

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KATETERİZE HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *CANDIDA*
SUŞLARININ OLASI MİNİ EPİDEMİLER AÇISINDAN
ARAŞTIRILMASI**

Efdal OKTAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Feza OTAĞ

MERSİN – 2013

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KATETERİZE HASTALARDAN İZOLE EDİLEN *CANDIDA*
SUŞLARININ OLASI MİNİ EPİDEMİLER AÇISINDAN
ARAŞTIRILMASI

Efdal OKTAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Feza OTAĞ

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE TMB (EO) 2012-7 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 247

MERSİN - 2013


Kabul ve Onay


Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü


Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan 'Kateterize Hastalardan İzole Edilen *Candida* Suşlarının Olası Mini Epidemiler Açısından Araştırılması' başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

25/12/2013


Prof. Dr. Gülşen EMEKDAŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Feza OTAĞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi/Danışman


Doç. Dr. Aylin DÖĞEN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 31.12.2013 tarih ve 2013/312 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. S. Necat Yılmaz


TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım andan itibaren her konuda yardımlarını ve desteğini gördüğüm, anlayışlı tavrı ile bilimsel çalışma disiplini ve tecrübelerini örnek aldığım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı hocam Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ'a,

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile her zaman yanımda olan, tez çalışmamın planlanması ve gerçekleştirilmesinde her türlü yardım ve desteklerini esirgemeyen, çalışma boyunca öneri, eleştiri ve rehberlikleriyle yol gösteren çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Feza OTAĞ'a,

Bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN, Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Prof. Dr. Nuran DELIALIOĞLU, Sayın Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN, Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Mahmut ÜLGER ve Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Şahin DİREKEL'e

Aynı zorlukları, sevinçleri ve üzüntüleri paylaştığım, her türlü konuda desteğini ve yardımlarını esirgemeyen değerli yüksek lisans arkadaşlarıma,

Tez çalışmam boyunca laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Laboratuvarında görev yapan Kevser ELÇİ başta olmak üzere anabilim dalında çalışan tüm arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da sonsuz sabır ve anlayışlarıyla beni destekleyen çok değerli annem, babam ve kardeşime,

Sonsuz teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Kabul ve Onay	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. <i>Candida</i> Türleri	2
2.1.1. <i>Candida albicans</i>	3
2.1.2. <i>Candida glabrata</i>	4
2.1.3. <i>Candida tropicalis</i>	5
2.1.4. <i>Candida parapsilosis</i>	5
2.1.5. Diğer <i>Candida</i> Türleri.....	6
2.2. ADC Türlerinde Patojenite ve Virulans Faktörleri	9
2.2.1. Yapışma (Aderans)	9
2.2.2. Biyofilm Yapımı	10
2.2.3. Enzimler ve Doku İnvazyonu	12
2.2.4. Filamentöz Büyüme	14
2.2.5. Morfolojik Değişim	15
2.2.6. Fenotipik Değişim.....	15
2.3. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri	16

2.4. Kolonizasyon.....	19
2.5. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarında Lokal ve Sistemik Direnç	20
2.6. Antifungal Tedaviler ve ADC Türlerine Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları	22
2.7. Hastane İnfeksiyonları ve <i>Candida</i> 'lar	24
2.8. Laboratuvar Tanısı	27
2.8.1. Doğrudan Mikroskopik İnceleme	27
2.8.2. Kültür ve İdentifikasyon	28
2.8.2.1. Çimlenme Borusu Deneyi	29
2.8.2.2. Hif, Blastospor ve Klamidospor Yapılarının İncelenmesi	29
2.8.2.3. Biyokimyasal Testler	30
2.8.2.4. Kromojenik Besiyerinde Üreme	32
2.8.3. Serolojik Testler	32
2.8.4. İn situ Hibridizasyon Yöntemi ile <i>Candida</i> 'nın Tanımlanması.....	35
2.8.5. Moleküler Yöntemler.....	35
2.8.5.1. RAPD-PZR (Randomly amplified polymorphic DNA)	37
2.8.5.2. Rep-PZR (Repetitive Extragenic Palindromic Element)	38
3. GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.1. Hasta Örneklerinin Toplanması.....	39
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	39
3.2.1. Cihazlar	39
3.2.2. Kimyasal Malzemeler	40
3.2.3. Kitler	41
3.2.4. Primerler	42
3.2.5. Besiyerleri	42
3.2.6. Hızlı Tanı Testleri	42
3.2.7. Standart Suşlar	43
3.3. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması	43
3.3.1. Kanlı Agar.....	43
3.3.2. Eosin Methylen Blue.....	43
3.3.3. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)	44
3.3.4. Sabouraud Dekstroz Buyyon (SDB)	44
3.3.5. Tween 80'li Mısırunlu Agar	45

3.3.6. %10 Gliserollü Buyyon Besiyeri	45
3.3.7. Taze Donmuş Plazma (TDP)	46
3.3.8. R.A.T (Rapid Assimilation Test)	46
3.4. Kültür ve İdentifikasyon.....	47
3.5. Moleküler Tiplendirme.....	49
3.5.1. RAPD-PZR	49
3.5.1.1. DNA İzolasyonu.....	49
3.5.1.1.1. Fenol kloroform yöntemi ile DNA İzolasyonu	49
3.5.1.1.2. Qiagen Hazır Kit Yöntemi ile DNA İzolasyonu	49
3.5.1.1.3. Dondurma-Kaynatma Yöntemi ile DNA İzolasyonu	50
3.5.1.2. RAPD-PZR Amplifikasyonu	51
3.5.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi	52
3.5.1.4. Elektforez Sonuçlarının Gözlenmesi	53
3.5.2. REP-PZR DiversiLab Sistemi ile Moleküler Tiplendirme	53
3.5.2.1. DNA İzolasyonu ve Miktarlarının Ölçülmesi	54
3.5.2.2. Rep-PZR Amplifikasyonu	55
3.5.2.2.1. DiversiLab DNA Labchip Uygulaması.....	56
3.5.2.3. İzolatların Rep-PZR Parmak İzi İlişkilerinin Değerlendirilmesi	57
4. BULGULAR	58
5. TARTIŞMA.....	86
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	92
7. KAYNAKLAR.....	94
ÖZGEÇMİŞ.....	107

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>Candida</i> türlerinin Tween 80'li Mısır unlu agarda mikroskopik yapıları ve CHROMagar'daki makroskopik kolonileri.....	8
Şekil 3.1. Kullanılan İdentifikasyon Yöntemlerinin Algoritması.....	48
Şekil 4.1. <i>Candida</i> suşlarının izole edildiği klinik materyale göre dağılımı	58
Şekil 4.2. <i>C. tropicalis</i> ve <i>C. glabrata</i> 'nın servislere göre dağılım oranı	61
Şekil 4.3. <i>C. parapsilosis</i> 'in servislere göre dağılımı	62
Şekil 4.4. <i>C. parapsilosis</i> suşlarının RAPD-PZR sonrası jel elektroforez görüntüsü.....	66
Şekil 4.5. <i>C. glabrata</i> suşlarının RAPD-PZR sonrası jel elektroforez görüntüsü	67
Şekil 4.6. <i>C. tropicalis</i> suşlarının RAPD-PZR sonrası jel elektroforez görüntüsü.....	68
Şekil 4.7. <i>C. parapsilosis</i> klonlarına ait dendogram.....	70
Şekil 4.8. <i>C. parapsilosis</i> klonlarına ait benzerlik matriksi.....	71
Şekil 4.9. <i>C. parapsilosis</i> ana klonlarına ait dendogram	72
Şekil 4.10. <i>C. parapsilosis</i> ana klonlarına ait benzerlik matriksi	72
Şekil 4.11. <i>C. parapsilosis</i> A ana klonlarına ait benzerlik matriksi	73
Şekil 4.12. <i>C. parapsilosis</i> A ana klonuna ait dendogram	74
Şekil 4.13. <i>C. parapsilosis</i> B alt klonlarına ve C klonuna ait dendogram.....	75
Şekil 4.14. <i>C. parapsilosis</i> B alt klonlarına ve C klonuna ait benzerlik matriksi.....	76
Şekil 4.15. <i>C. glabrata</i> suşlarına ait benzerlik matriksi	77
Şekil 4.16. <i>C. glabrata</i> suşlarına ait dendogram	78
Şekil 4.17. <i>C. glabrata</i> ana klonlarına ait dendogram.....	79
Şekil 4.18. <i>C. glabrata</i> ana klonlarına ait benzerlik matriksi.....	79
Şekil 4.19. <i>C. glabrata</i> A ana klonuna ait dendogram	80
Şekil 4.20. <i>C. glabrata</i> A ana klonuna ait benzerlik matriksi	81
Şekil 4.21. <i>C. glabrata</i> B ana klonuna ait dendogram	82
Şekil 4.22. <i>C. glabrata</i> C ana klonuna ait dendogram	83
Şekil 4.23. <i>C. glabrata</i> C ana klonuna ait benzerlik matriksi	84
Şekil 4.24. <i>C. glabrata</i> D,E,F ana klonuna ait dendogram.....	85
Şekil 4.25. <i>C. glabrata</i> D,E,F ana klonuna ait benzerlik matriksi.....	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. İnsanda İnfeksiyon Oluşturan <i>Candida</i> Türleri.....	2
Çizelge 2.2. <i>Candida</i> Türlerinin Özellikleri.....	3
Çizelge 2.3 <i>Candida</i> Skorlaması.....	20
Çizelge 2.4. <i>Candida</i> türlerinin genotiplendirilmesinde sıklıkla kullanılan yöntemler.....	36
Çizelge 3.1. RAPD-PZR 2X Amplifikasyon Karışımı.....	51
Çizelge 3.2. RAPD-PZR Reaksiyon Karışımı.....	51
Çizelge 3.3. RAPD-PZR Amplifikasyon Şartları.....	52
Çizelge 3.4. Rep-PZR amplifikasyonunda bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı ...	55
Çizelge 3.5. Rep-PZR Amplifikasyon Koşulları.....	55
Çizelge 4.1. <i>Candida</i> suşlarının izole edildiği klinik örnekler	58
Çizelge 4.2. <i>Candida</i> izole edilen hastaların demografik özellikleri ve altta yatan hastalıkları	59
Çizelge 4.3 <i>C. parapsilosis</i> izole edilen hastaların yaş grupları.....	60
Çizelge 4.4. <i>C. tropicalis</i> izole edilen hastaların yaş grupları.....	60
Çizelge 4.5. <i>C. glabrata</i> izole edilen hastaların yaş grupları	61
Çizelge 4.6. <i>C. glabrata</i> suşlarının aylara göre dağılımı.....	63
Çizelge 4.7. <i>C. tropicalis</i> suşlarının aylara göre dağılımı	64
Çizelge 4.8. <i>C. parapsilosis</i> suşlarının aylara göre dağılımı.....	65

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADC: Albicans dışı *Candida*

CA: Kanser

c gl: *Candida glabrata* ATCC 90030

c pr: *Candida parapsilosis* ATCC 90018

c trp: *Candida tropicalis* ATCC 2014

CYB: Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi

DM: Diabetes Mellitus

DYB: Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi

HT: Hipertansiyon

KOAH: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

KVH: Kardiyovasküler Hastalıklar

KVYB: Kardiyovasküler Yoğun Bakım Ünitesi

PYB: Pediatri Yoğun Bakım Ünitesi

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RAPD-PZR: Randomly amplified polymorphic DNA PZR

R.A.T: Rapid Assimilation Test (Hızlı Asimilasyon Testi)

REA: Anestezi ve Reanimasyon Ünitesi

Rep-PZR: Repetitive Extragenic Palindromic Element-PZR

SDA: Sabouraud Dekstroz Agar

SDB: Sabouraud Dekstroz Buyyon

SVK: Santral Venöz Kateter

TDP: Taze Donmuş Plazma

YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi

TPN: Total Parenteral Nutrisyon

ÖZET

Kateterize Hastalardan İzole Edilen *Candida* Suşlarının Olası Mini Epidemiler Açısından Araştırılması

Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda kateterizasyona bağlı olarak gelişen fungal infeksiyonlar arasında en sık kan dolaşımı infeksiyonları ve üriner sistem infeksiyonları görülmektedir. Bu çalışmada, hastanemizdeki tüm yoğun bakım ünitelerindeki kateterize hastaların idrar ve kan örneklerinden izole edilen *Candida* suşlarında hastane infeksiyonları bakımından genetik yakınlığın incelenmesi amaçlanmıştır. Ocak 2010-Haziran 2013 tarihleri arasında izole edilen 98 *Candida* suşu (kateter idrar örneklerinden 35 *C. glabrata* ve 30 *C. tropicalis*, santral venöz kateterden alınan kan örneklerinden 33 *C. parapsilosis*) çalışmaya dahil edilmiştir. Klasik yöntemlerle tür tanısı yapılan *Candida* suşlarının genetik yakınlıkları biri manuel, RAPD-PZR, diğeri yarı-otomatik rep-PZR (DiversiLab, bioMerieux, Fransa) yöntemle çalışılmış ve sonuçları karşılaştırılmıştır. RAPD-PZR analizi sonucunda *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* suşlarında 3'er, *C. tropicalis* suşlarında 2 farklı klon saptanmıştır. Rep-PZR analizi sonucunda ise *C. glabrata* suşlarında 6, *C. parapsilosis* suşlarında 3 farklı klon saptanmıştır, ancak ticari ekstraksiyon kitiyle yeterli DNA izole edilemediğinden *C. tropicalis* suşlarıyla sonuç alınamamıştır. Sonuç olarak, kateterize hastalarda *Candida* suşlarıyla nozokomiyal eksojen bulaş derecesinin yüksek olduğu ve aynı klonun hastane ortamında uzun süre kalabildiği görülmektedir. RAPD-PZR, DNA ekstraksiyon ve amplifikasyonunda değişik alternatiflerin kullanılabilirdiği bir yöntem olması nedeniyle, yarı otomatize rep-PZR kapalı sistemine göre daha kullanışlı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Nozokomiyal infeksiyon, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, RAPD-PZR, Rep-PZR.

ABSTRACT

Investigating of *Candida* Strains Isolated From Catheterized Patients in Terms of Possible Mini Epidemic

Bloodstream infections and urinary tract infections are seen the most common infections among the hospitalized patients who have developed fungal infections due to the catheterization in the intensive care units (ICU). In this study it was aimed to examine the clonal relationship in terms of hospital infections in the *Candida* strains which were isolated in ICU's of our hospital. 98 isolates of *Candida* strains (35 *C. glabrata* and 30 *C. tropicalis* strains from catheter urine samples, 33 *C. parapsilosis* strains from CVC blood samples) were included in the study between January 2010 - June 2013. Clonal relationships of *Candida* strains which were type diagnosed by the conventional methods were determined by RAPD-PCR and semi-automated rep-PCR (DiversiLab, bioMerieux, Fransa) system. As a result of RAPD-PCR analysis 3 different band patterns in the *C.glabrata* strains, 3 different band patterns in the *C. parapsilosis* strains, 2 different band patterns in the *C. tropicalis* strains were determined. As a result of Rep-PCR analysis ,6 different clone has been detected in strains of *C.glabrata* and 3 different clone has been detected in strains of *C. parapsilosis*, but with the commercial extraction kit, it was unable to obtain sufficient DNA isolated. So that, results have not been obtained with the *C.tropicalis* strains. As a result, at catheterized patients, with *Candida* strains, it is observed that the degree of nosocomial exogenous transmission is high and also the same clone can stay longer in the hospital atmosphere. Due to different alternatives usage in extraction and amplification of DNA, RAPD- PCR method has been found more useful than half-automatize Rep-PCR closed system.

Keywords: Nosocomial infection, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, RAPD-PCR, Rep-PCR.

1. GİRİŞ

Candida türleri doğada yaygın olarak bulunan ve hem yüzeysel hem de derin infeksiyonlara neden olabilen maya mantarlarıdır. Yüzeysel infeksiyonlar çoğunlukla toplum kökenli iken, derin sistemik infeksiyonlar nozokomiyal kaynaklıdır (1). Çok eski yıllardan beri bilinen mantar hastalıkları, büyük epidemilere yol açmamaları ve ciddi mortalite oluşturmamaları nedeniyle fazla önemsenmemiş, ancak son yıllarda hastanede yatan hastalarda görülen fırsatçı nitelikteki mikozların mortal seyretmesi ve prognozu ileri derecede bozması konunun güncelleşmesine neden olmuştur (2). Modern tedavi yaklaşımlarının gelişmesi, kemoterapi ve diğer immünespresif tedavi alan hastaların sayısının artması, transplantasyon cerrahisinin gelişmesi, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, yoğun bakım ünitesi (YBÜ)'de yatan hasta sayısının artması ve hastalara uygulanan invazif işlemler nedeniyle *Candida* infeksiyonlarının sıklığı son yıllarda belirgin bir artış göstermiştir (3). Türkiye'de *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*, *C. albicans*'tan sonra en sık kandidemi yapan türlerdir. *C. parapsilosis* daha çok deri ve mukozadan kaynaklanan kandidemiye yol açmaktadır. Bu tür, kateter ve implantlarda biyofilm oluşturma ve hastane ortamında kalıcılığı yanında bebek ve yenidoğan infeksiyonlarıyla bilinmektedir (4). Bir üniteye kan kültürlerinden *C. parapsilosis* üremesi infeksiyon kontrolünün eksikliği yönünden bir gösterge olarak kabul edilmektedir. Bu durum; kateter bakımında bozukluk, infeksiyon kontrol önlemlerinde yetersizlik ve immün yetmezliği olmayan hastalarda dışarıdan bulaşın varlığını belirtmektedir. İdrarda *Candida* varlığı (kandidüri), kontaminasyon, kolonizasyon veya infeksiyonun bir belirtisi olabilir. *C. tropicalis*, *C. glabrata* gibi albicans dışı *Candida* (ADC) türleri sıklıkla idrardan izole edilmektedir (2). Moleküler yöntemlerle izole edilen suşların genetik ilişkilerinin varlığı, etkenin kaynağı (ekzojen veya endojen) ve bulaş yolları saptanabilmekte ve epidemiyolojik inceleme yapılabilmektedir (5). Bu çalışmada, hastanemizin YBÜ'de yatan kateterize hastaların kan ve idrar örneklerinden izole edilen *Candida* suşları arasındaki genetik yakınlığın incelenmesi ve olası mini epidemilerin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. İzole edilen suşlar konvansiyonel yöntem olan RAPD-PZR ve ticari yarı-otomatik rep-PZR (DiversiLab, bioMerieux, Fransa) yöntemleriyle çalışılarak, sonuçların karşılaştırılması ve bu sistemin hastane infeksiyonlarının izlenmesindeki rolünün belirlenmesi planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Candida* Türleri

Candida'lar 4-6 µm çapında, tek hücreli, tomurcuklanarak çoğalan gerçek/yalancı hifler oluşturabilen, ökaryot hücre yapısında, doğada ve başta gastrointestinal sistem (GİS) olmak üzere tüm mukozal yüzeylerde, deride normal flora elemanı olarak bulunabilen mikroorganizmalardır (6). *Candida*'lar oldukça fazla miktarda heterojen gruplara sahip, değişik morfolojik karakterlerde fungal mikroorganizmalardır. Sabouraud dekstroz agar (SDA)'da krem renginden sarıya kadar değişen renklerde, yuvarlaktan ovale kadar değişen şekillerde koloniler oluşturmaktadırlar. Bu türler, kültür özelliklerine göre, S koloni, parlak veya kuru, R koloni, buruşuk veya mat olabilmektedir (7).

Candida cinsinin patojen olabilen birçok türü vardır. İnsanda infeksiyon etkeni olabilen türleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir (8). Sıklıkla izole edilen bazı *Candida* türlerinin özellikleri Çizelge 2.2'de verilmiştir (8, 9, 10).

Çizelge 2.1. İnsanda infeksiyon oluşturan *Candida* türleri (8)

Sık rastlanan türler	Seyrek rastlanan türler
<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> <i>C. kefyr</i>	<i>C. inconspicua</i> <i>C. norvegensis</i> <i>C. famata</i> <i>C. lypolitica</i> <i>C. lusitaniae</i> <i>C. guilliermondii</i> <i>C. dubliniensis</i> <i>C. pelliculosa</i> <i>C. ciferrii</i> <i>C. utilis</i> <i>C. catenulata</i> <i>C. haemulonii</i> <i>C. humicola</i> <i>C. lamblica</i> <i>C. pintolopesii</i> <i>C. pulcherrima</i> <i>C. zeylanoides</i>

Çizelge 2.2. *Candida* türlerinin özellikleri (8, 9, 10)

Türler	Sıklığı	Direnç	Hif/yalancı hif	Klamido- spor	Çimlenme borusu	CHROMagar
<i>C. albicans</i>	%63.8	--	+/+	+	+	Yeşil
<i>C. glabrata</i>	%11.3	Polyen (+) Azol (+)	-/+	-	-	Beyaz, pembe- mor
<i>C. tropicalis</i>	%7.2	--	+/+	+	-	Çelik mavi
<i>C. parapsilosis</i>	%6	Ekinokandin	-/+	-	-	Beyaz
<i>C. krusei</i>	%2.4	Polyen (+)	-/+	+	-	Toz pembe
<i>C. guilliermondi</i>	%0.7	--	-/+	+	-	Pembe-leylak
<i>C. lusitaniae</i>	%0.6	Polyen (→+++)	-/+	+	-	Pembe
<i>C. kefyr</i>	%0.5	--	-/+	+	-	Kirli beyaz- krem
<i>C. dubliniensis</i>	%0.1	--	+/+	+	+	Mavi-yeşil

(+++): Güçlü Primer Direnç, (+): Orta Primer Direnç, (→+++): Güçlü Sekonder Direnç (Kazanılmış)
+: Var, -: Yok

2.1.1. *Candida albicans*

1853 yılında Charles-Philippe Robin tarafından ilk kez *Oidium albicans* olarak adlandırılmış. 1890 yılında Zopf *Monilia albicans* olarak adını değiştirmiş. 1923 yılında Berkhout *Candida albicans* adı vermiştir. Birçok *Candida* türlerinin isimleri değiştirilmişken *C. clausenii* ve *C. langeronii* türleri de *C. albicans* ile birleştirilmiştir. *C. dubliniensis* türü farklı blastokonidya ve klamidospore yapıları nedeniyle *C. albicans*'tan ayrılmıştır (11). *C. albicans* ve *C. dubliniensis* gibi türler hif formunda veya yalancı hif gibi filamentöz tipte koloniler de oluşturabilmektedirler (Şekil 2.1). Hif ve yalancı hif arasındaki fark hangi yol ile oluştuğu ile ilgilidir. Yalancı hifler maya hücrelerinden tomurcuklanma yolu ile oluşur, ancak yeni gelişenler ana hücreye yapışık olarak uzantılar gösterirler ve filamentler halinde daralarak, hücre-hücre bağlantılarını oluşturmaktadırlar (Şekil 2.1). Yalancı hifler arasında internal septalar bulunmaz (Şekil 2.1). Gerçek hifler ise maya hücrelerinden ya da mevcut hiflerin dallarından oluşmaktadırlar. Gerçek hiflerin gelişmesi “çimlenme borusu” prensibiyle başlamakta daha sonra uzantılar ve yan dallar

halinde septalarla bölünmüş fungal birimler şeklinde devam etmektedirler (Şekil 2.1). *C. albicans* ve *C. dubliniensis* gerçekte polimorfik yapıya sahip olup bu durum hif ve/veya yalancı hif oluşturma yetenekleriyle ilişkilidir. Bu türler çimlenme borusu pozitif özelliği gösterirler (12). *C. albicans* sükröz dışında birçok şekeri fermente edebilmektedir (13). Mısır unlu agarda *C. albicans* ve *C. dubliniensis* suşlarının büyük bir çoğunluğu (>%90) karakteristik klamidospore oluştururlar. *C. albicans* genellikle gerçek veya yalancı hiflerin ucunda tek tek klamidospore üretir. Buna karşın *C. dubliniensis*'inkiler çok fazla sayıda ve ekseri çiftler halinde veya üçlü hatta bazen yalancı hifin ucundaki aynı bir taşıyıcı (süspansör) hücreye yapışmış kalın duvarlı birkaç klamidospordan oluşan kümeler veya salkımlar oluşturularak olağandışı düzen gösterirler (1).

2.1.2. *Candida glabrata*

İlk olarak 1917 yılında Anderson tarafından *Cryptococcus glabratus* olarak adlandırılan maya türüne 1938'de Lodder ile Vries *Torulopsis glabrata* adını vermiştir. *Candida* türlerinin sınıflandırılmasında olduğu gibi *Torulopsis* türleri de yalancı hif oluşumuna göre sınıflandırılmış (14) ancak *Torulopsis glabrata* sadece azot eksikliğinde yalancı hif oluşturduğu için sınıflandırmada yanlışlık olabileceği düşünülmüştür. Meyer ve Yarrow 1978'de bu türü ovoid yapısı ve yalancı hif oluşturamaması nedeniyle *Candida glabrata* olarak isimlendirmişlerdir (15, 16). *C. glabrata* hücresi 1-4 µm boyutlarında, polimorfik olmayıp ve sadece maya formunda üremektedir (Çizelge 2.3, Şekil 2.1). Geçmişte bu tür yalancı hif formu olmadığından *Torulopsis* familyası içerisinde sınıflandırılmıştır. Ancak 1978'de yalancı hif oluşturma yeteneğinin *Candida*'lar için belirleyici bir ayırt edici faktör olmadığı anlaşıldığından, *Torulopsis glabrata*'nın insanlarda hastalık yapıcı bir etken olduğundan *Candida* familyasında yer alması önerilmiştir (14, 17). SDA besiyerinde parlak, pürüzsüz ve krem rengi koloniler oluşturur. Bu koloniler büyüklükleri dışında (diğer türlerden biraz daha küçük), çoğunlukla diğer *Candida* türlerinden ayırt edilemezler. *Candida* türlerinin biyokimyasal özellikleriyle ilişkili olarak *C. glabrata* sadece glukoz ve trehalozu fermente etmektedir. Bu özelliğinden Rapid Assimilation Test (R.A.T) (Bknz. sayfa 46) ile koloniden hızlı tanısında yararlanılır. Mısır unlu agarda 72 saatte yalancı hif oluşturmayan tek *Candida* türüdür. Genetik faktörler açısından *C. glabrata*'nın ana ayırt edici özelliği, *C. albicans*'in ve benzer diğer

ADC türlerinin diploid genoma sahip olmalarına karşılık, haploid genoma sahip olmasıdır (14, 18).

