Langeron ve Talice 1932'de *Candida parapsilosis*'i, Komagata ve Nakase 1965 yılında *Candida glabrata*'yı tanımlamışlardır. Berkhout'un 1923 yılında *Monilia* yerine kullandığı *Candida* kelimesi 1954'de 8. Botanik Kongresi-Paris'de *Candida albicans* olarak kabul edilmiştir (2,10,28,52,69,95,96).

1961 yılında Hasenclever ve Mitchel hücre duvarındaki mannan bileşiklerine göre *C.albicans*'ı A ve B serotiplerine ayırmışlardır. Buna göre serotip A antijeninin *C.tropicalis*, B'nin ise *C.stellatoidea* ile ilişkili olduğu, A ve B serotiplerinin immun sistemi yeterli kişilerde eşit, B serotipinin ise immun sistem yetmezliği olan kişilerde daha prevalan olduğu belirlenmiştir. Serotip A'nın 5-florositozine duyarlı, serotip B'nin ise dirençli olduğu bildirilmiştir. 1969 yılında üçüncü ve minör bir grup olarak serotip C saptanmıştır (45,96).

Candida türleri, 4-6µm büyüklüğünde olup oval veya yuvarlak görünüme sahiptir; besiyerlerinde oda ısısında veya 37°C'de genellikle 24 saatte üreyerek S tipi koloni yapısında beyaz veya krem renge mayamsı kokulu koloniler oluştururlar. 200'den fazla türü olan *Candida*'ların yalnızca birkaç türü insanlarda hastalık yapmaktadır. Tıbbi açıdan önemi olan *Candida* türlerinden başlıcaları; *Candida albicans*, *Candida (Torulopsis) glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefir*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida stellatoidea* ve *Candida dubliniensis*'tir. *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Pichia* ve *Yarrowia* eşeyli (telemorfik) özellikli bazı *Candida* cinsleridir.*Candida* cinsinden mantarların hücre duvarında yaklaşık olarak %31-51 mannoprotein, %29-50 glukan, %7-13 protein,%1-13 lipid, %1-5 kitin,%0.3-0.5 fosfor; sitoplazmalarında %50 oranında protein, %45 lipid, %9 karbonhidrat, %2 nükleik asit bulunur, ancak bu içerik oranları, kültür şartları ve morfolojilerine göre farklılık gösterebilir. Şema.2.1'de *Candida*'ları diğer maya ve maya benzeri

mantarlardan ayıran özellikler belirtilmiştir. Tablo-2.2.'de klinik örneklerden izole edilen mayaların kültür ve biyokimyasal özellikleri gösterilmiştir (46,52,69,80, 86,93,97).

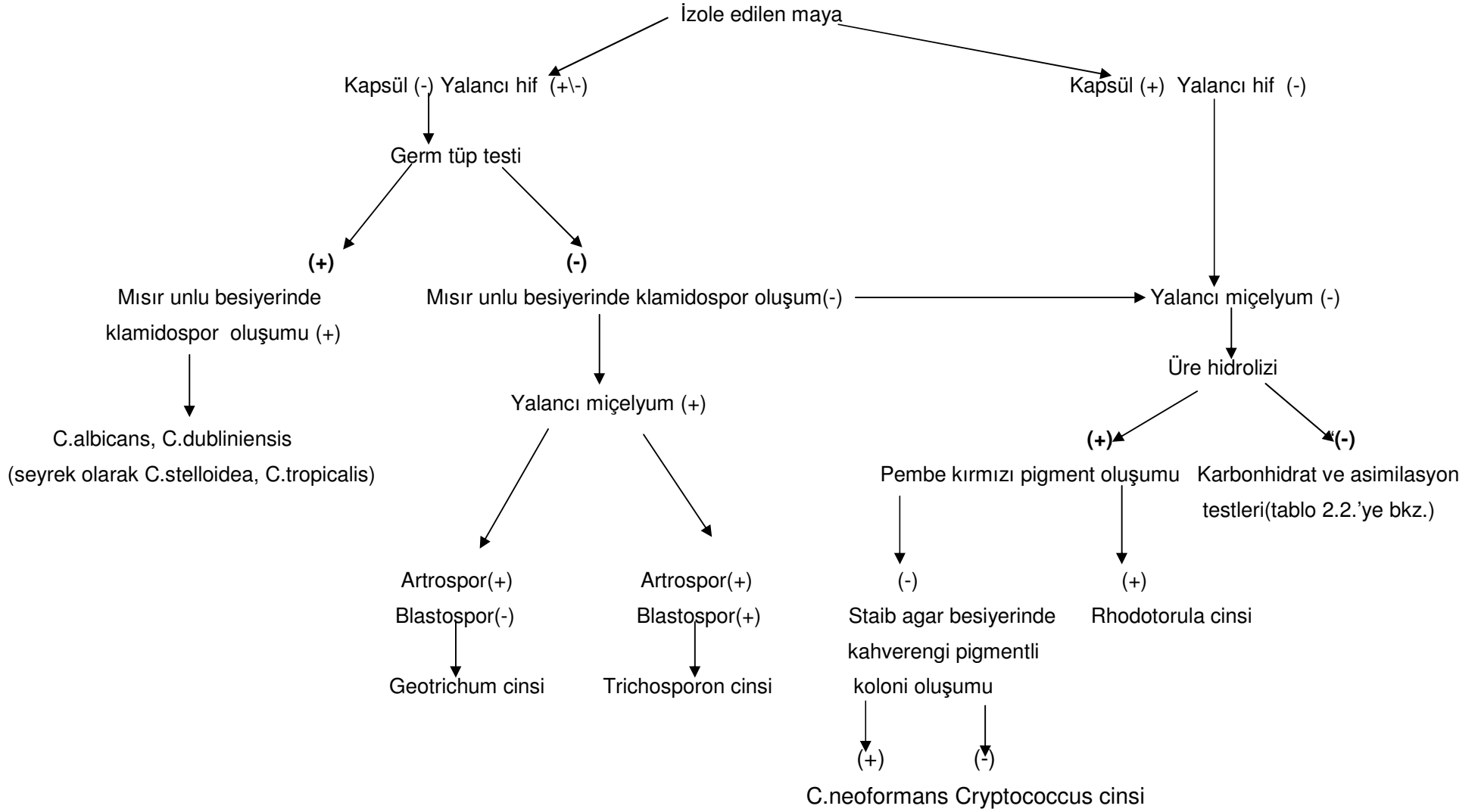
Tez içeriğinde deneysel olarak çalışılan *Candida*'lar; *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis* olduğu için, sadece bu türlere ait belli başlı özellikler belirtilmiştir.

Tablo 2.2. Klinik örneklerden izole edilen mayaların kültür ve biyokimyasal özellikleri (38).

Türler	Asimilasyon														Fermentasyon													
	37C' de üreme	Buyyonda zar oluşumu	Yalancı ya da gerçek hif	Klamidospor	Germ tüp oluşumu	Kapsül, çini mürekkebi	Glikoz	Maltoz	Sukroz	Laktöz	Galaktöz	Melibioz	Sellobioz	İnozitol	Ksiloz	Rafinoz	Trehaloz	Dulcitol	Glu ko z	Maltoz	Sukroz	Laktöz	Galaktöz	Trehaloz	Ure hidrolizi	KNO ₃ kullanımı	Fenol oksidaz	Askospor
C.albicans	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	F	F	-	-	F	F	-	-	-	-
C.catenulata	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.dublinsiensis	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	F	F	-	-	F	F	-	-	-	-
C.famata	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	H	-	H	-	-	H	-	-	-	-
C.glabrata	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	F	-	-	-	-	F	-	-	-	-
C.guilliermondii	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	F	-	F	-	F	F	-	-	-	-
C.kefyr	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	F	-	F	F	F	-	-	-	-	-
C.krusei	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	+	-	-	-
C.lambica	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.lipolytica	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
C.lusitaniae	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	F	-	F	-	F	F	-	-	-	-
C.parapsilosis	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.pintolopesii	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-
C.rugosa	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.tropicalis	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	F	F	F	-	F	F	-	-	-	-
C.neoformans	+	-	S	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
C.albidus	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
C.laurentii	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
C.luteolus	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
C.terreus	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
C.uniguttulatus	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
R.glutinus	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
R.rubra	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
S.cerevisiae	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	F	F	F	-	F	F	-	-	-	+
H.anomala	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	F	F	F	-	F	-	-	+	-	+
G.candidum	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B.capitatus	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P.wickerhamii	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

S:Seyrek, F:Fermentasyon olumlu, H:Hafif olumlu fermentasyon

Şema 2.1. Klinik örneklerden izole edilen mayaların tanımlanması (53).



Candida albicans

(Oidium albicans, Robin,1853;Monilia albicans, Zopf,1890; Endomyces albicans, Vuillemin, 1898; Monilia pinoyi, Castellani ve Chalmers, 1913; Monilia psilosis, Ashford, 1917; Candida cinsi, Berkhout, 1923; Mycotoruloides triadis, Langeron ve Talice, 1932; Candida stellatoidea, Jones ve Martin, 1938; Candida claussenii, Lodder ve Kreger-van Rij, 1952; Candida albicans,1954 8.Botanik Kongresi.) (52).

En sık soyutlanan kandidemi etkeni olup, sıklıkla mukozal ve sistemik mantar infeksiyonlarından soyutlanır. Glikozlu Sabouraud besiyerinde (SDA) 37°C'de ve 24 saatte krem renginde; genelde S, bazen de R şeklinde koloniler oluşturur. Serum içerisinde 37°C'de iki saat inkübe edildiklerinde oluşturduğu germ tüpü ve mısır unlu tween 80 agar'da yaptığı klamidospore nedeni ile diğer Candida'lardan ayırım gösterir. Candida dubliniensis'in de klamidospore oluşturması nedeni ile bu iki türün ayırımı için çeşitli testlere başvurulur (tablo1). C. albicans'ın hücre duvarındaki mannan antijenik özelliğe sahip olup, suşların serotiplerinin belirlenmesinde yararlıdır. A,B,C, B+C ve A+B+C serotipleri bulunan C.albicans'ın; salgısal proteinaz, lipaz, elastaz, enolaz ve ısı şok proteinleri gibi antijenleri de saptanmıştır (38,46,52,61,69,80,86,93,97).

Candida glabrata

(Cryptococcus glabratus, Anderson, 1917; Torulopsis glabrata, Lodder ve de Vries, 1938; Komagata ve Nakase,1965, Meyer ve Yarrow, 1978.) (52).

C.glabrata, kandidemi olgularında C.albicans'ın ardından ikinci sıklıkta izole edilir.Antifungallere duyarlılığın azalmış olması tedavide önemli bir sorun oluşturur.İdrar yolu infeksiyonlarının ve yenidoğan fungemilerinin önemli etkenlerinden biridir. İmmunsupressif hasta popülasyonunun çokluğu ve antifungallerin gelişigüzel kullanılması tüm dünyada insidensinin giderek artmasına neden olmuştur.Glikozlu Sabouraud dekstroza agar besiyerinde, 37°C'de 24 saatte krem şeklinde parlak S şeklinde koloniler oluşturur. İncelenen

preparasyonlarında yalancı miçelyum oluşturmadığı görülür (38,46,52,61,69, 80, 86,97).

Candida parapsilosis

(*Monilia onychophila*, Poll ve Nann, 1926; *Monilia parapsilosis*, Ashford, 1928; *Candida parapsilosis*, Langeron ve Talice, 1932.) (52).

Kandidemi etkenleri arasında üçüncü sıklıkta izole edilen türdür. Özellikle endokardit olgularından, intravenöz (i.v.) kateterli, protez cihaz ve i.v. ilaç kullanan hastalardan saptanır. Yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde kandideminin en sık nedenidir. Glikozlu Sabouraud dekstroza agar besiyerinde 37°C'de 24 saatte beyaz renkli, S şeklinde koloniler oluşturur. Mikroskopik morfolojisinde yalancı hifin etrafında tek tek, ya da kümeler yapan blastokonidyumların görünümü tipiktir. En önemli özelliği ise bu elemanların arasında iri hiflerin (dev hücrelerin) bulunmasıdır. Oluşturduğu slime faktörü sayesinde canlı ve cansız yüzeylere tutunabilme özelliğine sahiptir (38,46,52, 61,69,80,86,97).

Candida tropicalis

(*Oidium tropicale*, Castellani, 1910; *Monilia tropicalis*, Castellani ve Chalmers, 1913; *Candida tropicalis*, Berkhout, 1923.) (52).

Özellikle, lösemili, nötropenik ve yoğun bakım ünitelerinde uzun süredir yatmakta olan hastalarda üçüncü ya da dördüncü sıklıkta kandidemi etkeni olarak saptanır. Glikozlu Sabouraud dekstroza agar besiyerinde 37°C'de 24 saatte beyaz, S şeklinde koloniler yapar. Mikroskopik yapısı incelendiğinde, yalancı hifin etrafında tek tek ya da kümeler halinde bulunan çiçek şeklinde blastokonidyumlar görülür. Dissemine kandidoz olgularında sukroz olumsuz varyantları giderek artan sıklıkta saptanmaktadır (38,46,52,69,80,86,97).

Cryptococcus cinsi

Kapsüllü basidiomycetous bir mayadır. Hayvanların nazal kavitelerinde (özellikle koalalar) asemptomatik olarak bulunur. Bu cinsin türleri hücre duvarında ksiloz içerir, şekerleri fermente etmez; inozitolu asimile eder, üreaz oluşturur ve %0.1 siklohekzimide dirençlidir (7,52).

Cryptococcus cinsi yaklaşık olarak 37 tür içerir. C.neoformans, C.albidus, C.laurentii, C.terreus, C.uniguttulatus, C.ater, C.gastricus, C.curvatus bunlardan bazıları olup; en önemli ve insana patojen olan tek türün C.neoformans olduğu bildirilmiştir (52).

Cryptococcus neoformans

C.neoformans; kriptokokkozun tek etkeni olup, mukopolisakkarit yapıda kapsüle sahip fırsatçı bir mayadır (81,52).

1884 yılında Buscke ve Busse 31 yaşındaki kadın hastanın tibia örneğini pirinç besiyerine ekerek Saccharomyces hominis olarak adlandırdıkları suşu izole etmişlerdir. Sanfelice 1895 yılında şeftali suyunda görüp deney hayvanlarına şırınga ettiğinde granülomatöz lezyonlar oluşturan kapsüllü maya hücrelerine, Saccharomyces neoformans adını vermiştir. 1896 yılında Curtis bir hastanın kalçasına ait doku örneğinde gördüğü hücreleri Buscke ve Busse'nin bildirdiği olguya benzetmiş ve Saccharomyces subcutaneus tumefaciens olarak adlandırmıştır. P.Vuille 1901 yılında Busse ve Curtis'e ait suşu Saccharomyces cinsine özgü olan askospor içermemesi nedeni ile Cryptococcus hominis olarak adlandırmış; Sanfelice'nin izole ettiği suş için de C.neoformans adını kullanmıştır. 1951 yılında Emmons, Amerika Birleşik Devletleri'nde ilk kez bu fırsatçı mantarı topraktan izole etmiştir. 1978 yılında Beyt ve Waltman kriptokokkal endofthalmiti bildirmişlerdir (7,38,43,52,81) .

Ülkemizde 1955 yılında Soysal, Unat ve Tahsinoğlu tarafından ilk kriptokokkoz olgusu bildirilmiştir. 1973 yılında Anđ ve arkadaşları ilk kez kanserli bir hastanın balgamından C.neoformans'ı izole etmişlerdir. 1980 yılında Meco

ve arkadaşları, 1985 yılında da Baykal ve arkadaşları beyin omurilik sıvısı (BOS)'ndan yaptıkları kültürde *C.neoformans* ürettiklerini bildirmişlerdir (43).

Mukopolisakkarit yapıdaki kapsül antijenine göre *C.neoformans*'ın; *C.neoformans*.var. *neoformans* ve *C.neoformans*. var. *gattii* olmak üzere iki varyasyona sahip olduğu; *C.neoformans*.var.*neoformans*'ın A, D, AD; *C.neoformans*.var *gattii*'nin B, C serotiplerini içerdiği belirlenmiştir. Her iki varyasyon morfolojik olarak benzerlik gösterir (7,94).

C.neoformans. var. *neoformans* tüm dünyada yaygın olup, özellikle kurumuş güvercin dışkısı ile kontamine nitrojenli toprakta bolca bulunur. Ayrıca seyrek olarak diğer kuş dışkıları, sebze, meyve ve süt ürünlerinden izole edildiği bildirilmiştir. *C.neoformans*. var. *gattii* ise Avustralya, Orta Afrika, subtropik Amerika ve Güney Avrupa'da endemiktir ve doğal ortamı okalptus ağaçları (*Eucalyptus camaldulensis*: Kırmızı sakız ağacı)'dır. Çok nadiren badem gibi diğer ağaçlardan ve ağaç kovuklarından izole edilmiştir, koalalar (özellikle) ve yarasaların asemptomatik taşıyıcı olduğu gösterilmiş, ayrıca keçilerin akciğer infeksiyonlarından etken olarak soyutlanabildiği belirtilmiştir (66).

Cryptococcus serotipleri tüm dünyada düzensiz dağılım gösterir. Serotip A'nın Kuzey Amerika'da çok nadiren görüldüğü, buna karşın Japonya, Brezilya, Güneydoğu Asya ülkeleri ve Avrupa'da sıklıkla saptandığı, B ve C serotiplerine ise tropik ve subtropik iklim bölgelerinde rastlandığı, serotip B'nin, C'den daha çok görüldüğü bildirilmiştir (66).

Moleküler çalışmalar sonucunda yeni bir varyasyon olarak *C.neoformans*.var.*grubii* (serotip A) tanımlanmıştır (66).

C.neoformans. var. *neoformans*'ın eşeyli şekli *Filobasidiella neoformans*; *C.neoformans*.var.*gattii*'nin eşeyli şekli ise *Filobasidiella bacillispora* adını almaktadır (66).

C.neoformans.var.*neoformans*'ın mukopolisakkarit yapıdaki kapsülü, fenol oksidaz enzimi ve 37°C'de üreyebilme özelliği majör virulans faktörlerini oluşturur (66).

C.neoformans. var. neoformans ve C.neoformans. var. grubii'nin inhalasyonla alımı sonucunda infeksiyon süreci başlar. C.neoformans. var.neoformans nörotropik özellikli olduğu için en sık gözlemlenen klinik şekil meningoensefalitdir; bunun yanısıra deri, akciğer, prostat, üriner sistem, göz, miyokard, kemik ve eklemler de tutulabilir. Primer kutanöz infeksiyonda sıklıkla D serotipi etken olarak belirlenmiştir (66).

Özellikle hücresel bağışıklık yetmezliği hastalık oluşumunda esastır. AIDS'li kişilerde yaşamı tehdit eden çok önemli bir infeksiyon (%10-45) olup, organ transplantlılar, uzun süreli kemoterapi ve steroid tedavisi gören kanserli hastalar riskli grupta bulunurlar. İnfeksiyon tedavi edilmediğinde genellikle ölümlerle sonlanır.C.neoformans.var.gattii infeksiyonları AIDS'li olmayan, immünsup- resyonu bulunmayan sağlıklı kişilerde görülür; sistemik vakalar çok nadirdir (66).Laboratuvar tanısında kullanılan, BOS (Frank ve ark. 1993) ve serumda (Hamilton ve Goodley, 1993) antijen saptayıcı lateks aglütinasyon; altın standart değerinde mikoserolojik bir testtir (66).

C.neoformans; 48-72 saatte 25-37°C'de yumuşak kıvamlı, parlak, mat, S şeklinde, çoğunlukla mukoid, Sabouraud besiyerinde krem, sarımsı, pembe renkli koloniler oluşturur. Spesifik besiyeri olan Staib (kafeik asit, kuş tohumu) agar besiyerinde kahverengi, siyah koloniler yapar. 37°C'de üreyebilmesi ve Staib agar besiyerinde fenol oksidaz enzimi nedeni ile melanin oluşturarak kahverengi siyah koloniler meydana getirmesi, C.neoformans'ı diğer türlerden ayıran özelliğidir. Gerçek hif yoktur, yalancı hif genelde bulunmaz. Sert hücre duvarına sahip olup, tek veya çoklu tomurcuklu hücreler görünümündedir. Kapsül kalınlığı (3.5-7.5 µm) suşa özgü olmakla birlikte çevre koşulları ile de yakından ilişkilidir. %1 pepton ilavesi kapsül oluşumunu hızlandırır. Kapsül varlığı en iyi olarak çini mürekkebi ile boyalı preparasyonda saptanır. Rhodotorula cinsinden, inozitolü asimile etmesi; C.glabrata'dan, inozitolü asimile etmesi ve üreaz oluşturması ile farklanır (7,38,52,81,94).

Aspergillus cinsi

Aspergillus cinsinden fırsatçı patojen mantarlar; nötrofenisi olan, akut lökozlu, immünsüpressif, organ transplantı yapılan hastalarda, alkol bağımlılarında ve karaciğer işlev bozukluğu olan bireylerde infeksiyon etkeni olarak saptanabilir. Aspergillus türlerinin alerjik; paranazal sinüs, akciğer ve vücudun diğer bölgelerine invazyon sonucu oluşturdukları hastalıklarının genel adına aspergilloz adı verilir. 1729 yılında Micheli ilk olarak Aspergillus'u tanımlamış, 1842'de Rayer ve Montagne Aspergillus candidum suşunu bir kuş cinsinin hava kesesinden izole etmişlerdir. 1856'de Virchow, ayrıntılı mikroskopik gözlemleri ile Aspergillus'un insanlar için patojen olabildiğini bildirmiş, Cramer, 1859'da bir kulak infeksiyonundan A.niger'i, Fresenius, 1863'de A.fumigatus'u tanımlamıştır. 1889'da Siebenmann A.nidulans ve A.flavus'u kulak salgısı örneklerinden izole etmişlerdir. Deve, 1938'de mantar topunu (pulmoner aspergilloma) tarif etmiş, Hinson ve arkadaşları 1952'de alerjik bronkopulmoner aspergillozu, Rankin 1953'te immün sistemi baskılanmış hastalarda invazif aspergillozu bildirmişlerdir. Thom ve Church 1926 yılında 69 Aspergillus türünü 11 grupta toplamışlardır. Günümüzde 18 grup ve 200'ün üstünde tür bildirilmektedir (Raper ve Fennel 1965, Pitt 1994 ve Denning 2000). Aspergillus türleri çoğunlukla anamorfik (eşeysiz) olarak ürerler. A.nidulans, A.amstelodami gibi bazı türleri telemorfik (eşeyli) çoğalma özelliğine sahiptir. Telemorfik olarak üreyen A.nidulans, Emericella nidulans; A.amstelodami ise Eurotium amstelodami olarak adlandırılır. A.fumigatus ve A.flavus sırası ile Aspergillus türleri içinde öncelikli etken olarak saptanan türlerdir. Diğer türlerinden bazıları A.niger, A.terreus, A.versicolor, A.nidulans, A.candidus, A.clavatus, A.amstelodami, A.versicolor, A.oryzae, A.glaucus'tur. Aspergillus cinsinden mantarlar çeşitli besiyerlerinde geniş bir ısı yelpazesinde kolayca ve bir kaç gün içinde ürerler (hematojen yaygın aspergilloz etkenleri dışındakiler). Patojen olabilen türler 37°C'de üreyebilme özellikleri ile patojen olmayan türlerden ayrılır. Üreyen kolonilerin makroskopik ve tipik mikroskopik görünümüne (konidyofor uzunluğu, vezikül biçimi, tek veya çift sıralı fialid (sterigma) oluşumu, fialidlerin vezikülde kapladığı alan v.b) göre tür ayrımı yapılır (2,41,52,68).

Aspergillus cinsinden mantarların, Y şeklinde dallanmalar gösteren, 3-4µm enindeki bölmeli hifleri tipiktir. Dik ve bölmeli konidyoforların son kısmının yuvarlaklaşması sonucunda oluşan 10-30µm çapındaki vezikül; tamamen veya kısmen 4-6µm çapında fialidler ile kaplanmıştır. Tek veya çift sıralı fialidler üzerinde yuvarlak, nadiren oval 2.5-3µm çapındaki konidyum zincirleri bulunur. Aspergillus'ların hücre duvarının kimyasal bileşimi . %40-60 glukan, %10-20 oranında kitin içerir ve diğer filamentöz küfler ile benzerlik gösterir. Aspergillus türleri; solunum yolu ile alınan sporlarının antijenik uyarımı sonucunda oluşan alerjik yanıtı, önceden var olan kavimleri miçellerinin doldurması ile mantar topuna ve dokulara yayılarak invazif mikoza neden olabilirler. Son yıllarda yapılan çalışmalarda A.flavus'un oluşturduğu aflotoksin B1'in karaciğer karsinomuna yol açtığı bildirilmiştir (41,52,68).

Tez kapsamında deneysel olarak A.fumigatus ile çalışıldığından sadece bu türe özgü belli başlı özellikler bildirilmiştir.

Aspergillus fumigatus

(Aspergillus glaucoides, Spring, 1852; Aspergillus nigrescens, Robin, 1853; Aspergillus pulmonum-hominis, Welcker, 1855; Aspergillus fumigatus, Fresenius, 1863.) (52).

Aspergillus cinsinden fırsatçı patojen mantarların oluşturdukları infeksiyonların büyük bir kısmından sorumludurlar. İnvazif aspergillozun yaklaşık olarak %90'ından etken olarak saptandığı bildirilmiştir. 50°C'nin üzerinde üreyebilme yeteneği bu mantarı diğer türlerden ayıran en önemli özelliktir. A.fumigatus kolonileri; kadifemsi, pudramsı yapıda olup, ilk ürediğinde beyaz renkli olan koloniler, eskidikçe koyu gri, yeşilimsi renge döner. Kolonilerden hazırlanan preparasyonda, bölmeli hifler, düzgün yüzeyli, renksiz, kısa konidyoforlar görülür. Fialidler tek sıralı olup, vezikülün 2/3 üst yarısından başlamıştır ve konidyoforun eksenine paralel dizilim gösterirler.Konidyumlar 2-3,5µm çapında ve genelde düzgündür. A.fumigatus'un hücre duvarı, esas zincirde α-1,2; yan zincirde ise α-1,6 bağları ile ilgisi olan galaktomannanları içerir. Galaktomannanlar, hücre duvarı kuru ağırlığının %0.5'ini oluşturur ve

hücrenin antijenik özelliğini belirler. *A.fumigatus*'a özgü enzimler; oksidoredüktazlardan; laktat, malat, alanin, glukoz 6 fosfat dehidrogenaz ve katalaz-hidrolaz, karboesterazlardan; alkalin fosfataz, proteinaz, amilaz, glukuronidaz ve kemotripsindir (41,52,68).

Mantarların Moleküler Yöntemler ile Tanımlanmaları

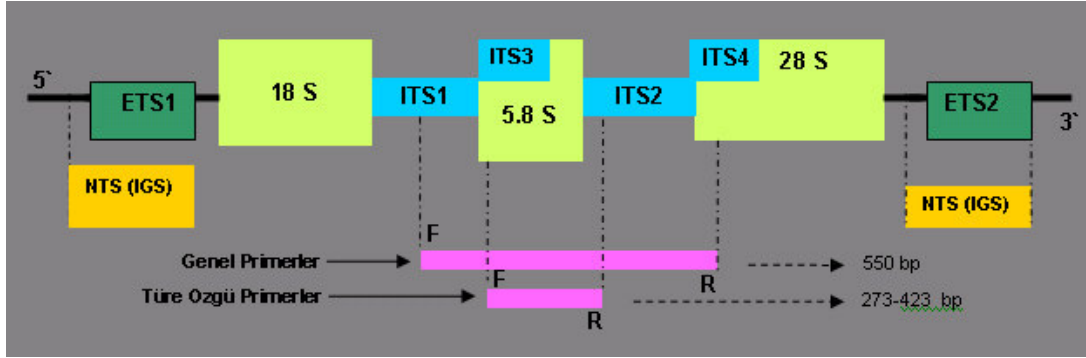
Organizmaların moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanması, aynı cinse ait türlerin, aralarında daha uzak ilişki olan organizmalara kıyasla daha az genetik farklılıklar göstereceği varsayımına dayanmaktadır. Bilinmeyen mantar türlerinin tanımlanması, organizmanın tam ya da kısmi DNA zincirinin, birbirleri ile bağlantılı uluslararası gen bankalarından;[DNA Data Bank of Japan-DDBJ(Japon veri bankası), European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Database-EMBL(Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı nükleotid dizilim verileri),USA National Center for Biotechnology-GenBank (Amerika ulusal biyoteknoloji bilgi merkezi)] sağlanan referans mantar DNA zincirleri ile karşılaştırılarak yapılabilir. Ticari kitlerin kullanıma sunulması ve polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) uygulanmaya başlanması sonucunda, yüksek molekül ağırlığına sahip DNA zincirlerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır (14).

Sporlanamayan veya geleneksel tanımlama yöntemleri ile izole edilemeyen mikroorganizmaların saptanmasında yeni moleküler yöntemlerin kullanılması yarar sağlamıştır. Moleküler tanımlamanın güvenilirliği doğal olarak; kıyaslanan veri tabanının güvenilirliğine bağlıdır (29,49). ITS zinciri üzerinde yapılan çalışmalar, gen bankalarındaki veri tabanının gelişmesine katkıda bulunmuştur (19,20).

Mantar tanımlanmasında en yaygın olarak kullanılan iki DNA bölgesi, küçük ve büyük ribozomal alt-üniteleri arasında yer alan Internal transcribed spacers (ITS) ve büyük ribozomal alt-ünitesinin (26S) D1/D2 bölgeleridir. Ribozomal DNA, bazı bölgelerinin korunmuş, bazı bölgelerinin aşırı değişken olmasından dolayı moleküler çalışmalar açısından tercih edilmektedir. Bu bölgeler tür düzeyinde farklılıklar gösteren yeterli zincir heterojenliği içermektedir. Genel olarak, nükleotid değişkenliği aynı cinslere ait türler arasında %1'den daha az iken farklı cinslere ait türler arasında bu oran daha fazladır (48,84). rDNA gen kompleksinde dört adet 'transcribed spacer' bölgesi bulunmaktadır. İki 5.8S rDNA'nın iki yanında ve 18S, 28S rDNA gen

bölgelerinin arasındadır. Bu bölgeler 'internal transcribed spacer' olarak tanımlanır. Diğer iki bölge ise 18S ve 28S rDNA bölgelerinin dışında kalan 'intergenic spacer' bölgesinde bulunur ve 'external transcribed spacer' bölgesi olarak tanımlanır (Şekil 2.1.) (70,71).

Şekil 2.1.rDNA gen bölgesi haritası (70,71)



Moleküler alt tiplendirilme, aynı türlerin birbirleri ile olan genetik ilişkisinin değerlendirilmesidir. Bu teknik, epidemiyolojik çalışmalarda kullanılır ve bu bağlamda, belirli suşların bir salgında potansiyel kaynak olup olmadığı değerlendirilir. Daha geniş anlamda, moleküler alt tiplendirilme verileri kolonizasyon ve infeksiyon arasındaki ilişkiyi belirlemek, bir popülasyon içindeki antifungal ilaçlara dirençli suşları izlemek ya da infeksiyonların tekrarlaması ile ilgili sorulara cevap bulabilmek, virülen mikroorganizmaların belirli bir coğrafik bölgede veya dünya çapında nasıl yayıldığını saptamak için kullanılır. Mantarların alt tiplendirilmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Genelde, fenotip tabanlı yöntemler, *Candida* ve benzeri türlerin fenotipik özelliklerinin değişime uğraması nedeniyle günümüzde fazla kullanılmamakta (75), buna karşın genotip temelli yöntemler giderek daha önemli konuma gelmektedir.

Son 10 senedir, patojenik mantarların filogenetikleri üzerinde yapılan çalışmalarda büyük bir artış olmuştur (33). Ribosomal, mitokondrial ve diğer nükleer DNA zincirlerinin analizleri birçok mantar grubu arasındaki genetik ilişkinin düzeyini belirlemek için kullanılmaktadır. Çalışmaların sonucunda, birçok anamorfik (eşeysiz üreyen) mantar ve Ascomycota veya Basidiomycota gibi telemorfik (eşeyli üreyen) özelliklere de sahip mantarlara özgü cinsel yaşama sahip olanlar arasında yakın genetik ilişkilerin bulunduğu belirlenmiştir

(32). Filogenetik araştırmalar çok sayıda patojenik ve saprofit mantar gruplarına ait DNA zincirlerinin uluslararası veri tabanlarına girilmesini sağlamıştır. Uluslar arası gen bankalarında referans mantar DNA zincirlerinin bulunması, mantar hastalıklarının DNA-tabanlı tanı yöntemleri ile saptanmasına büyük katkılar sağlamıştır. Günümüzde, GenProbe sistemi birçok ülkede mantarları tanımlama amacıyla kullanılan, onaylı tek nükleik asit tabanlı ticari testtir. Ancak patojenik mantarların hızlı DNA-tabanlı teşhisi için aynı zamanda yeni birçok sistem geliştirilmiş ve onaylanmıştır. İlk yöntemlerden biri, restriksiyon parçaları uzunluk polimorfizm (RFLP) testidir. Bu yöntem, mantar genomunun restriksiyon profillerini belirlemede kullanılır. RFLP analizi için, uygun restriksiyon enzimlerinin seçilmesinde iki önemli kriter bulunmaktadır; birincisi kesimden sonra ortaya çıkan parça uzunluğunun analiz için uygun olup olmadığı (analizde en iyi sonuçlar 1-1,5kb arasında olan parçalardan alınmaktadır), ikinci kriter ise kesim sonucunda analizi mümkün kılacak kadar parça olmasıdır. Yüzlerce kesim parçasının ortaya çıktığı durumlarda kompleks profilleri kıyaslamak zordur (6,24,44). Suşların birbirlerine olan yakınlığının belirlenmesi ise testin avantajıdır (90). Yöntemin uygulanmasında sırası ile gerçekleştirilen işlemler dizisinde öncelikle restriksiyon enzimleriyle mantar DNA'sı kesilir ve kesilen DNA bölgeleri agaroz jel elektroforezi yardımıyla büyüklüklerine göre ayrılarak Southern blot ile agaroz jelden nitrosellüloz ya da naylon membrana aktarılır. Son olarak da membrana bağlı olan nükleik asitler, incelenen gen bölgesine özgü probun p32 gibi radyoaktif maddeler ya da biotin-dioksijenin gibi radyoaktif olmayan maddeler ile işaretlenmesi sonucunda sadece prob ile hibridize olan DNA parçaları görülebileceğinden testin özgülüğü artırılmış olur. Restriksiyon enzimlerinin tanıdığı bölgeler türden türe değişkenlik gösterdiğinden, aynı türe ait mikroorganizmalar benzer bantları içerirken, farklı türlere ait mikroorganizmalar farklı bantlar oluştururlar (6,24,44). 1987 yılında Scherer ve Stevens tekrarlayan ribozomal DNA içeren (RNA kodlayan genler) RFLP temelli çalışmalarında çeşitli Candida türlerini idantifiye etmişlerdir. DNA parmak izi için kullanılan klasik RFLP yöntemi duyarlılığının fazla olmaması nedeniyle sorun oluşturmakta, genel olarak, sadece yüksek işaretlenme yoğunluğu olan bantlar çözümlenebilmektedir. Bantların bir izolat serisini çözümlemek için yeterli bilgiyi içermediği bilinmektedir. Duyarlılık, DNA'nın ince

bir zara transfer edilmesi ve işaretlenmiş bir DNA probunun hibridizasyonu ile geliştirilebilir. Her örnekte bir veya iki bant üretebilen tek-kopya probun çözünürlüğü, çoğu zaman birçok epidemiyolojik çalışma için yeterli değildir. RFLP analizi mikroorganizmalardaki mutasyonların saptanmasında, epidemilerin belirlenmesinde ve etkenlerin tiplendirilmesinde kullanılır (6,24,44,72).

En yaygın olarak kullanılan problardan bir tanesi, tekrarlanan element veya kompleks problemlerdir. Bunlar, organizmanın genomlarında dağılmış halde olan zincirler içeren bir DNA fragmanıdır. *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. dubliniensis* için tekrarlanan problemler, yeterli karmaşıklıkta parmak izi sağladıkları ve böylece birçok seviyede genetik değişkenlik analiz edilebildiği için faydalıdır. Bu parmak izi paternleri, mutasyon sonucunda çok değişken olabilirler. *C. neoformans* ve *A. flavus* için tekrarlanan element ve problemler de geliştirilmiştir (64,76,77).

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA analiz tekniği (RAPD) 1990 yılında geliştirilmiş olup (Williams, 1990; Welsh ve McClelland, 1991), bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine; rastgele seçilen bir veya daha fazla primer ile DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması testin esasını oluşturmaktadır. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları, agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki bantların oluşmasına neden olur. Bu teknikte, DNA'nın amplifikasyonu için G-C açısından zengin, 9-10 baz çiftlik tenmer oligonükleotid primerler kullanılmaktadır. Seçilen primerler kromozom üzerinde hem kendilerine özgü hem de özgü olmayan bölgelere bağlanırlar. Aynı tür içindeki farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları farklı olacağından agaroz jel elektroforezinde çoğaltılan parçaların sayı ve büyüklüğü de farklılık gösterecektir. Suşlar arasında primerlerin bağlanma yerlerinde gerçekleşmiş olan mutasyonlar bant polimorfizminin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Çoğaltma sonucunda jel elektroforezinde gözlenen her bir suşa ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılır. Aynı bant profilini gösteren suşların epidemiyolojik olarak ilişkili olduğu şeklinde yorum yapılabilir (87,89).

Rastgele çoğaltılan polimorfik DNA; *C.albicans*, *C.glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C.lusitaniae*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *C. neoformans*, *B. dermatitidis* ve *H. capsulatum*'u içeren bir çok mikroorganizmanın DNA parmak izinde kullanılmıştır (76). RAPD'ın popüler olmasının bir nedeni de organizmanın genomu veya DNA dizini ön bilgisine gerek duyulmamasıdır. Bu yöntem, uygulanma kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilmesi açısından geniş kullanım alanı bulmuştur (90). Ancak, bu yöntemin laboratuvarlar arası ve içi ortamında uygulanabilirliği bir takım sorunları da beraberinde getirmektedir (63). Türe özgü kalıp ve/veya fragmentler, uygun primer setleri kullanılarak görüntülenebilir (9).

1980 yılında Kary Mullis tarafından tasarlanmış olan PCR tekniği, moleküler araştırmaların yapılmasında büyük kolaylıklar sağlamış ve günümüzdeki PCR çalışmalarının temelini atmıştır. PCR, klonlanmaya gereksinim duymadan istenilen DNA veya RNA bölgesinin incelenmesini sağlayan kolay ve hızlı bir yöntemdir. Günümüzde PCR; özellikle çeşitli mikroorganizmalar ve türler arasındaki polimorfizmin tanımlanmasında, tıpta birçok infeksiyon hastalığının hızlı belirlenmesinde, DNA'nın haritalanmasında, transplantasyon için doku tipinin saptanmasında ve adli amaçlı (anne ve babalık testleri) olarak kullanılmaktadır. Dizilemede incelenecek bölgenin işaretlenerek çoğaltılması ve DNA dizilerinin restriksiyon tanıma bölgesini keserek seçilen bölgenin çoğaltılması, PCR'ın diğer kullanım alanlarıdır. Bu yöntem; çift iplikli kalıp DNA molekülünde bulunan hedef diziye iki oligonükleotidden oluşan primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır (5,6,22,25,44,47,83).

PCR yöntemi; denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzama olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilir (Şekil 2.2.).

1- Denatürasyon (çift iplikli DNA'nın açılımı):

Çift iplikli Kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklıklarda (95-100°C) oligonükleotid primerlerin (amplimer) bağlanması için denatüre edilir. Denatürasyon için başlangıç ısısı çoğaltılmak istenen hedef bölgenin G+C

içeriğine göre belirlenir. Sonuçta DNA'nın çift ipliğinin birbirinden ayrılması sağlanır. Her siklusun başında çift iplikli yapı yeniden ayrılmalıdır (5,6,25,44).

2- Primerlerin bağlanması (annealing):

Denatürasyon aşamasından sonra tek iplikli kalıp DNA molekülü üzerinde bulunan hedef bölgeye oligonükleotid primerlerin bağlanması için ısının düşürülmesi gerekmektedir. Bu nedenle de 'T_m / bağlanma sıcaklığı' reaksiyonun gerçekleşmesi açısından önemlidir. Bu sıcaklık değeri primerlerin baz sayısına göre değişir ve $[(A+T) \times 2^\circ\text{C} + (G+C) \times 4^\circ\text{C}]$ formülü ile hesaplanır. Bu formülde A: adenin, T: timin, G: guanin, C: sitozin nükleotidlerinin sayısıdır (5,6,44).