2.1.3. *Candida tropicalis*

Aldo Castellani (1877-1971) Sri Lanka'da *C. tropicalis* türünün de dahil olduğu birkaç *Candida* türünün ayrımıyla ilgili çalışmış ve 1910 yılında bu türe *Oidium tropicale* adını vermiştir. *C. tropicalis*'e 58 farklı isim verilmiştir. Bunlardan bazıları; *Monilia tropicalis*, *Candida vulgaris*, *Mycotorula dimorpha*, *Candida paratropicalis*'dir. Son olarak Berkhout 1923 yılında *Candida tropicalis* adını vermiştir. *C. tropicalis* çimlenme borusu oluşturmayan, diploid Ascomycetes sınıfı bir mayadır (13, 15, 16). Bazı kaynaklara göre *C. tropicalis*'in kimi tipleri, mısır unlu agarda, 25°C-72 saatte, oval blastosporları yalancı hif ve gerçek hifler oluşturdukları bildirilmiştir (12). Hücreleri 4-8 µm büyüklüğünde olan *C. tropicalis*, SDA'da krem renğinde, kuru ve mat, ışınal dizili miselyum kitlesi ile halelenmiş koloniler oluşturur. Sükroz ve maltozu fermente eder (13). Genetik olarak *C. tropicalis* en çok *C. albicans*'a ve en az oranda ise *C. glabrata*'ya benzemektedir (19). *C. tropicalis* çimlenme borusu ile karışabilecek hif başlangıcı benzeri yapılar üretebilir ancak hifin ana hücreden çıkış yerinde darlık mevcuttur ve blastokonidyalı *C. albicans*'ın blaktokonidyalılarından daha geniştir (12).

2.1.4. *Candida parapsilosis*

İlk kez Ashford tarafından ishali bir hastanın gaytasından maltoz fermentasyonu yapamayan *Monilia*'nın bir türü olarak tanımlanmıştır. Bu türe günümüzde *C. albicans* olarak bilinen *Monilia psilosis*'ten ayırmak için *Monilia parapsilosis* olarak adlandırılmıştır. Koloni morfolojisi *C. albicans* türüne benzer ancak mikroskopik olarak çarpık veya kıvrık kısa yalancı hif görüntüsü vardır ve bazen büyük hifal unsurları ile dev hücreler olarak adlandırılır (20). Langeron ve Talice 1932 yılında bu diploid maya türüne *Candida parapsilosis* adını vermiştir (16, 20). *C. parapsilosis* 2.5-4 µm'den daha küçük yapıdadır, SDA besiyerinde beyaz ya da kremi renkte, parlak/berrak veya pürüzsüz/buruşuk koloniler yapar. Mısır unlu agarda yalancı hif boyunca tek tek veya

bazen küçük kümeler yapacak biçimde dizilmiş blastokonidyumlar, arada iri hifler (dev hücreler) bulunur. Geçmişte *C. parapsilosis* maltozu fermente edemediği için bir *Monilia* türü olarak sınıflandırılmaktaydı (20, 21).

2.1.5. Diğer *Candida* Türleri

2.1.5.1. *Candida dubliniensis*

C. albicans ile fenotipik olarak yakından ilişkilidir. Sağlam ve HIV enfeksiyonlu kişilerden izole edilmesi nedeniyle *Candida dubliniensis*'in normal ağız florasının üyesi olduğu ve özellikle bağışıklık sistemi bozukluğu olanlarda ağız lezyonlarına yol açtığı düşünülmektedir. Koloni morfolojisi ve mikroskopik görünümü *C. albicans* ile aynıdır ancak, *C. dubliniensis* 45°C'de üreyemez ve klamidosporeleri çok daha bol, ikili, üçlü hatta kümeler veya salkımlar halindedir. Ayrıca *C. dubliniensis*'in ksiloz kullanımı ve β glukozidaz aktivitesi yoktur. Ayrımalarında moleküler çalışmaların yararlı olacağı bildirilmektedir (8).

2.1.5.2. *Candida krusei*

Castellani 1910'da *C. krusei*'yi *Sacharomyces krusei* olarak ve 1912'de *Endomyces krusei* olarak adlandırmıştır. Chalmers 1913'te *Monilia krusei* ismini vermiştir. Berkhout 1923'te *C. krusei* olarak tekrar isimlendirmeden önce bu tür için 18 farklı isim kullanılmıştır. *C. krusei* kolonileri SDA'da *C. albicans* ve diğer *Candida* türlerinin oluşturduğu kolonilerine benzer ancak Tween 80'li mısır unlu agarda uzamış blastokonidyalarla yalancı hif oluşturması, çapraz (birbirine girmiş) ağaç dalı görüntüsü ile ayrılır. *C. krusei* türü flukonazole doğal dirençlidir (8).

2.1.5.3. *Candida kefyr (pseudotropicalis)*

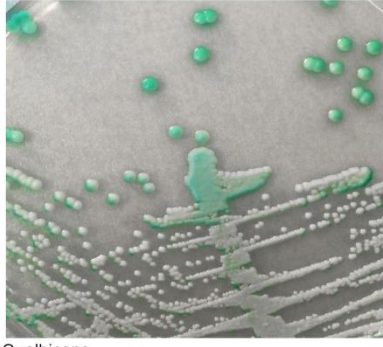
Vücutun her yerinde akut, subakut ve kronik infeksiyona neden olabilir. SDA'da krem renginde, yumuşak kıvamlı, S tipi koloniler oluşturur. Mısır unlu agarda yalancı hifler ve bunun etrafında uzun, genellikle hiften ayrılıp birbirine paralel dizilim gösteren blastokonidyumlar gözlenir. Bu görünüm ırmakta yüzen kütüklere benzetilebilir ve diğer türlerden ilk bakışta ayırt edilmesini kolaylaştırır (8).

2.1.5.4. *Candida guilliermondii*

Tüm vücut bölgelerinde infeksiyona neden olabilir. SDA'da düzgün yüzeyli, S tipi, nemli görünümde, krem- sarı renkli, yaşlandıkça pembeleşen koloniler oluşturur. Mısırunlu Tween 80 agarda yalancı hiflerin çevresinde küçük blastospor kümeleri oluşturur, yalancı hifler kısa ve az sayıdadır (8).

2.1.5.5. *Candida lusitaniae*

Dietrichson bu türü 1954'te *Candida parapsilosis* var. *Obtusa* olarak isimlendirmiştir. van Uden ve do Carmo-Sousa 1959'da *C. lusitaniae* adını vermişlerdir. Bu tür ilk olarak Portekiz'de sıcak kanlı hayvanların sindirim kanalından izole edilmiştir. *C. lusitaniae* 1979'dan beri insanlarda kan, idrar ve solunum sisteminde fırsatçı patojen olarak değerlendirilmiştir. *C. lusitaniae* türü *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* türlerine benzer ancak sellobiyozu fermente edebilmesi ve ramnozu sindirebilmesi ile bu türlerden ayrılır. *C. lusitaniae* genellikle düşük virulanslı bir mayadır ve amfoterisin B'ye direnç gösterebilmektedir (8).



C. albicans

A



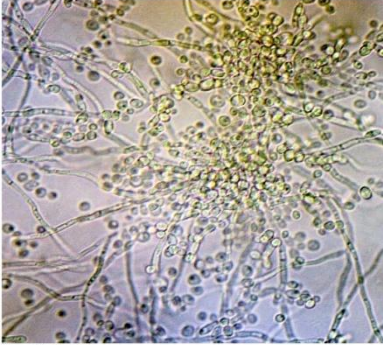
Candida dubliniensis

B

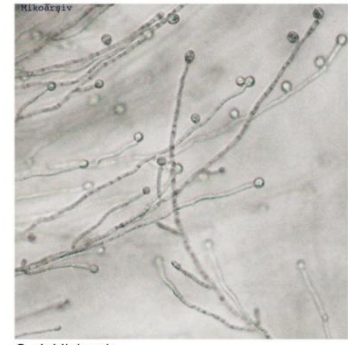


Candida parapsilosis

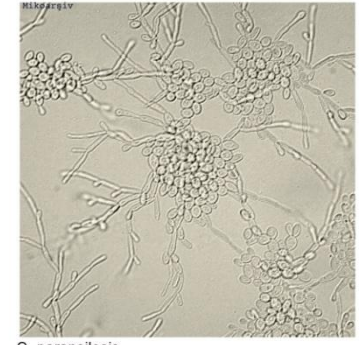
C



C. albicans



C. dubliniensis



C. parapsilosis



C. glabrata

D



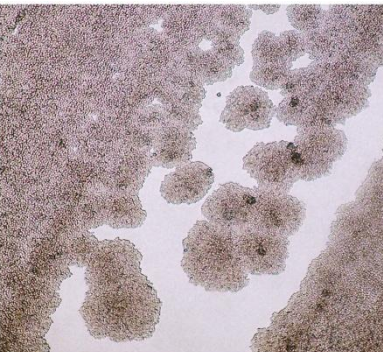
Candida tropicalis

E

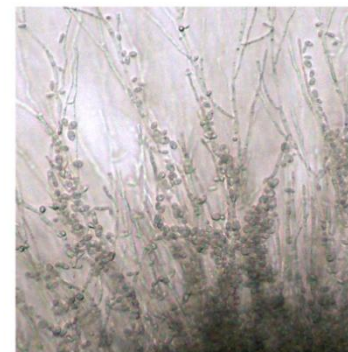


Candida krusei

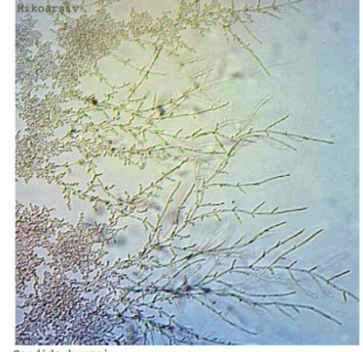
F



Candida glabrata



C. tropicalis



Candida krusei

Şekil 2.1. *Candida* türlerinin Mısır unu-Tween 80 agardaki yapıları (X40) ve CHROMagar *Candida*'daki kolonileri. A-*Candida albicans*, B-*Candida dubliniensis*, C-*Candida parapsilosis*, D-*Candida glabrata*, E-*Candida tropicalis*, F-*Candida krusei*.

2.2. ADC Türlerinde Patojenite ve Virulans Faktörleri

Candida infeksiyonlarının patogenezini açıklamak ve yeni *Candida* tedavisini geliştirmek amacı ile yapılan çalışmalarda konakçı savunma sisteminin rolünün yanında *Candida*'ya ait virülans faktörlerinin de önemi belirtilmektedir. Tüm araştırmacılar yüzeysel infeksiyondan yaygın kandidiyazise kadar değişen infeksiyonlarda tek bir virülans faktörünün etken olmadığı görüşündedirler. *Candida* infeksiyonlarının patogenezindeki majör virulans faktörleri konak epitel ve endotel hücrelerine adezyon, çimlenme borusu oluşumu ve proteinaz üretimidir. Ayrıca fosfolipaz, toksinler, fenotip değişimi, hücre duvarı ve yüzey değişimi, hidrofobisite gibi faktörler de virülans ve patogenezde rol alır (18, 22).

Konak dokuya yayılmak için mikroorganizmaların ürettiği hidrolitik enzimlerin ilk hedefi lipit ve proteinden oluşan konak hücre membranıdır. Hidrolitik enzimleri peptit bağlarını parçalayan proteinaz, fosfolipitleri hidrolize eden fosfolipazlar, lipitleri parçalayan lipazlar gibi enzimler oluşturmaktadır. Birçok çalışmada *C.albicans*'ın patogenezinde proteinaz ve fosfolipaz enzimlerinin yer aldığı, lipaz ve esterazlar gibi daha başka hidrolitik enzimlerin de üretildiği gösterilmiştir (6, 23).

Konak hücreye invazyon, mikroorganizmaların penetrasyonu ile hücre membranının harabiyetiyle sonlanır. Fosfolipaz, proteinaz gibi hidrolitik enzimler hücre membranında bulunan başlıca kimyasal bileşenler olan fosfolipitleri ve proteinleri hidrolize etme yeteneğinde olup, konak hücre invazyonu sırasında meydana gelen hücre harabiyetinde rol oynadıkları düşünülmektedir (24).

2.2.1. Yapışma (Aderans)

Aderans, *Candida* infeksiyonu ve kolonizasyon oluşum sürecinde ilk basamağı oluşturmaktadır. *Candida*'ların özellikle kateterli hastalarda tıbbi cihaz yüzeyine yapışması ve biyofilm oluşturması ile kandidemi ve antifungal direnç oranının arttığı bildirilmiştir. Hücre duvarı proteinlerinin yapısı ve hücre yüzeyinin fizyokimyasal özellikleri yapışmayı etkileyen önemli faktörlerdir (25, 26) .

Candida türlerinin konak hücreye bağlanmasında esas rolü oynayan, hücre yüzeyinde bulunan adezinlerle konak hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerin birbiriyle

etkileşimidir. Oluşan infeksiyonun patogenezi ile *Candida*'nın aderans yeteneği arasında korelasyon izlenmiştir (27). Adezinler, yapışmaya özel olan *Candida* hücre yüzeyi proteinleridir. *C. glabrata*'da adezinlerin büyük bir kısmı, epitelyal adezin (EPA)'ler olarak adlandırılmaktadır. EPA proteinlerinin genel yapısı *C. albicans* türünün ALS (agglutinin-like sequence) proteinlerine benzemektedir (28, 29). *C. glabrata* EPA proteinleriyle ilgili yapılan birkaç çalışmada EPA1p'nin glikol konjugatlarını ihtiva eden N-asetil laktozamine bağlanan kalsiyum bağlayıcı lektin olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, EPA genini çok sayıda bulunmasına rağmen EPA1p bölgesinin ortamdaki kaldırılması in-vitro adezyonda azalmaya yol açmaktadır. Bunun yanında EPA6'nın in vivo üriner sistem infeksiyonunda arttığı bildirilmiştir (30). Bioinformatik bir çalışmada *C. parapsilosis*'de adezin benzeri hücre duvar protein genleri bulunmuştur. Bu çalışmaya 5Als protein ve 6Pga30 (predicted glycosyl phosphatidyl inositol-anchored protein 30) protein genleri dahil olmuştur (19). Ancak bu proteinlerin *C. parapsilosis*'in adezyonunda rol oynadığını gösteren başka çalışma yoktur. *C. tropicalis*'in hücre duvar proteinleriyle ilgili, en az 3Alsp, Western blot aracılığıyla anti-Als antikolarıyla tanımlanmıştır (31). Ancak bu alanda başka çalışmalar yapılmamıştır.

2.2.2. Biyofilm Yapımı

Sıklıkla vasküler ve üriner kateterler, eklem protezleri, protez kalp kapakları gibi tıbbi cihazların varlığında infeksiyon oluşturan *Candida* türleri bu aletlerin yüzeylerine yapışarak biyofilm üretimi ile kolonizasyon oluşturabilirler. Biyofilm yapımı sonucu oluşan kolonizasyonun, antifungal direnç ve kandidemide artışa yol açtığı belirtilmiştir. *Candida* türlerinin biyofilm oluşturma yeteneği ile virulansın derecesi arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmektedir (25). Biyofilm; mukopolisakkarit yapıda ekstraselüler bir polimerdir. Kateter yüzeyinde oluşan biyofilmde hem mikroorganizmaya hem de konağa ait faktörler rol oynamaktadır. Bu yapışma ve kolonizasyon için mantarın "slime" faktörünün, konağın da fibrin ve fibronektinlerinin karşılıklı etkileşiminin gerekli olduğu bildirilmektedir. Biyofilmlerdeki hücrelerin planktonik hücrelerden tamamen farklı fenotipik özellikler gösterdiği, klinikte kullanılan antifungallere de bu hücrelerden daha dirençli olduğu ve infeksiyon için bir kaynak oluşturdukları belirtilmektedir (32).

Candida'ların konak dokuya ya da medikal araçlara ilk bağlanmasını hücre bölünmesi, proliferasyon ve biyofilm oluşturması izler (32). Artık biyofilm mikroorganizmaların en yaygın büyüme formu olarak düşünülmektedir (33). Biyofilm formasyonu birçok *Candida* türü için, önemli bir virulans faktörü olup, kimyasalların yüzeye penetrasyonunu engelleyip konak immün sisteminden korunarak, antifungal tedaviye direnç gösterdikleri bildirilmektedir (34, 35). Ayrıca, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* gibi biyofilm oluşturabilen türler oluşturmayanlara göre daha yüksek mortalite ve morbiditeyle ilişkilendirilmiştir (36). Biyofilm formasyonu ve takibinde ekstraselüler matriksin üretimi, türe, suşa ve çevresel koşullara (pH, besiyeri bileşimi, oksijen yoğunluğu) büyük ölçüde bağlı olduğu düşünülmektedir (32, 37). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada *C. glabrata*'nın, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*'e kıyasla, üriner sistemde infeksiyonlarında silikon yüzeylerde daha fazla biyofilm üretme yeteneğinin olduğunu gösterilmiştir (38). Sabouraud Dekstroz Buyyon'da yapılan çalışmalarda ise bu durumun tam tersi gözlenmiştir (39). Zenginleştirilmiş besiyerinde yapılan çalışmada da *C. glabrata*'nın diğer ADC türlerine kıyasla daha düşük biyofilm oluşturma yeteneğinin olduğu rapor edilmiş (40). *C. tropicalis* izolatları, silikon ve lateks kateterlerde biyofilm formasyonu oluşturma yeteneklerine göre sınıflandırılmıştır (41, 42). *C. parapsilosis* türlerinin yüksek glikoz ve lipid konsantrasyonları ihtiva eden besiyerlerinde üretildiklerinde biyofilm oluşturdukları gözlenmiştir. Bu durum parenteral beslenen hastaların kan dolaşımı infeksiyonlarındaki yüksek prevalansla ilişkilendirilmiştir (43). Bu türün, plastik medikal aletlere karşı seçiciliği, üriner kateter ve damar yolu kateterlerinde kolonize olma yeteneğini arttıran biyofilm formasyonundan ileri gelmektedir (20). *C. albicans*'ın aksine *C. parapsilosis* biyofilmleri daha ince, daha yapısız ve sadece kümelenmiş blastosporlardan oluşur. (44). Bu biyofilm özellikleri Silva ve ark.'nın (181) rapor ettiği çalışmayla uyumlu bulunmuştur. Bir çalışmada yeni tanımlanmış iki *Candida* türünün de (*C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis*) *C. parapsilosis* gibi biyofilm oluşturma yeteneğinde olduğu gösterilmiştir (45).

2.2.3. Enzimler ve Doku İnvazyonu

Candida türlerinin konak hücreye kolonizasyonunda rol oynayan hidrolitik enzimlerin fizyolojik rolü, deri ve mukozal bariyerlerin yıkımıdır. Bu şekilde *Candida*'ların konak hücreye daha güçlü aderansı sağlanmakta ve bu süreci besin sağlamak amacıyla mikroorganizma tarafından konak proteinlerinin sindirimi izlemektedir (46). Bu şekilde konak savunma mekanizmalarında önemli rol oynayan immünglobulin ve sitokinler parçalanmakta ve böylelikle immün bariyer ortadan kalkmaktadır (18, 47). *Candida* türleri, hücre dışı üç önemli hidrolitik enzim üretir. Bu enzimler konak hücre zarlarındaki protein ve lipitleri hedeflerler (25, 48).

I) Salgısal aspartil proteinazlar (Sap)

II) Lipazlar (fosfolipaz B)

III) Hemolizinler

2.2.3.1. Salgısal aspartil proteinazlar (SAP)

Candida türleri tarafından en sık üretilen hidrolitik enzimler olan SAP'lar konak hücre yüzey moleküllerinin parçalanmasına neden olmakta, hücre membranlarında hasar oluşturarak *Candida*'ların dokulara invazyonunda doğrudan rol oynamaktadır. Aynı zamanda konak immün sistem molekülleri ve hücreleri üzerine etki ederek antimikrobiyal aktiviteyi ortadan kaldırmaktadır (23).

Ekstraselüler proteinazları en sık *C. albicans* salgılamakta, bu enzimler *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* tarafından da salgılanmaktadır. Salgısal aspartil proteinazları kodlayan 10 kadar SAP geni bulunmaktadır. Bu enzimleri kodlayan ilk sekiz gen (SAP 1-8) ekstraselüler alana salınırken, SAP 9 ve SAP 10 membrana bağlı olarak bulunmaktadır (17, 47).

SAP gen ekspresyonu özellikle *C. albicans* için hif oluşumu, adezyon ve fenotip değişimi gibi diğer virülans faktörleri ile de yakın ilişki göstermektedir. SAP1, SAP2, SAP3 genleri yalnızca maya hücrelerinde; SAP4, SAP5, SAP6 ise hif yapılarında bulunmaktadır. SAP 1-3'ün yüzeyel, mukozal ve kutanöz infeksiyonlarda; SAP 4-6'nın ise sistemik infeksiyonlarda rol oynadığı gösterilmiştir (49). *C. glabrata*'nın, sadece tek bir çalışmada

proteinaz üretebilme yeteneği gösterilmiş ancak proteinaz tipi belirtilmemiştir (50). *C. parapsilosis* ile yapılan araştırmalarda ise SAP'ı kodlayan iki farklı gen grubunun bulunduğu saptanmıştır (51). *C. albicans* gibi *C. tropicalis* de azot kaynağı olarak sığır serum albümini ihtiva eden besiyerlerinde yüksek seviyede SAP salgılar. Ayrıca *C. tropicalis*'e ait en az 4 gen (SAPT 1-4) sap'ı kodlar (52, 53).

2.2.3.2. Fosfolipazlar

Fosfolipidler biyolojik membranların yapısal ve fonksiyonel en önemli komponenti olup, ekstraselüler fosfolipazlar konak hücre membranındaki gliserofosfolipidlerin ester bağlarını hidrolize ederek konak hücre membranında hasara ve bunun sonucunda da invazyona yol açarlar. Fosfolipazlar konak hücreye penetrasyon, epitel hücrelerine tutunma, insan ağız epiteline invazyonda görevlidirler (23).

Fosfolipaz üretme yeteneğini değerlendirmek için yapılan yumurta sarısı bazlı testler önceleri yalnızca *C. albicans*'ın ekstraselüler fosfolipaz ürettiğini göstermiş, bunun tersine, son zamanlarda ADC türlerinde de fosfolipaz üretimini gösteren çalışmalar mevcuttur (54, 55). Fosfolipaz etkinliği ile patojenlik ve mukoza epitel hücrelerine yapışma arasında bir korelasyon bulunmuş, böylece mantarın ağız epitel hücrelerine daha kuvvetli tutunduğu ve yüksek fosfolipaz etkinliğine sahip olanların farelerde daha patojen olduğu gösterilmiştir (56). Aksine *C. albicans*'ın yapışmayan ve fareleri öldürmeyen kökenleri dahil *Saccharomyces cerevisiae* ve *C. parapsilosis* gibi patojen olmayan mayalar düşük fosfolipaz etkinliğine sahiptirler (57). Son yapılan çalışmalara göre; *C. tropicalis*'in suşa bağımlı olarak fosfolipaz enzim üretme yeteneğinde azalma görüldüğu belirtilmiştir (42, 55). *C. glabrata*'nın fosfolipaz aktivitesiyle ilgili bir çalışma ise henüz yoktur (14, 54).

Lipazlar mono-di-triaçilgliserol ve diğer fosfolipidlerin ester bağlarının hidrolizini katalize etme yeteneğine sahip olup, on üyeli bir gen ailesi tarafından kodlanırlar (*LIP 1-10*). *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* suşlarının lipaz aktivitesi gösterdiği ve bu genleri eksprese ettiği saptanmıştır. *C. albicans*'ın konak dokudaki virulans ve persistansının, *LIP* genlerinin in vivo ve in vitro olarak lipolitik aktivite göstermesini yansıttığı düşünölmekte ve konu ile ilgili araştırmalar halen sürmektedir (23).

Son yıllarda iki yeni hidrolitik enzim olan ekstraselüler serin ve metalloproteinaz aktiviteleri *C. albicans* ve *C. guilliermondii* suşlarını içeren sıvı kültürde belirlenmiştir.

Ancak diğer hidrolitik enzimlerden farklı olarak bu enzimler ile *Candida*'ların virulansı arasında net bir ilişki tanımlanamamıştır (58, 59).

2.2.3.3. Hemolizinler

Çeşitli hidrolitik enzimlerin yanı sıra, birçok patojen kandida türünün hemolizin de ürettiği saptanmıştır. Hem alfa hem de beta hemoliz, hif ve maya formlarının her ikisinde de gözlenmiş, ancak virulansa katkısı tam olarak anlaşılamamıştır (60, 61). *C. albicans*'ın, özellikle glikozla zenginleştirilmiş kanlı besiyerinde hemolitik aktivite gösterdiği 1994 yılında Manns ve ark. tarafından bildirilmiştir (62). Bu konu ile ilgili en geniş çalışma 2001 yılında Lou ve ark. tarafından yapılmıştır. Lou ve ark. çalışmalarında 14 farklı türün hemolitik aktivitelerini saptamış ve hemoliz tiplerini belirlemişlerdir (61).

2.2.4. Filamentöz Büyüme

Doku invazyonunda hifaların büyük rolü mevcuttur. İn vitro araştırmalarda hifa formu olmayan *C. albicans*'ın olanlara göre dokulara daha az invaze olduğunu göstermiştir (63). Ayrıca, *Candida* türlerinin filamentöz formlarının (hif/yalancı hif) mayalarla karşılaştırıldığında fagositoza karşı daha dirençli olduğu görülmüştür (64). *C. tropicalis*'in morfolojisinin virulanstaki önemiyle ilgili bir kaç çalışma yapılmıştır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada Silva ve ark. *C. tropicalis*'in sadece filamentöz formunun oral epitelyuma invaze olabileceğini göstermiştir (181).

C. parapsilosis, *C. albicans* ve *C. tropicalis*'in aksine hifal dönüşümün suşa özgü bir biçimde sergilendiği gösterilmiş, oral epitelyuma invazyonu yalancı hifal ürün ile ilişkilendirilmemiştir (65).