3- Primerlerin uzaması (extension):

Oligonükleotid primerlerin uzama aşamasında Taq DNA polimerazın polimerizasyonu için en uygun sıcaklık olan 72°C kullanılır. Enzim, ortamdaki deoksiribonükleotid trifosfatları (dNTP), primerlerin 3' ucuna bağlayarak uzamalarını sağlar. Genelde toplam döngü sayısı 25-35 arasındadır. Sayının artması istenmeyen ürünlerin ortaya çıkmasını sağlarken, çoğaltılmak istenen bölgenin ürünlerinde bir artış olmaz. Bu nedenden dolayı 40 dan fazla siklusu olan PCR reaksiyonlarında istenilen sonuç elde edilmez (5,6,44).

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Temel Bileşenleri: (5,6,44)

a) Kalıp DNA:

PCR'da herhangi bir DNA parçası kalıp DNA olarak kullanılabilir ve araştırma laboratuvarı ya da klinik hastalarından izole edilmiş olabilir.

b) Taq DNA polimeraz:

DNA polimeraz enzimleri kalıp DNA ipliğindeki bölgeye bağlanan oligonükleotid primerlerin 3' hidroksil ucuna ortamda serbest olan dNTP'leri bağlayarak yeni DNA ipliğinin polimerizasyonunu sağlar.

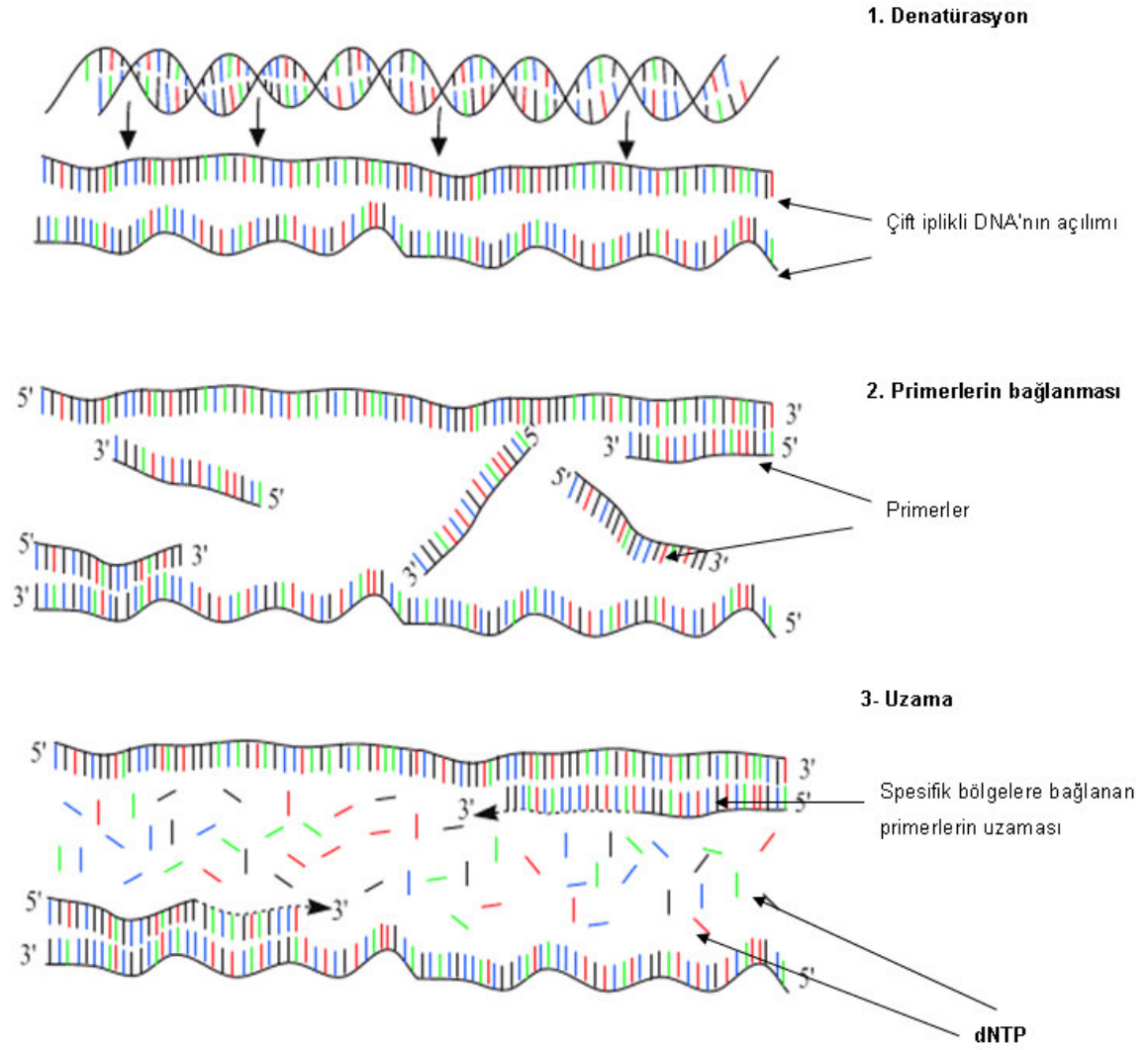
c) Primerler:

Çalışılacak kalıp DNA'daki istenen bölgeye tamamen komplementer olan primerler seçilir. Primer seçilirken çiftlerin 3' uçlarının birbirlerine ya da oligonükleotid dizinin içindeki başka bir yere komplementer olmamasına dikkat edilmelidir.

d) dNTP ve Mg⁺²:

Reaksiyonda kullanılacak dört dNTP'nin konsantrasyonları aynı olmalıdır. dNTP konsantrasyonunun yükselmesine bağlı olarak; daha çok bağlayacağından, Mg⁺² konsantrasyonu artar. Mg⁺² iyonun azalması ise Taq DNA polimerazın aktivitesini etkiler. Bu nedenle dNTP konsantrasyonu arttıkça Mg⁺² iyonunun konsantrasyonu artırılmalıdır.

Şekil 2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (5,6)



PCR yönteminde birden fazla türe özgü primer çiftinin kullanılması sonucunda multipleks PCR testi geliştirilmiştir. Bu teknikte, ilk aşamada geniş özgüllüğü olan DNA ürünü (örneğin, ITS bölgesi) çoğaltılır ve daha sonra bu ürün türe-özü primerler ile reaksiyona sokulup, DNA ürünleri jel üzerinde farklı bantlar oluşturur (98). Elde edilen ürün, sadece söz konusu tür açısından amaçlanan hedefe özeldir.

Mantarların PCR uygulamalarında, intron splice sitelerini tamamlayıcı oligonükleotid primerler, değişik türler arasındaki polimorfizmi göstermek için tercih edilmiştir (23). Kısa bir süre önce, geliştirilmiş ITS 1 ve ITS 2 bölgeleri içinde boyut farklılıkları ölçülerek (uzunluk polimorfizmi) patojenik maya türlerini anlamak için fluro ışınma kılcal elektroforezi kullanılmıştır. Bu bölgelerdeki ürünleri çoğaltmak için PCR uygulanır ve zincir uzunluğu boyunca iki tür arasındaki fark sadece 1-2 nükleotid olduğundan, bu fark kılcal elektroforez kullanılarak büyük bir duyarlılık ile ölçülebilir. Bu nedenle farklı türlerin izolatları arasındaki farkı görmek için ITS bölgelerinin uzunluk farkından yararlanılır (19,20).

Mantar DNA'larının saptanmasında delinmiş leke melezleştirilmesi (slot blot), çizgi prob (line-prob) analizi ve tek sarmal yapıda polimorfizm (SSCP) (single strand conformation polymorphism) teknikleri de kullanılmaktadır (39,55,62). SSCP yönteminde primerler, radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddeler ile işaretlenip çoğaltma gerçekleştirilir, oluşan ürün dizilenmiş yükleme tamponu (sequencing loading buffer) ile karıştırılıp, ısı ile denatüre edilir. Ayrılan sarmalların tekrar birleşmesini önlemek için karışım buzda bekletilip, denatüre olamamış dizilenmiş format-gel (nondenaturing sequencing-format gel)'de elektroforez uygulanır. Tek sarmal olarak jelle yüklenen DNA'lar elektroforez sırasında kendi üzerine katlanarak yeni bir yapı kazanır ve elektroforetik hareketleri bu yapı tarafından belirlenir. Primerlerin işaretlendiği maddeye göre elektroforez paterni, röntgen filmi ya da otomatize sistemler ile ölçülür. Bu yöntem yardımı ile DNA'daki tek bir mutasyon bile gösterilebilir. Uygulama alanı ve değerlendirme gücü, yüksek maliyeti ve zaman alıcılığı nedeniyle rutin laboratuvarlarda uygulanması güçtür (6,90,44).

Daha yeni kuşak problr, floresans ile işaretlenerek kullanılmaktadır. Bu problrın uygun gen dizinine bağlanması esnasında ortaya çıkan enerji, Taq-man (Perkins Elmer Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) veya Light Cycler (Roche Molecular Biochemicals Inc., Indianapolis, IN), gibi lazer içeren Real-Time PCR'lar ile algılanabilmektedir (13,34,57).

Multilokus (çok yerleşimli) enzim elektroforezi (MEE), hücresel izoenzimlerin veya alloenzimlerin değerlendirilmesinde kullanılır. Burada bir hücre ekstraktı (özütü), denatüre olmamış jelde elektroforezlendikten sonra, replike jel dilimleri enzim aktivitesini saptamak için, spesifik substratlar ile işaretlenerek boyanmıştır ve enzim aktiviteleri doğrudan bu enzimin gen kodlarının alelleri ile ilişkilidir. Bu yüzden, bir izolat serisi içindeki alel farkları kıyaslanarak genetik ilişki doğrudan değerlendirilebilir. MEE hem haploid (tek band) hem de diploid (bir veya iki band) organizmaların enzimlerini belirler. Eğer yeterli sayıda enzimler incelenirse, MEE, bir grup organizma için genetik benzerlik verileri oluşturmak açısından çok faydalıdır. Ancak, bu yöntem zaman alıcıdır ve yüksek nitelikli teknik uzman gerektirmektedir (14).

Son yıllarda kullanıma sunulan nükleik asit hibridizasyon ve görüntüleme yöntemi, oligonükleotid "microarray" veya "microchip" (DNA çip) tekniğidir. Bu yöntemde DNA çiftleri, katı destek faz üzerine yerleştirilmiş oligonükleotid kütüphanelerini içeren minyatür analitik araçlardır. Yakalayıcı oligonükleotidler sentetik olarak elde edilmiş ve membranlara immobilizasyonu sağlanmış yapılardır. Bu sistem ile mikroçip yüzeyine binlerce hedefe prob bağlama reaksiyonu gerçekleştirilebilir ve son aşamada reaksiyon sonuçları bilgisayardaki uygun programlar tarafından algılanarak analiz edilir. Klinik örneklerden çoğaltılan hedef moleküllerin hızla taranmasını sağlayan bir tekniktir (16,58).

Halen kullanılmakta olan ticari kitlerin çoğu doku ve vücut sıvılarındaki bakteri ve virüslere ait DNA ve/veya RNA'yı elde etmek amacı ile üretilmiştir. Mantarların hücre duvarlarının kalınlığı, kapsüllü türlerinin ve sporlarının bulunması, genetik materyallerinin saptanmasında zorluk oluşturduğundan; kuşku örneklerine öncelikli olarak lizozim ve/veya zimolizin gibi enzimlerle ön

işlem uygulanır. Bu ve benzeri zorluklardan dolayı günümüzde mantar DNA'sını belirleyecek test sayısı oldukça kısıtlıdır. Son yıllarda bu konuda yapılan çalışmaların sayısı giderek artış göstermektedir (56).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta örnekleri ve referans suşlar:

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı'na, (etik kurul kararı 14.7.2004 'de alınmış olup, bu tarihten sonra örnekler toplanmaya başlanılmıştır.) immunsupresyonlu hastalardan alınarak gönderilen, 24 bronkoalveoler lavaj sıvısı, 14 kan, beş periton diyaliz sıvısı, dört plevra sıvısı, birer beyin omurilik sıvısı, perikard sıvısı ve idrar örneği mikolojik yönden incelenmiştir. Referans suş olarak ise İstanbul Tıp Fakültesi Mikroorganizma ve Kültür Koleksiyonları Merkezi (KÜKENS)'nden sağlanan *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida glabrata* ATCC 15126, *Candida tropicalis* KÜEN 1025, *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112 ve *Aspergillus fumigatus* ATCC 9197 suşları kullanılmıştır.

2.Hasta Örneklerinin Geleneksel yöntemler ile tanımlanması:

a) Doğrudan mikroskopik yöntemler:

Sistemik mikoz kuşkulu hasta örneklerine %10-15 KOH+kalkoflor beyazı eklenerek hazırlanan preparasyonlar floresan mikroskop yardımıyla incelemiş ve mantar elemanları (hif ve sporlar) aranmıştır (52).

b) Kültür:

Sistemik mikoz kuşkulu hasta örnekleri glikozlu Sabouraud (pH: 5.5-6) ve beyin kalp infüzyon agar (BHIA) besiyerlerine ekilerek iki farklı ısı derecesinde (25-30°C ve 37°C) 30 gün boyunca bekletilmiştir. İzole edilen mayaların idantifikasyonlarında koloni görünümü ve rengi, hif ve/veya yalancı hif oluşumu, klamidospore, artrokonidya, blastokonidya oluşturmaları, germ tüp oluşturabilme yetenekleri, çini mürekkebi yardımıyla hazırlanan preparasyonlarda kapsül varlığı, karbonhidrat, nitrat asimilasyonları ve şekerleri fermente edebilme gibi temel morfolojik ve biyokimyasal özellikler esas olarak alınmıştır (52).

3- Klinik örneklerin ve referans suşların moleküler yöntemler ile tanımlanması:

a) **İlk aşama:** DNA ekstraksiyon kiti ve fenol-kloroform -izoamilalkol yöntemi ile referans suşlardan ve hasta örneklerinden öncelikle mikroorganizma daha sonra genel primerler ile mantar DNA'sının saptanması.

b) **İkinci aşama:** Türe özgü primerler kullanılarak multipleks PCR yöntemi ile mantarların tür düzeyinde tanımlanması.

a-1) Fenol kloroform yöntemi ile DNA izolasyonu (56):

a-1-1) Ön işlem:

1. 100ml'lik erlen içindeki 10ml maya pepton dekstroz buyyona alınarak süspanse edilen hasta örneği 30°C'de bir gece bekletilir.
2. 50 ml'lik Granier tüplere aktarılıp, beş dakika 4000 rpm'de santrifüj edilir.
3. Üst sıvı dökülür ve çöküntü bir ml 1 M sorbitol ile süspanse edilip, 2 ml'lik ayrı bir ependorf tüpüne aktarılır.
4. İki dakika 13 000 rpm'de santrifüj edilir.
5. Üst sıvı atılır ve çöküntü deney günü hazırlanan 1 ml lizis tamponu ile süspanse edilip, 37 °C'de 2 saat bekletilir.

a-1-2) İzolasyon:

1. Ön işleme tabi tutulmuş örnek beş dakika 13 000 rpm'de santrifüj edilip, üst sıvı atılır, çöküntü bu aşamada jel gibidir. Çöküntünün üzerine deney günü hazırlanan proteinaz tampondan 0,8 ml ilave edilir ve yeniden süspanse edilip 4 saat 56°C'de bekletilir.
2. 0,8ml fenol/kloroform/izoamilalkol karışımı ilave edilip, beş dakika el ya da vorteks yardımı ile karıştırılır, beş dakika 13 000 rpm'de santrifüj edilir.

3. Santrifüj sonrası oluşan iki fazın üstte olanından 600µl yeni bir tüpe aktarılıp üzerine 0,6 ml %100 luk izopropanol ilave edilir, el ile karıştırılarak, beş dakika 13 000rpm'de santrifüj edilir.
4. Üst sıvı atılır. üzerine %70'lik etanolden 1 ml eklenerek üç dakika 13 000rpm'de santrifüj edilir.
5. Üst sıvı atılır ve çöküntü havada tamamen kurutulur.
6. Çöküntü üzerine 200µl tris-EDTA tamponu ve 2 µl RNaseA eklenerek üç dakika vorteks ile DNA şeffaf olana dek süspansiyon edilir ve 30 dakika 37°C'de bekletilir.
7. 200µl fenol/kloroform/izoamilalkol ilave edilip, beş dakika süt rengine gelene dek el ile çalkalanır ve beş dakika 13 000 rpm'de santrifüj edilir.
8. Oluşan İki ayrı fazın, üstte olanından bir pipet yardımı ile alınıp içerisinde 200µl kloroform/izoamilalkol bulunan tüplere eklenir.
9. İki dakika vortekslenir ve daha sonra beş dakika 13 000rpm'de santrifüj edilir
10. Ortadaki faza dokunmadan, üst faz bir pipet yardımıyla çekilip içerisinde 200µl %100 luk izopropanol bulunan yeni tüplere aktarılır.
11. Tüpler hafifçe sallanarak içindeki DNA görülür.
12. Beş dakika 13 000rpm'de santrifüj edilip, üst sıvı atılır.
13. Çöküntüye %70'lik etanol'den bir ml eklenip, beş dakika 13 000rpm'de santrifüj edilir.
14. Çöküntü tamamen kurutulup, 50-80µl distile su eklenir, karıştırılır ve kullanılmaya dek -20°C'de saklanır.

a-2) Ticari kit ile DNA izolasyon yöntemi (56):

Küçük modifikasyonlarla birlikte kit protokolüne göre yapıldı.

a-2-1) Ön işlem:

1. Örnekten 200µl alınarak tüplere aktarılır ve 14 000rpm'de santrifüj edilir
2. Santrifüj sonrası üst sıvı atılır, çökeltiyeye 500µl litikaz solüsyonu eklenip, 37°C'de 2 saat bekletilir.
3. 14 000rpm'de santrifüj sonrası üst sıvı atılır,

a-2-2) İzolasyon:

1. Çökelti, üzerine 180µl ATL solusyonu ve 20µl proteinaz K stok solüsyonu eklenerek, 56°C'de 4 saat bekletilir.
2. 4µl RNaseA (100 mg/ml) eklenir ve 15 saniye vorteksleme sonrasında iki dakika bekletilir.
3. 200µl AL solüsyonu eklenir ve 15 saniye vortekslemeden sonra 70°C'de 10 dakika bekletilir.
4. 200µl etanol eklenip, 15 saniye vorteksleme yapılarak karıştırılır.
5. Tüpün içindeki karışım koleksiyon tüpüne (filtreli) aktarılıp, bir dakika 10 000 rpm'de santrifüj edilir ve filtre içeriği pipet yardımı ile çekilerek atılır.
6. Koleksiyon tüpüne 500µl AW1 solüsyonu eklenerek, bir dakika 8000 rpm'de santrifüj edilir, filtre dikkatlice çıkarılıp yeni bir koleksiyon tüpünün içerisine konur.
7. 500µl AW2 solüsyonu koleksiyon tüpüne eklenerek, üç dakika 14 000 rpm'de santrifüj edilir.
8. Koleksiyon tüpünün filtresi 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünün içine konulur. 100µl elüsyon solüsyonu ya da distile su ilave edilerek oda ısısında beş dakika bekletilir ve bir 8000 rpm'de dakika santrifüj edilir.
9. Kullanılana dek -20°C'de saklanılır.

KULLANILAN PRİMER DİZİMLERİ

Genel primerler

Luo ve arkadaşlarının (59) bildirdiği ve *Saccharomyces cerevisiae*'den seçilen primerler:

U1 GTGAAATTGTTGAAAGGGAA ~550bp

U2 GACTCCTTGGTCCGTGTT

Aspergillus fumigatus

AFUM1CGCCGAAGACCCCAACATGAACGC (GenBank AF17662, AF078889) ~385bp

AFUM2 TAAAGTTGGGTGTCCGGCTGGC

Candida albicans

CALB1 TTTATCAACTTGTCACACCAGA (GenBank 47111, L28817) ~273bp

CALB2 ATCCCGCCTTACCACTACCG

Candida glabrata

CGL1 TTATCACACGACTCGACACT (GenBank AB032177, AF167993) ~423bp

CGL2 CCCACATACTGATATGGCCTACAA

Candida parapsilosis

CPA1 TTGGTAGGCCTTCTATATGGG (GenBank AF287909, L47109) ~ 320bp

CPA2GCCAGAGATTAAACTCAACCAA ~300bp

Candida tropicalis

CTR1 CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT (GenBank AF287910, AF268095) ~357 bp

CTR2 TGGCCACTAGCAAATAAGCGT

Cryptococcus neoformans

CN4 GAAGGGCATGCCTGT TTG AGAG (GenBank M94516, M64517) ~136bp

CN5 ATCACCTTCCCACTAACACATT

a-III) PCR döngüsü (genel primerler ile) (59)

U1 (GTG AAA TTG TTG AAA GGG AA) ~550 bp

U2 (GAC TCC TTG GTC CGT GTT)

Ana karışım:

1. 2µl (~1 ng) sulandırılmış genomik DNA,
2. 20mM tris-HCl (pH 8,4)
3. 50 mM KCl
4. dNTP (her biri için 0.2 mM, dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
5. 0.5µmol primer
6. 0.5 U Taq polimeraz

Total hacim:20µl

PCR döngüsü

1. 96°C'de 5 dakika
 2. 94 °C'de 30sn
 3. 58 °C'de 30sn
 4. 72 °C'de 30sn
 5. 72°C'de 15 dakika
- } toplam 40 döngü

Elektroforez

- a) PCR ürünlerinin kontrolü için %1'lik agaroz jel hazırlanır.
- b) 50ml Eritilen agaroz jele, 42°C'de,5µg etidyum bromit eklenir.
- c) PCR ürünlerinden 10µl alınıp 2µl yükleyici solüsyon ile karıştırılır.
- d) Karışım, jel üzerindeki kuyucuklara konur ve içerisinde 1x tris-borat-EDTA solüsyonu bulunan elektroforezde 100 volt altında yaklaşık 30 dakika yürütülür.
- e) DNA bantları ultraviyole ışığı altında incelenip, fotoğraf çekilir.

b) Türe özgü Multipleks PCR

Luo ve arkadaşlarının bildirdiği yöntem modifiye edilerek uygulandı (59).

1. Altı mantar türü için iki multipleks PCR paneli test edilmiştir.
2. T-P paneli içinde yer alan primerler:
 - a) CTR 1 ve CTR2 (*C. tropicalis*)
 - b) CPA1 ve CPA2 (*C. parapsilosis*)
3. T-A-N paneli içinde yer alan primerler
 - a) CTR 1 ve CTR2 (*C. tropicalis*)
 - b) CALB1, CALB2 (*C. albicans*)
 - c) CN4 ve CN5 (*C. neoformans*)
4. T-P panelindeki primerler *C. tropicalis* (CTR1,CTR2) ve *C. parapsilosis*'i (CPA1,CPA2), T-A-N panelindeki primerler, *C. tropicalis* (CTR1,CTR2) *C. albicans* (CALB1,CALB2) ve *C. neoformans*'ı (CN4,CN5) idantifiye ederler.

Ana karışım

1. 2µl (~1 ng) sulandırılmış genomik DNA,
2. 20mM Tris-HCl (pH8,4)
3. 50 mM MgCl₂
4. dNTP (herbiri için 0.2 mM, dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
5. Primerler

T-P paneli içinde yer alan primerler

 - a) CTR 1 ve CTR2 primerlerinin herbiri için 0,4 µl
 - b) CPA1 ve CPA2 primerlerinin herbiri için 0,6 µl

T-A-N paneli içinde yer alan primerler

- a) CTR 1 ve CTR2 primerlerinin herbiri için 0,4 µl
- b) CALB1, CALB2 primerlerinin herbiri için 0,5 µl
- c) CN4 ve CN5 primerlerinin herbiri için 0,5 µl
6. 0,75 U Taq DNA polimeraz
7. Distile su

PCR döngüsü:

1. 96°C'de 5 dakika
 2. 94 °C'de 30sn
 3. 58 °C'de 30sn
 4. 72 °C'de 30sn
 5. 72°C'de 15 dakika
- } toplam 40 döngü

Elektroforez

- a) PCR ürünlerinin kontrolü için %1'lik agaroz jel hazırlanır.
- b) 50ml Eritilen agaroz jele, 42°C'de,5µg etidyum bromit eklenir.
- c) PCR ürünlerinden 10µl alınıp 2µl yükleyici solüsyon ile karıştırılır.
- d) Karışım, jel üzerindeki kuyucuklara konur ve içerisinde 1x tris-borat-EDTA solüsyonu bulunan elektroforezde 100 volt altında yaklaşık 30 dakika yürütülür.
- e) DNA bantları ultraviyole ışığı altında incelenip, fotoğraf çekilir.

Dilüsyon:

C.albicans referans suşu (ATCC 10231) katı besiyerinde 10^{-5} dilüsyona kadar sulandırılmış ve gerek fenol kloroform izoamilalkol yöntemi, gerekse ticari kit ile DNA ekstraksiyonu ve ardından PCR yapılmıştır.

İstatiksel analiz:

Çalışmanın kültür, PCR ve mikroskopi, PCR uyumları ile ilgili istatistiksel analizleri için Kappa testi kullanılmıştır (3).

Cihaz ve Mazeme Listesi

1- Cihazlar

- a) Vorteks
- b) Termosiklus cihazı (Biometere)
- c) Su banyosu
- d) Santrifüj (Herause)

2- Mazemeler besiyerleri ve tamponların hazırlanışı

1. Maya pepton dekstroz buyyonu:

- a. 20gr pepton+kazein,10gr maya özeti,15 gr agar karışımına 900 ml distile su eklenir.
- b. Otoklavda sterilize edilir ve üzerine 100 ml %20 glukoz eklenerek, oda ısısında bekletilir.

2. 1M Sorbitol:

1 litreye 182,82 gr sorbitol ilave edilip otoklavda sterilize edilir.

3. Lizis tamponu:

1 M sorbitolden 50ml,100mM Na-Sitrat (pH5,8)'dan 10 ml ve 50mM EDTA (pH.8,0)'dan 10ml; 100'mlik bir şişe içinde karıştırılıp üzerine 12.5 gr litikaz ve 400µl beta merkaptol etanol eklenir.Tüplere bölünür ve -20°C'de saklanır.

4. Proteinaz tamponu: (100 ml için)

1ml 10mM Tris-Cl (pH7,5),10ml 50mM EDTA (pH 7,5),5 ml %0,5 SDS üzerine 84ml distile su ilave edilir. Tüplere bölünür ve -20°C'de saklanır.

5. Tris EDTA Tamponu:

4 ml 10 mM tris-Cl ve 400 ml 1 mM EDTA 0.5 M karıştırılır.

6. RnaseA 10mg/ml (200u/ml)

30µl tris-Cl (10mM), 9µl M NaCl (15mM) ve 2961µl distile su ilave edilip, otoklavlanır, sonra üzerine 30mg RNaseA eklenip, -20°C'de saklanır.

7. 1 M Tris-Cl

50gr tris-Cl, 200ml distile suda çözülür, pH ayarlanır ve distile su ilave edilir.

8. 1M NaCl

58,44gr NaCl, 1 litre distile suya ilave edilip otoklavlanır.

9. Fenol/Kloroform/Izoamilalkol

25ml fenol,24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılır, bir gece 4°C'de bekletilir.

4. BULGULAR

Çalışmada İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikoloji Bilim Dalı'na, immünsupressif hastalardan alınarak gönderilen, 14 kan, 24 bronkoalveoler lavaj, beş periton diyaliz, dört plevra, birer beyin omurilik, perikard sıvıları ve idrar örneği geleneksel (kültür-mikroskopi) ve moleküler yöntemler ile incelenerek değerlendirilmiştir.

Çalışma içeriğinde yer alan 50 immünsupressif hasta örneğinin 17'sinde (%34) kültürel yöntemler ile olumlu sonuç alınmış [16 *C.albicans* (%32), bir *C.parapsilosis* (%2)], 33 (%66) örnekte üreme olmamıştır (Tablo 4.1.).

Klinik örneklerin 14'ü kan olduğu için mikroskopi ve kültür uyumu 36 örnek üzerinden değerlendirilerek yapılmıştır. Altı (%16,6) örneğin mikroskopisi olumsuz, kültürü olumlu; yedi (%19,4) örneğin ise mikroskopi ve kültür sonuçları olumlu bulunmuştur. Mikroskopisi olumlu, kültürü olumsuz suş saptanmamış, 23 (%63,8) örneğin mikroskopi ve kültür sonuçları olumsuz yanıt vermiştir (Tablo 4.1.).

Genel primerler ile yapılan PCR testi sonucunda incelenen tüm klinik örneklerin 27'sinde (%54) mantar DNA'sı gözlemlenmiş, 13 (%36,1) klinik örnek (kan dışında kalan) mikroskopik olarak incelendiğinde mantar elemanları görülmemiş, kültür ve PCR test sonuçları olumsuz bulunmuştur. Kültürleri olumlu bulunan 17(%34) örneğin tümünün mantar DNA'sı içerdiği belirlenmiştir. 10 (%20) klinik örnek kültürel yöntemler ile olumsuz, PCR ile olumlu sonuç vermiş; kültür sonucu olumlu, PCR'ı olumsuz örnek görülmemiştir. 23 (%46) klinik örnek; gerek kültürel, gerekse PCR test yöntemi ile olumsuz yanıt vermiştir (Tablo 4.1.).

Kan dışındaki yedi (%19,4) örneğin mikroskopi, kültür ve PCR sonuçları olumlu bulunmuş; 16 (%44,4) örneğin mikroskopisi olumsuz ve PCR test sonucu olumlu olarak saptanmıştır. Örneklerden altısının (%16,6) mikroskopisi

olumsuz, kültür ve PCR sonuçları olumlu bulunmuştur. Mikroskopi ve kültürü olumlu, PCR test sonucu olumsuz örnek görülmemiştir(Tablo 4.1.).

Mantar DNA'sı olumlu olan örneklere türe özgü multipleks PCR yöntemi uygulandığında saptanan mantarların 24'ünün (%88,8) *C.albicans*, ikisinin (%7,4) *C.parapsilosis*, birinin (%3,7) *C.neoformans* olduğu belirlenmiştir. İdantifiye edilen mayalar sıklık sırasına göre incelendiğinde; *C.albicans*'ın %88,8 ile ilk sırayı aldığı görülmüştür (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. İncelenen klinik örneklerin mikroskopi,kültür, genel primer çiftleri ile PCR ve türe özgü primer çiftleri ile multipleks PCR sonuçları

No	Örnek	Mikroskopi	Kültür	Genel primer ile PCR	Türe özgü primerler ile multipleks PCR
1	BAL	(+++)	C.albicans	+	C.albicans
2	BAL	(++)	C.albicans	+	C.albicans
3	BAL	(++)	C.albicans	+	C.albicans
4	BAL	(+)	C.albicans	+	C.albicans
5	BAL	(+)	C.albicans	+	C.albicans
6	BAL	(+)	C.albicans	+	C.albicans
7	BAL	(+)	C.albicans	+	C.albicans
8	BAL	-	C.albicans	+	C.albicans
9	BAL	-	C.albicans	+	C.albicans
10	BAL	-	C.albicans	+	C.albicans
11	BAL	-	C.albicans	+	C.albicans
12	BAL	-	C.albicans	+	C.albicans
13	İdrar	-	C.albicans	+	C.albicans
14	Kan	Yapılmadı	C.albicans	+	C.albicans
15	Kan	Yapılmadı	C.albicans	+	C.albicans
16	Kan	Yapılmadı	C.albicans	+	C.albicans
17	Kan	Yapılmadı	C.parapsilosis	+	C.parapsilosis
18	BAL	-	-	+	C.albicans
19	BAL	-	-	+	C.albicans
20	BAL	-	-	+	C.albicans
21	BAL	-	-	+	C.albicans
22	BAL	-	-	+	C.albicans
23	Periton sıvısı	-	-	+	C.albicans
24	Periton sıvısı	-	-	+	C.albicans
25	Periton sıvısı	-	-	+	C.albicans
26	Periton sıvısı	-	-	+	C.parapsilosis
27	BOS	-	-	+	C.neoformans
28	Plevra sıvısı	-	-	-	-
29	Plevra sıvısı	-	-	-	-
30	Plevra sıvısı	-	-	-	-
31	Plevra sıvısı	-	-	-	-
32	Periton sıvısı	-	-	-	-
33	Perikard sıvısı	-	-	-	-
34	BAL	-	-	-	-
35	BAL	-	-	-	-
36	BAL	-	-	-	-
37	BAL	-	-	-	-
38	BAL	-	-	-	-
39	BAL	-	-	-	-
40	BAL	-	-	-	-
41	Kan	Yapılmadı	-	-	-
42	Kan	Yapılmadı	-	-	-
43	Kan	Yapılmadı	-	-	-
44	Kan	Yapılmadı	-	-	-
45	Kan	Yapılmadı	-	-	-
46	Kan	Yapılmadı	-	-	-
47	Kan	Yapılmadı	-	-	-
48	Kan	Yapılmadı	-	-	-
49	Kan	Yapılmadı	-	-	-
50	Kan	Yapılmadı	-	-	-

İncelenen 24 bronkoalveoler lavaj sıvısı (BAL) örneğinin yedisinde (%29,1) doğrudan mikroskopik inceleme sonucunda mantar elemanları tespit edilmiştir. 12 (%50) örneğin kültüründe *C.albicans* izole edilmiş, 12 (%50) örnekte ise üreme olmamıştır. Genel primer ile yapılan PCR sonucunda örneklerin 17'sinde (%70,8) mantar DNA'sı saptanırken, türe özgü multipleks PCR sonuçlarına göre DNA'ların tamamının *C.albicans* olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. BAL örneklerinin mikroskopi,kültür, genel primer çiftleri ile PCR ve türe özgü primer çiftleri ile multipleks PCR sonuçları

No	Mikroskopi	Kültür	Genel primer ile PCR	Türe özgü primerler ile multipleks PCR
1	(+++)	<i>C.albicans</i>	+	<i>C.albicans</i>
2	(++)	<i>C.albicans</i>	+	<i>C.albicans</i>
3	(++)	<i>C.albicans</i>	+	<i>C.albicans</i>
4	(+)	<i>C.albicans</i>	+	<i>C.albicans</i>
5	(+)	<i>C.albicans</i>	+	<i>C.albicans</i>
6	(+)	<i>C.albicans</i>	+	<i>C.albicans</i>
7	(+)	<i>C.albicans</i>	+	<i>C.albicans</i>
8	-	<i>C.albicans</i>	+	<i>C.albicans</i>
9	-	<i>C.albicans</i>	+	<i>C.albicans</i>
10	-	<i>C.albicans</i>	+	<i>C.albicans</i>
11	-	<i>C.albicans</i>	+	<i>C.albicans</i>
12	-	<i>C.albicans</i>	+	<i>C.albicans</i>
13	-	-	+	<i>C.albicans</i>
14	-	-	+	<i>C.albicans</i>
15	-	-	+	<i>C.albicans</i>
16	-	-	+	<i>C.albicans</i>
17	-	-	+	<i>C.albicans</i>
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-

Kültürü yapılan 14 kan örneğinin, üçünde (%21,4) *C.albicans*, birinde (%7,1) *C.parapsilosis* olmak üzere dördünde (%28,5) üreme olmuştur. Genel primer ile yapılan PCR testi sonucunda kültürleri olumlu bulunan örneklerin tümünden mantar DNA'sı saptanmış (%28,5), kültürleri olumsuz olan örneklerde PCR testi ile olumsuz yanıt alınmıştır (%71,5). Türe özgü multipleks PCR test sonuçlarına göre mantarların üçü (%21,4) *C.albicans*, biri de (%7,1) *C.parapsilosis* olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Kan örneklerinin kültür, genel primer çiftleri ile PCR ve türe özgü primer çiftleri ile multipleks PCR sonuçları

No	Kültür	Genel primer ile PCR	Türe özgü primerler ile multipleks PCR
1	C.albicans	+	C.albicans
2	C.albicans	+	C.albicans
3	C.parapsilosis	+	C.parapsilosis
4	C.albicans	+	C.albicans
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-

İncelenen beş periton diyaliz, dört plevra ve birer perikard, beyin omurilik sıvılarının kültürleri steril kalmış, doğrudan mikroskopik incelendiklerinde mantar elemanlarına rastlanmamıştır. İdrar örneğinin mikroskopik incelenmesinde mantar elemanları görülmemiş, kültüründen C.albicans izole edilmiştir.

Genel primerler ile yapılan PCR sonucuna göre beş periton diyaliz sıvısı örneğinin dördü (%80), birer idrar ve beyin omurilik sıvısı örneğinde mantar DNA'sı saptanmıştır. Türe özgü multipleks PCR sonuçlarına göre ise periton diyaliz sıvısı örneklerinin üçünde (%60) C.albicans, birinde C.parapsilosis (%20); idrar örneğinde C.albicans ve beyin omurilik sıvısında C.neoformans ait DNA'lar bulunmuştur (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. Periton diyaliz, plevra, beyin omurilik, perikard sıvılarının ve idrarın mikroskopi, kültür, genel primer çiftleri ile PCR ve türe özgü multipleks PCR sonuçları

No	Örnek	Mikroskopi	Kültür	Genel primer ile PCR	Türe özgü primerler ile multipleks PCR
1	Periton diyaliz sıvısı	-	-	+	C.albicans
2	Periton diyaliz sıvısı	-	-	+	C.albicans
3	Periton diyaliz sıvısı	-	-	+	C.albicans
4	Periton diyaliz sıvısı	-	-	+	C.parapsilosis
5	Periton diyaliz sıvısı	-	-	-	-
6	Plevra sıvısı	-	-	-	-
7	Plevra sıvısı	-	-	-	-
8	Plevra sıvısı	-	-	-	-
9	Plevra sıvısı	-	-	-	-
10	İdrar	-	C.albicans	+	C.albicans
11	Perikard sıvısı	-	-	-	-
12	Beyin omurilik sıvısı	-	-	+	C.neofmans

Referans *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus*'un genel primer çiftleri ile PCR sonuçları resim 4.1.'de, referans *Candida tropicalis*'in genel ve türe özgü primer çiftleri ile PCR sonucu resim 4.2.'de, referans *Candida glabrata*'nın türe özgü primer çiftleri ile PCR sonucu resim 4.3.'de, referans *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*'in genel ve türe özgü primer çiftleri ile PCR sonuçları resim 4.4.'de, referans *Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans*'ın türe özgü primer çiftleri ile PCR sonuçları resim 4.5.'de, referans *Aspergillus fumigatus*'un genel ve türe özgü primer çiftleri ile PCR sonuçları resim 4.6.'da, referans *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*'ın multipleks PCR sonuçları resim 4.7.'de, klinik örneklerdeki mantar DNA'sı genel primerler ile resim 4.8'de, türe özgü primerler ile resim 4.9'da gösterilmiştir.

C.albicans referans suşu (ATCC 10231)'nın 10 katlı sulandırımalarının SDA'da 24 saatlik kültürleri sonucunda 10^{-4} 'e kadar üreme görülmüştür (Resim 4.10.). Gerek fenol kloroform izoamilalkol yöntemiyle, gerekse ticari kit ile DNA ekstraksiyonu ve ardından PCR yapılmıştır. Sonuçta her iki izolasyon yönteminde de 10^{-3} 'e kadar mantar DNA'sı saptanmıştır (Resim4.11.).

Çalışmada kullanılan iki ekstraksiyon yöntemi karşılaştırıldığında fenol kloroform izoamilalkol yöntemi ile ticari kit arasında büyük bir fark olmadığı görülmüş, sadece fenol kloroform izoamil alkol yönteminde bir örnekte (BAL) kit ile elde edilemeyen mantar DNA'sı saptanmıştır.