2.2.5. Morfolojik Değişim

Candida türleri maya ve hif formları arasında geri dönüşümlü geçiş yeteneğine sahiptir. Çeşitli koşullara bağlı olarak maya, yalancı ve gerçek hif oluşturabilmektedir. Mayadan hife geçişte konağa ilişkin bazı faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Mukozadaki koşullara benzerlik gösteren 37°C'nin altındaki sıcaklık, asit pH ve serumun olmadığı bir ortam maya şeklinde üremeyi indüklerken, 37°C sıcaklık, nötral pH ve serumun ortamda bulunmasının hif formunun gelişmesini indüklediği gösterilmiştir. Bu formlar arasındaki morfolojik geçişin, konakta *Candida*'ların üremesini uyarıp, konak hücreye invazyonu ile korelasyon gösterdiği düşünülmektedir. Çimlenme borusu ve hif formlarının aderanslarının maya formuna göre daha fazla olduğu, doku invazyonunda gerçek ve yalancı hiflerin önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir. Özellikle *C. albicans* için maya formundan hif formuna geçiş, doku invazyonu için gereklidir (64).

2.2.6. Fenotipik Değişim

Fenotip değişimi, geri dönüşümlü olan, *C. albicans* suşlarında spontan olarak sıklıkla gerçekleşen bir olaydır. *C. albicans* kolonileri düz, yıldız, noktalı, pürtüklü, düzensiz buruşuk ve tüylü gibi farklı fenotipler arasında değişim göstermektedir. Bununla birlikte fenotipik değişim ile *C. albicans*'ın virulansı arasındaki ilişki belirgin değildir. Yuvarlak-ovalimsi, beyaz ("white") faz hücrelerinin; geniş yüzeyli, yassı, yüzeyi pürtüklü, gri renkli koloniler oluşturan uzun, büyük opak ("opaque") faz hücrelerine dönüşümü "W-O" değişimi şeklinde değerlendirilmektedir. Opak faz hücrelerinin kutanöz kandidiyazis modelinde deriye kolonizasyon yeteneğinin beyaz faz hücrelerinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. İlginç olarak sistemik hayvan modelinde ise opak faz hücrelerinin beyaz faz hücrelerinden daha az virülan olduğu saptanmıştır (25, 66).

2.3. Epidemiyoloji ve Risk Faktörleri

Farklı mikroorganizmalarla ilişkili mortalite oranı erken antibiyotik ve antifungal kullanımıyla azalmıştır. Ancak buna rağmen sistemik fungal infeksiyonlar önemli mortalite ve morbidite etkeni olarak kabul edilmektedir. *Candida* türleri sıklıkla yatan hastaların kan kültüründen izole edilmektedir (67, 68). Aslında kanser hastaları, cerrahi servis ve YBÜ’de yatan hastaların dahil olduğu immün sistemi baskılanmış hastalarda *Candida* infeksiyonlarının insidansında artış görülmüştür (69, 70). Sağlıklı bireylerin yaklaşık olarak %31-55’inde *Candida* türleri çoğunlukla oral kavite, vulvovajina ve üriner yolda tespit edilmiştir (69). Ancak son 10-30 yılda ADC türleri insanda fırsatçı infeksiyon olarak ortaya çıkmaktadır. Bunun nedeni yukarıda belirtildiği gibi tıbbi uygulamaların değişmesi veya yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesiyle ilgilidir. Bu değişikliklere bakılmaksızın son epidemiyolojik veriler mikolojik değişimleri ortaya çıkarmıştır. *C. albicans* en sık etken olarak kalırken, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* gibi türlerin prevalansında artış olmasıyla *C. albicans* infeksiyon insidansı göreceli olarak azalmıştır (71, 72).

Pfaller ve Diekema’nın invaziv kandidiyazis epidemiyolojisi üzerine yaptığı bir çalışmada *Candida* infeksiyonlarının %95’ine *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*’in neden olduğu gözlenmiştir (67). Ayrıca, Kiehn ve ark.’nın yaptığı bir çalışmada kanserli hastaların kan örneklerinden izole edilen türlerin %68’ini *C. albicans*, %12’sini *C. tropicalis*, %10’unu *C. parapsilosis* ve %3’ünü *C. glabrata*’nın oluşturduğu bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, fungemilerin çoğu önemli ölçüde ADC türleriyle ilişkili bulunmuştur (68, 71, 72). Ancak *Candida* türlerinin coğrafi yerleşimlere ve hasta gruplarına göre önemli değişiklikler gösterdiği ve hatta bazı ülkelerde ADC türlerinin *C. albicans*’a oranla daha yüksek prevalansa sahip oldukları bildirilmiştir (73, 74).

Türlerdeki insidans yaşa ve hastanın durumuna göre farklılık gösterebilmektedir. *C. glabrata* insidansı yetişkinlerde daha yüksek, yeni doğanda daha düşüktür (75). Ancak *C. parapsilosis* yenidoğanlarda, transplant hastalarında ve parenteral beslenen hastalarda önemli bir problem oluşturmaktadır (20). Ayrıca *C. tropicalis* nötropeni ve malignite ile sıklıkla ilişkilidir (3). Yıllardır *C. glabrata*, insanda infeksiyona neden olmayan, sağlıklı bireylerin normal florasında bulunan patojen olmayan saprofit bir tür olarak kabul edilmiş, ancak geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının ve immünsüpresif tedavi uygulamalarının

artması ve yaygınlaşmasıyla *C. glabrata*'nın neden olduğu mukozal ve sistemik infeksiyonların insidansında artış olduğu görülmüştür (76). Avrupa Tıbbi Mikoloji Konfederasyonu'nun verilerine göre, *Candida* infeksiyonuyla ilgili ölüm oranı hasta türü ve etkene göre değişmesine rağmen, ADC türlerinin neden olduğu kandidiyazis oranları *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* için %14, *C. tropicalis* için %7 olarak bildirilmiştir (77). Chen ve ark. Avustralya'da *C. glabrata*'nın önemli bir kandidüri etkeni olduğunu bildirmiştir (182). Diğer bir çalışmada da *C. glabrata*'nın mortalite oranının diğer ADC türlerine göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (78).

Yakın zamanda yapılan birkaç çalışmada nozokomiyal kaynaklı *C. glabrata* ile ilişkili bağımsız risk faktörleri değerlendirilmiştir. Hastane personelinin eliyle taşındığının gösterildiği çalışmalar mevcuttur (79, 80). Böylece diğer nozokomiyal patojenler gibi *C. glabrata*'nın da doğrudan ya da dolaylı olarak çevresel yüzeylerden bulaşabileceği gösterilmiştir. Son zamanlarda, oral kandidiyazisli hastaların yaklaşık %70'inde *C. albicans* ve *C. glabrata*'nın birlikte infeksiyon oluşturduğundan söz edilmektedir (41).

C. parapsilosis patojen olmayan bir tür olarak düşünülmediği 1940'lı yıllarda intravenöz ilaç kullanıcılarında fetal endokardit etkeni olarak saptanmıştır (50). Ayrıca son on yılda *C. parapsilosis* infeksiyon insidansı önemli derecede artmıştır. Aslında raporlar *C. parapsilosis*'in kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türleri arasında ikinci sıklıkta olduğunu göstermektedir (73, 81). *C. parapsilosis* insan elinden en sık izole edilen mantarlardan biridir. Hastanede yatan hastaların normal vücut florasından ikinci sıklıkta izole edilen *Candida* türüdür (82). Bu türün, Kuzey Amerika'da *Candida* izolatlarının %15.5'ini, Latin Amerika'da %23.4, Avrupa'da %16.3'ünü oluşturduğu bildirilmiştir (83). Ancak *C. parapsilosis* fungemisi *C. albicans* ve *C. glabrata*'ya kıyasla daha düşük mortaliteye sahiptir (20).

Diğer *Candida* türlerindeki gibi *C. parapsilosis* infeksiyon insidansındaki artış çeşitli risk faktörlerine bağlanmıştır. Bu faktörler arasında hiperalimentasyon sıvıları içerisinde yüksek üreme kabiliyeti, intravasküler kateterler ve prostetik materyallere yüksek afinite ve bu alanlara yüksek kolonize olma yetenekleri sayılabilir. Ayrıca kanser hastalarında santral venöz kateter ve kalıcı kateterin uzun süre kullanılması *C. parapsilosis* infeksiyon riskini arttırmaktadır. İspanya'da yapılan bir çalışmada 72 *C. parapsilosis* infeksiyonlu hastada infeksiyon risk faktörleri olarak vasküler kateterizasyon (%97), antibiyotik tedavisi (%91), ameliyat geçmişi (%46), immünsüpresif tedavi (%38),

malignite (%27), transplantasyon (%16), nütropeni (%12), kolonizasyon (%11) olduğu bildirilmiştir (81). Brezilya'da 2002-2003 yılları arasında rapor edilen 64 *C. parapsilosis* kandidemi vakasında; primer risk faktörleri nütropeni, santral venöz kateter (SVK) kullanımı ve kanser kemoterapisi olduğu bildirilmiştir (84). *C. parapsilosis*'in neden olduğu hastane infeksiyonlarında en riskli popülasyonun düşük doğum ağırlıklı yeni doğanlar olduğu bildirilmiştir (85). Aslında kandidiyazis patogenezinde deri veya gastrointestinal sistem (GİS) kolonizasyonu sıklıkla ilk basamaktır. Deri bütünlüğünün bozulması durumunda, GİS infeksiyonlarına duyarlılık, uzun süre SVK veya göbek kateteri takılı olanlar ve uzun süre entübe edilmiş hastalar da bu tip infeksiyonlara karşı oldukça duyarlıdır. *C. parapsilosis*, sağlıklı yeni doğanların orofarenksinin %23'ünden, *Candida* türleriyle kolonize GİS'te kolonize *Candida* türlerinin üçte birinden izole edildiği bildirilmiştir (50). ADC türlerinin aksine *C. parapsilosis*'in düşük ağırlıklı yenidoğanlarda mortalite oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (20).

C. tropicalis en sık izole edilen 3 ADC türlerinden biridir (73, 86, 87). Genellikle kan ve idrar örneklerinden üçüncü sıklıkla izole edildiği kabul edilir (86, 88). Ayrıca Brezilya'da yapılan epidemiyolojik bir çalışmada 12 farklı tıp merkezinde *C. tropicalis*'in *Candida* türleri arasında ikinci sıklıkta izole edildiği ve kandidemi vakalarının %33-48'ini oluşturduğu bildirilmiştir (73). Buna ek olarak *C. tropicalis*, özellikle kanserli hastalarda, geniş spektrumlu antibiyotik alan, uzun süreli kateterizasyonu olan ve YBÜ'de yatan hastalardan sıklıkla izole edilmektedir (73, 88). *C. tropicalis*'in, *C. albicans* ve diğer ADC türlerine kıyasla nütropenik bireylerde daha fazla yayılım gösterdiği gözlemlenmiştir (73).

Kandidemi ve kandidüri gelişimiyle ilgili, çeşitli kaynaklarda belirtilen risk faktörleri aşağıda sıralanmıştır (5, 71, 90).

- 1) Gastrointestinal kolonizasyonun artması: Antimikrobik kemoterapi (kandidemi öncesi iki hafta içinde geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı), antiasit ve/veya H₂ reseptör blokörleri ile tedavi, ileus, diyare varlığı,
- 2) Parenteral hiperalimentasyon: Önceki 30 gün içinde İV. hiperalimentasyon sıvıları intravasküler hiperglisemik ortam sağlayarak *Candida* infeksiyonlarının gelişmesini kolaylaştırır.
- 3) Sistemik konak savunmasının bozulması: Kortikosteroid tedavisi, immünsüpresif tedavi, sitotoksik kemoterapi, nütropeni (1000/mm³ altında nötrofil sayısı), diabetes mellitus,

böbrek yetmezliği, malign hastalıklar, hasarlı mukozal bariyer (kemoterapi ve radyoterapi sonrası maserasyona bağlı doku invazyonu gelişebilir),

4) İnvazif girişimler: SVK, üriner kateterler, arteriyel kateterler, endotrakeal tüp, hemodiyaliz,

5) Hastaya bağlı faktörler: İleri yaş veya prematürite, cinsiyet.

6) Kan ürünü transfüzyonu.

7) Yoğun bakım ünitesinde kalmak: Diğer ünitelerde yatan hastalara oranla 5-10 kat daha fazladır.

8) Kan biyokimyasındaki değişiklikler: Azotemi, hiperglisemi (transplantasyondan önce gelişen ve insülin tedavisi gerektiren iki haftadan fazla devam eden hiperglisemi).

9) Birlikte bulunan bakteriyemi veya diğer infeksiyonlar: Öncesinde veya takip eden haftalar içinde bildirilmiş herhangi bir infeksiyon öyküsü.

10) Graft Versus Host (GVH) reaksiyonu varlığı.

11) Önceki üç gün içerisinde antifungal profilaksi uygulanması: Yoğun bakım tedavisi altında olmak, herhangi bir nedenle cilt veya mukoza bütünlüğünün bozulması, solid organ transplantasyonu, önceden antifungal kullanımı.

Bu risk faktörleri kandidemi ve kandidüri gelişme riski yüksek hastaların tanınmasını, dolayısıyla erken antifungal tedaviye başlanmasını sağlar. Genellikle prognoz, predispozan faktörlerin sayısı ve derecesiyle ilişkilidir (87).

2.4. Kolonizasyon

Kolonizasyon, mikroorganizmanın bir vücut bölgesinde herhangi bir klinik tablo oluşturmadan üremesidir. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar yatıştan kısa süre sonra hastane florasını oluşturan mikroorganizmalar ile kolonize olmaktadır; gelişen fungal infeksiyonlardan sıklıkla endojen flora ve invaziv işlemler sorumlu tutulmaktadır. Normal sağlıklı insanda gastrointestinal kanal, cilt ve genitoüriner sistemin normal flora üyesi olarak bulunan *Candida* türleri, altta yatan ciddi hastalık varlığı, tekrarlayan GİS cerrahileri, uzun süre antibiyotik tedavisi gibi durumlarda endojen flora değişikliklerine bağlı olarak mukoza yüzeylerine yapışır ve burada çoğalır. Sırası ile kolonizasyon ve infeksiyon gelişir (91).

İnfeksiyon ve kolonizasyon arasındaki ilişki kolonizasyon indeksi ile gösterilebilir. Kolonizasyon indeksi, kolonize olan vücut bölge sayısının bir hastadan alınan toplam örnek sayısına oranını göstermektedir (CI=kolonize vücut bölgesi sayısı/bir hastadan alınan toplam örnek sayısı) (92).

Kolonizasyon ve risk faktörlerinin birlikte kullanılması ile oluşturulan “Kandida Skoru” 2.5 ise invazif kandidiyazis için yüksek risk mevcuttur. Kandida skorlaması Çizelge 2.3’de gösterilmiştir (93, 94).

Çizelge 2.3. *Candida* skorlaması (93)

Risk Faktörleri	Skorlama Puanı
Total parenteral beslenme	1
Cerrahi girişim	1
Multifokal <i>Candida</i> Kolonizasyonu	1
Ağır sepsis	2

2.5. *Candida* İnfeksiyonlarında Lokal ve Sistemik Direnç

2.5.1. Doğal Direnç

Sistemik infeksiyonda ilk engel epitel hücreleridir. Epitel hücreleri, doğal ve kazanılmış bağışıklığın düzenlenmesini sitokinleri ve membranları aracılığıyla yapar. Fagositik hücreler *Candida* infeksiyonlarına dirençte önemlidir. Fagositik hücreler hem blastospor hem de hifaları yutarak öldürebilir (95). Polimorf nükleuslu lökositler (PNL), yani nötrofiller *Candida*’nın oluşturduğu sistemik infeksiyonlara karşı çok önemli bir savunma faktörüdür. İn vitro deneylerde insan kanının *Candida*’yı öldüren bir aktivitesinin bulunduğu ve bunun doğrudan doğruya lökositlerden kaynaklandığı belirlenmiştir. Nötrofillerin fungisidal aktiviteleri oksidatif ve non-oksidatif olmak üzere iki tiptedir. Oksidatif mekanizmayla nötrofilin bazı önemli oksidanları sentezlenir. Bunlar arasında hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri, hipoklorik asitler, defansinler, lizozim, serum

proteazlar ve kloraminler sayılabilir. Hipoklorik asit ve kloramin sentezi yine PNL'de bulunan myeloperoksidaz (MPO) enzimi aracılığıyla olur. Özellikle MPO ve hidrojen peroksid gibi fungisidal moleküller PNL'lerin *C. albicans*'ı eradike edebilmesi için gereklidir. Ancak ADC non-oksidatif mekanizmalarla yok edilebilmektedir. Non-oksidatif mekanizma ise antifungal aktiviteye sahip protein ve peptidlerin varlığıyla açıklanmaktadır. PNL'lerin azürofil granüllerinde bulunan antimikrobik maddelerden defensin'lerin *Candida* türlerine karşı aktivite gösterdikleri saptanmıştır. Yine aynı granüllerde bulunan katepsin G'nin de antifungal aktivitesi mevcuttur (95, 96).

2.5.2. Humoral İmmünite

Candida infeksiyonlarına karşı korunmada sıvısal bağışıklığın rolü henüz tam bilinmemektedir. Ancak kompleman varlığında veya yokluğunda antikora bağlı opsonizasyon ve fagositozun kolaylaştığı belirtilmiş olmakla beraber, in vitro serumdaki antikor ve komplemanın birbirinden bağımsız olarak *C. albicans*'ı öldürebildiğine dair çok az veri vardır (96).

2.5.3. Hücresel İmmünite

Lenfositlerin *Candida* infeksiyonlarındaki rolü tam olarak anlaşılmamıştır. Aktif lenfositlerden salınan lenfokin benzeri maddelerin *C. albicans* üzerinde toksik etkisi bulunduğu öne sürülmüştür. *Candida* antijenlerine karşı T lenfosit yanıtının başlatılmasında ve makrofajlarla nötrofillerin aktivasyonunda lenfosit-makrofaj etkileşimleri önemlidir. Kronik mukokutanöz kandidiyazisli hastalarda hücre aracılı immünite bozukluklarının bulunuşu, hücre aracılı immünitenin *Candida* infeksiyonlarına karşı dirençte önemli olduğunu düşündürmektedir (96).

2.6. Antifungal Tedaviler ve ADC Türlerine Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

Antibiyotiklerle karşılaştırıldığında antifungallerin gelişmesi nispeten sınırlı kalmıştır. Bu durumun konak hücreye zarar vermeyen ökaryotik mantar hücresi üzerinde etkili bir ajanın identifikasyonunda karşılaşılan doğal problemlerin bir sonucundan kaynaklandığı düşünülebilir. Kullanımda olan antifungaller, polyenler (amfoterisin B; konvansiyonel ve lipid formülleri), floro-pirimidinler (flusitozin), azoller (ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol), ekinokandinler (kaspofungin, mikafungin) ve alilaminler (terbinafin)'dir.

Antifungal direnç, üç başlık altında incelenir: Primer (intrinsik), sekonder (kazanılmış) ve klinik direnç.

Primer direnç antifungal temas öyküsü yokken kalıtımla gelen dirençtir. Sekonder direnç uzun süreli bir antifungal kullanım sonucu olarak, önceden duyarlı olan bir izolatın dirençli bir fenotip geliştirmesiyle ortaya çıkar. Klinik direnç laboratuvar testlerine göre hassas olduğu bilinen antifungal kullanıma rağmen hastalığın ilerleyici olması ya da relaps göstermesi durumu olarak tanımlanmaktadır. Bu durum tipik olarak persistan, derin immün yetmezlik durumları (AIDS, nötropeni gibi) enfekte prostetik materyal varlığında söz konusu olmaktadır (5, 14, 48).

Nozokomiyal fungal infeksiyon risk faktörlerini azaltmayı amaçlayan korunma yöntemleri gittikçe önem kazanmaktadır. Kolonizasyon öncesi endojen kaynaklı infeksiyonun gösterilmesine rağmen kolonizasyonun tespitinde ve antifungal tedavinin planlanmasında kültürün rolü iyi bir şekilde belirlenmemiştir. Ancak son çalışmalar, kemik iliği alıcılarında ve lösemilerde profilaktik flukonazol kullanımını desteklemektedir. Son 10 yılda, amfoterisin B (Amp-B), flukonazol ve itrakonazol nozokomiyal fungal hastalıkların tedavisinde kullanılabilir hale gelmiştir. *C. lusitaniae* ve *C. glabrata*'nın Amp-B'ye nispeten dirençli olduğunu gösteren raporlar olmasına rağmen, *Candida* 'ların çoğu, bu antifungallere duyarlıdır (5, 8). Bir çalışmada Amp-B direncinin mantar membran sterollerindeki artışla ilişkili olduğu bulunmuştur (46).

Candida 'lar arasında azol direnci çok yaygın olmamasına rağmen, immün sistemi baskılanmış kişilerde bu antifungalın sıklıkla kullanılması bazı endişelerin doğmasına sebep olmuştur. Yapılan iki çalışmada, lösemi veya kemik iliği alıcısı olan hastalarda

flukonazolun profilakside kullanılmasının klinik olarak faydaları incelemiştir. Bu antifungalın *C. krusei* hariç tüm *Candida* türlerinde infeksiyon ve/veya kolonizasyonu engellediği görülmüştür (68). Herhangi bir hastanedeki çeşitli epidemiyolojik faktörler *C. krusei* insidansını etkilemesine rağmen, endojen kaynaklı *Candida* infeksiyonu riski yüksek olan hastalarda profilaktik tedavinin rutin kullanılması *C. krusei* gibi ilaç direnci olan mantarların ortaya çıkmasına yol açabilir (37).

Geçtiğimiz on yıl içinde, duyarlılık testleri nozokomiyal *Candida* infeksiyonlarının tedavisinde minimal rol oynamıştır. *Candida* türleri için antifungal duyarlılık testlerinin tekrarlanabilirliğinin ve güvenilirliğinin oluşturulmasında birçok zorluk ortaya çıkmıştır. Test sonuçlarını etkileyen inkübasyon süresi, sıcaklık, besiyeri türü, inokulum miktarı gibi faktörler ve standardize yöntemler son zamanlarda geliştirilmiştir (9).

Duyarlılık testleri, flukonazolun *C. albicans* ve *C. parapsilosis*'e karşı etkili olduğunu göstermiştir (10). Pfaller ve ark. tarafından yapılan büyük bir sürveys çalışmasında, *C. tropicalis* suşlarında flukonazole orta düzeyde direnç geliştiği gözlemlenmiştir (97). Daha sonraki yapılan çalışmalarda ise bu direncin arttığı görülmüştür (77).

Itrakonazol, flukonazole dirençli ya da duyarlı *Candida* türlerine (*C. glabrata* hariç) orta derecede etkilidir (98). Vorikonazol, bazı fırsatçı mantarlara ve mayaların çoğuna (ADC türleri) karşı fungisidal etki gösterir. Bu antifungal, genellikle flukonazole dirençli *C. albicans* ve *C. glabrata*'ya karşı da etkilidir (99). *C. tropicalis* dışında *Candida* türlerine karşı flukonazolden daha etkilidir (10). Posakonazol, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* gibi ADC türlerine karşı fungisidal etki gösterir (100).

Flusitozin dar spektrumlu bir antifungaldir. Direnç mekanizması primidinlerin üretiminde artış veya UMP pirofosforilaz, sitozin permeaz ve sitozin deaminaz gibi hedef enzimlerdeki değişikliklerle meydana gelmektedir (10). Flusitozin *Candida* türleri, *Cryptococcus* türlerine ve *Aspergillus* türlerine sınırlı etkisi olan bir antifungaldir (101).

Antifungallere son olarak ekinokandin sınıfı dahil olmuştur. Bu antifungalın kullanımı sınırlı olduğu için ekinokandinlere karşı direnç gelişip gelişmeyeceği henüz belirlenmemiştir. Ekinokandinlere doğal dirençli mikroorganizmalarda ya beta 1-3 glukan sentaz enzimini yetersizdir ya da ekinokandin bağlayan enzimin başka bir formu üretilmektedir. Tüm ekinokandinler *Candida* türlerine karşı fungisidal etkilidir. Ekinokandinler in vitro ve in vivo *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis*'e karşı oldukça

etkindir (98, 102). Ekinokandinlerin Minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değeri *C. parapsilosis* için diğer yaygın *Candida* türlerinden (özellikle *C. albicans*) çok daha yüksek olduğu önemle vurgulanmaktadır (103).

Klinik açıdan *Candida*'nın en önemli özelliği olan biyofilm, antifungal tedaviye toleransın artmasında önemli rol oynar. *C. albicans* biyo-filminin antifungallere karşı azalmış duyarlılığı ilk kez 1995 yılında rapor edilmiştir (104). Birçok çalışmada, en çok kullanılan antifungallere karşı (Amp-B ve flukonozal) büyük ölçüde tolerans geliştiren biyofilm hücreleri gösterilmiştir (105). *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* gibi ADC türlerinin biyo-filminin antifungallere karşı duyarlılıklarında azalma olduğu görülmüştür (104).

2.7. Hastane İnfeksiyonları ve *Candida*'lar

Fırsatçı mantar patojenleriyle oluşan nozokomiyal mantar infeksiyonlarının insidansı giderek artmaktadır. 'National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS)' ve 'Centers for Disease Control' (CDC) verilerine göre son on yılda %2'den %3.8'e yükselen anlamlı bir artış görülmektedir (5,107). Yoğun bakım ünitelerinde gelişen fungal infeksiyonlar arasında kateterizasyona bağlı olarak en sık kan dolaşımı infeksiyonları ve üriner sistem infeksiyonları görülmektedir (5). Riskli hastaların yattığı birimlerde, endemik infeksiyonların 1/3'ünden fazlası çapraz bulaşmayla meydana gelmektedir; kontrol önlemlerinin yetersizliği halinde bu oran daha da yükselmektedir (1).

Candida türleri hastanede yatan hastalarda lokal ve sistemik infeksiyonlara neden olmaktadır. Bu organizmalar immün sistemi baskılanmış hastalarda önemli nozokomiyal etken olarak yerleşmiştir. 1980'li yıllarda 'Centers for Disease Control' (CDC)'nin yaptığı sümveyansta hastane kaynaklı infeksiyon etkenleri arasında *Candida* türlerinin yedinci sırada yer aldığı dikkati çekmiştir. YBÜ'de *Candida*'lar nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak dördüncü sırada yer alırken; kan dolaşımı infeksiyonlarının %10'unu tüm üriner sistem infeksiyonlarının %25'ni oluşturmaktadır (106). Emori ve Gaynes'in raporlarına göre 1990-1992 yılları arasında NNIS hastaneleri arasında *Candida* türleri nozokomiyal patojenler arasında altıncı kan dolaşımı infeksiyon etkenleri arasında dördüncü sırada yer almıştır (108).