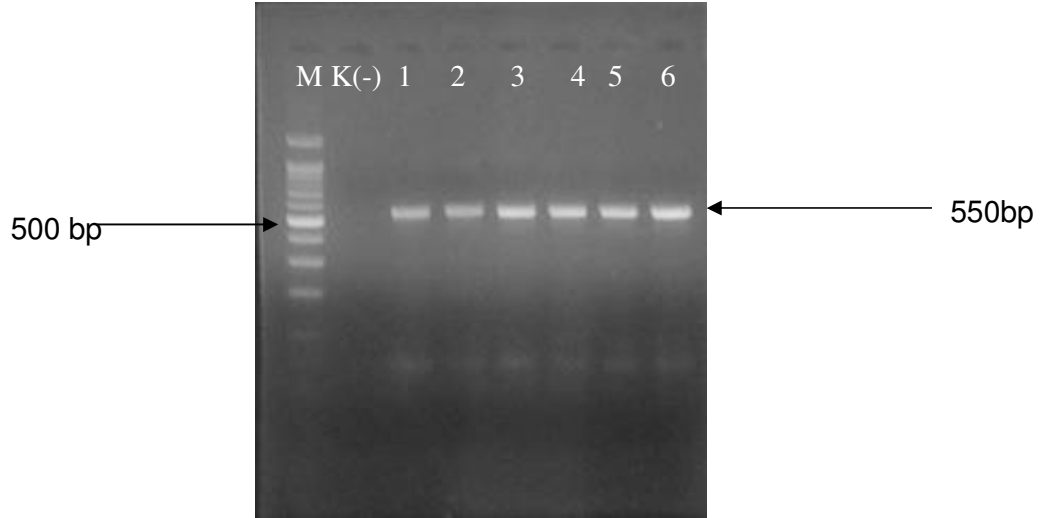
DNA ekstraksiyonu için, bu konuda çalışan araştırmacılar(59) gibi; lizozim enzimi kullanılmıştır. Ancak deneyler sonucunda enzim ile işlem gören örneklerin araştırmacıların bildirdiği (lizozim için 37°C'de 30 dakika, proteinaz K için 55°C'de 15 dakika) inkübasyon süreleri uzatıldığında (lizozim için 37°C'de 2 saat, proteinazK için 56°C'de 4 saat) daha iyi sonuçlar alındığı gözlemlenmiştir.

İstatiksel Analiz (3)

Çalışmada Kappa istatistiksel analiz testi yardımı ile kültür PCR uyumu

0,61($p<0,001$), mikroskopi PCR uyumu ise 0,24 ($p<0,001$) olarak saptanmış, uygulanan PCR yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %69,7 olarak belirlenmiştir.

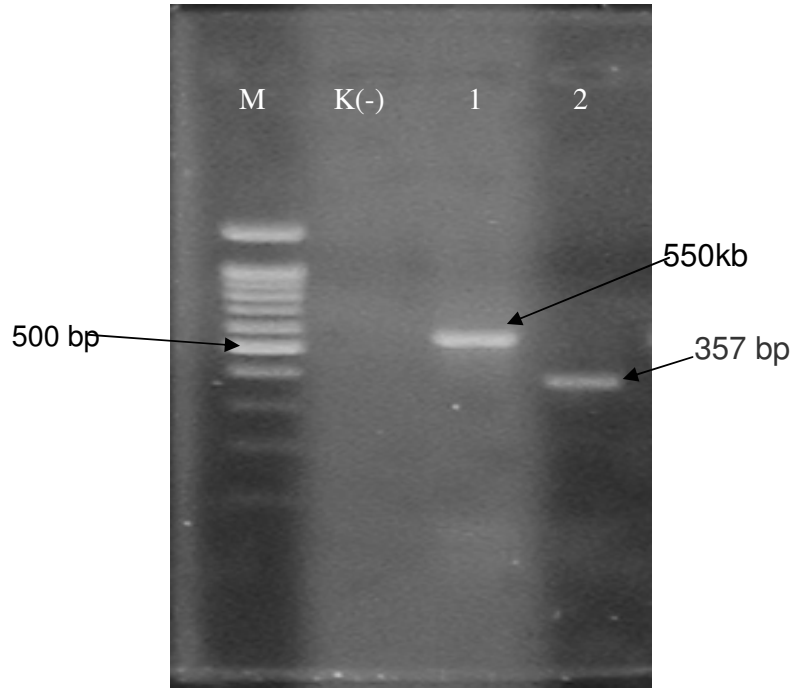
Resim 4.1. Referans *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus*'un genel primer çiftleri ile PCR sonuçları



M: 100bp DNA marker, K(-): Negatif kontrol (H₂O),

1. *Candida albicans*, 2. *Candida parapsilosis*, 3. *Candida glabrata*
4. *Candida tropicalis*, 5. *Cryptococcus neoformans*, 6. *Aspergillus*

Resim 4.2. Referans *Candida tropicalis*'in genel ve türe özgü primer çiftleri ile PCR sonucu

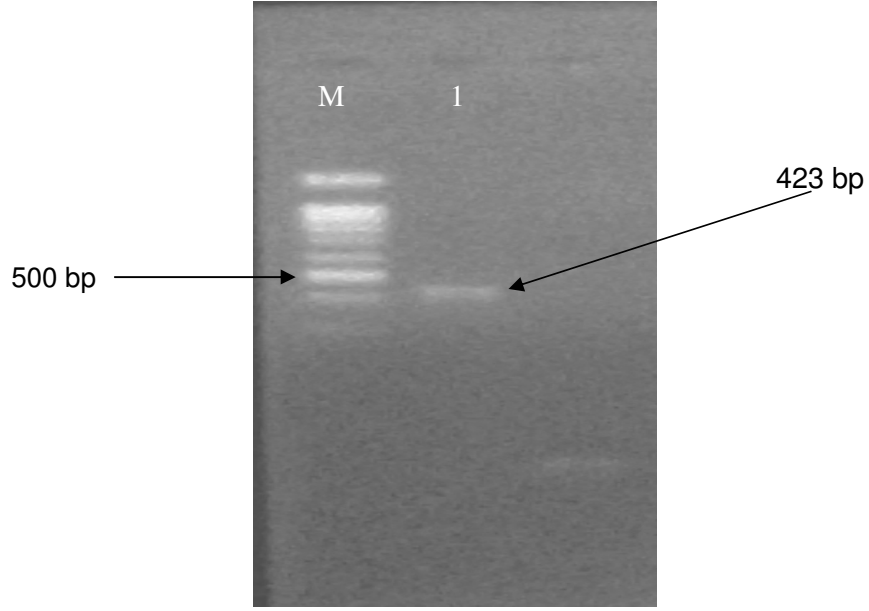


M: 100bp DNA marker, K(-): Negatif kontrol (H₂O),

1. Mantar DNA'sı, 2. *Candida tropicalis*

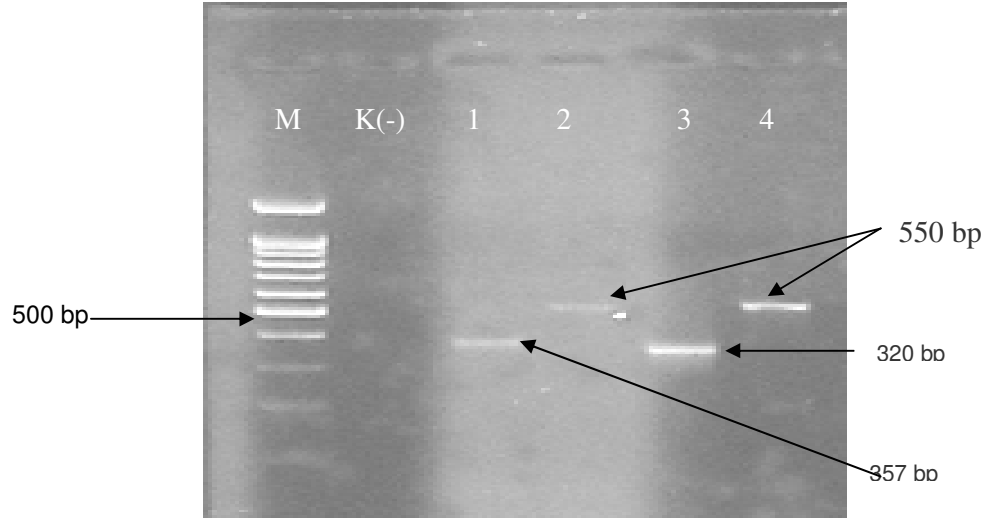
Resim 4.3.Referans *Candida glabrata*'nın türe özgü primer çiftleri ile PCR

sonucu



M: 100bp DNA marker, 1.Candida glabrata

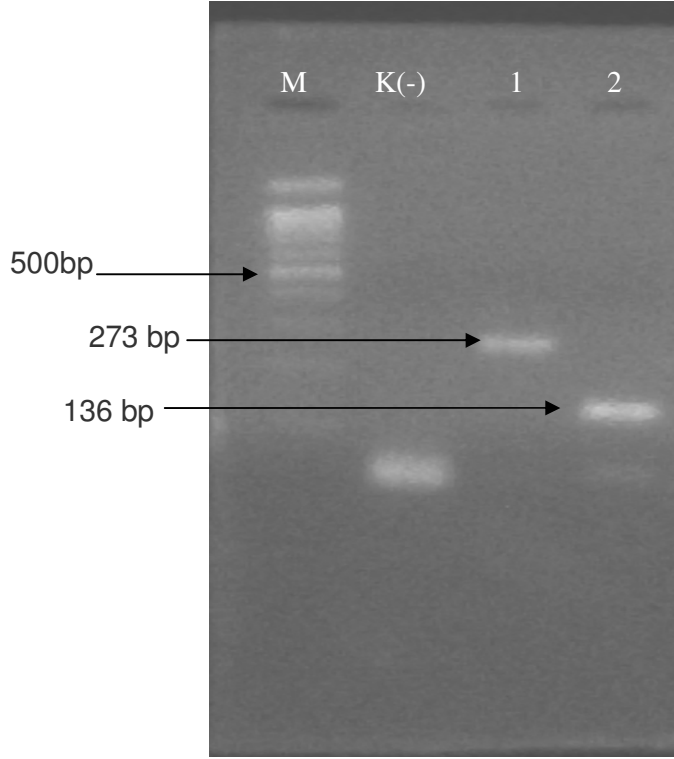
Resim4.4. Referans *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*'in genel ve türe özgü primer çiftleri ile PCR sonuçları



M: 100bp DNA marker, K(-): Negatif kontrol (H₂O),

1. *Candida tropicalis*, 2-4. Mantar DNA'sı, 3. *Candida parapsilosis*

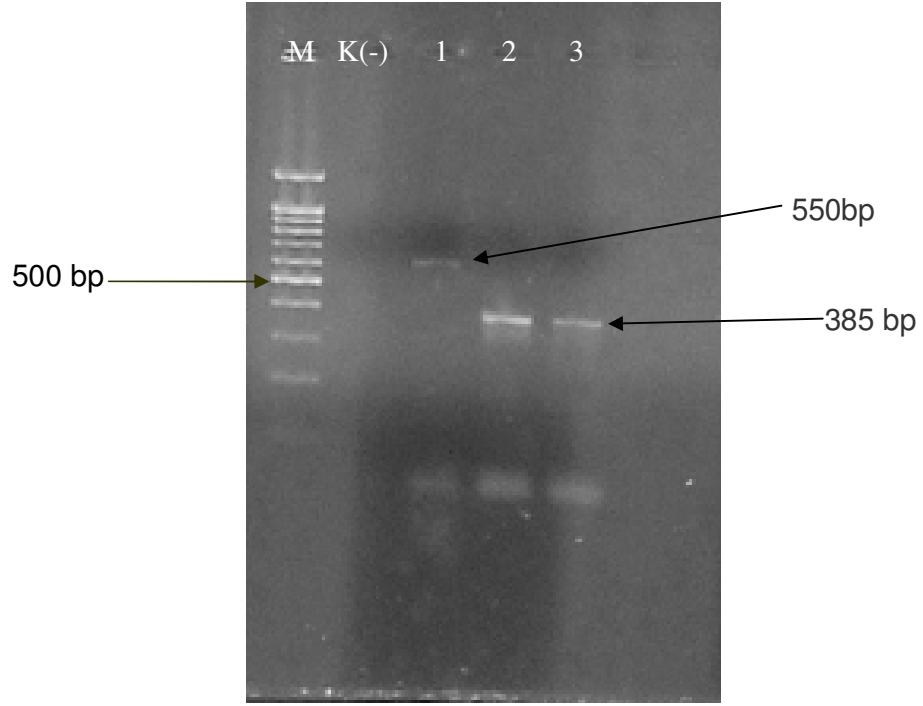
Resim 4.5. Referans *Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans*'ın türe özgü primer çiftleri ile PCR sonuçları



M: 100bp DNA marker, K(-): Negatif kontrol (H₂O),

1. *Candida albicans*, 2. *Cryptococcus neoformans*

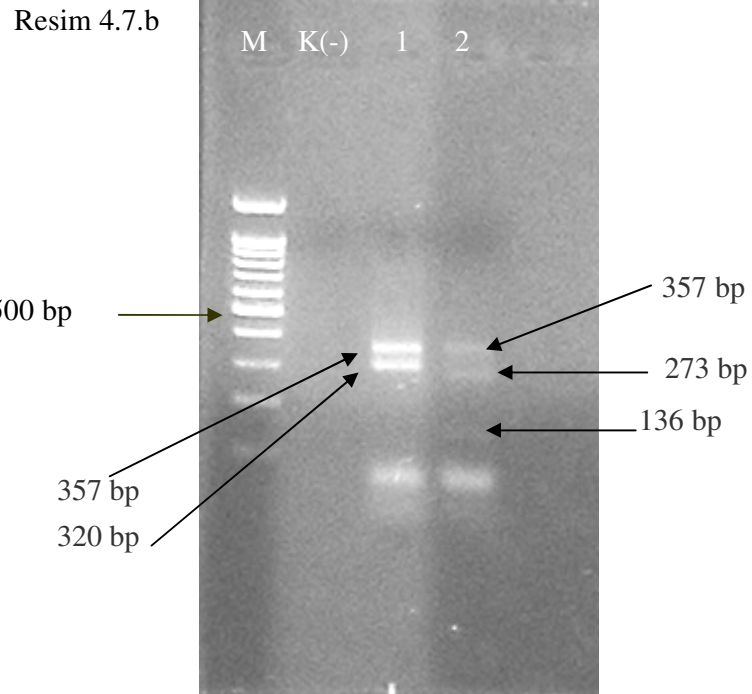
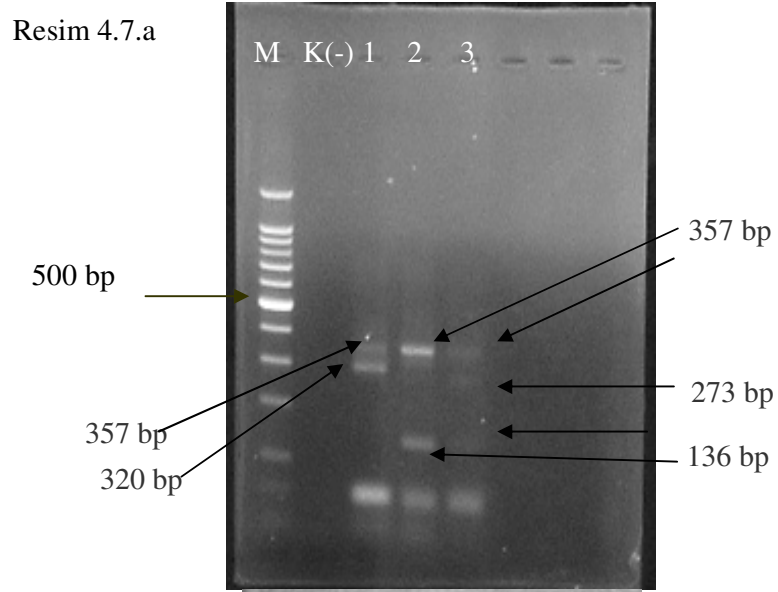
Resim 4.6. Referans *Aspergillus fumigatus*'un genel ve türe özgü primer çiftleri ile PCR sonuçları



M: 100bp DNA marker, K(-): Negatif kontrol (H₂O),

1. Mantar DNA'sı 2-3. *Aspergillus fumigatus*

Resim 4.7. Referans *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*,
Candida tropicalis, *Cryptococcus neoformans*'ın multipleks PCR sonuçları

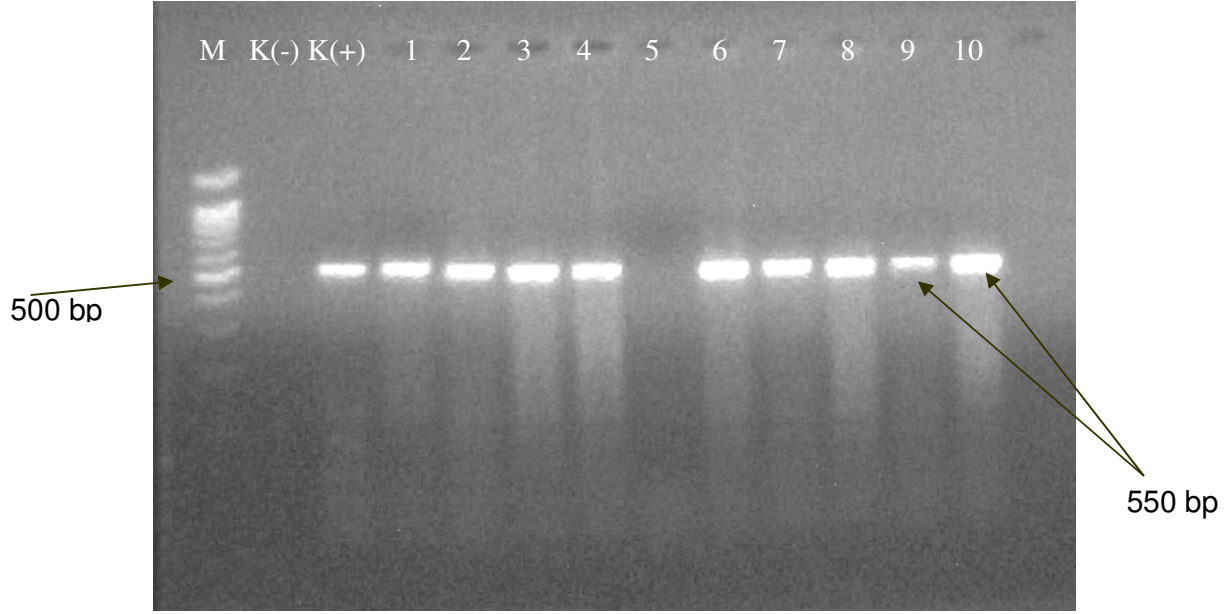


M: 100bp DNA marker, K (-): Negatif kontrol (H₂O),

Resim 4.7.a: 1. *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, 2. *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* 3. *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*

Resim 4.7.b: 1. *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, 2. *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*

Resim 4.8. Klinik örneklerdeki mantar DNA'sı (genel primer çiftleri ile)

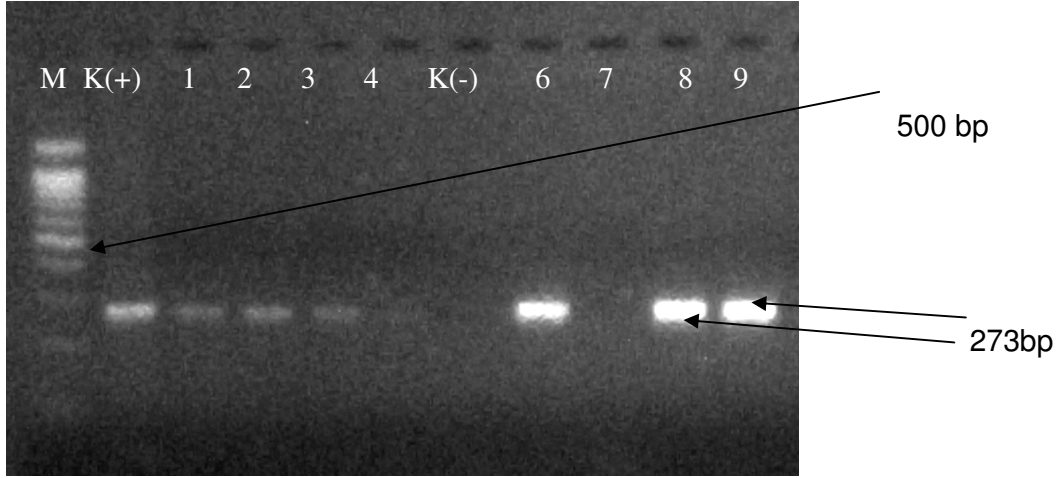


M: 100bp DNA marker, K(-): Negatif kontrol (H₂O), K(+): Pozitif kontrol

1-2-3-4-6-7-8-9-10: Mantar DNA'sı saptanan klinik örnekler

5: Mantar DNA'sı saptanamayan klinik örnek

Resim 4.9. Klinik örneklerdeki mantar DNA'sı (türe özgü primer çiftleri ile)