Nozokomiyal infeksiyonlar vücut bölgesine göre değişiklik göstermesine rağmen bu oran hastanın yattığı servise göre de değişiklik göstermektedir (108). Yüksek infeksiyon oranları, sadece onkoloji servisi ve yenidoğanla sınırlı olmayıp kalp cerrahisi ve yanık-travma servislerinde de ortaya çıkmaktadır. Bu bilgiler, nozokomiyal fungal infeksiyonların üniversite hastanelerinde yaygın olacağını göstermesine rağmen her türlü hastanede kandidal infeksiyon insidansında artış olduğu açıkça görülmektedir (5).

Candida türlerinin neden olduğu infeksiyonların klinik önemi literatürlerde açıkça belirtilmektedir (105). Bazı çalışmalarda; invaziv *Candida* infeksiyonu için önemli risk faktörü olarak intravasküler kateter, antibiyotik kullanımı, mukozal kolonizasyon ve nötrepeni tanımlanmıştır. Bu infeksiyonların önemli mortalite ve morbidite nedeni olduğu farkedilmiştir. Günümüzde ADC türlerinin infeksiyon etkeni olarak sıkça izole edildiği, nozokomiyal kandidiyazisin geçiş şekilleri, olası rezervuarları ve ADC türlerinin sıklıkla infeksiyon etkeni olması göze çarpmaya başlamıştır (2, 109).

Yüzün üzerinde *Candida* türü tanımlanmıştır ancak bunların sadece bir kaçı insandan izole edilmiştir. Son on yıl içinde, Birçok patojenin neden olduğu nozokomiyal infeksiyonlar, A.B.D. hastanelerinde artmasına rağmen, özellikle *C. albicans*'ın neden olduğu nozokomiyal fungal infeksiyon sıklığının oransal olarak daha fazla olduğu görülmektedir. Son raporlara göre *Candida* türlerinin neden olduğu infeksiyon dağılımında değişiklikler görülmüştür. *C. albicans* fungemi ve hematojen kandidiyazisler arasında en sık etken olmasına rağmen, bir kaç raporda *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. lusitaniae*'nin etken olduğu bildirilmiştir (5).

C. tropicalis invaziv *Candida* infeksiyonunun önemli bir nedeni olarak bilinmektedir. Kanserli hastalarda genellikle *C. tropicalis* kan ve idrardan en sık izole edilen ADC türleri sıralamasında ilk sıralarda yer almaktadır (86, 88). *C. tropicalis*, YBÜ'de özellikle kanserli hastalarda, uzun süre kateterizasyon gerektiren ve/veya genişlemiş spektrumlu antibiyotik alan hastalardan sıklıkla izole edilmektedir. Bu türler nötropenik hastalarda *C. albicans* ve diğer ADC türlerinden daha fazla yayılım göstermektedir. Bu eğilimini *C. tropicalis* ile ilişkili yüksek mortalite raporları açıklayabilir. *C. tropicalis*'in neden olduğu infeksiyonların çoğunun endojen flora kaynaklı olduğu görülse de nozokomiyal bulaştan kaynaklı olduğu da rapor edilmiştir. *C. tropicalis*'in endojen kaynaklı infeksiyonlarında, değişen koşullar altında GIS yoluyla farklı anatomik bölgelere yayılması söz konusudur. Nozokomiyal infeksiyonlarda ise,

sağlık çalışanlarının el teması, kateterler, implante protez ve kontamine olmuş solüsyonlar suçlanmaktadır. İdrarda *Candida* varlığı (kandidüri); kontaminasyon, kolonizasyon veya infeksiyonun bir belirtisi olabilir (54, 110).

C. glabrata, önemi gittikçe artan nozokomiyal infeksiyon etkeni haline gelmiştir. Son zamanlara kadar *C. glabrata*'nın nozokomiyal epidemiyolojisi retrospektif olarak araştırılmış ve sadece bir kaç çalışmada *C. glabrata*'nın risk faktörleri değerlendirilmiştir. Fungal nozokomiyal kolonizasyon ve *C. glabrata* ile infeksiyon epidemiyolojisi hakkındaki bilgiler nozokomiyal infeksiyon yayılımının önlenmesi açısından önemlidir (14). Vazquez ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, *C. glabrata*'nın prospektif vaka kontrol analizleriyle birlikte yapılan moleküler analizlerinde, *Candida* infeksiyonu olmayan kişilere kıyasla daha uzun hastanede kalış süresi ve daha sık antibiyotik kullanma öykülerinin olduğu gösterilmiştir (80). *C. glabrata*'nın hastane rezervuarları çok az bilinmekle beraber *C. albicans*'da olduğu gibi olası kaynaklar çevresel ve insan rezervuarlarının karmaşık etkileşimini içerir (14, 80). *C. glabrata*, *C. albicans* ve diğer nozokomiyal patojenler gibi doğrudan veya dolaylı olarak kontamine çevresel yüzeylerden bulaşabilir. *C. glabrata*'nın hastane personelinin elinden sıklıkla izole edilmemesine rağmen geçici taşımanın ellerin çevresel yüzeylere temasıyla olduğu ileri sürülmektedir (14, 17).

C. parapsilosis'in fungemi, endokardit, septik artrit ve peritonitten kaynaklanan klinik bulgularıyla önemli bir nozokomiyal patojen olduğu belirtilmiştir. *C. parapsilosis* epidemiyolojisi, *Candida* türleri arasında eşsizdir. Çünkü vücut yüzeylerinden sıklıkla izole edilmektedir. *C. parapsilosis* fırsatçı patojen olmasına rağmen *C. parapsilosis*'in neden olduğu kandidiyazide hastaların çoğu immünsüpresif değildir. Oluşan infeksiyon için baskın risk faktörleri nozokomiyal ve/veya iatrojenik faktörlerdir. Bu türler özellikle düşük doğum ağırlıklı bebeklerde kandidemi etkenidir. Ancak intravenöz hiperalimentasyonlu ve/veya kateterle ilişkili kandidemili hastalarda da sıklıkla görülmektedir (111). Avrupa ülkelerinde ve Türkiye'de *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*, *C. albicans*'tan sonra en sık kandidemi yapan türlerdir (2, 112, 113). Bir üniteye kan kültürlerinden *C. parapsilosis* üremesi infeksiyon kontrolünün eksikliği yönünden bir gösterge olarak kabul edilmektedir (2).

Mantar türlerinin tanımlanmasında geleneksel yöntemler kullanılırken epidemiyolojik araştırma amacıyla moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır. Moleküler

yöntemler, hastane infeksiyonu etkenin kaynağının (ekzojen veya endojen) ve bulaş yollarının ortaya çıkarılması, suşlar arasındaki klonal ilişkilerin araştırılmasında ve takibinde önemli katkı sağlamaktadır (5).

2.8. Laboratuvar Tanısı

Normal florada bulunan *Candida* türleri ile ilgili olarak laboratuvarlarda karşılaşılan en büyük sorunlardan birisi klinik örneklerde üreyen *Candida*'ların patojen etken olup olmadığını saptamak ve rapor edilip edilmemesine karar vermektir. Bu nedenle klinik laboratuvar ile klinisyenin yakın işbirliği içinde olması invaziv mikozların tanısında bütünleştirici bir rol oynamaktadır. Uygun hasta örneğinin alımı, miktarı ve laboratuvara taşınması konusunda ortaya konulacak ilkeler, laboratuvardan optimal sonuçların alınmasına yardımcı olur (111, 113).

Geleneksel olarak *Candida*'ların identifikasyonu makroskopik ve mikroskopik olarak morfolojik karakterlerinin incelenmesi ve biyokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesiyle yapılır. Morfolojik olarak koloni rengi ve görünümü, hif veya yalancı hif üretimi, çimlenme borusu veya klamidospore oluşturma yetenekleri gibi özellikleri, biyokimyasal olarak karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyonu reaksiyonları değerlendirilir (116, 124).

2.8.1. Doğrudan Mikroskopik İnceleme

Klinik örneklere uygulanacak ilk işlem doğrudan bakıdır. Bu amaçla lam-lamel arası boyasız preparat hazırlanabildiği gibi Gram, metilen mavisi, Wright, Giemsa, kalfloflor beyazı, periyodik asit-schiff (PAS) ve methenamin gümüş boyası ile hazırlanan boyalı preparatlar da kullanılabilir (110).

Candida türleri Gram boyama ile Gram pozitif boyanırlar. Mikroskopta incelendiklerinde, 3-6 µm büyüklüğünde oval ve/ya yuvarlağımsı, tomurcuklanan hücreler olarak görülürler.

Kalkoflor beyazı ile boyama, fungusların tespiti için duyarlı bir yöntemdir ancak floresan mikroskop gerektirir. Kullanılan UV. filtresine göre maya hücreleri, yalancı hifler ve hif yapıları tebeşir beyazı veya parlak elma yeşili renginde floresan verir (114).

Doku incelenmesinde hematoksilen eozin, PAS ve Gomori'nin methenamin gümüş boyası tanıda yararlıdır. *Candida* türleri dokuda en iyi PAS ve methenamin gümüş boyası ile gösterilmektedir (110, 115).

Potasyum hidroksit (KOH), kalın mukoid ve saç, deri, tırnak gibi keratinize örneklerden *Candida* türlerinin ayrıştırılmasını sağlamaktadır. Hazırlanan KOH preparatında tomurcuklanan blastosporların yanında yalancı hiflerin görülmesi, tanıda kültürden daha değerlidir. Doğrudan incelemede KOH veya KOH ile birlikte *Candida* hücre duvarındaki kitine bağlanma özelliği gösteren kalkoflor beyazının kullanılması duyarlılığı arttırmaktadır.

Hazırlanan boyalı preparatların doğrudan mikroskopik incelemesinde tomurcuklanan maya hücreleri, yalancı ve gerçek hif yapıları aranır. Yalancı ve gerçek hif yapılarının görülmesi dokuya invazyonun yani infeksiyonun göstergesi olarak kabul edilir (116).

2.8.2. Kültür ve İdentifikasyon

Candida türlerini üretmek için en çok tercih edilen izolasyon besiyeri, düşük pH'sı nedeniyle birçok bakterinin üremesini baskılayan Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyeridir (117, 118). Bu besiyeri içine sikloheksimid gibi antimikotikler ilave edilerek kontaminant saprofit mantarların; kloramfenikol ve gentamisin gibi antibiyotikler ilave edilerek de bakterilerin üremesi engellenmektedir (119,120). *Candida* türleri oda ısısı ile 37°C aralığında, 24-72 saat inkübasyon sonucu üreyebilmekte ve oluşan kolonilerin görünümü kirli beyaz veya krem rengi, nemli, düzgün veya buruşuk kenarlı, düzgün yüzeyli veya göbekli, maya kokulu ve yumuşaktır (110).

2.8.2.1. Çimlenme Borusu Deneyi

Kültürde üreyen maya kolonilerinin tanımlamasında uygulanacak ilk yöntem çimlenme borusu deneyidir. *C. albicans*'ın diğer *Candida*'lardan ayrılmasını sağlayan basit ve çok değerli bir testtir. Hızlı sonuç verir, uygulaması kolaydır (50, 121). Ancak *C. albicans* suşlarının hepsinde pozitif olmadığı gibi yalancı pozitiflik de olabilmektedir. Test için az bir miktar koloni, 0.5 ml taze donmuş plazma (TDP) konulmuş bir tüp içerisinde karıştırılıp, 35°C'de en çok 2 saat inkübe edilir (122). Süre sonunda maya-serum süspansiyonundan lama bir damla damlatılır ve lamel ile kapatılıp, çimlenme borusu varlığı açısından mikroskopik olarak incelenir. Çimlenme borusu, blastospordan orijin alan, başlangıç noktasında hiç daralma olmayan ve uzunluğu boyunca hiç kabarıklık yapmayan bir borucuk olarak gözlenir. Yalancı çimlenme borusunda ise daha büyük bir blastospor vardır ve hif ile bağlantı bölgesinin daha belirgin olduğu gözlenir. ADC türlerinde ise germinasyon maya formu ile büyüyen hifal hücre arasında bir darlık ile karakterizedir. Çimlenme borusu maya hücresinin genişliğinin yarısı, boyunun ise 3-4 katı kadar uzunluktadır. Maya hücrelerinden çıkan paralel uzantılar olarak gözlenir ve hücreden çıkış noktasında boğumlanma oluşturmaz. *C. tropicalis* çimlenme borusu ile karışabilecek hif başlangıcı benzeri yapılar üretebilir ancak hifin ana hücreden çıkış yerinde darlık mevcuttur ve blastokonidyalı *C. albicans*'inkilerden daha geniştir (13).

Çimlenme borusu saptanması etkenin *C. albicans* olduğunu, saptanmaması büyük olasılıkla ADC olduğunu düşündürür. Ancak, *C. albicans*'ların yaklaşık %5'inde çimlenme borusu negatif olarak bulunmaktadır. Üç saatten uzun süren inkübasyon ve yoğun maya inokulumu kullanılması, antifungal sağaltım uygulanması gibi durumlarda *C. albicans* çimlenme borusu oluşturmayabilir (123).

2.8.2.2. Hif, Blastospor ve Klamidospor Yapılarının İncelenmesi

Mısır unlu agar gibi besin açısından fakir ortamlarda mayaların oluşturduğu blastospor, yalancı hif, hif yapısı ve klamidospor varlığı mikroskopik olarak değerlendirilir ve *Candida*'ların identifikasyonunda kullanılır. Bunun için iğne yardımıyla agar üzerine taşınan maya suşundan birbirine paralel çizgiler şeklinde ekim yapılır. Ekim alanı steril bir lamelle kapatılarak besiyeri 26°C'de 24-72 saat inkübe edilir. Kapatılan lamelin ortamın

oksijenini azaltması ve Tween 80'in yüzey gerilimini düşürmesi klamidospore ve yalancı hif üretimini artırır. Hiflerin içinde (ara klamidospore), kenarında (yan klamidospore) veya uçlarında (uç klamidospore) gelişebilen, büyük, yuvarlak, sitoplazması yoğunlaşmış ve kalın duvarlı klamidosporelar görülür. Bu yapılar, besin eksikliği ve diğer uygunsuz çevre koşullarına karşı *Candida*'ların canlılığını korumasını sağlar (124).

Mısır unlu agarda *C. albicans* ve *C. dubliniensis* suşlarının büyük bir çoğunluğu (>%90) karakteristik klamidospore oluştururlar. *C. albicans* genellikle gerçek veya yalancı hiflerin ucunda tek tek klamidosporelar üretir. Buna karşın *C. dubliniensis*'inkiler çok daha bol ve ekseri çiftler halinde veya üçlü hatta bazen yalancı hifin ucundaki aynı bir taşıyıcı (süspansör) hücreye yapışmış kalın duvarlı birkaç klamidospordan oluşan kümeler veya salkımlar oluşturularak olağandışı düzen gösterirler (1). *C. tropicalis*, yalancı hif boyunca tek tek veya küçük kümeler oluşturmuş yuvarlağımsı blastokonidyumları ile; *C. glabrata* ise yalancı hiflerinin olmaması ve tomurcuklanan maya hücrelerinin varlığıyla tanımlanmaktadır.

C. parapsilosis ise yalancı hif boyunca tek tek veya bazen küçük kümeler yapacak biçimde dizilmiş blastokonidyumları ile tanımlanabilmektedir. Maya üremesi olan kan kültüründen doğrudan mısır unlu agar yüzeyine bir damla örnek bırakıldıktan sonra lamel ile kapatılıp 30-35°C'de bekletilmiş, hif oluşumunun saptanması amacıyla yarım saat aralıklarla mikroskopik olarak incelenmiştir. Yaklaşık 5 saatlik süreden sonra *C. parapsilosis*'in el ayasına benzer şekildeki yalancı hif ve blastokonidyumlarının oluşturduğu tipik yapısıyla hızlı tanıya gidilebileceği deneyimlenmiştir (Laboratuvarımızda bu yöntemle hızlı tanıya gidilmektedir).

2.8.2.3. Biyokimyasal Testler

– Karbonhidrat asimilasyon testi:

Mayaların karbon kaynağı olarak spesifik bir karbonhidratı oksijen varlığında kullanma yeteneklerini ortaya çıkarır. Bu test Wickerman ve Burton gibi rutinde pek kullanılmayan yöntemlerle yapılabileceği gibi, çeşitli otomatize ve yarı otomatize ticari sistemler kullanılarak da uygulanabilir (111, 125). *C. parapsilosis* glukozu fermente ve

asimile ederken, galaktoz, sukroz, maltoz, trehaloz, D-ksiloz ve gliserolu asimile eder. *C. tropicalis* glukoz, sukroz, galaktoz, maltoz ve ksilozu asimile eder (50).

Karbonhidrat asimilasyonu ve/veya enzim saptama amacıyla API 20C AUX ve API *Candida* ID 32C strip system (bioMerieux, Fransa), Vitek Yeast Biochemical Card system (bioMerieux, Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.), Vitek 2 ID-YST card system (bioMerieux, Vitek, Inc.), Rapid ID Yeast Plus system gibi ticari testler bulunmaktadır. Bunlar belirli bir kimyasal profil üretmek için farklı substratları içeren kuyucuklardaki yoğunluk artışını veya renk üretimini kullanırlar. Bu testler hızlı ve 24-72 saatte sonuç verebilir nitelikte olup, API 20C AUX en yaygın kullanılanıdır (85, 89, 98). API 20C AUX sonuçları mısır unlu-tween 80 agarda morfolojik görünümler ile birlikte değerlendirilerek sistem tarafından verilebilecek birden fazla tür arasında ayırım yapılabilmektedir (118).

– **Karbonhidrat fermentasyon testi:**

Fermentatif mantarlar karbondioksit ve alkol oluştururlar. Gaz oluşumu ve pH’da değişiklik olmaması fermentasyonu gösterir. Bu test değişik *Candida* türlerini, *Cryptococcus* ve *Rhodotorula* türlerinden ayırmada kullanılır (111, 125). *C. tropicalis* glukoz ve sukrozu fermente ederken, *C. parapsilosis* sadece glukozu fermente eder. *C. glabrata* sadece glukoz ve trehalozu fermente etmektedir (50).

– **Üreaz testi:**

Mayaların Christensen’s üre agarda üre hidrolizi, üreaz aktivitesini gösterir. Üreaz enzimine sahip mikroorganizmalar, üreyi amonyak ve karbondioksit parçalar. Amonyakın oluşturduğu alkali ortam pH indikatörü fenol kırmızısını koyu pembe renge dönüştürür. Bu test klinik önemi olan *Candida* türlerini diğer mayalardan ayırmaktadır. Klinik önemi olan türlerin büyük çoğunluğu üreaz negatiftir. *C. krusei* ve *C. lipolytica* üreyi hidroliz edebilir (125, 126).

2.8.2.4. Kromojenik Besiyerinde Üreme

Kromojenik besiyerlerinin içerdiği türe özgü kromojenik substratlar mayaların ürettikleri enzimlerle reaksiyona girerek türe özgü renklere koloni oluşumunu sağlamaktadır. Pagano-Levin Agar (Difco), tetrazolium hidrokloridin redüksiyonu ile farklı renkte koloniler oluşturarak tek bir klinik örnekten birden fazla *Candida* türünün izolasyonuna olanak sağlar. Bismuth Sulfite Glucose Glycine Yeast (BiGGY) agarda ise, bizmut sülfid bakteriyel üremesini inhibe eder. Bizmut sülfid indirgenmesi ile kahverengimsiyah pigmentli koloniler ve koloni çevresinde koyu presipitasyon zonları oluştururlar (127). Oxoid Chromogenic Candida Agar (OCCA), hekzoz aminidaz ve alkalen fosfataz aktivitesini saptamak için 5-bromo-4-kloro-3-indol/N-asetil beta-D-glukozamid ve 5-bromo-6-kloro-3-indol fosfat p-toluidin tuzu substratlarını içerir (128).

Koloni rengine göre tek tür ya da birden fazla türün tanısı için kullanılan ticari kromojenik besiyerleri vardır. Bunlar arasında Albicans ID (bioMerieux), Candichrom albicans (International Mycoplasma), Candiselect (Sanofi Diagnostics Pasteur), CHROMagar *Candida* (BBL), CHROMagar *Candida* (RTA) sayılabilir. Kromojenik besiyerlerinin kullanımı uygun antifungal ajanın seçilmesi ve tedaviye erken başlanması açısından klinisyene ve hastaya zaman kazandıracaktır (110, 117, 129).

2.8.7. Serolojik Testler

Serolojik testler, *Candida* tür izolatlarının klinik önemini belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır. İmmünsüpre bireylerde invazif kandidiyazise yol açan *C. albicans*'a karşı immünglobulin G (IgG) düzeyinde artış görülür. Akut infeksiyon tanısında, IgA ve IgM antikor titrelerinin belirlenmesi önemlidir. Sadece kolonizasyon olması durumunda bile antikorların saptanması ve immünsüpre hastalarda invazif kandidiyazide bile antikor oluşmaması testlerin duyarlılığını düşürmektedir. Kandidiyazis kliniği bulgularının varlığında, ardışık alınan serumlarda antikor titresinin artmaya devam etmesi infeksiyon lehine değerlendirilebilir. Ayrıca antijen testleri ile kombine değerlendirildiklerinde tanıya yardımcı olabilirler (130). Serolojik testler kandidiyazide rutin tanı yöntemleri arasında sayılmaz. Ancak bu gibi yöntemler antimikotik tedaviye zayıf yanıt veren vakalarda prognostik açıdan değerli olabilmektedir (131).

Fungal infeksiyonların tanısında antijen tespiti için; Lateks Partiküler Aglütinasyon (LPA), Counter İmmünoelektroforez (CIE), Radyoimmünoassay (RIA), Western Blotting (WB), Dot-İmmünoassay, Enzim İmmünoassay (EIA) gibi yöntemler kullanılırken, özgül antikoları ölçmek için ise; kompleman birleşme deneyi (KB), immün difüzyon (ID), Lateks Partiküler Aglütinasyon (LPA), hemaglütinasyon (HA) gibi yöntemler kullanılır (132).

2.8.7.1. Antijen Saptama

Serumda veya vücut sıvılarında mantar antijenlerinin veya metabolitlerinin aranmasına yönelik testler invazif mantar infeksiyonlarının serolojik tanısı için daha değerlidirler. Bu amaçla mannan, D-arabinitol, enolaz ve (1-3) β -D-glukan araştırılmaktadır. Günümüzde en yaygın kullanılan mannan antijen testidir (133, 134).

– *Candida* hücre duvarı mannoprotein (mannan) antijeninin saptanması:

Mannan, *Candida* hücre yüzeyinin, infeksiyon sırasında, dolaşıma geçen karbonhidratıdır. Dolaşımdan çabuk temizlenir ve kandaki düzeyi hızlı düşer. Bu nedenle saptanabilmesi için hastadan sık kan örneği alınması gerekir. İnvaziv kandidiyazis olgularında, dolaşımda hücre duvarı mannan antijenlerinin varlığı ilk kez 1976'da gösterilmiştir. Bu antijeni tespit etmek için EIA, RIA, lateks aglütinasyon testleri ve monoklonal antikoların kullanıldığı “dot immünobinding” yöntemi geliştirilmiştir. Değişik çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüğüne ilişkin farklı oranlar bildirilmektedir (133, 134).

– D-arabinitol saptanması:

D-arabinitol bazı *Candida* türlerinin metabolik ürünüdür. Sistemik kandidiyazisli hastaların idrarında düzeyi artar. Test birden çok tekrarlanırsa, duyarlılık ve özgüllük artar. *C. krusei* ve *C. glabrata* bu metaboliti üretmediklerinden bu iki etkenin infeksiyonlarında saptanmaz (135).

– **Dolaşımda enolaz aktivitesinin saptanması:**

Ardışık alınan kanlarda aranmasının duyarlılığı arttıracığı kabul edilmektedir. Kanseri ve nötropenili olup kandidiyazis riski yüksek hastaların serumlarında enolaz saptanması için “lipozomal immünoassay” uygulanmıştır. Enolaz aktivitesinin saptanması bu grup hastalarda invaziv infeksiyon ve kolonizasyon ayırımında yararlı ve kan kültürlerini destekleyici olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca enolaz *Candida* türlerine oldukça özgül olup yüzeysel kandidiyazislerde serumda saptanmaması da bir avantajdır (133).

– **(1-3) β -D-glukan antijen testi:**

Bir hücre duvarı komponenti olan (1-3) β -D glukan, *Candida* ve *Aspergillus* türlerinin de içinde bulunduğu bazı funguslar (*Zygomycetes* ve *Cryptococcus* türleri hariç) için spesifiktir. Serumda (1,3) β -D-glukan antijeninin bulunması fungal invazyonun göstergesidir ancak *Aspergillus* türleri için özgül değildir (136). Kontamine kan toplama tüpleri, gazlı bezler, kan ürünlerinin hazırlanmasında kullanılan filtreler ve çeşitli antibiyotikler (bazı sefalosporinler, karbapenemler ve ampisilin-sulbaktam) yalancı pozitif sonuçlara yol açabilir (137).

2.8.7.2. Antikor Saptama

– **Sitoplazmik antijenlere karşı antikor araştırılması:**

ELISA ile invaziv kandidiyazisli hastaların serumlarında erken dönemde IgG sınıfı antikorların saptanmasının, yüzeysel infeksiyonlardan ayırt edici olduğu belirlenmiştir. *Candida*'nın enolaz antijenine karşı olan antikor yanıtı da araştırılmıştır. Kanıtlanmış invaziv infeksiyonu olan ya da yalnızca kolonizasyonu olan, ancak bağışıklık sistemi normal işlevini görebilen hastalardan elde edilen IgG yanıtına göre yöntemin duyarlılığı %50, özgüllüğü %86 olarak saptanmıştır (137).

– **Hücre duvarı (mannan) antijenine karşı antikor araştırılması:**

RIA ve ELISA ile hücre duvarı mannan antijenine karşı antikorların invaziv infeksiyonlular kadar, sağlıklı insanların serumunda da var olduğu gösterilmiştir. Bu testlerde en yüksek duyarlılık %65 olarak bildirilmiştir (137).

2.8.8. In situ Hibridizasyon Yöntemi ile *Candida*'nın Tanımlanması

Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi, 26S rRNA'yı hedef alan floresan işaretli probalar ile hedefin işaretlenmesi ve floresan mikroskopunda görüntülenmesi prensibine dayanan moleküler bir yöntemdir. FISH yöntemi ile kültür ve fenotipik özelliklerin belirlenmesine gerek kalmadan mikroorganizmaların kısa sürede tanısı yapılabilmektedir. Maya pozitif kan kültürlerinden *C. albicans*'ın, 2.5 saat içinde, yüksek duyarlılık ve %100 özgüllükte diğer *Candida* türlerinden ayırmada başarıyla kullanıldığı bildirilmiştir (138). Bu yöntemin *C. albicans*'ı fenotipik olarak benzer *C. dubliniensis*'den %98.7-%100 arası duyarlılık ve %100 özgüllükte ayırım sağlayabildiği bildirilmiştir (139). Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan bu yöntemin ucuz, pratik ve kolay olması ve yaklaşık 2-2.5 saat gibi kısa sürede tür düzeyinde tanımlamaya olanak sağlaması yönünden avantajları bulunmaktadır. FISH yöntemi, tıbbi genetik, biyoteknoloji ve moleküler ekoloji alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikrobiyoloji alanında ise kullanılan problemlerin ucuz olması, tanımlama süresinin kısa olması, duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olması, yöntemin kolay olması, pahalı alet ve cihazlar gerektirmemesi gibi avantajları bulunmasına rağmen ülkemizde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında geniş yer bulamamıştır (139).

2.8.9. Moleküler Yöntemler

Candida infeksiyonlarının varlığının saptanmasında, doğru tanımlanmasında duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksek testlere gerek duyulduğunda DNA saptanmasına dayalı yöntemler kullanılmaktadır. Moleküler tiplemenin infeksiyon hastalıklarında en fazla gerekli olduğu alan, hastane infeksiyonlarının incelenmesidir. Moleküler tipleme yöntemleriyle salgınların kaynağı ve yayılma yolları hakkındaki hipotezler

sorgulanmaktadır. Salgının özellikleri belirlenerek, kimin nerede, ne zaman, ne ile ve nasıl etkilendiği, bulaş yolları, potansiyel kaynak ve vektörlerin tanımı yapılabilir. Endojen ve ekzojen kaynaklı infeksiyonlar ayırt edilebilir. Moleküler tiplendirme yöntemleriyle patojen bakterilerin hastane ortamında yaygınlık dereceleri ve kalış süreleri araştırılabilir (140).

Polimeraz zincir reaksiyon (PZR) bazlı tiplendirme yöntemleri kısa süre içinde gelişen salgınlarda başarıyla uygulanabilmektedir. Ancak uzun zaman periyodunda izole edilen suşların tiplendirilmesinde bu yöntemlerin stabilitesi ve etkinliği hakkındaki bilgiler sınırlıdır. *Candida* türlerinin genotiplendirilmesinde sıklıkla kullanılan moleküler yöntemler Çizelge 2.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. *Candida* türlerinin genotiplendirilmesinde sıklıkla kullanılan yöntemler (141)

Moleküler Yöntemler	Ayrım gücü	Tekrarlanabilirlik	Kullanım	Yorumlama	Maaliyet	Sonuç verme zamanı
EK	Düşük	İyi	Çok zor	Çok Kolay	Yüksek	4 gün
Makrorestriksiyon	Yüksek	İyi	Çok zor	Kolay	Yüksek	4 gün
REA	Yüksek	Yüksek	Çok zor	Kolay	Yüksek	2 gün
RAPD-PZR	İyi	Düşük	Çok kolay	Kolay	Orta	1 gün
AFLP	Yüksek	İyi	Zor	Kolay	Orta/Yüksek	2 gün
Rep-PZR	Orta	İyi	Kolay	Çok kolay	Orta	1 gün
MLP	Çok yüksek	Çok yüksek	Çok kolay	Çok kolay	Çok yüksek	1 gün
MLST	Çok yüksek	Çok yüksek	Orta	Çok kolay	Çok yüksek	2 gün

Elektroforetik karyotiplendirme (EK), Repetitive extragenic palindromic element (REP)-PZR, Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PZR), Amplified fragment length polymorphism (AFLP), restriksiyon enzim analizi (REA), Multilokus sekans tiplendirme (MLST), Microsatellite length polymorphism (MLP)

2.8.9.1. RAPD-PZR (Randomly amplified polymorphic DNA)

RAPD-PZR yönteminde primerler rastgele seçilir, bilinen belirli bir DNA sekansı hedeflemez. Bu yöntemde rastgele seçilen bir veya daha fazla primer ile DNA'daki birçok bölge çoğaltılır. Kullanılan primerlerin uzunluğuna göre yöntem farklı isimler alır. RAPD-PZR'de kullanılan primerler klasik PZR'dekine benzer şekilde 18-24 baz çifti (bç) olarak tasarlanmıştır. RAPD-PZR yönteminde kullanılan primerler 8-10 bç ve DAF (DNA amplifikasyon fingerprinting) yönteminde kullanılan primerler 4-5 bç uzunluğunda dizayn edilir. Bu kısa primerlerde G-C bazları fazladır. Bu yöntemlerde primerin rastgele bağlanmasındaki kilit nokta düşük "annealing" ısısı kullanılmasıdır, bağlanma ısısı 40-50°C'ye düşürülerek primerlerin kromozom üzerinde hem kendilerine özgü bölgelere hem de özgü olmayan bölgelere bağlanması sağlanır ve DNA sentezi gerçekleşir. Aynı tür içerisindeki farklı suşların belirlenmesi amplifikasyon sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jelde yürütülmesiyle elde edilen bantların sayısı ve büyüklüğünün değerlendirilmesi ve her suşa ait bant profillerinin karşılaştırılarak suşlar arası ilişkilerin belirlenmesiyle yapılır (142).

RAPD-PZR yöntemi, nozokomiyal patojenlerin tiplendirilmesinde diğer tiplendirme yöntemlerine göre daha hızlı olmasına karşın, teknik varyasyonlara duyarlılığı daha fazladır. Reaksiyon şartlarında ya da reaktiflerdeki küçük değişiklikler sonuçların tekrarlanabilirliğini zorlaştırır ve elde edilen bant paternlerinin değişmesine neden olur. Bu yüzden, olası salgın suşlarını karşılaştırmak problemlidir. Sıkı kontrol edildiği zaman, özellikle farklı primerler kullanılarak multiple amplifikasyon yapıldığında RAPD-PZR yüksek seviyede ayırım sağlayabilir (142).

Laboratuvarlar arası standardizasyonu sağlamak için, M13 gibi evrensel primer kullanılması, sonuçların güvenilirliğini arttırmak için standardize edilmiş amplifikasyon karışımı ve standart bir amplifikasyon protokolü uygulanmalıdır. Ayrıca, tüm salgın suşları aynı anda çalışılmalıdır (143).

RAPD-PZR sonuçlarının yorumlanması bazen zordur, çünkü RAPD-PZR varyasyonları spesifik genetik olaylar ile sıkı bir şekilde eşleşmez. Bu yüzden PFGE için tanımlanan prensipler tipik RAPD-PZR paternleri için uygulanamaz. Eğer suşlar aynı bant paternine sahipse ya da paternler üç ya da daha fazla bant farklılığı içeriyorsa tiplendirmenin yorumlanması daha kolaydır; sırasıyla suşlar klonal olarak ilişkili ya da

ilişkisiz olarak değerlendirilir. Fakat tek bir bant büyüklüğündeki bir değişikliği ya da birkaç bant yoğunluğunu yorumlamak için bir ölçüt yoktur (143).

2.8.9.2. Rep-PZR (Repetitive Extragenic Palindromic Element)

Rep-PZR yönteminde fungal genom boyunca serpiştirilmiş kodlanmayan-tekrarlayan sekansları hedefleyen primerler kullanılmaktadır. Bu tekrarlayan elementlerin amplifikasyondaki en önemli avantajı ayırt edici genomik parmak izi oluşturmasıdır (13). Bu dizilerin boyutları her bir mikroorganizma suşuna spesifiktir. Bu sebeple de amplifiye olan parçaların büyüklüğü farklı suşlar arasında değişkenlik göstermektedir. Amplikonların büyüklük ayırımı ise standart agaroz jel elektroforezi ile yapılabilmektedir. Ortaya çıkan bant kalıpları çok çeşitli prokaryotik ve ökaryotik organizmaların DNA parmak izlerinin ortaya çıkarılmasında kullanılabilir (144).

Ticari olarak temin edilebilen tek moleküler suş tiplendirme sistemi olan otomatize DiversiLab sistemi (Spectral Genomics, Inc., Houston, Tex.), rep-PZR tekniği ile çalışmakta olup, bakteriyel ve fungal suşların tür düzeyinde ayırımı yapmaktadır (145). Öncelikle suşlara DNA ekstraksiyonu yapılmaktadır, daha sonra kullanılan primerler fungal genom boyunca serpiştirilmiş çokça kodlanmayan-tekrarlayan sekansları (genellikle 30-500 bp) hedeflemektedir. İç kısımdan bağlanan primerler tekrarlayan elementleri amplifiye ederken, dış taraftan bağlanan primerler genellikle bu elementlerin arasını amplifiye eder. DiversiLab sistemi, Agilent 2100 bioanalizörü, Rep-PZR reaktif kitleri ve web tabanlı DiversiLab yazılımından oluşmaktadır. Agilent 2100 bioanalizörü; çoğaltılmış parçacıkları mikroakışkan bir çip üzerinde ayırır ve floresan yoğunluğuna ve göç süresine göre tespit eder. Yazılım analiz sonuçları ise; test edilen bütün örnekler arasındaki çiftlerin benzerliğini hesaplamak için Pearson korelasyonu kullanarak benzerlik matrisini oluşturmaktadır. DiversiLab sistemi tarafından oluşturulan sonuçlar, dendogram (suşlar arasında hiyerarşik ilişkiyi gösteren cetvel), scatterplot (grafiksel çizim, ilişkinin boyutsal, non-hiyerarşik görüntüsünü sağlamaktadır), jel-benzeri görüntü ve/veya elektroferogram olarak değerlendirilmektedir. Ticari olarak temin edilebilen bu bileşenlerin, otomasyon, teknik kolaylık, hızlilik ve yoğun mikrobiyoloji laboratuvarlarında çalışanlar için kullanışlı olduğu bildirilmektedir (145, 146).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan araç ve gereçler kullanılarak yapılmıştır.

3.1. Hasta Örneklerinin Toplanması

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na YBÜ'de yatan, uzun süreli tedavi gören, invaziv girişim uygulanan hastaların kateter idrar ve santral venöz kateterden alınan kan örneklerinden izole edilen *Candida* suşları çalışma kapsamına alınmıştır.

Tıbbi Mikoloji Laboratuvarı'na 01.01.2010 ile 05.06.2013 tarihleri arasında toplam 1056 kateter idrar örneği ve 814 SVK kan örneği gönderilmiştir. Çalışmaya 65'i kateter idrar, 33 SVK kan örneği dahil edilmiştir. Aynı zaman diliminde birden fazla hastadan izole edilen ve nozokomiyal infeksiyon etkeni olabileceği düşünülen *Candida* suşları seçilmiştir. Suşlar çalışma yapılıncaya kadar %10 gliserollü buyyona alınarak -30°C'de saklanmıştır. Çalışmaya dahil edilen hastaların örneklerinden birden fazla izolasyon gerçekleştirildiyse, bu hastalardan izole edilen sadece bir *Candida* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada 98 hastadan izole edilen 98 *Candida* suşu (35 *C. glabrata*, 33 *C. parapsilosis*, 30 *C. tropicalis*) ve 3 standart suş kullanılmıştır. Hasta sayıları YBÜ'lerde yatan hasta dağılım oranlarına göre belirlenmiştir.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Cihazlar

- Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
- Biyogüvenlik kabini (Nuair NU 425-300E Class II, A.B.D)
- Hassas terazi (Sartorius BL310, Almanya)
- Distile su cihazı (Millipore, Fransa)

- Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich-Micro 200R, Avustralya)
- Midi santrifüj (Avustralya)
- Vorteks (Nüve NM-110, Türkiye)
- Sıcak su banyosu (Nüve BM 402 Türkiye)
- -80°C'lik derin dondurucu (Heto, Çin)
- +4°C'lik soğutucu (Ariston, Türkiye)
- Otoklav (Hirayama- HA-300 M4, Japonya)
- Elektrik ocağı (Beko, 0.710, Türkiye)
- Işık mikroskobu (Olympus, Japonya)
- Dijital fotoğraf makinesi (Olympus, C7070, Japonya)
- Yatay çalkalayıcı (IKA, Werke Typ VX2, Brezilya)
- pH metre (Hanna, İtalya)
- Mikrodalga fırın (Beko-MD 1500, Türkiye)
- Mikropipet seti (Biohit, Proline 0,5µL-1000µL, Finlandiya)
- PZR cihazı (Thermal Cyclers, Eppendorf Mastercycler, Almanya)
- Elektroforez tankı (Agagel Mini Biometra, Almanya)
- Elektroforez güç kaynağı (Biometra P30, Almanya)
- Jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, Fransa)
- Nanodrop (NANODROP 2000, A.B.D ve Kanada)
- Homojenizatör (Heidolph Tip F/F, İngiltere)
- DiversiLAB (Spectral Genomics, Inc., Houston, Texas, A.B.D)
 - Agilent 2100 bioanalizörü
 - DiversiLab yazılımı (DiversiLab, version 2.1.66, bioMerieux, Fransa)

3.2.2. Kimyasal Malzemeler

- Tris-hidroklorid (Sigma, T-5941, Lot 31 K5466)
- Etilen diamin tetra asetik asit disodyum salt dihydrate (EDTA) (Sigma, E5134)
- Sodyum dodezil sülfat (SDS) (Merck, L51736210)
- Magnezyum klorid (MgCl₂) (Promega, A351H)
- Sodyum klorid (ADCl₂) (Riedel-de Haën, Lot 33000/13423)

- β - 2 merkaptoetanol (Sigma, 024K0117)
- Proteinaz K (Sigma P2308 lot 065 K8603)
- Litikaz (Sigma, L4276)
- Sıvı fenol (Sigma, P4557-100ML)
- Kloroform (Merck)
- İzoamil alkol (Merck)
- İzopropil alkol (Merck, K-32883695 405)
- Etanol absolut (Riedel de Haën/ Lot 32221)
- 10x PZR tamponu (Mg free) (Vivantis)
- dNTP karışımı (Sigma, Deoxynucleotide set DNTP-100)
- Taq DNA polimeraz (Vivantis)
- DNase, RNase free Su
- Agaroz (Sigma, A-5093)
- Potasyum asetat (Sigma K1190)
- Steril distile su
- 100 bç moleküler ağırlık standardı (Fermentas, GeneRuler 100 bp DNA Ladder, #SM0241)
- Brom fenol mavisi
- Etidyum bromid

3.2.3. Kitler

- Qiagen QIAamp DNA Mini Kit (50) (Catalog No: 51304, Lot No: 136238313)
- DiversiLab DNA Ekstraksiyon Kiti (UltraClean Microbial DNA isolation Kit 50 Purifications) (Catalog: BMX12224-50, LOT:BX11H15, MO BIO Laboratories, bioMerieux SA, Fransa)
- DiversiLab *Candida* Kiti (Rep-PZR Reagents for DNA Fingerprinting, Lot: CN121101, bioMerieux SA, Fransa)
- Kit içeriği: Primer MixA, Rep-PZR MM1, Pozitif kontrol C3, Negatif kontrol AmpliTaq DNA polymerase, 10X PZR Buffer (Applied Biosystems, Lot: N13173, Roche)

- DNA Reagent ve Supplies DiversiLab System 25 Chip Kits (Lot: NM06RK01, bioMerieux SA, Fransa) Kit içeriği: DNA Dye Concentrate, DNA gel matrix, DNA ladder, DNA marker DiversiLab System labchip (Lot No: ND12BK02, bioMerieux SA, Fransa)

3.2.4. Primerler

- Tüm mantarlara özđü M13 primeri (5'-CAG GGT CCC GGT TCT-3')
- DiversiLab *Candida* Kit içeriğinde bulunan Primer MixA

3.2.5. Besiyerleri

- Kanlı Agar (Titan Media, lot: M3G0CG01, Hindistan)
- Eosin Methylene Blue Agar (EMB) (BioMerieux SA, lot: 866855801, Fransa)
- Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Oxoid, Hampshire/İngiltere)
- Sabouraud Dekstroz Buyyon (SDB) (Oxoid, Hampshire/İngiltere)
- Tween 80'li Mısır Unlu Agar (Oxoid, Hampshire/İngiltere)
- CHROMagar Candida (RTA, Türkiye)
- %10 Gliserollü Buyyon
- Taze Donmuş Plazma (TDP)

3.2.6. Hızlı Tanı Testleri

- R.A.T (Rapid Assimilation Test)
- Çimlenme borusu deneyi (147)

3.2.7. Standart Suşlar

- *Candida tropicalis* ATCC 2014
- *Candida parapsilosis* ATCC 90018
- *Candida glabrata* ATCC 90030
- *Candida albicans* ATCC 64454

3.3. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

3.3.1. Kanlı Agar

Besiyeri içeriğinde sığır kalp infüzyonu (500 gr/L), agar (15gr/L), triptoz (10 gr/L) ve sodyum klorür (5 gr/L) bulunur. Toz besiyerinden 40 gr tartılarak 950 ml distile su içerisinde eritilir. 121°C’de 15 dak otoklav işleminin ardından besiyeri 45-50°C’ye kadar soğuması beklenir ve üzerine 50 ml steril defibrine insan kanı eklenir. Çalkalanarak karışması sağlanır ve hemen ardından 90 mm çapındaki steril plastik petri kaplarına, kalınlığı 4 mm olacak şekilde dökülür. Kullanım süresine kadar buzdolabında (+ 4°C) saklanır. Besiyeri pH değeri 7,3’tür.

3.3.2. Eosin Methylene Blue Agar (EMB)

Toz haldeki EMB agardan 36 gr 1000 ml distile su içerisinde eritilir. Besiyeri, 121°C’de 15 dak otoklav işleminden sonra besiyeri 50°C’ye kadar soğuması için su banyosunda bekletilir. 90 mm çapındaki steril plastik petri kaplarına, kalınlığı 4 mm olacak şekilde döküldükten sonra kullanım süresine kadar buzdolabında (+ 4°C) saklanır.

3.3.3. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)

Hastalardan alınan klinik örnekler, mantarların üretilmesinde kullanılan bir genel üretim besiyeri olan SDA besiyerine ekilerek maya üremesi yönünden değerlendirilmiştir.

Besiyerleri 90 mm çapındaki steril plastik petrilere döküldükten sonra kalite kontrolleri yapılarak kullanılmıştır.

Besiyerinin içeriği:

Mikolojik pepton	10 g/L
Glikoz	40 g/L
Agar	15 g/L
pH	5,6±0,2

Balon jøjeye konulmuş 65 g toz besiyeri üzerine 1 L'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenerek süspanse edilir. Kaynar suda ısıtılarak besiyerinin çözünmesi sağlanır. Otoklavda 121°C'de 15 dak sterilize edildikten sonra steril petri kutularına kalınlığı 4 mm olacak şekilde 25'er ml dökülerek katılaşıncaya kadar bekletilir ve kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanır. Hazırlanan besiyerlerinin kalite kontrolü için hazırlanan besiyerlerine standart bir *Candida* suşu ve bilinen bir bakterinin ekimi yapılarak mikroorganizmaların üremeleri karşılaştırılmıştır.

3.3.4. Sabouraud Dekstroz Buyyon (SDB)

Derin dondurucuda saklanmış olan *Candida* suşlarının canlandırılması ve kolayca üretilmesi için kullanılan bir genel üretim besiyeridir. Düşük pH içeriği nedeni ile bakterilerin üremesini inhibe etmektedir. Besiyerleri 10 cm uzunluğundaki steril tüplere dağıtılmıştır. Daha sonra kalite kontrolleri yapılarak çalışmada kullanılmıştır.

Besiyerinin içeriği:

Mikolojik pepton	10 g/L
Dekstroz	20 g/L
Agar	15 g/L
pH	5,6±0,2

Toz besiyerinden 30 g tartılarak bir balon jøjeye konulur, üzerine 1 L'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenerek süspanse edilir. Kaynar suda ısıtılarak besiyerinin çözünmesi sağlanır. Otoklavda 121°C'de 15 dak sterilize edilir. Steril tüplere 5'er ml dağıtılarak kullanılmıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanır.

3.3.5. Tween 80'li Mısır unlu Agar

Candida türlerinin gerçek hif, yalancı hif ve klamidospor yapılarının incelenmesinde kullanılan genel amaçlı besiyeridir.

Mısır unu	40 .0 g.
Agar	15.0 g
Distile su	1000.0 ml

Mısır unu 500 ml distile suya konarak karıştırılır, kaynatılır, eritilir ve süzülür. Sonra içine 500 ml suda ayrıca eritilmiş olan agar katılarak iyice karıştırılır. Tekrar süzülür. Otoklavda 121°C'de 15 dak sterilizasyondan sonra steril petrilere 12,5'er ml dökülür. Deneylede kullanılmak üzere +4°C'de buzdolabında saklanır.

Hazırlanan besiyerinin kalite kontrolünü yapmak için; *Candida glabrata* ATCC 90030 ve *Candida albicans* ATCC 64454 standart suşları kullanılarak mayalar besiyerinde klamidospor ve hif oluşumları açısından takip edilmiştir. *C. albicans* suşunun bol klamidospor oluşturması ve *C. glabrata* suşunun hiç yalancı hif oluşturmaması hazırlanan besiyerinin kullanım için uygun olduğunu göstermiştir.

3.3.6. %10 Gliserollü Buyyon Besiyeri

100 ml'lik balon jøjeye 2,1 gr Müller Hinton Broth besiyeri tartılır ve üzerine 10 cc gliserol ilave edilir ve ağzı tıkaçla kapatılır. Otoklavda 121°C'de 15-20 dak steril edilir. Besiyeri otoklavdan çıktıktan sonra soğuması beklenir ve steril ependorflara 1 ml olacak şekilde dökülür.

3.3.7. Taze Donmuş Plazma (TDP)

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kan Merkezi'nden raf ömrü dolmuş bir ünite TDP temin edilmiştir. Alınan TDP 50 ml'lik steril falkon tüplere bölüştürülerek -30°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Deneysel çalışmalarda kullanılmadan önce derin dondurucudan çıkartılarak ev tipi soğutucuda bir gece bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır.

3.3.8. R.A.T (Rapid Assimilation Test)'ın Hazırlanması

R.A.T Solüsyonunun Hazırlanması:

4 mg Trehaloz

1.06 gr Yeast Nitrojen Base

1 ml bromkresol yeşili solüsyonu (20 mg bromkresol yeşili 10 ml distile su ile karıştırılarak hazırlanır)

Hazırlanan karışım 100ml distile su içerisinde çözülür. Filtre ile süzöldükten sonra steril edilir. +4°C'de saklanır.

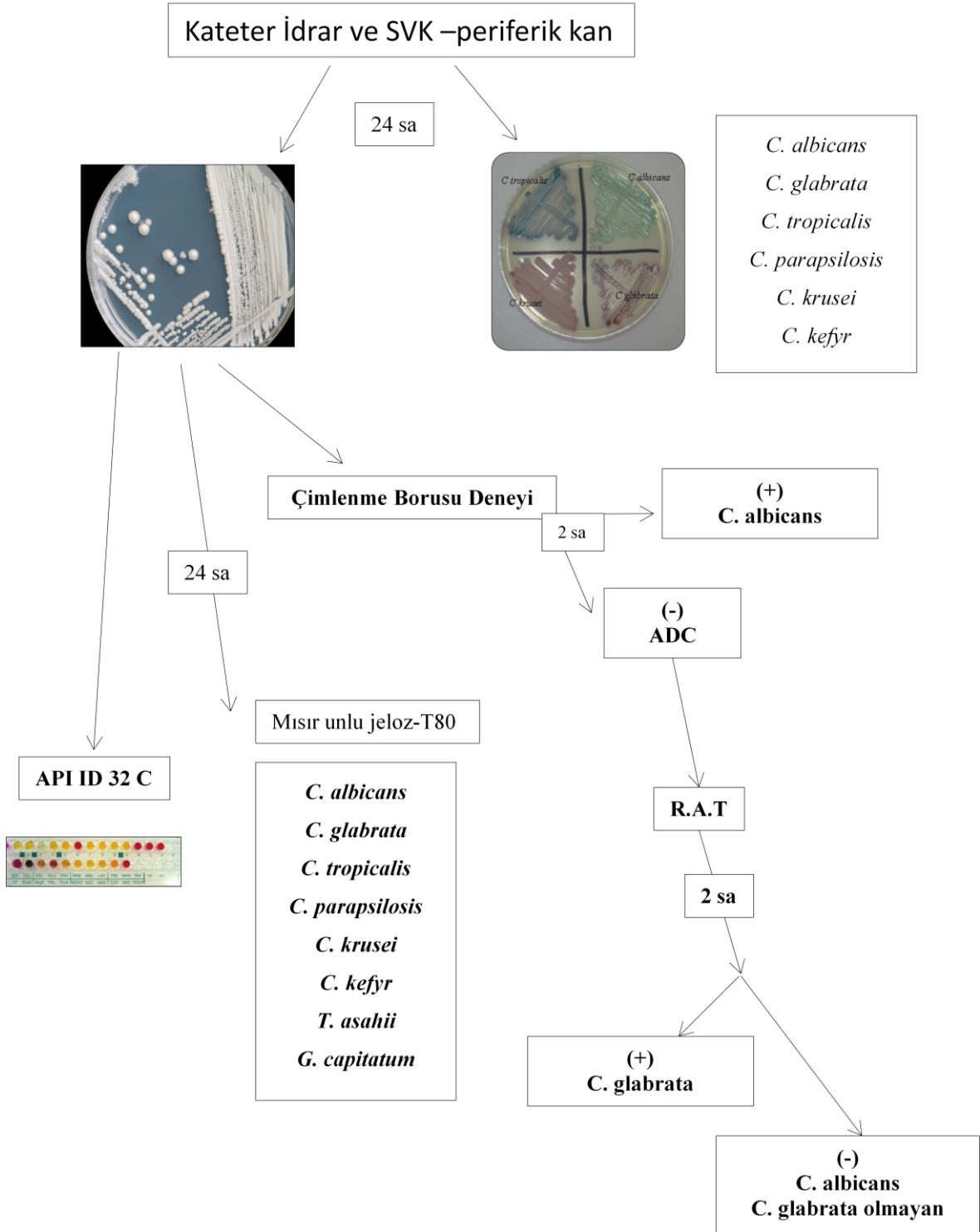
Deneyin Yapılışı:

C. glabrata'nın trehaloz enziminin hidrolize etmesi esasına dayanan hızlı tanı testidir. R.A.T solüsyonunu içeren tüplere maya kolonileri süspanse edilir. 37°C'de 3 saatlik inkübasyon sonucunda sadece *C. glabrata* trehaloz asimilasyonu gösterir. İnkübasyon sonucu tüplerde renk değişiminin olması sonucun pozitiflik ya da ne gatiflik hakkında bilgi verir. Mavi olan solüsyon renginin sarıya dönmesi testin sonucunun pozitif olduğunu gösterir.