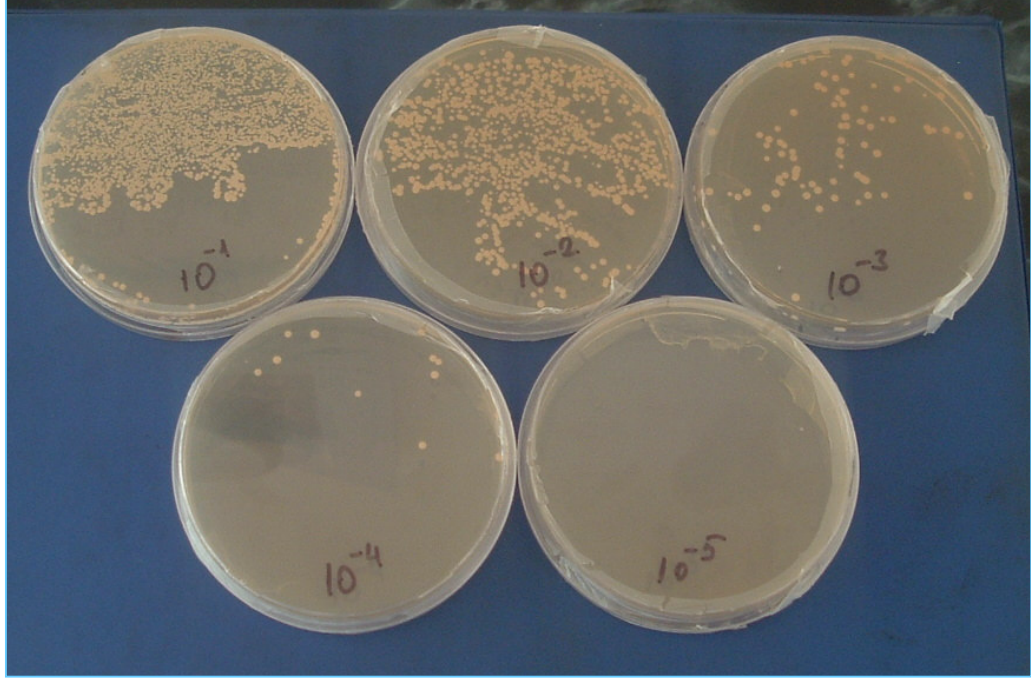


M: 100bp DNA marker, K(-): Negatif kontrol (H₂O), K(+): Pozitif kontrol

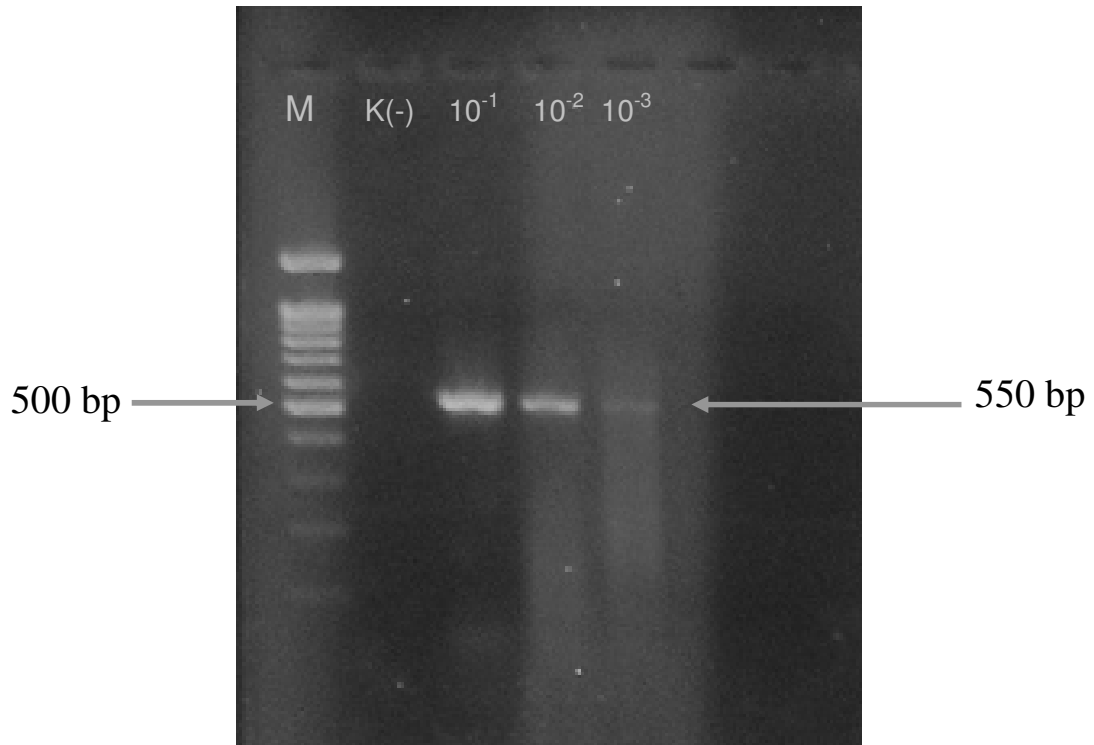
1-2-3-4-6-8-9: *Candida albicans*

7: Türe özgü PCR negatif

Resim 4.10. Referans *Candida albicans*'ın 10 katlı sulandırılmalarının SDA'da 24 saatlik kültür sonuçları



Resim 4.11. Referans *Candida albicans*'ın 10 katlı sulandırılmalarının genomik DNA izolasyonu ve fenol kloroform izoamil alkol yöntemi ile yapılan PCR sonuçları.



M: 100 bp DNA

K(-):Negatif kontrol

5. TARTIŞMA

İnfeksiyon etkeni olan/olabilen gerçek ve fırsatçı patojen mantarların tanımlanmasında, doğrudan mikroskopik inceleme ve kültür günümüzde halen altın standart yöntemler olma değerini korumaktadır. Ancak gerek zaman alıcı olması, gerekse her zaman olumlu sonuç vermemeleri, bazı mantarlar açısından zor uygulanabilir ve yorumlanabilir olması nedeniyle bu yöntemlerin yanı sıra; daha hızlı olan, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek yeni tanı yöntemlerine gereksinim duyulmuştur. Günümüzde fenotipik tanı yöntemlerinde karşılaşılan sorunlar, moleküler yöntemlerin; mikrobiyolojinin diğer alanlarında olduğu gibi gerektiğinde mikoloji alanında da kullanılmasını zorunlu hale getirmiş olup, tanı, tedavi izlemi ve epidemiyoloji konusunda giderek başarılı sonuçlar alınmasını sağlamıştır.

Watson-Crick'in 1953'de moleküler hibridizasyonu tanımlamasından sonra, mantarları ilgilendiren ilk genetik çalışmalar 1960 yılında *S.cerevisiae*'nin genetik haritasının incelenmesiyle başlamıştır (35,36).

1975 yılındaki genetik çalışmalar sonucunda *C.neoformans*'ta heterotallizmin saptanması, *C.neoformans* var. *neoformans* ile ilgili birçok çalışmanın aydınlatılmasında yardımcı olmuştur (52).

Whelan, 1980'de *C.albicans* ile genetik çalışmalara başlamış, Kurtz, 1986 yılında *C.albicans*'a *ade2* geninin transformasyonunu bildirmiştir. Ballance ve arkadaşları, vektör olarak kullandıkları bakteriyel plazmitler aracılığı ile *Neurospora crassa*'dan *A.nidulans*'a transformasyonu başarmışlardır (52).

1983 yılında Mullis'in PCR'ı mikroorganizmaların moleküler tanılarında kullanması sonucu mantarlar, bakteriler, virüs veya parazitlerin genetik yapıları, konaktaki transkripsiyonel aktiviteler ve enfeksiyona karşı oluşan yanıtta; testin üstün analitik gücünden dolayı kısa zamanda başarılı sonuçlar alınması, bu alanda yapılan çalışmalara hız ve değer kazandırmıştır (5,6,44).

van Belkum ve arkadaşları, 1993 yılında DNA parmak izi yöntemini kullanarak 15 klinik örnekten (ikişer yara, ağız sürüntüsü ve dışkı, üçer

bronkoalveoler lavaj sıvısı ve akciğer biyopsi örneği, birer perikard sıvısı, mide ve akciğer dokusu) yedi *A.fumigatus*, ikişer *A.terreus* ve *A.flavus*, birer *A.versicolor*, *P.boydii*, *Fusarium* ve *Rhizopus* cinsinden mantar saptamışlardır (85).

Caugant ve arkadaşları, 1979-1990 yılları arasında izole ettikleri 94 *C.albicans* suşuna MEE yöntemini uyguladıklarında suşların 4 ve 10'uncu enzim bölgelerinde polimorfizm olduğunu bildirmişlerdir (17).

Bretagne ve arkadaşları, 1995 yılında 52 bronkoalveoler lavaj sıvısı örneğini PCR ve kültürel yöntemler ile *Aspergillus* türleri açısından incelediklerinde; dördünü kültür, 15'ini (dördünün kültürü olumlu) ise PCR yöntemi ile olumlu olarak bulmuşlardır (15).

Spreadbury ve arkadaşları, 22 klinik örnekteki (12 bronkoalveoler lavaj sıvısı, dört bronşiyal yıkantı suyu, dört bronşiyal aspirat, birer balgam ve ağız sürüntüsü) *A.fumigatus* (401 bp) varlığını PCR yöntemi ile araştırdıklarında %36 civarında olumluluk saptamışlar ve kültür ile PCR uyumunu %93 olarak belirtmişlerdir (78).

Yamakami ve arkadaşları, 20 hastadan alınan kan örneklerinde PCR yöntemi ile *Aspergillus* cinsinden mantar araştırmışlar ve 14 örneğin olumlu olduğunu saptamışlardır (91).

Williams ve arkadaşları, Bfa1, Dde1 ve Hae3 restriksiyon enzimleri yardımı ile, ağızdan izole edilen 84 *Candida* suşunun RFLP profillerini çıkarmış; 41'inin *C.albicans*, 13'ünün *C.glabrata*, 10'unun *C.krusei*, altısının *C.tropicalis*, beşer tanesinin *C.kefyr* (*C.pseudotropicalis*) ve *C.parapsilosis*, üçünün *C.guilliermondii*, birinin de *C.stellotoidea* olduğunu bildirmişlerdir (88).

Einsele ve arkadaşları, 1992-1994 yılları arasında 601 kan örneğini PCR yöntemi ile incelemişler; olumlu 109 örneğin 40'ında *C.albicans*, 10'unda *C.tropicalis*, altışar tanesinde *C.parapsilosis* ve *A.flavus*, 11'inde *C.glabrata*, sekizer tanesinde *C.krusei* ve *A.fumigatus*, ikisinde *C.guilliermondii*, üçer

tanesinde *C.kefyr* ve *A.versicolor*, yedisinde *A.niger*, beşinde *A.nidulans* saptamışlardır (26).

Crist ve arkadaşları, 550 klinik örneğin (214 idrar, 176 solunum yolu örneği, 53 yara sürüntüsü, 44 dışkı, 23 kan, iki beyin omurilik sıvısı, 12 diğer çeşitli vücut sıvıları, 26 kaynağı bilinmeyen örnek) kültürlerinden 294'ünde *C.albicans*, 145'inde *C.glabrata*, 58'inde *C.tropicalis*, 33'ünde *C.parapsilosis* izole ettiklerini bildirmişlerdir (21).

Shin ve arkadaşları, BacT/Alert yöntemi ile incelenen 150 kan örneği kültürlerinin; 36'sında *C.albicans*, 19'unda *C.glabrata*, yedisinde *C.parapsilosis*, beşinde *C.tropicalis*, üçünde *C.krusei*, ikisinde *C.krusei+C.glabrata*, birinde *C.glabrata +C.albicans*, aynı sayıda örneğe uygulanan PCR-EIA tekniği ile de; 35'inde *C.albicans*, 18'inde *C.glabrata*, yedisinde *C.parapsilosis*, beşinde *C.tropicalis*, üçer tanesinde *C.krusei* ve *C.glabrata+C.albicans*, ikisinde *C.krusei+C.glabrata*'yı birlikte saptamışlardır (73).

Morace ve arkadaşlarının, nötropenik, ve hematolojik malignitesi olan 72 hastanın ateşli dönemlerinde ve antifungal kullanımı sırasında aldıkları kan örnekleri PCR ve kültürel yöntemler ile incelenmiş, PCR ile 31'i (24 *C.albicans*, ikişer tanesi *C.glabrata* ve *C.tropicalis*, üçü *C.kefyr*) olumlu, 41'i ise olumsuz olarak bulunmuştur. PCR'ı olumlu olarak saptanan hastalardan dördünün (üçü *C.albicans*, biri *C.tropicalis*) kültür sonuçları da olumlu olarak bildirilmiştir (65).

Ahmad ve arkadaşları, 76 *Candida* suşu ile yaptıkları çalışmada PCR ile Vitek ve ID32C testini karşılaştırmışlar; *C.albicans* suşlarında, PCR yönteminin Vitek ile %84, ID32C ile %85, *C.parapsilosis* suşlarında; Vitek ile %85, ID32C ile %100 uyumlu olduğunu bildirmişler, *C.tropicalis* suşlarında PCR yöntemi ile Vitek testi ve ID32C uyumunun %93, *C.glabrata* suşlarında PCR yönteminin Vitek testine %87, ID32 C'ye ise %100 oranında uyumlu olduğunu vurgulamışlardır. Semi nested PCR ile Vitek ve ID32C arasında *C.albicans*'da %100, *C.parapsilosis*'te %95, *C.tropicalis*'te %93, *C.glabrata*'da %100 oranında uyum gözlemlemişlerdir (1).

Loeffler ve arkadaşları, 95 nötropenik hastanın örneklerinden DNA ekstraksiyonu yapmışlar ve “in house” yöntemi ile 52’sini olumlu, 43’ünü olumsuz, ticari kit ile 51’ini olumlu 44’ünü ise olumsuz bulmuşlardır. İki DNA ekstraksiyon yöntemi arasında %99 oranında uyum olduğunu bildirmişlerdir (56).

Elie ve arkadaşları, 1998 yılında yaptıkları çalışmada 18 *Candida* türüne (*C.albicans*, *C.dubliniensis*, *C.glabrata*, *C.guilliermondii*, *C.haemulonii*, *C.kefyr*, *C.krusei*, *C.lambica*, *C.lusitaniae*, *C.norvegensis*, *C.norvegica*, *C.parapsilosis*, *C.pelliculosa*, *C.rugosa*, *C.tropicalis*, *C.utilis*, *C.viswanathii*, *C. zeylanoides*) özgü prob geliştirdiklerini bildirmişlerdir (27).

Bozdayı ve arkadaşları, 16’şar vajina sürüntüsü ve kan, birer kist ve intraabdominal sıvı, iki idrar örneğinden 35 *C.albicans* suşu izole etmişlerdir. Kültürü olumlu olarak bulunan 35 örneğe PCR uygulandığında duyarlılığın %88,6 olduğunu saptamışlardır (12).

Kalkancı ve arkadaşları, nötropenisi olan 49 hastadan aldıkları 107 kan örneğinde PCR yöntemi ile mantar DNA’sı araştırmışlar, 49 hastanın yedisinde (%14,2) genel (panfungal) primerler ile ve beşinde (%10,2)’de *Candida* primerleri ile olumlu sonuç bildirmişlerdir (42).

Skladny ve arkadaşları, 18S rRNA bölgesinden çoğaltılan *Aspergillus* türlerine özgü primerler ile 315 klinik örneğe (250 kan, 65 bronkoalveolar lavaj sıvısı) uygulanan PCR sonucunda kan örneklerinin %2,1’inde, bronkoalveolar lavaj sıvılarının %8,5’inde *Aspergillus* cinslerine (236bp) özgü bant saptamışlardır. PCR sonuçlarının; histopatoloji, kültür ve radyolojik bulgularla uyumlu ve duyarlılığın %100 olduğu, %89 civarında özgüllük saptandığı bildirilmiştir (74).

Turenne ve arkadaşları, 5.8S r DNA, 28S rDNA ve ITS2 gen bölgelerinden çoğaltılan primerler ile *C.albicans*’ı (279bp), *C.neoformans*’ı (316bp), *C.tropicalis*’i (268bp), *C.glabrata*’yı (359bp), *C.parapsilosis*’i (251bp), *C.krusei*’yi (282bp), *A.fumigatus*’u (284bp)’de tanımlamışlardır (79).

Bougnoux ve arkadaşları, ITS1 ve ITS4, ITS2-ITS3 gen bölgelerinden çoğalttıkları primerler ile *C.albicans*'ı (386bp), *C.tropicalis*'i (373bp), *C.glabrata*'yı (234bp), *C.parapsilosis*'i (336bp), *C.krusei*'yi (360bp)'de saptamışlardır (11).

Becker ve arkadaşları, 173 maya izolatının 93'ünde (84'ü insan, dokuzu hayvan kökenli) *C.glabrata*'yı mitokondrial ribozomda hedef alınarak çoğatılan primerler ile (978bp)'de tanımlamışlardır (8).

Li ve arkadaşları, 234 kültürü olumlu kan örneğinden, 237 maya (121 *C.albicans*, 50 *C.tropicalis*, 29 *C.glabrata*, 20 *C.parapsilosis*, altı *C.neofomans*, dört *C.krusei*, üç *C.guilliermondii*, bir *C.lusitaniae*, üç idantifiye edilemeyen maya) izole etmişler ve 234 kan örneğine 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2, ITS4 ve 26S rDNA gen bölgelerinden çoğaltılan türe özgü ve genel primerler ile uygulanan multipleks PCR test sonucunda; *C.albicans* (402bp), *C.glabrata* (632bp), *C.guilliermondii* (185bp), *C.krusei* (475bp), *C.lusitaniae* (116bp), *C.parapsilosis* (126bp), *C.tropicalis* (149pb) ve *C.neofomans* (516bp)'i tanımladıklarını bildirmişlerdir. Multipleks PCR'ın duyarlılığı araştırmacılar tarafından %98,7 (234/237) olarak saptanmıştır (54).

Hayette ve arkadaşları, 177 bronkoalveoler lavaj sıvısı ile yaptıkları çalışmada hastaları klinik özelliklerine göre; invazif veya kuşkulu invazif aspergillozlu (10 hasta), kolonizasyon düşünülen (beş hasta) ve aspergilloz kriterlerine uymayan (162 hasta) olmak üzere üç gruba ayırmışlar, invazif veya kuşkulu invazif aspergillozlu olgu örneklerinin hepsinin PCR ile olumlu, ikisinin kültürünün olumsuz olduğunu bildirmişlerdir. Kolonizasyon düşünülen olguların kültür ve PCR sonuçları olumlu bulunmuş, duyarlılığın %100, özgüllüğün ise %96 olduğu belirtilmiştir. Aspergilloz kriterlerine uymayan olgulara ait örneklerden %3,4'ünün yalancı olumlu sonuç verdiği gösterilmiştir (37).

Maaroufi ve arkadaşları, antifungal tedavi gören dört hastaya ait örnekten kültürel yöntemler ile olumsuz, PCR ile olumlu yanıt aldıklarını bildirmişlerdir (60).

Fujita ve arkadaşları, kültür ve Apı 20C ile tanımladıkları 75 maya suşuna (23 *C.albicans*, sekiz *C.glabrata*, 12 *C.tropicalis*, altışar *C.neofomans*, *C.krusei*

ve *C.parapsilosis*, dokuz *C.guilliermondii*, beş tanımlanamayan *Candida* cinsi) multipleks PCR yöntemi uygulamışlar, kültür sonuçlarıyla multipleks PCR'ın uyumlu olduğunu belirtmişlerdir. Kültür ile saptayamadıkları beş suşun ikisini multipleks PCR tekniği ile *C.guilliermondii* ve *C.krusei*, birini *C.zeylanoides* olarak idantifiye etmişlerdir (31).

Chang ve arkadaşları kan kültüründen multipleks PCR yöntemi ile iki çift primer kullanarak *C.glabrata* (482 ve 483bp), *C.guilliermondii* (248bp), *C.parapsilosis* (229bp), *C.albicans* (218 veya 219 ve 110bp), *C.tropicalis* (218 bp), *C.neoformans* (201bp) ve *C.krusei*'yi (182bp) tanımlamışlar duyarlılığın %96,9, özgüllüğün ise %87,5 olduğunu bildirmişlerdir (18).

Luo ve arkadaşları ise 'multipleks PCR' yöntemi ile iki ayrı panel altında primer çifti kullanarak *A.fumigatus* (385bp), *C.albicans* (273bp), *C.glabrata* (423bp), *C.parapsilosis* (320ve 300bp), *C.tropicalis* (357bp) ve *C.neoformans*'ı (136bp) saptamışlardır (59).