3.4. Kültür ve İdentifikasyon

Mikrobiyolojik inceleme için laboratuvarımıza gönderilen klinik örnekler, örneğin cinsine göre kan kültür ŐiŐesi (Becton Dickenson kan kültür ŐiŐeleri), kanlı agar, EMB ve/veya SDA besiyerlerine ekimleri yapıldı. Saf maya kolonisi üretilen kültürlerden öncelikle Gram boyama yapıldı. Gram boyamada Gram (+) maya hücresi görülen örneklerin SDA besiyerlerine pasajları yapılarak 37°C’de 24-48 saat inkübe edildi.

SDA besiyerinde üreyen mayaların; koloni yapıları, Gram boyamada tipik maya hücrelerinin görünümü, çimlenme borusu oluşumu, Mısır Unlu Agarda gerçek veya yalancı hiflerin varlığı, klamidospor yapıları ve CHROMagar Candida’daki görünümleri değerlendirildi. *C. glabrata*’ların hızlı tanısı için R.A.T kullanıldı. Konvansiyonel yöntemlerle sonuç alamadığımız durumlarda API ID 32 C (BioMerieux, France) hazır ticari kitler kullanıldı. Şekil 3.1’de identifikasyon için kullanılan yöntemlerin algoritması gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Kullanılan İdentifikasyon Yöntemlerinin Algoritması

3.5. Moleküler Tiplendirme

3.5.1. RAPD-PZR ile Moleküler Tiplendirme

3.5.1.1. DNA İzolasyonu

3.5.1.1.1. Fenol kloroform yöntemi ile DNA İzolasyonu

1. Besiyerinde üreyen maya kolonilerinden bir öze dolusu alınarak 1.5 ml'lik plastik tüplerde 1 ml steril distile su içerisinde süspanse edildi.
2. Tüpler su banyosunda 80°C'de 20 dak (veya 30 dak) tutularak mayaların parçalanması sağlandı.
3. Süre sonunda tüpler su banyosundan çıkarılarak oda ısısına gelmesi beklendi.
4. Daha sonra ependorf tüpü 12.000g'de 10 dak santrifüj edilerek üst sıvı atıldı.
5. Pellet üzerine 200 µl fenol kloroform ve 200 µl steril distile su ilave edildikten sonra karışım 12.000g'de 10 dak tekrar santrifüj edildi.
6. Üst sıvı PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanıldı.

3.5.1.1.2. Qiagen Hazır Kit Yöntemi ile DNA İzolasyonu (134)

Çalışmada Rep-PZR öncesi *C. tropicalis*'in DNA izolasyonunda sorunlar yaşandığı için Qiagen firmasına ait Qiamp DNA Mini kit DNA izolasyonu için kullanıldı.

- Örnekten 200 µl alınarak tüplere aktarılır ve 14.000 rpm'de santrifüj edilir
- Santrifüj sonrası üst sıvı atılır, çökeltiye 500µl litikaz solüsyonu eklenip, 37°C'de 2 saat bekletildi.
- İnkübasyondan sonra karışım 14.000 rpm'de santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı.
- Çökelti, üzerine 180 µl ATL solüsyonu ve 20 µl proteinaz K stok solüsyonu eklenerek, 56°C'de 4 saat bekletildi.

- 4 µl RNaseA (100 mg/ml) eklenir ve 15 sn vorteksleme sonrasında iki dak beletildi.
- 200 µl AL solüsyonu eklenir ve 15 sn vortekslelendikten sonra 70°C’de 10 dak beletildi.
- 200 µl etanol eklenip, 15 sn vorteksleme yapılarak karıştırıldı.
- Tüpün içindeki karışım koleksiyon tüpüne (filtreli) aktarılıp, bir dak 10.000 rpm’de santrifüj edilir ve filtre içeriği pipet yardımı ile çekilerek atıldı.
- Koleksiyon tüpüne 500 µl AW1 solüsyonu eklenildi, 1 dak 8.000 rpm’de santrifüj edildi, filtre dikkatlice çıkarılıp yeni bir koleksiyon tüpünün içerisine konuldu.
- 500 µl AW2 solüsyonu koleksiyon tüpüne eklenildi, üç dak 14.000 rpm’de santrifüj edildi.
- Koleksiyon tüpünün filtresi 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpünün içine konuldu.
- 100µl elüsyon solüsyonu ya da distile su ilave edilerek oda ısısında 5 dak beletilir ve bir 8000 rpm’de dak santrifüj edildi.
- Kullanılana dek -20°C’de saklanıldı.

3.5.1.1.3. Dondurma-Kaynatma Yöntemi ile DNA İzolasyonu (147)

Daha önce bakterilerin DNA izolasyonunda kullanılan dondurma–kaynatma yöntemi *Candida* türleri için de uygulanmıştır. SDA besiyerinde saf olarak üretilmiş olan maya kolonisinden bir miktar alınarak içerisinde 1 ml serum fizyolojik bulunan steril ependof tüpe konulmuştur. Tüpler -80°C’de en az bir saat beletilmiştir. Tüplerin içerisindeki sıvı çözülmeden kaynayan su içerisinde 15 dakika beletilmiştir. Örnekler 13.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant amplifikasyonda kullanılmıştır.

3.5.1.2. RAPD-PZR Amplifikasyonu

İzole edilen genomik DNA örneklerinden, M13 primeri kullanılarak PZR amplifikasyonu yapıldı. Hazırlanan PZR reaksiyon karışımı (Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2) vorteksledikten sonra, her bir örnek için numaralandırılmış steril 0,5 µL'lik PZR tüplerine 48 µl dağıtılıp, klinik örneklerden ekstrakte edilen DNA örneğinden 2 µl eklenip flash spin yapılarak termal döngü cihazına (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler) yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. RAPD-PZR 2X Amplifikasyon Karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	1 örnek için
10X Amplifikasyon tamponu	5 µL
dNTP mix (10mMOL)	1 µL
MgCl ₂ (25mM)	8 µL
Steril DN _{az} ve RN _{az} içermeyen su	11 µL
Toplam hacim	25µL

Çizelge 3.2 RAPD-PZR Reaksiyon Karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
2X Amplifikasyon Karışımı	25 µL
Primer M13 (100 pmol/ µL)	1 µL
Taq DNA polimeraz (5 U/ µL)	0,5 µL
Steril DN _{az} ve RN _{az} içermeyen su	21,5 µL
Ekstraksiyon ürünü (5ng/ µL)	2 µL
Toplam hacim	50 µL
Primer M13 (5'-CAGGGTCCCGTTCT-3')	

3.5.1.2.1. Amplifikasyon Şartları

Çalışmada DNA'ları çoğaltmak için kullanılan PZR amplifikasyon şartları Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3 RAPD-PZR Amplifikasyon Şartları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre (dak)	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	5	2 siklus
Primer bağlanması (annealing)	40	5	
Zincir uzaması (extension)	72	5	
Denaturasyon için	94	1	40 siklus
Primer bağlanması (annealing)	40	1	
Son uzama (Final extension)	72	2	
Muhafaza	4	∞	∞

3.5.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR sonrası oluşan ürünlerin, hazırlanan jelde yürütülmesi ile DNA'ların bant büyüklükleri, belli DNA fragmentleri ihtiva eden DNA size marker ile kıyaslanarak saptandı. Elektroferez yürütme tamponu olarak 1X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) kullanıldı.

PZR ürünlerinden 7,5'er µl alınarak 2,5 µl 1X TBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 sükröz veya gliserol, %0,25 brom fenol mavisi) ile iyice karıştırıldı ve elektroferez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Tankın kapağında bulunan elektrotlar yerleştirilerek güç kaynağına bağlandı. Güç kaynağı 130 Volt ve 40 mA olacak şekilde ayarlanarak çalıştırıldı. Yükleme tamponunun jel üzerinde yürütmesi takip edilerek yaklaşık 45–60 dak jelin 3/4'lük kısmını yürütmesi beklenerek elektroferez işlemi sonlandırıldı.

3.5.1.4. Elektroforez Sonuçlarının Gözlenmesi

Jel tanktan çıkararak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-translüminatöründe incelendi ve elektroforez işlemi sonunda elde edilen bantlar jel görüntüleme sisteminde gözlemlenerek kaydedildi. Ayrıca jel görüntüsünün çıktısı alındı

3.5.2. REP-PZR DiversiLab Sistemi ile Moleküler Tiplendirme

Çalışmaya dahil edilen hasta örneklerinden izole edilen 68 *Candida* suşu (*C. glabrata* ve *C. parapsilosis*) arasındaki klonal ilişkinin varlığı Rep-PZR DiversiLab sistemi ile araştırıldı.

3.5.2.1. DNA İzolasyonu ve Miktarlarının Ölçülmesi

DNA izolasyonu UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, ABD) ile üretici firmanın önerdiği DNA izolasyon protokolüne göre yapıldı. DNA ekstraksiyonu yapılacak örnekler kanlı agara tek koloni ekimi yapılarak 35°C’de 18-24 inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda örnekler ikinci kez pasajlanarak elde edilen kültürlerden DNA ekstraksiyonu yapıldı.

3.5.2.1.1. DNA ekstraksiyonunun yapılışı:

- 300 µl MicroBead çözeltisi, çalışılacak örnek sayısı kadar çıkarılan MicroBead tüplerine dağıldı.
- Besiyerindeki bakterilerden 1 µL’lik steril öze ile 2 öze dolusu örnek MicroBead tüpü içerisine alınarak tüp içerisinde bulunan kum taneleri ile karışması sağlandı.
- MicroBead tüpüne 50 µl MD1 çözeltisi eklendi.
- İçerisinde bakteri süspansiyonu bulunan MicroBead tüpleri, MOBIO vorteks adaptörüne takılarak 10 dak boyunca maksimum hızda vortekslendi.
- Vorteksleme işleminden sonra tüpler 10.000 x g’de 30 sn çevrildi.

- Temiz tüplere 100 µl MD2 çözeltisi kondu.
- Santrifüj işlemi sonunda elde edilen tüm süpernatant 100 µl MD2 çözeltisine aktarıldı. Bu aşamada süpernatant ile birlikte MicroBead tüplerindeki kum tanelerinin transfer edilmemesine dikkat edildi.
- Örnekler kısa bir süre vortekslendi ve 15 dak veya yeterli soğukluğa ulaşıncaya kadar buzdolabına bırakıldı.
- Buz dolabından çıkarılan örnekler 1 dak 10.000 x g'de santrifüj edildi.
- Temiz tüplere 900 µl MD3 çözeltisi eklendi.
- Santrifüj sonunda örneklerden 200 µl süpernatant 900 µl MD3 çözeltisine aktarıldı.
- Tüpler kısa bir süre vortekslendi ve çevrildi.
- Süpernatant (yaklaşık 650 µl) temiz bir spin filtreye transfer edildi.
- Spin filtreli tüpler 30 sn boyunca 10.000 x g'de santrifüj edildi. Toplama tüpüne akan sıvı atıldı.
- 300 µl MD4 çözeltisi spin filtreye boşaltıldı.
- Spin filtreli tüpler 30 sn boyunca 10.000 x g'de santrifüj edildi ve toplama tüpüne akan sıvı atıldı.
- Tüpler, 1 dak 10.000 x g'de kuru olarak santrifüj edildi.
- Spin filtreler temiz bir tüpe aktarıldı.
- 35 µl MD5 çözeltisi spin filtrenin ortasına gelecek şekilde boşaltıldı ve 2 dak oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda spin filtre içeren 30 sn 10.000 x g'de santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra DNA'lar toplama tüpüne aktarıldı ve spin filtre atıldı.
- Toplama tüpünde elde edilen DNA'lar Rep-PZR uygulamasına kadar 20°C'de bekletildi.

3.5.2.1.2. DNA miktarlarının ölçülmesi

Ekstrakte edilen DNA'ların miktarları nanodrop cihazı ile ölçüldü. Miktarı fazla olan örneklerin DNA'ları, DiversiLab dilüsyon hesaplama programı ile dilüsyon için

gereken DNA ve su miktarları hesaplanarak, nükleaz içermeyen steril su ile 35 ng/ μ L olacak şekilde seyreltildi.

3.5.2.2. Rep-PZR Amplifikasyonu

Rep-PZR uygulaması DiversiLab *Candida* DNA fingerprinting kit ile yapıldı. Reaksiyon bileşenlerinin hazırlanması ve termal cyclus programının oluşturulması DiversiLab sistemi Rep-PZR çalışma programında belirtildiği gibi uygulandı (Çizelge 3.4. ve Çizelge 3.5).

Çizelge 3.4. Rep-PZR amplifikasyonunda bir örnek için hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
Rep-PZR MM1	18 μ L
GeneAmp 10X PZR Buffer	2,5 μ L
Primer Mix	2 μ L
AmpliTaq DNA polimeraz	0,5 μ L
Ekstraksiyon ürünü 35ng/ μ L	2 μ L
Toplam	25 μL

Çizelge 3.5. Rep-PZR amplifikasyon koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü Sayısı
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	94	120	1
Denatürasyon	94	30	35
Primer bağlanması (annealing)	50	30	
Zincir uzaması (extension)	70	90	
Son uzama (Final extension)	70	180	1
Muhafaza	4	∞	∞

3.5.2.2.1. DiversiLab DNA Labchip Uygulaması

Rep-PZR ile amplifiye edilen *Candida* DNA'ları DiversiLab kitine yüklenerek Agilent 2100 Bioanalizör ile mikroakışkan elektroforez uygulandı. Labchip elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen ham grafikler internet tabanlı DiversiLab yorumlama ve yazılım programı ile değerlendirildi.

– Boya Matriks Hazırlanması

- DiversiLab DNA chip kiti ile birlikte kullanılan ve buzdolabında muhafaza edilen DNA Reagent & Supplies kiti jel matriksi hazırlamak için buzdolabından çıkartıldı ve oda ısısına gelinceye kadar beklendi.

- Jel ve boya vortekslendi ve kısaca spin yapıldı.
- 1.5 ml'lik bir tüpe 200 µl jel yavaşça pipetlendi ve üzerine 10µl boya eklendi.
- Karışım homojen olana kadar vortekslendi.
- Karışım kit içinde bulunan spin filtreye transfer edildi.
- Spin filtre 1500 X g'de 10 dak santrifüj edildi.
- Santrifüj işleminden sonra filtre atılarak toplama tüpündeki jel-boya çip yükleme aşamasında kullanıldı.

– Çip Yükleme

- DNA Reagent & Supplies kiti oda ısısına gelinceye kadar bekletildi.
- Kit içerisinde bulunan DNA marker ve ladder kısaca vortekslendi, jel boya karışımını vortekslenmeden kullanıldı.

- 9 µl jel boya karışımı çipin üzerindeki siyah daireye alınmış G yükleme kuyusuna pipetlendi.

- Çip yükleme istasyonu şırıngası 1ml'de iken çip istasyona yerleştirildi ve çipe 30 sn basınç uygulandı.

- Kalan G kuyularına 9 µl jel boya karışımı pipetlendi.
- Her bir numune kuyusuna 5 µl DNA marker pipetlendi.

- İlgili numune kuyularına 1 µl PZR ürünü eklendi.
- Örnekler çipe yüklendikten sonra çip 1 dak vortekslendi.

Çip vorteks işleminden sonra Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) cihazına yerleştirildi ve cihazın programına çip numarası girilerek mikroakışkan çip elektroforezi başlatıldı. Çip elektroforezi sonucunda Rep-PZR parmak izi grafikleri ve bant kalıpları internet tabanlı yazılım program ile elde edildi. Örneklerin Rep-PZR profil benzerliklerinin hesaplanması, DiversiLab yazılımı üzerinde Pearson korelasyon katsayısı ve UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) yöntemi kullanılarak yapıldı. Verilerin analizinde, her bir izolat için jel profil görüntüsü, yüzde benzerlik oranları ve dendrogram raporu oluşturuldu.

Rep-PZR parmak izi profil benzerliklerinin yorumlanması DiversiLab rehberinde verilen kriterler referans alınarak yapıldı.

3.5.2.3. İzolatların Rep-PZR Parmak İzi İlişkilerinin Değerlendirilmesi

1. Ayırt edilemez örneklerin benzerlik yüzdeleri (benzerlik > %97) yüksektir. Bu grupta yer alan örnekler genellikle %97'nin üzerinde benzerlik gösterirler ve bant farklılığı yoktur. Çalışmada bu grupta yer alan örnekler ana klonun alt tipi olarak (alt klon) olarak değerlendirildi.
2. Benzer örneklerin benzerlik oranları (benzerlik %95-97 arasında, 1-2 bant farkı) biraz düşüktür. Genellikle % 95'in üzerinde benzerlik gösterirler ve 1-2 bant farklılığı vardır. Çalışmada bu özelliğe sahip örnekler ana olarak değerlendirildi.
3. Farklı örnekler düşük benzerlik oranına (benzerlik < %95 ve > 2 bant farkı) sahiptir. Benzerlik oranı genellikle %95'in altındadır ve bant farklılığı fazladır. Bu grupta yer alan örnekler çalışmada farklı klon olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

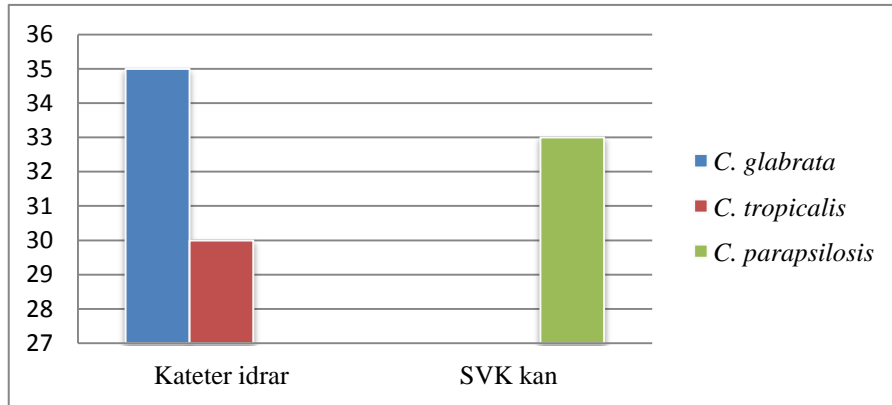
4.1. Örneklerin Değerlendirilmesi

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi'nde, Ocak 2010-Haziran 2013 tarihleri arasında Reanimasyon (REA), Dahiliye YBÜ (DYB), Cerrahi YBÜ (CYB), Kardiyovasküler YBÜ (KVYB) ve Pediatri YBÜ (PYB)'de yatan kateterize hastaların kan ve idrar örneklerinden izole edilen 98 *Candida* suşu çalışmaya alınmıştır.

Candida suşlarının izole edildiği klinik örnekler ve sayıları şu şekildedir: SVK kan örneği 33 (%33,7), kateter idrar örneği 65 (%66,3). SVK kan örneğinden 33 *C. parapsilosis* suşu izole edilirken kateter idrar örneğinden 35 *C. glabrata* ve 30 *C. tropicalis* suşları izole edilmiştir (Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. *Candida* suşlarının izole edildiği klinik örnekler

Örnek Türü	<i>Candida</i> Türü	Sayı	Yüzde (%)
SVK kan	<i>C. parapsilosis</i>	33	33,7
Kateter idrar	<i>C. glabrata</i> / <i>C. tropicalis</i>	35/30	35,7/30,6



Şekil 4.1. *Candida* suşlarının izole edildiği klinik materyale göre dağılımı

C. parapsilosis izolasyonu yapılan hastaların hastanede kalış süreleri ortalaması 44 gün (6-156 gün) olarak belirlendi. En önemli risk faktörleri olarak TPN, SVK, antibiyotik kullanımı, hipertansiyon (HT), diabetes mellitus (DM) tespit edildi (Çizelge 4.2).

C. glabrata izolasyonu yapılan hastaların hastanede kalış süreleri ortalaması 33,1 gün (2-107 gün) En önemli risk faktörleri arasında ileri yaş, DM, HT, antibiyotik kullanımı, kalıcı kateter varlığı, TPN sayılabilir (Çizelge 4.2).

C. tropicalis izolasyonu yapılan hastaların hastanede kalış süreleri ortalaması 29,8 gün (5-154 gün) . En önemli risk faktörleri arasında HT, antibiyotik kullanımı, kalıcı kateter varlığı, TPN sayılabilir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. *Candida* izole edilen hastaların demografik özellikleri ve altta yatan hastalıkları

	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Hasta sayısı	30	35	33
Cinsiyet (E/K)	22/8	5/30	23/10
Yaş	24-84	21-88 (1 hasta 4 yaşında)	2 ay-81
YBÜ'de ort. yatış süresi	29.8	33,1	44
Altta yatan Hastalıklar			
DM	2	19	7
HT	9	18	8
CA	5	9	9
Akciğer Hastalıkları			
Solunum Yetmezliği	16	9	2
Pnömoni	12	3	8
KOAH	4	5	3
Diğer Akc.Hastalıkları			
KVH	8	10	5
Nefrotik Hastalıklar	3	3	3
Nörolojik Hastalıklar	6	3	3
Transplant hastaları	1		1
Travma	7	1	2
Kalıcı kateter	26	30	28
Antibiyotik kullanımı	30	30	22
TPN	27	27	30

C. parapsilosis suşlarının izole edildiği hastaların 23'ü (%69,7) erkek ve 10'u (%30,3) kadın hastalardı. Hastaların yaş ortalaması 37,9 (1 ay-87 yıl) olarak belirlendi. *C. parapsilosis*'in izole edildiği yaş gruplarına bakıldığında daha sık olarak 0-20 yaş grubu hastalardan izole edildiği görüldü (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *C. parapsilosis* izole edilen hastaların yaş grupları

	Yaş aralığı				
	0-20 yaş	21-40 yaş	41-60 yaş	61-80 yaş	80 yaş üzeri
Sayı	13	3	7	8	2
Yüzde (%)	39,3	9	21,2	24,2	6

C. tropicalis suşlarının izole edildiği hastaların 22'si (%73,3) erkek ve 8'i (%26,7) kadın, yaş ortalaması 59,7 (24-84 yıl) olarak belirlendi. *C. tropicalis*'in izole edildiği yaş gruplarına bakıldığında daha sık olarak 61-80 yaş grubu hastalardan izole edildiği görüldü (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *C. tropicalis* izole edilen hastaların yaş grupları

	Yaş aralığı				
	0-20 yaş	21-40 yaş	41-60 yaş	61-80 yaş	80 yaş üzeri
Sayı	1	6	4	15	4
Yüzde (%)	3,3	20	13,3	50	13,3

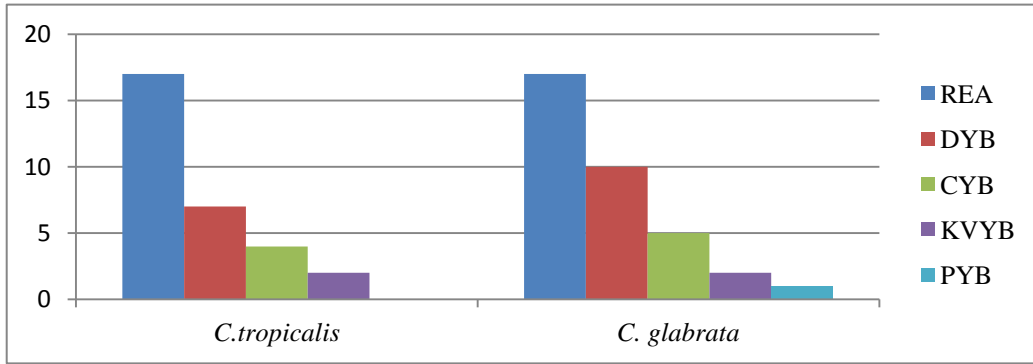
C. glabrata suşlarının izole edildiği hastaların 5'i erkek (%14,3) ve 30'u (%85,7) kadın hastalardı. Hastaların yaş ortalaması 60,8 (4-93 yıl) olarak belirlendi. *C. glabrata*'nın izole edildiği yaş gruplarına bakıldığında daha sık olarak 61-80 yaş grubu hastalardan izole edildiği görüldü (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. *C. glabrata* izole edilen hastaların yaş grupları

	Yaş aralığı				
	0-20 yaş	21-40 yaş	41-60 yaş	61-80 yaş	80 yaş üzeri
Sayı	1	3	10	17	4
Yüzde (%)	2,8	8,5	28,5	48,5	11,4

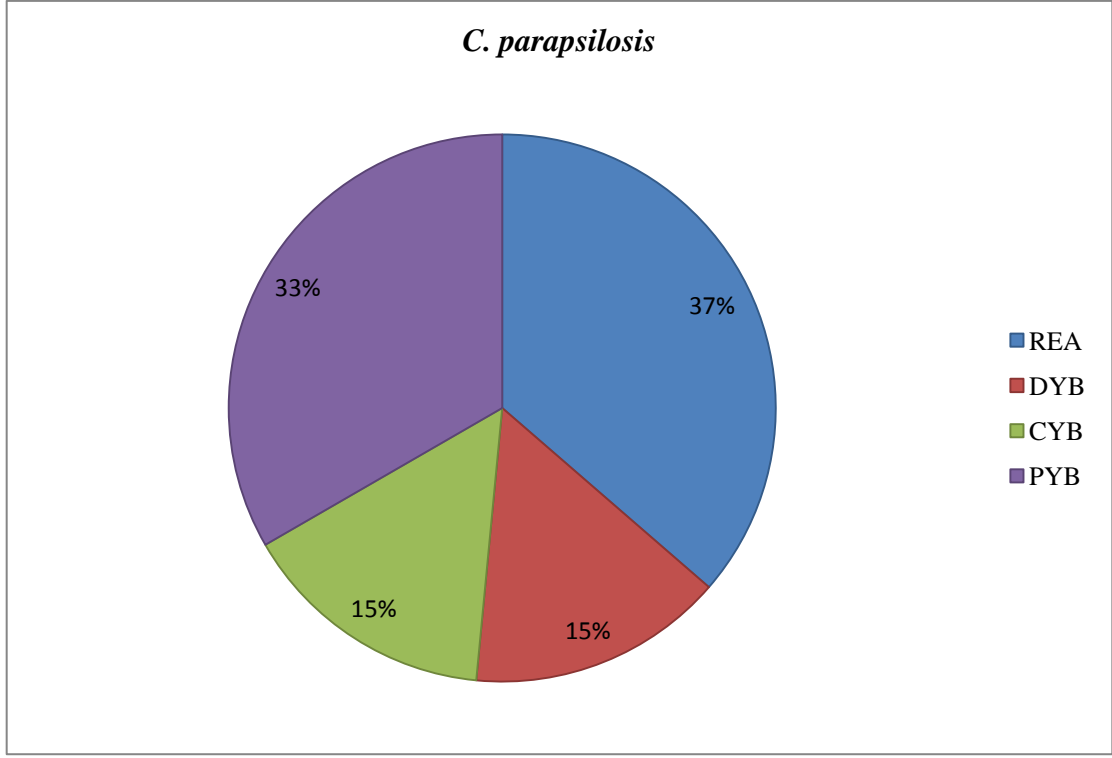
C. glabrata suşlarının 17 (%48,5) tanesi REA’da yatan hastalardan, 18 (%51,5) ise diğer servislerden izole edilmiştir. Suşların diğer servislere göre dağılımı; DYB 10 (%28,5), CYB 5 (14,3), KVYB 2 (%5,8), PYB 1 (%2,9) *C. glabrata* suşu izole edilmiştir (Şekil 4.2).