Moleküler yöntemlerin uygulandığı çalışmalardan anlaşıldığı gibi, araştırmacılar mantara ait genetik materyeli saptamak için var olan çeşitli yöntemlerden, kendi koşullarına uygun olanlarını yeğlemişlerdir. Bu çalışmada, DNA'nın saptanması amacı ile fenol kloroform izoamilalkol ve Loeffler'in (56) çalışmasında belirtilen ticari DNA ekstraksiyon kiti kullanılmış, her iki ekstraksiyon yöntemi karşılaştırıldığında aralarında uyumsuzluk olmadığı görülmüştür.

Çalışmada yer alan 50 immüsupressif hasta örneğinin 17'sinde (%34) kültürel yöntemler ile olumlu sonuç alınmış [16 *C.albicans* (%32), bir *C.parapsilosis* (%2)], 33 (%66) örnekte üreme olmamıştır.

Klinik örneklerin 14'ü kan olduğu için mikroskopi ve kültür uyumu 36 örnek üzerinden değerlendirilerek yapılmıştır. Altı (%16,6) örneğin mikroskopisi olumsuz, kültürü olumlu; yedi (%19,4) örneğin ise mikroskopi ve kültür sonuçları olumlu bulunmuştur. Mikroskopisi olumlu, kültürü olumsuz suş saptanmamış, 23 (%63,8) örneğin mikroskopi ve kültür sonuçları olumsuz yanıt vermiştir.

Sadece mikroskopi veya kültürün mikolojik tanıda yetersiz ve birlikteliğin zorunlu olduğu, diğer birçok çalışmada olduğu gibi bu çalışma sonuçları ile de bir kez daha yinelenmiştir.

Çalışmada ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, 5,8S rDNA ve 28S rDNA bölgelerinden çoğaltılan genel ve türe özgü primerlerin kullanılması sonucunda mantarlara özgü genel primer ile (550bp)'de, türe özgü primerlerin kullanılması ile: *C.albicans* (273bp), *C.parapsilosis* (320bp), *C.glabrata* (423bp), *C.tropicalis* (357bp), *A.fumigatus* (385bp) ve *C.neoformans* (136bp)'de bant saptanmıştır. Bu sonuçların Luo ve arkadaşlarının(59) verileri ile benzer olduğu görülmüştür.

Genel primerler ile yapılan PCR testi sonucunda incelenen tüm klinik örneklerin 27'sinde (%54) mantar DNA'sı gözlemlenmiş, 13 (%36,1) klinik örnek (kan dışında kalan) mikroskopik olarak incelendiğinde mantar elemanları görülmemiş, kültür ve PCR test sonuçları olumsuz bulunmuştur. Kültürleri olumlu bulunan 17(%34) örneğin tümünün mantar DNA'sı içerdiği belirlenmiştir. 10 (%20) klinik örnek kültürel yöntemler ile olumsuz, PCR ile olumlu sonuç vermiş; kültür sonucu olumlu, PCR'ı olumsuz örnek görülmemiştir. 23 (%46) klinik örnek; gerek kültürel gerekse PCR test yöntemi ile olumsuz yanıt vermiştir.

Kan dışındaki yedi (%19,4) örneğin mikroskopi, kültür ve PCR sonuçları olumlu bulunmuş; 16 (%44,4) örneğin mikroskopisi olumsuz ve PCR test sonucu olumlu olarak saptanmıştır. Örneklerden altısının (%16,6) mikroskopisi olumsuz, kültür ve PCR sonuçları olumlu bulunmuştur. Mikroskopi ve kültürü olumlu, PCR test sonucu olumsuz örnek görülmemiştir.

Mantar DNA'sı olumlu olan örneklerle türe özgü multipleks PCR yöntemi uygulandığında saptanan mantarların 24'ünün (%88,8) *C.albicans*, ikisinin (%7,4) *C.parapsilosis*, birinin (%3,7) *C.neoformans* olduğu belirlenmiştir. İdentifiye edilen mayalar sıklık sırasına göre incelendiğinde; *C.albicans*'ın %88,8 ile ilk sırayı aldığı görülmüştür.*C.albicans*'ın infeksiyon etkeni olarak öncelikli saptanması literatür bilgileri ile uyumludur.

İncelenen 24 bronkoalveoler lavaj sıvısı (BAL) örneğinin yedisinde (%29,1) doğrudan mikroskopik inceleme sonucunda mantar elemanları tespit edilmiştir. 12 (%50) örneğin kültüründe *C.albicans* izole edilmiş, 12 (%50) örnekte ise üreme olmamıştır. Genel primer ile yapılan PCR sonucunda örneklerin 17'sinde [(%70,8) beşinin kültürü olumsuz] mantar DNA'sı saptanırken, türe özgü multipleks PCR sonuçlarına göre DNA'ların tamamının *C.albicans* olduğu belirlenmiştir.

Kültürü yapılan 14 kan örneğinin, üçünde (%21,4) *C.albicans*, birinde (%7,1) *C.parapsilosis* olmak üzere dördünde (%28,5) üreme olmuştur. Genel primer ile yapılan PCR testi sonucunda kültürleri olumlu bulunan örneklerin tümünden mantar DNA'sı saptanmış (%28,5), kültürleri olumsuz olan örneklerde PCR testi ile olumsuz yanıt alınmıştır (%71,5). Türe özgü multipleks PCR test sonuçlarına göre mantarların üçü (%21,4) *C.albicans*, biri de (%7,1) *C.parapsilosis* olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar kültürel ve moleküler yöntemlerin uyumlu olduğunu göstermiştir.

İncelenen beş periton diyaliz, dört plevra ve birer perikard, beyin omurilik sıvılarının kültürleri steril kalmış, doğrudan mikroskopik incelendiklerinde mantar elemanlarına rastlanmamıştır. İdrar örneğinin mikroskopik incelenmesinde mantar elemanları görülmemiş, kültüründen *C.albicans* izole edilmiştir.

Genel primerler ile yapılan PCR sonucuna göre beş periton diyaliz sıvısı örneğinin dördü (%80), birer idrar ve beyin omurilik sıvısı örneğinde mantar DNA'sı saptanmıştır. Türe özgü multipleks PCR sonuçlarına göre ise periton diyaliz sıvısı örneklerinin üçünde (%60) *C.albicans*, birinde *C.parapsilosis* (%20); idrar örneğinde *C.albicans* ve beyin omurilik sıvısında *C.neoformans*'a ait DNA'lar bulunmuştur. Çalışma sonuçları, konu ile ilgili diğer araştırmacıların da belirttiği gibi "moleküler yöntemlerin kültüre kıyasla daha fazla olumluluk belirleyip, duyarlı olduğu" savı ile uyumluluk göstermektedir. Bu çalışmada saptanmış olan %100 duyarlılık oranının Skladny ve Hayette'in verileri ile tamamen; >%90 değer bildiren Li ve Chang'ın sonuçları ile de yüksek oranda benzer olduğu; özgüllük oranının (%69,7) ise Hayette, Skladny ve Chang

tarafından bildirilen %96, % 89 ve %87,5'dan daha düşük olduğu görülmüştür (18,37,54,74).

10 klinik örnek (beş bronkoalveoler lavaj, dört periton diyaliz ve bir beyin omurilik sıvısı) hastaların antifungal ile tedavi edildiği dönemde alınmış, onunun da kültürleri ve mikroskopi sonucu olumsuz kalırken, PCR testi ile tümü olumlu olarak saptanmıştır. Bu sonuç sistemik mikozlu hastaların erken tedaviye alınmaları açısından moleküler testlerin ne denli önemli olduğunu göstermektedir. Çalışma sonuçlarında moleküler yöntemlerin, gerek mikroskopi ve kültürün olumsuz olarak saptandığı koşullarda, gerekse kısa sürede yanıt alınabilmesi nedeni ile geleneksel yöntemler ile kıyaslandığında büyük üstünlük sağladığı görülmektedir.

Sonuçlar:

1. Mantar DNA'sını elde etmek için klasik fenol kloroform izoamilalkol ve DNA ekstraksiyon kiti kullanılmış, iki ekstraksiyon yöntemi arasında büyük bir fark olmadığı görülmüş, sadece fenol kloroform izoamil alkol yönteminde bir örnekte (BAL) kit ile elde edilemeyen mantar DNA'sı saptanmıştır. Ticari kit ile DNA'nın elde edilmesi 6-7 saatte tamamlanırken, bu süre fenol kloroform izoamilalkol yönteminde yaklaşık 9-10 saat olarak belirlenmiştir. Çalışmada DNA ekstraksiyonu için araştırmacıların kullandığı (56) gibi lizozim enzimi kullanılmıştır. Ancak deneyler sonucunda enzim ile işlem gören örneklerin araştırmacıların bildirdiği (lizozim için 37°C'de 30 dakika, proteinaz K için 55°C'de 15 dakika) inkübasyon süreleri uzatıldığında (lizozim için 37°C'de 2 saat, proteinaz K için 56°C'de 4 saat) daha iyi sonuçlar alındığı gözlemlenmiştir.
2. C.albicans referans suşu (ATCC 10231)'nin 10 katlı sulandırımının SDA'da 24 saatlik kültürleri sonucunda 10^{-4} 'e kadar üreme görülmesine rağmen, gerek fenol kloroform izoamilalkol yöntemiyle gerekse ticari kit ile DNA ekstraksiyonu ve ardından yapılan PCR testi sonucunda her iki izolasyon yönteminde de 10^{-3} 'e kadar mantar DNA'sı saptanabilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak mantarların hücre duvarlarının kalınlığı,

kapsüllü türlerinin ve sporlarının bulunması genetik materyallerinin saptanmasında sorun oluşturduğundan, mantar DNA'larının ekstraksiyonu için daha hassas yöntemlerin geliştirilmesi bir zorunluluk gibi görülmektedir.

3. Mikroskopi, kültür ve PCR olumlu yedi (%19.4); mikroskopi olumsuz, PCR olumlu 16 (%44.4), mikroskopi olumsuz kültür ve PCR olumlu altı (%16), örnek saptanmıştır. Hiçbir örneğin PCR'ı olumsuz kültür ve mikroskopisi olumlu bulunmamıştır.
4. Luo ve arkadaşları(59), multipleks PCR protokolünün uygulanmasında altı maya türünü (*A.fumigatus*, *C.albicans*, *C.neoformans* ve *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*) iki grup olarak kullanmıştır. Ancak araştırmacının önerdiği protokol uygulandığında yalancı bantlar görüldüğü için, bu çalışmada multipleks PCR protokolü (*C.tropicalis*, *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis*, *C.albicans*, *C.neoformans*) modifiye edilerek uygulanmıştır.
5. 50 immünsupressif hastaya ait klinik örneklerin 27 (%54)'sinde multipleks PCR yöntemi ile, 17(%34)'sinde de kültürel yöntemler ile olumlu yanıt alınmıştır.
6. Anamnezlerinde örneklerin gönderildiği dönemde antifungal tedavi altında oldukları belirtilen ve bu nedenden dolayı kültürel yöntem sonuçlarının olumsuz olduğu düşünülen 10(%20) hastanın tümü multipleks PCR testi ile olumlu yanıt vermiştir.
7. Çalışmada Kappa istatistiksel analiz testi yardımı ile kültür PCR uyumu 0,61($p<0,001$), mikroskopi PCR uyumu ise 0,24 ($p<0,001$) olarak saptanmıştır (3).
8. Uygulanan PCR yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %69,7 olarak belirlenmiştir.

Tıbbi önemi olan mantarların izolasyon ve idantifikasyonlarında geleneksel yöntemler (mikroskopi, kültür) halen altın standart olmalarına rağmen, bazı koşullarda; etken olabilen mantar; güç ve/veya geç ürediğinde, izole edilemediğinde veya üretilen mantarların idantifikasyonu benzer morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinden dolayı zorluk gösteriyor ya da yapılamıyorsa laboratuvarlarda moleküler tanı yöntemlerine gereksinim duyulur.

Genellikle; vücut direnci düşük, immünsüpressif, hastanede yatarak tedavi gören hastalar ileri dönemlerinde infeksiyona yakalandıklarından ve bu grupta yer alan hastalarda mortalite riski yüksek olduğundan genellikle klinik tanı esas alınarak etken saptanmadan hemen antifungal tedaviye başlanmaktadır. Antifungal etkisi altındaki klinik örneklerden mikroskopi ve kültürel yöntemlerle tanımlama hemen hemen olanaksızdır. Bu dönemde moleküler yöntemler ile genetik materyalin kısa zamanda saptanabilmesi hastanın yaşamı açısından son derece önemlidir. Ancak bazı çalışmalarda düşük olarak bildirilen yalancı olumluluk ve olumsuzluk oranlarının da gözardı edilmemesi gerekir.

Akademik ortamlarda özgün bir DNA parçasının bol miktarda eldesi ve moleküler analizini yapma çalışmaları günümüz teknolojisinde birçok araştırma ve araştırmacıyı yönlendirme açısından da oldukça önemlidir. Geleneksel yöntemler ile kıyaslandığında daha pahalı olması nedeni ile moleküler yöntemler özellikle ekonomisi yeterince güçlü olmayan ülkelerde mikolojiyi de içeren klinik mikrobiyoloji alanında rutin uygulamalardan ziyade doğrulama veya kapsamlı inceleme amacı ile ancak referans laboratuvarlarında uzman kişiler tarafından çalışılmaktadır. Uygulamada tercih edilmesi gereken testler, kullanım sırası ve şekilleri ülkelerin koşulları göz önüne alınarak belirlenmelidir. Ayrıca mikroskopi ve kültürel yöntemler ile çözümlenebilecek olgularda moleküler yöntemlerin uygulanması laboratuvar ve hastaya ayrı bir yük getirmesi nedeni ile de gereksiz ve anlamsızdır.

Bu nedenle yöntemlerin uygulanış sırasına dikkat edilmeli, gerekli testler gerekli zamanlarda yapılmalı, hiçbirini bir diğerinin yerine kullanılmamalıdır. Öncelikli olarak geleneksel yöntemler, gerektiğinde moleküler testlerin

uygulanması ve sonuçların klinik, histopatolojik, görüntüleme yöntemleri ile birleştirilip doğru yorumlanabilmesi, özellikle vurgulanması gereken kurallar olmalıdır.

6. KAYNAKLAR

1. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7):2483-9.
2. Ainsworth GC. *Introduction to the History of Medical and Veterinary Mycology.* Cambridge University press:1986.
3. Alpar R. *Spor Bilimlerinde Uygulamalı İstatistik.* 2.basım; Nobel kitabevi, İstanbul;2001.sayfa.219-55.
4. Aran N. Mikotoksin ile kontamine gıdaların insan sağlığı üzerine etkileri. İçinde Yeğenoğlu Y, Erturan Z, editörler. *3. Ulusal mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Tutanaklar.* Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:46; Çatı grafik,İzmir; 2003.sayfa.314-20.
5. Arı Ş. DNA'nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması. İçinde Temizkan G, Arda N, editörler. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler.* İstanbul Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİOGEM),yayın no:2; 2004.sayfa.101-20.
6. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Short Protocols in Molecular Biology* . 3rd ed, John Wiley&Sons pres,printed in USA.;1995.
7. Baddley JW, Dismukes WE. Cryptococcosis. İçinde Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD, editors. *Clinical Mycology.* Oxford:University press; 2003.pp.188-217.
8. Becker K, Badehorn D, Keller B, Schulte M, Bohm KH, Peters G, Fegeler W. Isolation and characterization of a species-specific DNA fragment for identification of *Candida (Torulopsis) glabrata* by PCR. *J Clin Microbiol.* 2001;39(9):3356-9.
9. Berg, DE; Akopyants, NS; Kersulyte, D. Fingerprinting microbial genomes using the RAPD or AP-PCR method. *Methods in Molecular and Cellular Biology.* 1994: 5(1): 13-24.

10. Bilgehan H. Candida'ların tarihçesi, ekolojisi ve dağılımı.İçinde Tümbay E, editör. *Candida ve İnfeksiyonları*.Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:6.Bigehan basımevi;1986.sayfa.1-8.
11. Bougnoux M, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D, Nicolas-Chanoine M. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR.*J Clin Microbiol.* 1999;37(4):925-30.
12. Bozdayı G, Kalkancı A, Biri A, Kuştımur S. Çeşitli örneklerden izole edilen ve ID32 C kiti ile Candida albicans olarak isimlendirilen suşların PCR ve klasik yöntemler ile yeniden tiplendirilmesi (sözlü bildiri no:9) .İçinde Kuştımur S, Kalkancı A. editörler.2.*Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:39. Sistem ofset,Ankara ; 2002 .sayfa.193.
13. Brandt ME, Padhye AA, Mayer LW, Holloway BP. Utility of random amplified polymorphic DNA PCR and TaqMan automated detection in molecular identification of *Aspergillus fumigatus*.*J Clin Microbiol.* 1998;36(7):2057-62.
14. Brandt ME, Warnock DW.Laboratory aspects of medical mycology.İçinde Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD, editors. *Clinical mycology*. Oxford:University press; 2003.pp.3-22.
15. Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, Poron F, Cordonnier C, Vidaud M, Fleury-Feith J. Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR.*J Clin Microbiol.* 1995;33(5):1164-8.
16. Bulut H,Duymaz MZ . Blotlama teknikleri ve mikrobiyolojide kullanımları. İçinde Durmaz R editör. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*.Kozen ofset,Ankara;2001.sayfa123-37.
17. Caugant DA, Sandven P. Epidemiological analysis of *Candida albicans* strains by multilocus enzyme electrophoresis.*J Clin Microbiol.* 1993;31(2):215-20.

18. Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3466-71.
19. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulia-Barrett SL, Lafe K, Bui U, Limaye AP, Cookson BT. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *J Clin Microbiol.* 2001;39(11):4042-51.
20. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulia-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol.* 2000;38(6):2302-10.
21. Crist AE Jr, Johnson LM, Burke PJ. Evaluation of the Microbial Identification System for identification of clinically isolated yeasts. *J Clin Microbiol.* 1996;34(10):2408-10.
22. Çerikçioğlu N. Yeni identifikasyon yöntemleri. İçinde Yeğenoğlu Y, Erturan Z. Editörler. 3. *Ulusal mantar hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Tutanaklar.* Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:46; Çatı grafik, İstanbul ; 2003. sayfa.182-90.
23. de Barros Lopes M, Soden A, Martens AL, Henschke PA, Langridge P. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int J Syst Bacteriol.* 1998;48:279-86.
24. Doymaz MZ, Bulut Y. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ve mikrobiyolojideki önemi. İçinde. Durmaz R editör. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji.* Kozen ofset, Ankara;2001. sayfa109-22.
25. Durmaz R. Polimeraz zincir reaksiyonunun tipleri. İçinde Durmaz R editör. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji.* Kozen ofset, Ankara;2001. sayfa. 35-43.
26. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Muller CA, Bowden RA, van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol.* 1997;35(6):1353-60.

27. Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. *J Clin Microbiol.* 1998;36(11):3260-5.
28. Espinel-Ingroff A. History of medical mycology in the united states. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(2):235-72.
29. Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2000; 50:1351-71.
30. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* . 11th ed. Mosby, Inc. an Imprint of Elsevier Science; 1998. pp.711-95.
31. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3617-22.
32. Gene J, Guillamon JM, Guarro J, Pujol I, Ulfing K. Molecular characterization, relatedness and antifungal susceptibility of the basidiomycetous *Hormoglyphiella* species and *Coprinus cinereus* from clinical and environmental sources. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1996;70(1):49-57.
33. Guarro J, Gene J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(3):454-500.
34. Guiver M, Levi K, Oppenheim BA. Rapid identification of *Candida* species by TaqMan PCR. *J Clin Pathol.* 2001;54(5):362-6.
35. Günalp A (çeviren). *Gen ve Moleküler Biyolojisi*. "Watson JD: Molecular Biology of the Gene kitabından" Hacettepe Üniversitesi yayınları, no:1; 1965. sayfa.57.
36. Hawthorne DC, Mortimer RK. Chromosome mapping in *Saccharomyces*: centromere-linked genes. *Genetics* .1960;45: 1085-110.
37. Hayette MP, Vaira D, Susin F, Boland P, Christiaens G, Melin P, De Mol P. Detection of *Aspergillus* species DNA by PCR in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol.* 2001;39(6):2338-40.