C. tropicalis suşlarının 17 (%56) tanesi REA’da yatan hastalardan, 13 (%43,3)’ü ise diğer servislerden izole edilmiştir. Suşların diğer servislerdeki dağılımı; DYB 7 (%23,3), CYB 4 (13,3), KVYB 2 (%6,7) *C. tropicalis* suşu izole edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *C. tropicalis* ve *C. glabrata*'nın servislere göre dağılım oranı

C. parapsilosis suşlarının 12 (%36,3) tanesi REA’da yatan hastalardan, 21 (%63,6)’i ise diğer servislerden izole edilmiştir. Suşların diğer servislerdeki dağılımı; DYB 5(%15,1), CYB 5 (%15,1), PYB 11 (%33,4) *C. parapsilosis* suşu izole edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *C.parapsilosis*'in servislere göre dağılımı

İzole edilen *Candida* suşlarının aylara göre dağılımı Çizelge 4.6, 4.7 ve 4.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. *C. glabrata* suşlarının aylara göre dağılımı

HASTA		2010												2011											
NO	E/K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	E	RE																							
2	K																								
3	E		TO																						
4	K		TO																						
5	E		TO																						
6	K			TO																					
7	K				RE																				
8	K					KO																			
9	K					TO																			
10	K							KO																	
11	K									RE															
12	K										RE														
13	K													PE											
14	K													RE											
15	K														RE										
16	K															RE									
17	K																RE								
18	K																	RE							
19	K																	TO							
20	K																	PE							
21	K																		KO						
22	K																		KO						
23	K																		RE						
24	K																		TO						
25	K																			TO					
26	E																			MOR					
27	K																			RE					
28	K																				TO				
29	K																					RE			
30	K																					RE			
31	E																						KO		
32	K																						RE		
33	K																						TO		
34	K																							RE	
35	K																							RE	

KIRMIZI: REA, **PEMBE:** KQYB, **TURUNCU:** DYB, **KOYU MAVİ:** CYB, **MOR:** PYB

Çizelge 4.7. *C. tropicalis* suşlarının aylara göre dağılımı

HASTA		2012												2013												
NO	E/K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	K																									
2	K																									
3	E																									
4	K																									
5	E																									
6	K																									
7	E																									
8	E																									
9	E																									
10	E																									
11	E																									
12	E																									
13	E																									
14	K																									
15	E																									
16	E																									
17	E																									
18	E																									
19	E																									
20	E																									
21	E																									
22	K																									
23	K																									
24	E																									
25	E																									
26	E																									
27	E																									
28	E																									
29	E																									
30	K																									

KIRMIZI: REA, **PEMBE:** KVYB, **TURUNCU:** DYB, **KOYU MAVİ:** CYB

Çizelge 4.8. *C. parapsilosis* suşlarının aylara göre dağılımı

HASTA		2012												2013											
NO	E/K	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	E									RE															
1	E									RE															
2	E			RE																					
2	E			RE																					
3	K								RE																
4	E							RE																	
5	K					RE																			
6	E										RE														
7	E								RE																
8	K		RE																						
9	E	RE																							
10	E								RE																
11	E								RE																
12	E								RE																
13	K		RE																						
14	E		RE																						
15	E								RE																
16	K								RE																
17	E	RE																							
18	E		RE																						
19	K								RE																
20	E								RE																
21	E					RE																			
22	E					RE																			
23	E								RE																
24	E																								
25	K																								
26	E								RE																
27	E																								
28	K																								
29	K																								
30	E																								
31	E																								
32	K																								
33	E																								

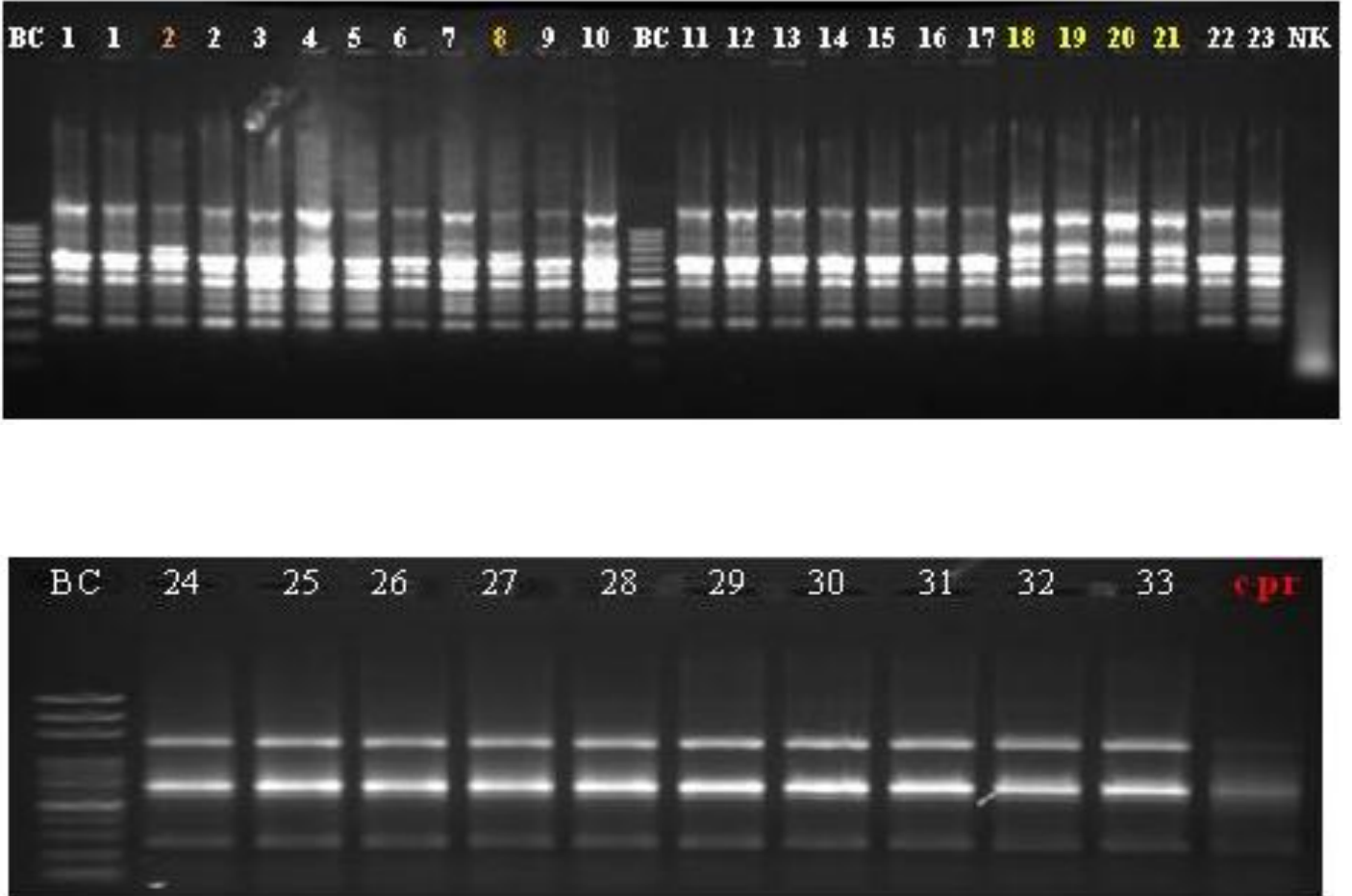
KIRMIZI: REA, **TURUNCU:** DYB, **KOYU MAVİ:** CYB, **MOR:** PYB

4.2. Moleküler Tiplendirme Sonuçları

4.2.1. RAPD-PZR Sonuçları

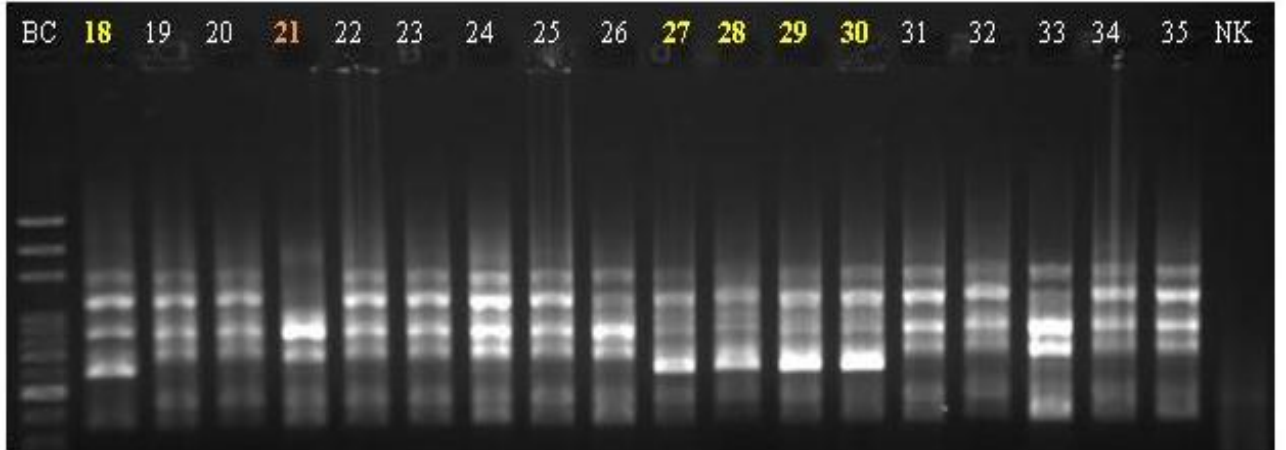
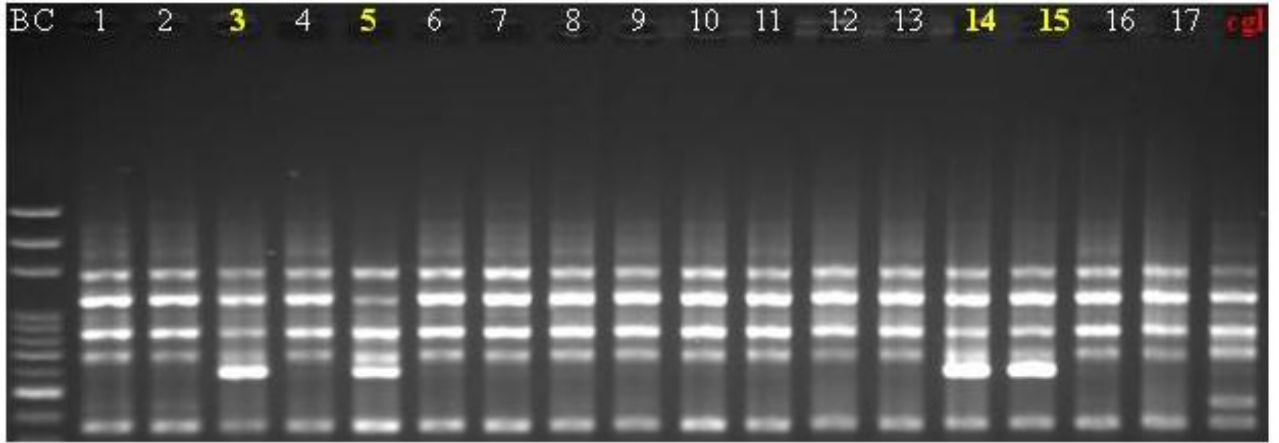
Çalışmada 98 *Candida* suşu RAPD-PZR yöntemiyle tiplendirilmiştir.

33 *C. parapsilosis* suşundan ikisi ana klon (A ve B) olmak üzere toplam 3 farklı klon (A-C) elde edilmiştir. A ana klonu 27 (%81,8) *C. parapsilosis* suşunun toplandığı en büyük klon olarak tespit edilmiş ve REA, DYB, CYB ve PYB’nde dağılım göstermiştir. B klonu 4 suş (%16) ve sadece PYB’nde, C klonu 2 suş (%4) ve sadece REA’da görülmüştür. . (Şekil 4.4)



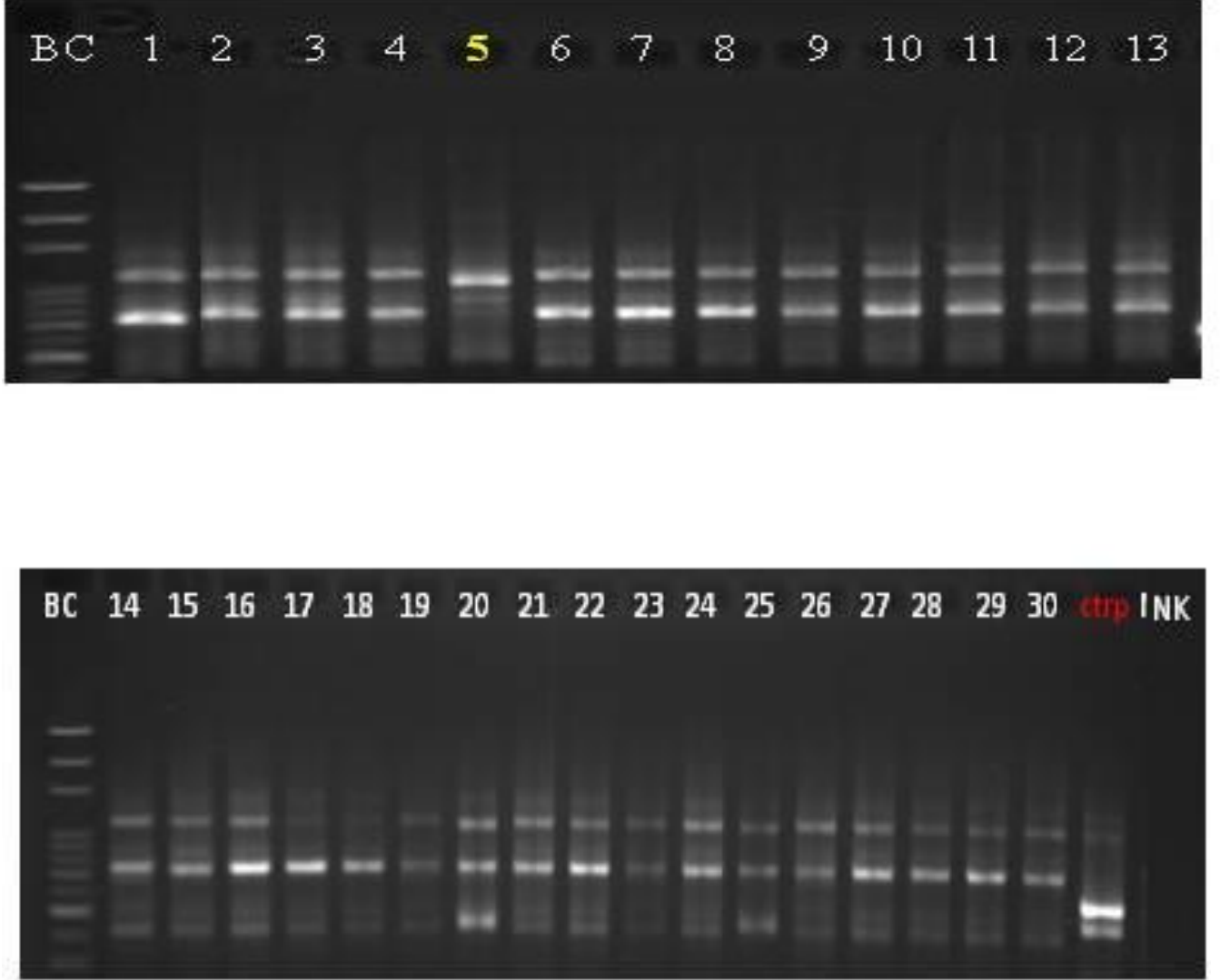
Şekil 4.4. *Candida parapsilosis* suşlarının RAPD-PZR sonrası jel elektroforez görüntüsü.
(NK: Negatif Kontrol, BC: Baz çifti, cpr: *C. parapsilosis* ATCC 90018)

35 *C. glabrata* suşundan ikisi ana klon (A ve B) olmak üzere toplam 3 farklı klon (A-C) elde edilmiştir. A klonu 25 suş (% 71,4) ile REA, DYB, CYB, PYB ve KVYB'nde, B klonu 9 suşla (%25,7) REA, DYB'nde, C klonu tek suşla (%2,9) REA'da görülmüştür. A ana klonu 25 *C. glabrata* suşunun toplandığı en büyük klon olarak tespit edilmiştir. (Şekil 4.5)



Şekil 4.5. *Candida glabrata* suşlarının RAPD-PZR sonrası jel elektroforez görüntüsü (NK: Negatif Kontrol, BC: Baz çifti, cgl: *C. glabrata* ATCC 90030)

30 *C. tropicalis* suşunda 2 farklı klon profili saptanmıştır. A klonu (29 suş, %96,6) REA, DYB, CYB ve KVYB'nde, 1 suş DYB'nde görülmüştür. (Şekil 4.6)



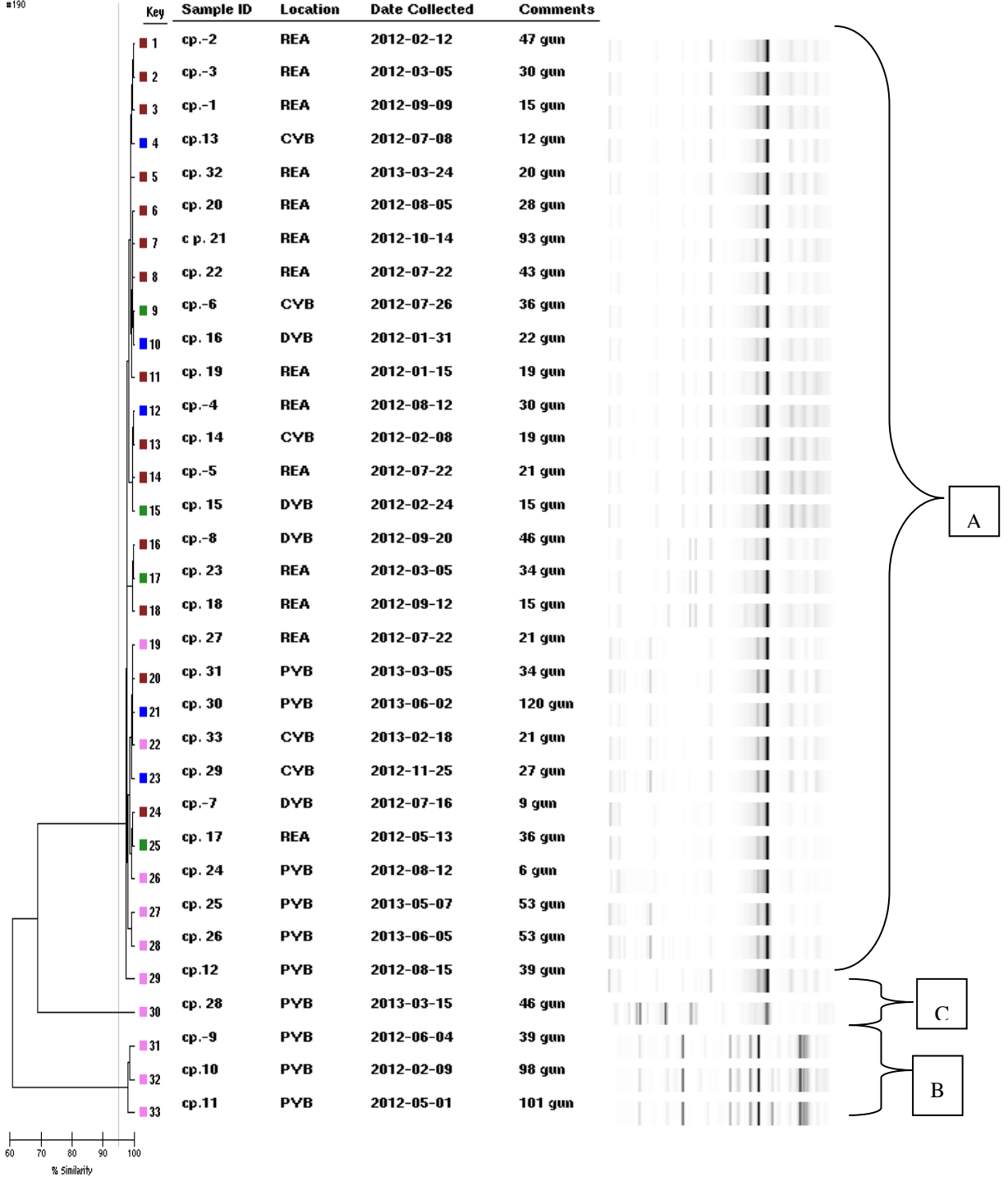
Şekil. 4.6. *Candida tropicalis* suşlarının RAPD-PZR sonrası jel elektroforez görüntüsü.
(NK: Negatif Kontrol, BC: Baz çifti, ctr: *C. tropicalis* ATCC 2014)

4.2.2. Rep-PZR Sonuçları

– *C. parapsilosis* Rep-PZR sonuçları

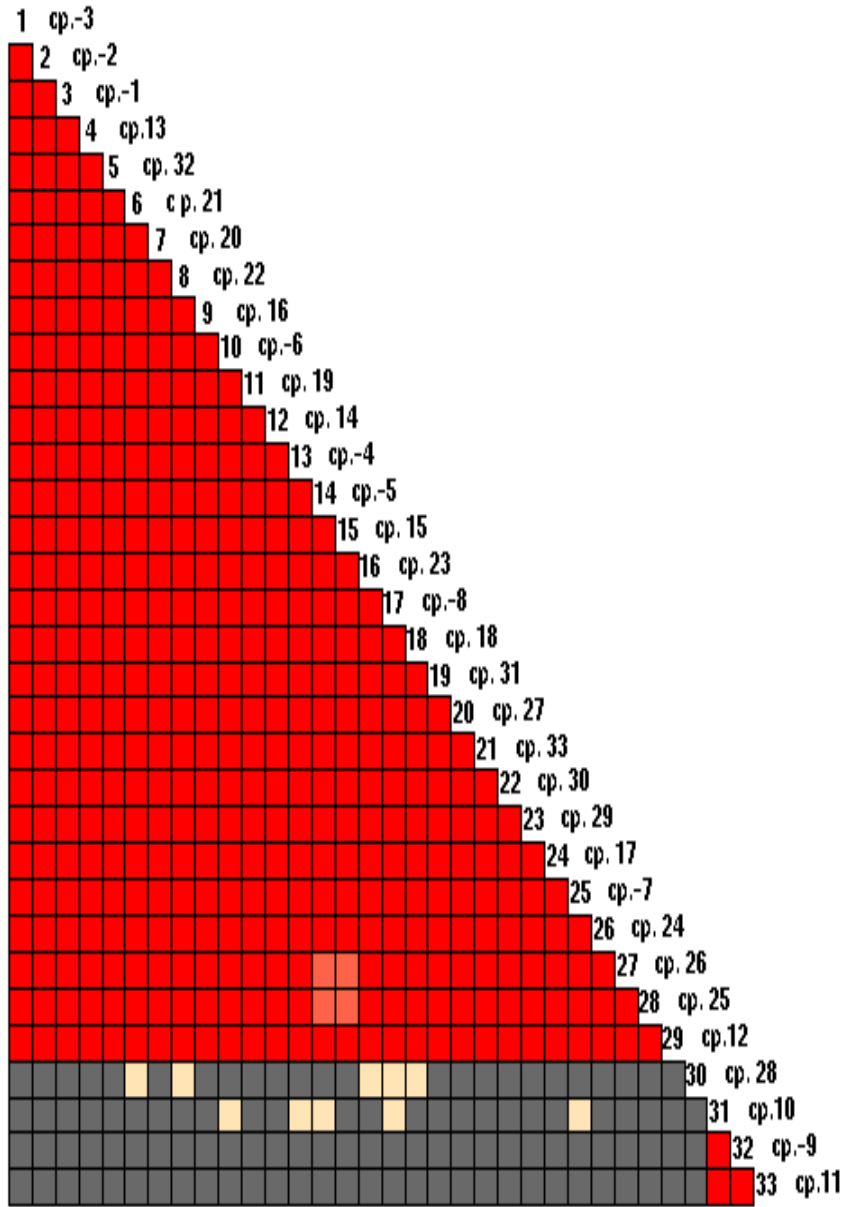
A ana klonu *C. parapsilosis* 'lerin 29 (%87,8)'unun toplandığı en büyük klon olarak tespit edilmiştir. B klonunda 3 suş (%9,1), C klonunda 1 (%3,1) suş saptanmıştır. Rep-PZR profilleri DiversiLab kütüphanesiyle karşılaştırıldığında *C. parapsilosis* suşlarının, 31 tanesi *C. parapsilosis* ve 2 tanesi *C. parapsilosis* grup 3 (cp) olarak tanımlanmıştır. Suşların birbirlerine benzerlik oranları, dendrogram (şekil 4.7, şekil 4.9) ve benzerlik matriksinde (şekil 4.8, şekil 4.10) gösterilmiştir.