38. Hazen KC, Howell SA. Candida, Cryptococcus, and other yeasts of medical importance. İçinde Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed, ASM press, Washington DC; 2003. pp.1693-710.
39. Hui M, Ip M, Chan PK, Chin ML, Cheng AF. Rapid identification of medically important Candida to species level by polymerase chain reaction and single-strand conformational polymorphism. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;38(2):95-9.
40. İnci R. Mantarların yapıları, üreme özellikleri ve sınıflandırılması. İçinde Ustaçelebi Ş, editör. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş kitabevi; 1999. sayfa.1015-21.
41. İnci R. Aspergilloz. İçinde Ustaçelebi Ş, editör. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş kitabevi; 1999. sayfa.1093-98.
42. Kalkancı A, Kuştimur S, Güneş İ, Otlı B. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda invazif mantar enfeksiyonlarının tanısında polimeraz zincir reaksiyonunun kullanılması (poster no8). İçinde Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. *Candida Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu Tutanaklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:43. Oğü Basımevi, Eskişehir; 2002. sayfa.178.
43. Kasımoğlu Ö. Cryptococcus neoformans ekolojisi, dağılımı ve kriptokokkoz epidemiyolojisi. İçinde Tümbay E, editör. *Cryptococcus neoformans ve Kriptokokkoz*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:12. Bigehan basımevi; 1988. sayfa.1-8.
44. Kaufman PB, Wu W, Kim D, Cseke LJ. *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*. CRC pres, Boca Raton, Florida; 1995.
45. Kiraz N. Candida türlerinde fenotipik ve genotipik tiplendirme. Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş, editörler. *1. Ulusal mantar hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Tutanaklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:36; Ege Üniversitesi basımevi, İzmir; 1999; sayfa.125-35.
46. Koç AN. Tıp bakımından önemi olan Candida türlerinin mikolojik özellikleri. İçinde Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y, editörler. *Candida*

- Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Tutanaklar*.Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:43.Ogü Basımevi, Eskişehir;2002. sayfa.37-46.
- 47.Koç N.Mantarlarda moleküler tanı yöntemleri. İçinde. Kuştimur S, Kalkancı A. editörler.*2.Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:39. Sistem ofset, Ankara; 2002.sayfa.105-10.
- 48.Kurtzman CP. Molecular taxonomy of the yeasts.*Yeast*. 1994;10(13): 1727-40.
- 49.Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1998;73(4):331-71.
- 50.Kuştimur S. Candida'da virülans faktörleri. İçinde Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş. editörler.*1.Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi,Tutanaklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:36; Ege Üniversitesi basımevi,İzmir;1999.sayfa.145-50.
- 51.Kuştimur S.Dermatofitlerin patogenezi ve virülans faktörleri.İçinde Özbal Y, Koç AN editörler.*2.Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Simpozyumu,Dermatomikoz Etkenleri ve Dermatomikozlar, Tutanaklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:46; Erciyes Üniversitesi,Kayseri; 2004.sayfa.2-8.
- 52.Kwon-Cung KJ, Bennet JE. *Medical Mycology*.Lea&Febiger.1992
- 53.Laron DH.*Medically Important Fungi*. 3th ed.Wahington DC:ASM press;1995.
- 54.Li YL, Leaw SN, Chen JH, Chang HC, Chang TC. Rapid identification of yeasts commonly found in positive blood cultures by amplification of the internal transcribed spacer regions 1 and 2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003;22(11):693-96.
- 55.Loeffler J, Hebart H, Magga S, Schmidt D, Klingspor L, Tollemar J, Schumacher U, Einsele H. Identification of rare Candida species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization.*Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;38(4):207-12.

56. Loeffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol.* 1997;35(12):3311-2.
57. Loeffler J, Henke N, Hebart H, Schmidt D, Hagemeyer L, Schumacher U, Einsele H. Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):586-90.
58. Lucchini S, Thompson A, Hinton JC. Microarrays for microbiologists. *Microbiology.* 2001;147:1403-14.
59. Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40(8):2860-5.
60. 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;41(7):3293-8.
61. Maenza JR, Merz WG. Fungi. İnde. Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, editors. *Infection Diseases.* 3rd ed, Lippincott Williams&Wilkins; 2004.pp.2197-275.
62. Martin C, Roberts D, van Der Weide M, Rossau R, Jannes G, Smith T, Maher M. Development of a PCR-based line probe assay for identification of fungal pathogens. *J Clin Microbiol.* 2000;38(10):3735-42.
63. Meunier JR, Grimont PA. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res Microbiol.* 1993;144(5):373-9.
64. Monod M, Porchet S, Baudraz-Rosselet F, Frenk E. The identification of pathogenic yeast strains by electrophoretic analysis of their chromosomes. *J Med Microbiol.* 1990;32(2):123-9.
65. Morace G, Pagano L, Sanguinetti M, Posteraro B, Mele L, Equitani F, D'Amore G, Leone G, Fadda G. PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1871-5.
66. Odds FC, Gow NA, Brown AJ. Fungal virulence studies come of age. *Genome Biol.* 2001;2(3):1009.1-1009.4.

67. Ögünç D. Mantarlarda virülans faktörleri.İçinde Tuncer i, Fındık D, Arslan U,editörler.*4.Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi,Tutanaklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:49;2005. sayfa.11-20.
68. Patterson TF. Aspergillozis.İçinde Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD, editors. *Clinical Mycology*. Oxford:University press; 2003.pp.221-40.
69. Rippon JW.*Medical Mycology*. 3th ed. W.B.Saunders Company;press. 1988.
70. Saraçlı MA. Candida infeksiyonlarının laboratuvar tanısı: Moleküler ve genetik tanı yöntemleri.İçinde Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y.*Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Tutanaklar*.Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:43.Ogü Basımevi, Eskişehir; 2002.sayfa.133-44.
71. Saraçlı MA.Mikozların moleküler tanısı: Neredeyiz? .İçinde Tuncer i, Fındık D, Arslan U, editörler.*4.Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi,Tutanaklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:49;2005. sayfa.33-45.
72. Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of Candida species.*J Clin Microbiol*. 1987;25(4):675-9.
73. Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. Rapid identification of Candida species in blood cultures by a clinically useful PCR method. *J Clin Microbiol*. 1997;35(6):1454-9.
74. Skladny H, Buchheidt D, Baust C, Krieg-Schneider F, Seifarth W, Leib-Mosch C, Hehlmann R. Specific detection of Aspergillus species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR.*J Clin Microbiol*. 1999;37(12):3865-71.
75. Soll DR. High-frequency switching in Candida albicans.*Clin Microbiol Rev*. 1992;5(2):183-203.
76. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi.*Clin Microbiol Rev*. 2000;13(2):332-70.

77. Spitzer ED, Spitzer SG. Use of a dispersed repetitive DNA element to distinguish clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol.* 1992;30(5):1094-7.
78. Spreadbury C, Holden D, Aufauvre-Brown A, Bainbridge B, Cohen J. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1994;32 (8):2039.
79. Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1846-51.
80. Tümbay E. *Candida* türleri. İçinde Ustaçelebi Ş, editör. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş kitabevi; 1999. sayfa. 1081-86.
81. Tümbay E. *Cryptococcus neoformans*. İçinde Ustaçelebi Ş, editör. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş kitabevi; 1999. sayfa. 1087-91.
82. Uzun M. *Candida albicans*. . İçinde Ağaçfidan A, Anđ Ö, editörler. *Cinsel Temasla Bulaşan Hastalıklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:35. İstanbul; 1999. sayfa 375-77.
83. Uzun M. Mantarların tanısında moleküler tanı yöntemleri *Candida albicans*. İçinde Ağaçfidan A, Badur S, Türkoğlu S, editörler. *İnfeksiyon hastalıklarının laboratuvar tanısında moleküler yöntemler*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:42. İstanbul; 2002. sayfa. 182-4.
84. Valente P, Ramos JP, Leoncini O. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. *Can J Microbiol.* 1999;45(11):949-58.
85. van Belkum A, Quint WG, de Pauw BE, Melchers WJ, Meis JF. Typing of *Aspergillus* species and *Aspergillus fumigatus* isolates by interrepeat polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1993;31(9):2502-5.
86. Vazquez JA, Sobel JD. *Candidiasis*. İçinde Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD, editors. *Clinical Mycology*. Oxford: University press; 2003. pp. 143-87.
87. Welsh J, McClelland M. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(19):5275-9.

88. Williams DW, Wilson MJ, Lewis MA, Potts AJ. Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2476-9.
89. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990; 25:18(22):6531-5.
90. Yağcı A. Restriction fragment length polymorphism ve polimeraz zincir reaksiyon bazlı tiplendirme yöntemleri. İçinde. Durmaz R editör. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. Kozen ofset, Ankara; 2001. sayfa 149-71.
91. Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M. PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 1996;34(10):2464-8.
92. Yeğenoğlu Y. Kandidozların laboratuvar tanısı. İçinde Ağaçoğlu A, Anđ Ö. editörler. *Cinsel Temasla Bulaşan Hastalıklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:35. İstanbul; 1999. sayfa. 379-82.
93. Yeğenoğlu Y. Mantarlar. İçinde Bozkaya E, editör. *Tıbbi Mikrobiyoloji-1*. Nobel tıp kitabevi; 2002. sayfa. 181-92.
94. Yücel A. *Cryptococcus neoformans*'ın mikolojisi. İçinde Tümbay E, editör. *Cryptococcus neoformans ve Kriptokokkoz*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:12. Bigehan basımevi; 1988. sayfa. 9-21.
95. Yücel A. Tıp mikolojisinin dünü bugünü. İçinde. Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş. editörler. *1. Ulusal mantar hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Tutanaklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:36; Ege Üniversitesi basımevi, İzmir; 1999. sayfa. 3-15.
96. Yücel A. *Candida*'ların dünü. İçinde Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Tutanaklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:43. Oğü Basımevi, Eskişehir; 2002. sayfa. 3-28.
97. Yücel A. Tıp bakımından önemli *Candida* türlerinin mikolojisi. İçinde Tümbay E, editör. *Candida ve İnfeksiyonları*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları No:6. Bigehan basımevi; 1986. sayfa 9-22.

98. Zhao J, Kong F, Li R, Wang X, Wan Z, Wang D. Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol.* 2001;39(6):2261-6.

ETİK KURUL KARARI

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI

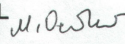
Toplantı Tarihi: 14.07.2004
Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Pembe Salon
Toplantı Sayısı: 07
Prot.No.Sayısı :

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Yıldız Yeğenoğlu'nun, üstlendiği Dr.Serdar Susever'in yürüteceği "İnvaziv mantar infeksiyonlarının tanımlanmasında moleküler yöntemlerin önemi; uygulanması ve geleneksel yöntemler ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi" isimli tek merkezli tanı testi geliştirmeye yönelik çalışma kurulumuzda incelendi, etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr.Deniz **SARGIN**



Prof.Dr.Mübeccel **DEMİRKOL**



Prof.Dr.Berrin **UMMAN**

Prof.Dr.Cahide **GÖKKUŞU**

Prof.Dr.Koray **ACARLI**

Prof.Dr.Selim **BADUR**

Prof.Dr.Aykan **CANBERK**

Prof.Dr.Emin **DARENDELİLER**

Prof.Dr.Beyhan **ÖMER**

Prof.Dr.Oğuzhan **COBAN**

Prof.Dr.Veli **UYSAL**

Prof.Dr.Kamil **PEMBECİ**

Prof.Dr.Nuran **YILDIRIM**



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Serdar	Soyadı	Susever
Doğum Yeri	İskenderun	Doğum Tarihi	8.03.1976
Uyruğu	T.C.		
Tel	0532 314 43 26	Email	ssusever2@yahoo.com

Eğitimi

Eğitim Düzeyi	Lise / Fakülte, Üniversite	Mezuniyet Yılı
Doktora	İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul Üniversitesi	2006
Yüksek Lisans	İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul Üniversitesi	1999
Fakülte/Yük.Okul	Fen Fakültesi, İstanbul Üniversitesi	1997
Lise	Burhan Felek Lisesi	1993

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Asistan	İstanbul Tıp Fakültesi	1998-
2.		-
3.		-

Yabancı Dilleri

	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi
İspanyolca	Orta	Orta	Orta
Almanca	-	-	-

Çok iyi, iyi, orta, zayıf, - olarak değerlendirin

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word, excel, power point	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlar:

Uluslararası yayınlar:

- 1- Anđ-Küçüker M,Büyükbaba-Boral Ö,Tolun V,Törümküney D,_Susever S, Anđ Ö: Effect of some antibiotics on pigmentation in *Serratia marcescens*. *Zent. Bl.Bacteriol.* 1999;289.781.
- 2- Anđ-Küçüker M, Tolun V,Büyükbaba-Boral Ö, Diren S,_Güngör G, Susever, S Boral Ö, Anđ Ö From Turkey: First isolation of E.coli O157. *Notiziario.* 1999;12(10).1.
- 3- Anđ-Küçüker M, Tolun V, Helmut H, Rabsch W, Boral Ö,Akbulut D, Susever S, Anđ Ö: Salmonella enteritidis strains in İstanbul, Turkey. *Clin. Microbiol. Infect.* 2000;6.593.
- 4- Kucukates E, Erturan Z, Susever S, Yegenoglu Y.In vitro susceptibility of yeasts isolated from patients in intensive care units to fluconazole and amphotericin B during a 3-year period. *APMIS.* 2005;113(4).278-83.
- 5- Can SK, Budak F, Yucesoy G, Susever S, Willke A.Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women.*APMIS.* 2006 ;114(2).139-45.
- 6- İssever H, Hapçioğlu B, Özdilli K, Koçyiğit E, Kaymakçalan H, Yeğenoğlu Y, Öztürk O, Agkoç S, Topuzoğlu A, Önoğlu N, Işık E, Susever S, Çalac B, Gürtekin B. Assesment of nasal flora and respiratory function tests of bakery workers , working under modern conditions. *Indoor Built Environ.*2006;15(2):197-202.

Ulusal Yayınlar:

- 1- Tolun V, Törümküney Akbulut D, Susever S, Katrancı H, Derbentli Ş, Anğ Küçüker M, Anğ Ö: Metisiline dirençli Staphylococcus aureus suşlarının faj tipleri, siderofor sentez yetenekleri., antibiyotiklere ve ağır metallere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2001;31. 143 .
- 2- Tolun V, Susever S, Yılmaz G, Anğ-Küçüker M, Anğ Ö: İstanbul 'da satılan süt ve süt ürünlerinde Salmonella ve Verotoksijenik Escherichia (VTEC) varlığının araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Der* 2002;32.48-54.

Bildiriler:

Uluslararası bildiriler:

- 1- Susever S, Aydın D, Anğ Ö: Epidemiological data on male patients with urethritis. *Recent Advances in The Diagnosis of Sexually Transmitted Diseases*. İstanbul, Turkey ;1998.p.54.
- 2- Anğ-Küçüker M, Boral Ö, Susever S, Tolun V, Törümküney D, Ögüt T, Anğ Ö: Relationship between haemolysin types and antibiotic resistance among E.coli strains. *10th European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases* Stockholm-Sweden ;2000.p.105.
- 3- Anğ-Küçüker M, Tolun V, Diren Ş, Günay G, Susever S, Anğ Ö: First report on isolation of E.coli 0157 in Turkey. *9th International Congress on Infectious Diseases* Buenos Aires- Argentina ;2000.p227.
- 4- E.Küçükateş, Erturan Z, Susever S, Yeğenoğlu Y: Yeasts isolated from patients in the coronary and surgical intensive care units and their susceptibilities to fluconazole and amphotericin B. *Mycoses* V.45;2002. p.33.
- 5- Yeğenoğlu Y, Özel M, Susever S, Gürler N, Vatansever S, Akkaya V: Can Alternaria be the cause of disease. *10th Congress of the European Confederation of Medical Mycology*;2004.p.74.
- 6- Yeğenoğlu Y, Susever S, Kiraz M, Uzun M, Erturan Z: Onychomycoses in İstanbul: 2000-2003. *10th Congress of the European Confederation of Medical Mycology*;2004.p.83.

Ulusal bildiriler:

1. Törümküney D, Tolun V, Anđ-Küçüker M, Anđ Ö, Susever S, Derbentli Ş, Katrancı H: Neonatal infeksiyon aktivitesi gösteren Klebsiella pneumoniae suşları. 8'inci *Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi* Antalya-Türkiye ;1997.s.633.
2. Susever S, Anđ Ö: Salmonella suşlarında katalaz aktivitesi. *28'inci Türk Mikrobiyoloji Kongresi*. Antalya-Türkiye;2000.s.324.
3. Kiraz M, Susever S, Uzun M, Erturan Z, Yeğenoğlu Y: Çeşitli hasta gruplarının dışkı örneklerinden üretilen mantarlar. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti 70'inci Yıl Bilimsel Toplantısı*, Bursa-Uludağ ;2001.s.311.
4. Yeğenoğlu Y, Hapcıoğlu B, Susever S, İnce N, Saygılı H: Çeşitli jinekolojik yakınmalı hastalarda vulvovaginal Candida taşıyıcılığı ve demografik özellikler. *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu*, Eskişehir ;2002. s.183.
5. Susever S, Ağırbaşı H, Erturan Z, Yeğenoğlu Y, Morschausser J: Lösemili hastalardan izole edilen Candida albicans suşlarının moleküler tiplendirilmesi. *3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Mikoloji Kongresi*, Bodrum; 2003. s .160.
6. Yeğenoğlu Y, Erturan Z, Kiraz M, Uzun M, Boral Ö, Susever S, Çimen A, Yavuz S, Atamer T: Akut lenfoblastik lösemili bir hastadan soyutlanan difazik mantar. *3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Mikoloji Kongresi*, Bodrum;2003 s.344.
7. Atasever L, Demir D, Kiraz M, Susever S, Arıdoğan A, Yeğenoğlu Y, Öztürk A:Paranasal sinüs infeksiyonlarından etken olabilecek mantarların araştırılması. *3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Mikoloji Kongresi*, Bodrum;2003 s.352.
8. Susever S, Yeğenoğlu Y, Sütlaş M: Lepralı hastaların ağızlarından izole edilen Candidaların esteraz ve hemolitik aktiviteleri. *3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Mikoloji Kongresi*, Bodrum;2003 s.362.

9. Susever S, Ağırbaşı H, Erturan Z, Yeğenoğlu Y: Lösemili çocuklardan soyutlanan *Candida albicans* suşlarında esteraz ve hemolitik aktivitelerinin araştırılması. *3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Mikoloji Kongresi*, Bodrum;2003 s.363.
10. Susever S, Kiraz M, Erturan Z, Uzun M, Yeğenoğlu Y: Dermatofit suşlarının bazı antifungal ilaçlara karşı invitro duyarlılığı ve esteraz aktivitesinin araştırılması. İçinde Özbal Y, Koç N editör: *2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Simpozyumu Dermatomikoz etkenleri ve dermatomikozlar Tutanaklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını. No.48;2004. s.193.
11. Susever S, Keçeli S, Uzun M, Yeğenoğlu Y: Vulvovaginal kandidoz olgularından izole edilen *C. albicans* suşlarında esteraz, lipaz, proteinaz ve fosfolipaz enzim aktivitelerinin araştırılması, *1. Ulusal Cinsel Yolla Bulaşan İnfeksiyonlar Simpozyumu*. Simpozyum Kitabı;2004.s.84
12. Hapçioğlu B, Susever S, Yeğenoğlu Y: İstanbul'un çeşitli semtlerinden alınan meyva sularının mikolojik açıdan değerlendirilmesi, *XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı* ;2004.s.382
13. Susever S, Hasöksüz M, Ilgaz A, Yeğenoğlu Y: *Candida* türleri ile *C. neoformans* için Multiplex PCR geliştirilmesi, DNA saflaştırma kitlerinin karşılaştırılması ve farklı *C. albicans* izolatlarının ITS genlerinin sekans analizleri. *4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Tutanaklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.49;2005. s.175.
14. Yeğenoğlu Y, Susever S, Uzun M, Erturan Z, Kiraz M: İmmün sistem yetmezliği olan invazif aspergilloz kuşkulu hastalarda *Platelia Aspergillus* sandviç ELISA ile galaktomannan antijeni araştırılması. *4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Tutanaklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.49;2005. s.191.
15. Yeğenoğlu Y, Susever S: Yeni bir test kiti (BICHRO_DUBLI FUMOUZE) ile *Candida dubliniensis* tanısına yaklaşım. *4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Tutanaklar*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını. No.49;2005. s.215.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Skuba, gitar ve piyano çalmak, pul ve para koleksiyonu.