Diversilab v3.4
PC
#190

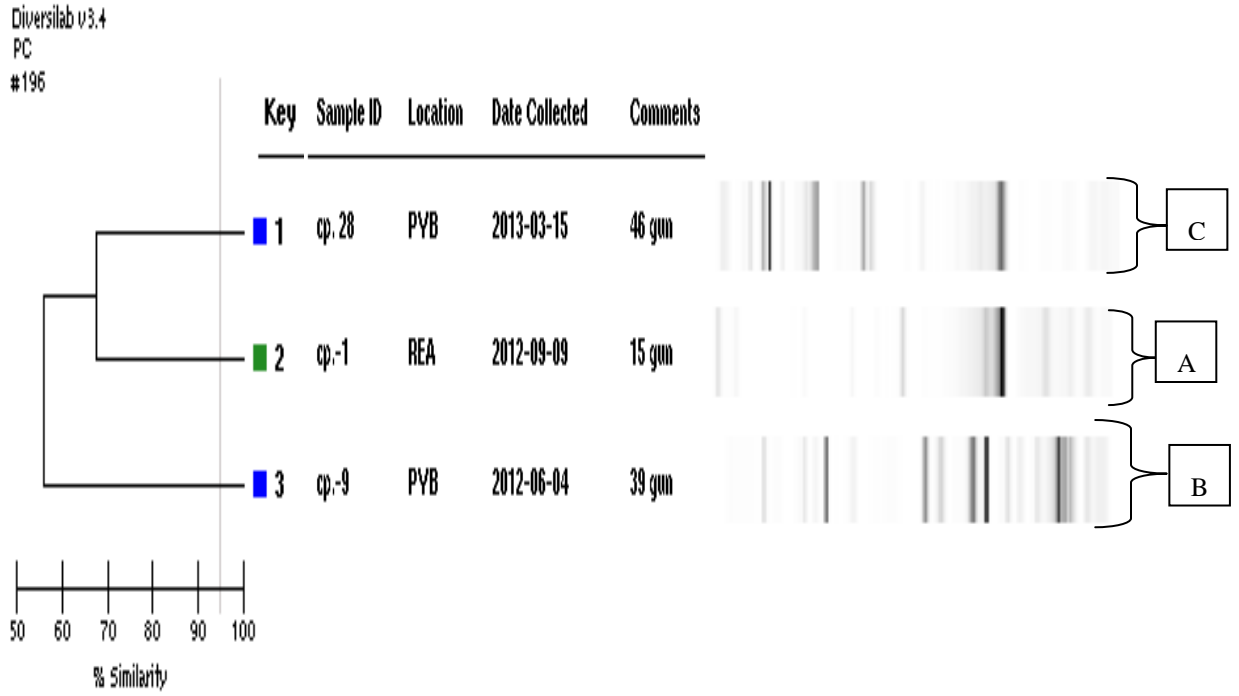


Şekil 4.7. *C. parapsilosis* klonlarına ait dendrogram

Diversilab v3.4
PC
#190



Şekil 4.8. *C. parapsilosis* klonlarına ait benzerlik matrisi



Şekil 4.9. *C. parapsilosis* ana klonlarına ait dendrogram



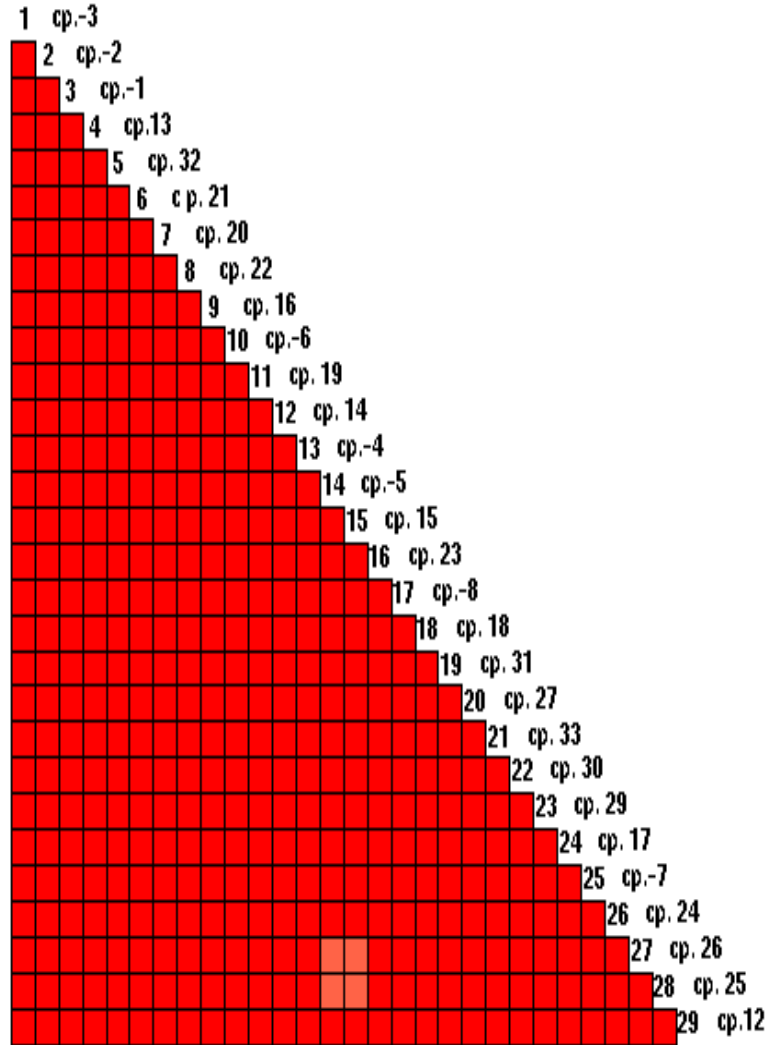
Şekil 4.10. *C. parapsilosis* ana klonlarına ait benzerlik matrisi

Klonların Epidemiyolojik İlişkileri

A Klonu

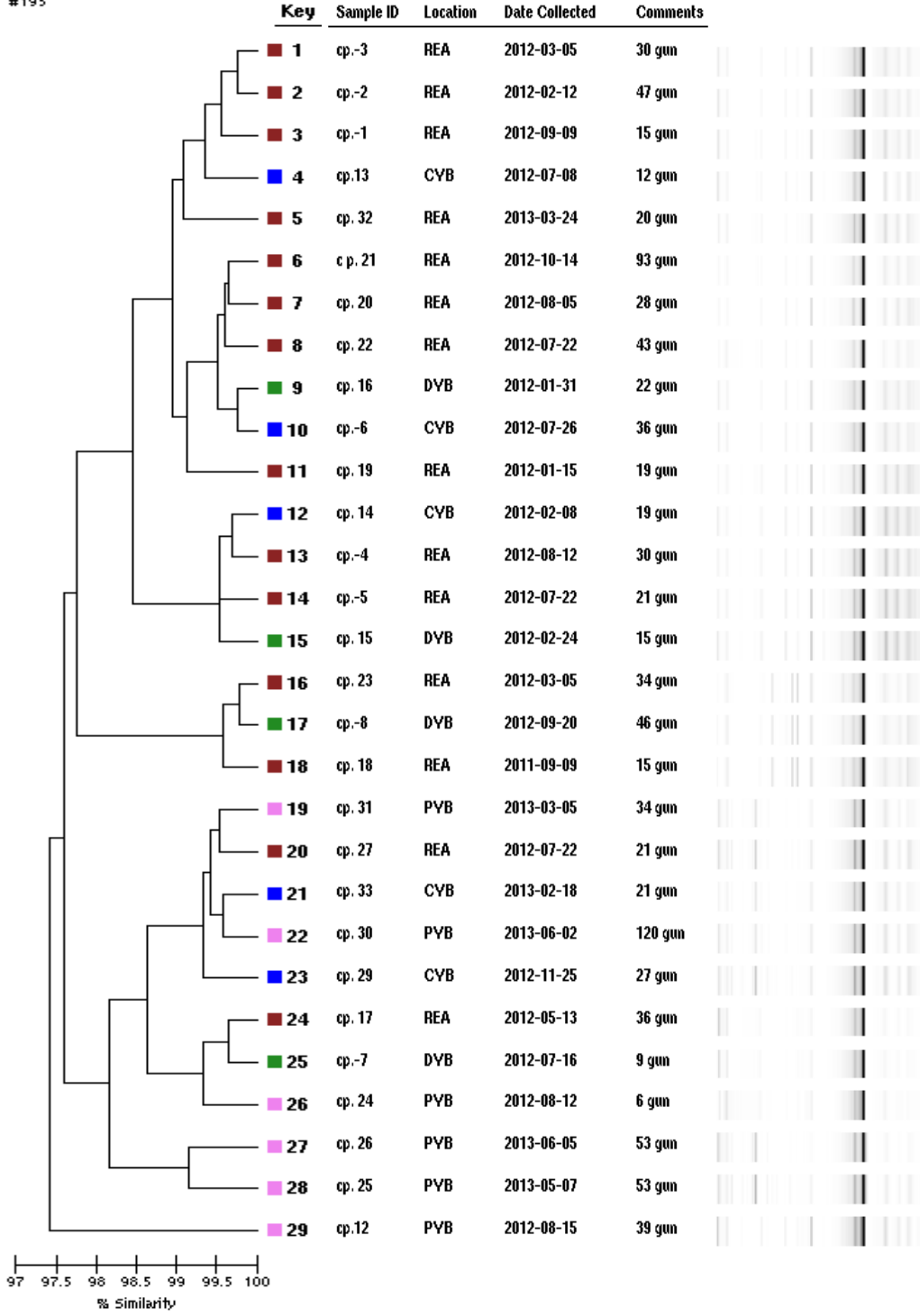
A ana klonu 29 suşla en büyük klonu oluşturmuştur. Klondaki ilk suş 15.01.2012 tarihinde REA’da yatan bir izole edilmiştir. Klondaki son suş ise 05.06.2013 tarihinde PYB’nde yatan hastadan izole edilmiştir. A klonunu oluşturan *C. parapsilosis* suşu, REA (n: 14), DYB (n: 4), CYB (n: 5), PYB (n: 6)’nde Ocak-2012 ve Haziran 2013 tarihleri arasında varlığını sürdürmüştür.

Diversilab v3.4
PC
#195



Şekil 4.11. *C. parapsilosis* A ana klonuna ait benzerlik matrisi

Diversilab v3.4
PC
#195



Şekil 4.12. *C. parapsilosis* A ana klonuna ait dendrogram

B klonu

B klonundaki suşlar pediyatrik yoğun bakım ünitesinden (n: 3) izole edilmiştir. B klonundaki ilk suş 09.02.2012 tarihinde PYB’nde yatan hastadan izole edilirken son suş ise 04.06.2012 tarihinde PYB’nde yatan hastadan izole edilmiştir.

- **B 1 Alt Klonu**

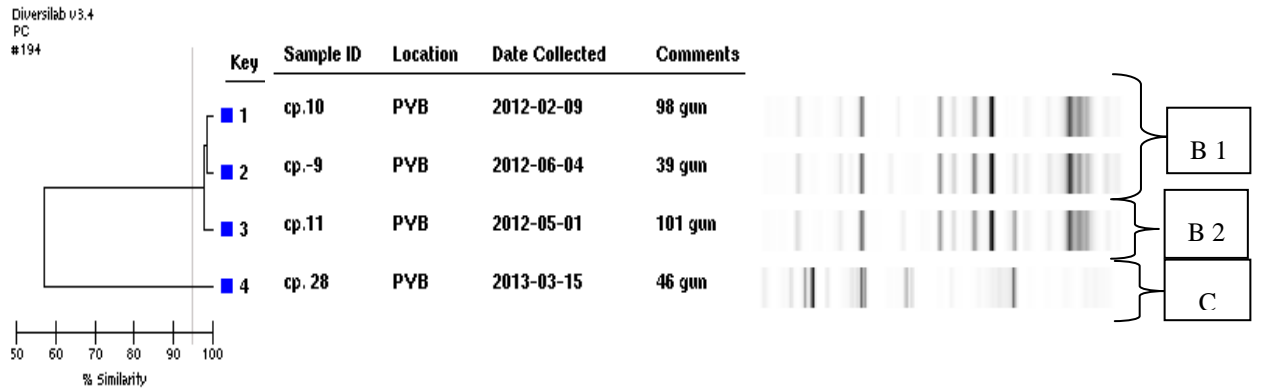
2 suş (cp 9 ve cp 10 numaralı hasta) içermektedir. İlk suş 09.02.2012 tarihinde PYB’nde yatan hastadan izole edilmiştir. Diğer suş ise 04.06.2012 tarihinde PYB’nde yatan hastadan izole edilmiştir.

- **B 2 Alt klonu**

1 suş (cp 11 numaralı hasta) içermektedir. Bu suş 01.05.2012 tarihinde PYB’nde yatan hastadan izole edilmiştir.

C klonu

Tek bir suş (cp 28 numaralı hasta) içermektedir. Bu suş 15.03.2013 tarihinde PYB’nde yatan hastadan izole edilmiştir.



Şekil 4.13. *C. parapsilosis* B alt klonlarına ve C ana klonuna ait dendrogram



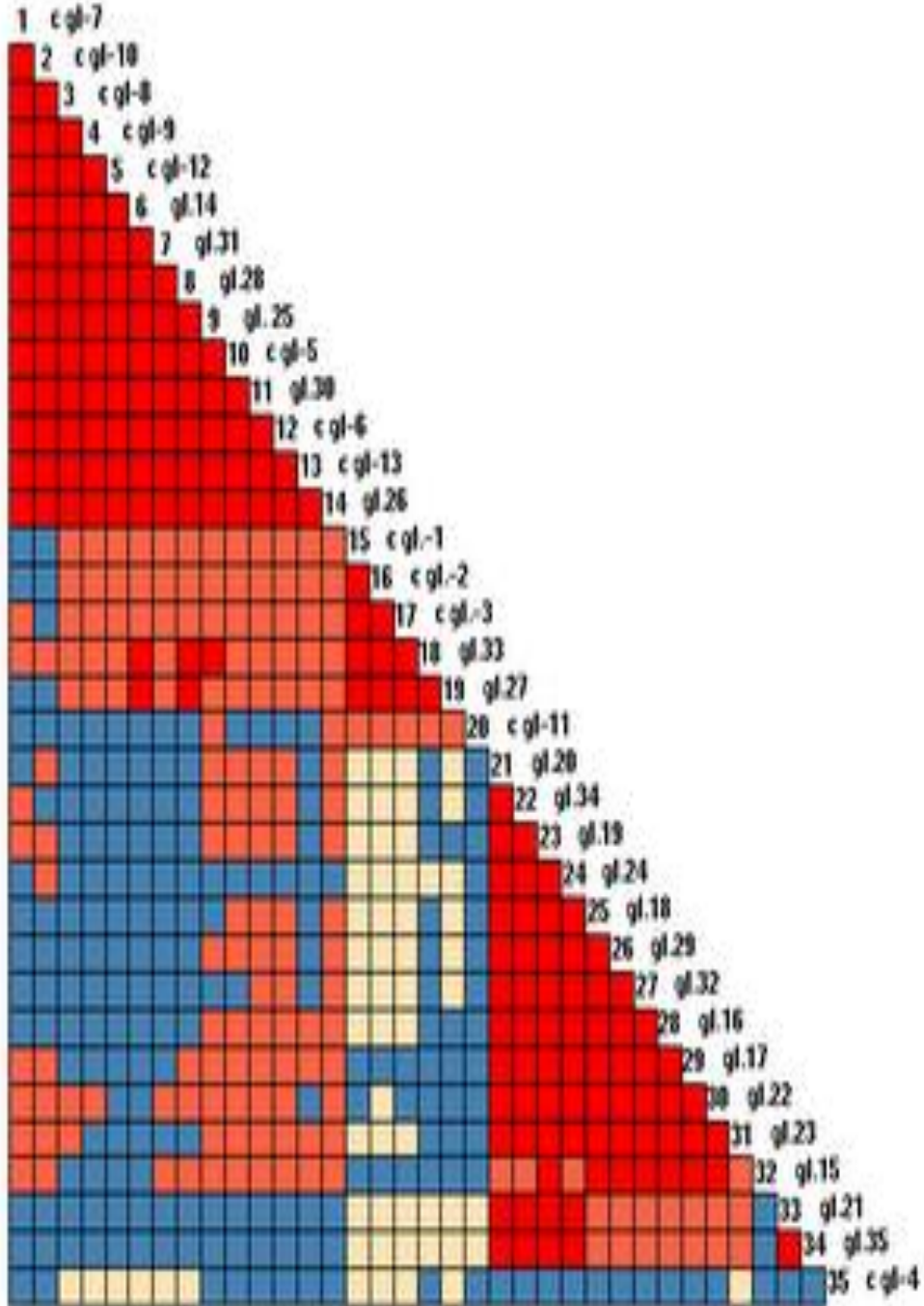
Şekil 4.14. B alt klonlarına ve C ana klonuna ait benzerlik matrisi

– *C. glabrata* Rep-PZR sonuçları

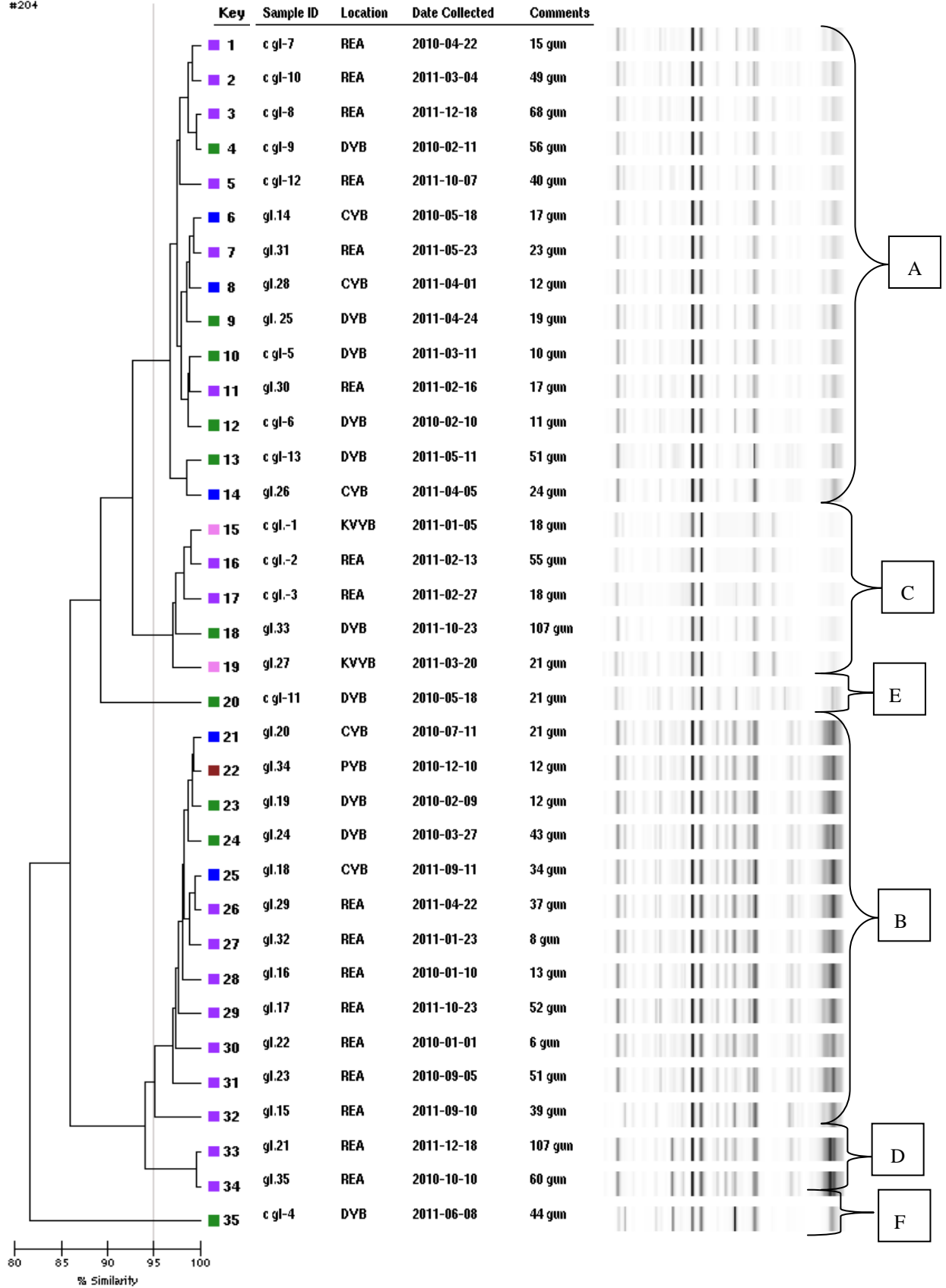
Çalışmada Rep-PZR DiversiLab yöntemi ile tiplendirilen 35 *C. glabrata* suşundan ikisi ana klon (A ve B) olmak üzere toplam 6 farklı klon (A-F) elde edildi. A ana klonu *C. glabrata* 'ların 14 (%40)'unun toplandığı en büyük klon olarak tespit edildi. B ana klonu 12 suş (%34,3), C klonu 5(%14,3) suş, D klonu 2 (%5,8), E klonu 1 (%2,8), F klonu 1(%2,8) içermekteydi.

Suşların birbirlerine benzerlik oranları, benzerlik matrisi (Şekil 4.15) ve dendrogramda (Şekil 4.16) gösterilmiştir.

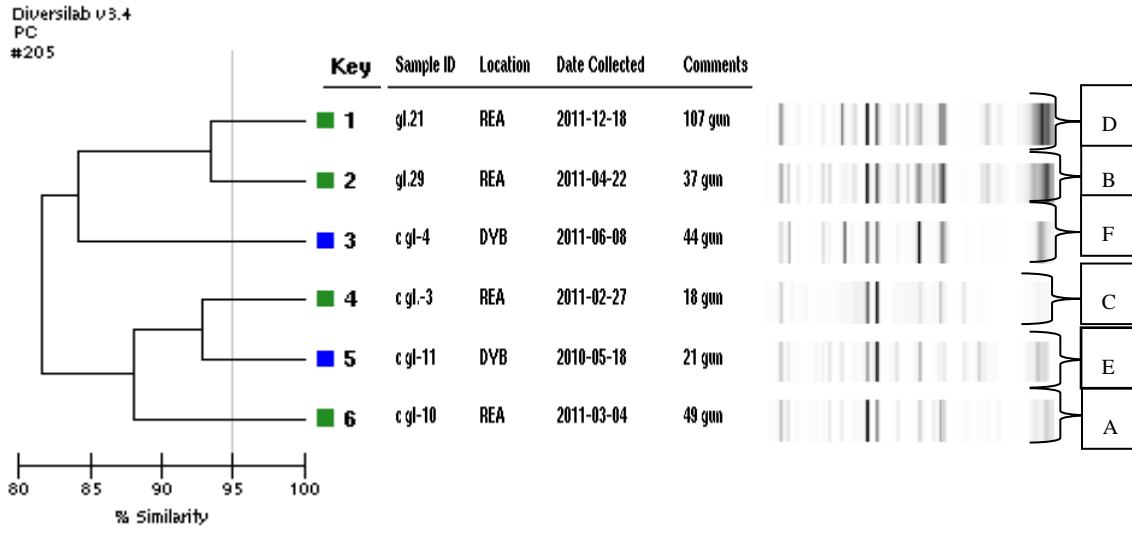
DiversiLab v3.4
PC
#204



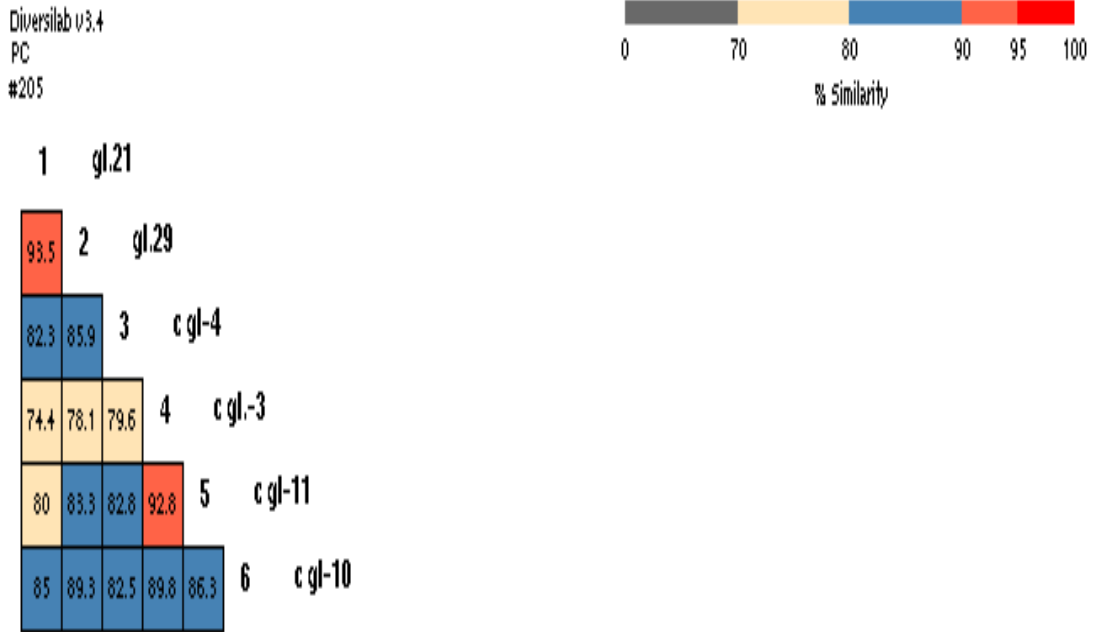
Şekil 4.15. *C. glabrata* klonlarına ait benzerlik matrisi



Şekil 4.16. *C. glabrata* klonlarına ait dendrogram



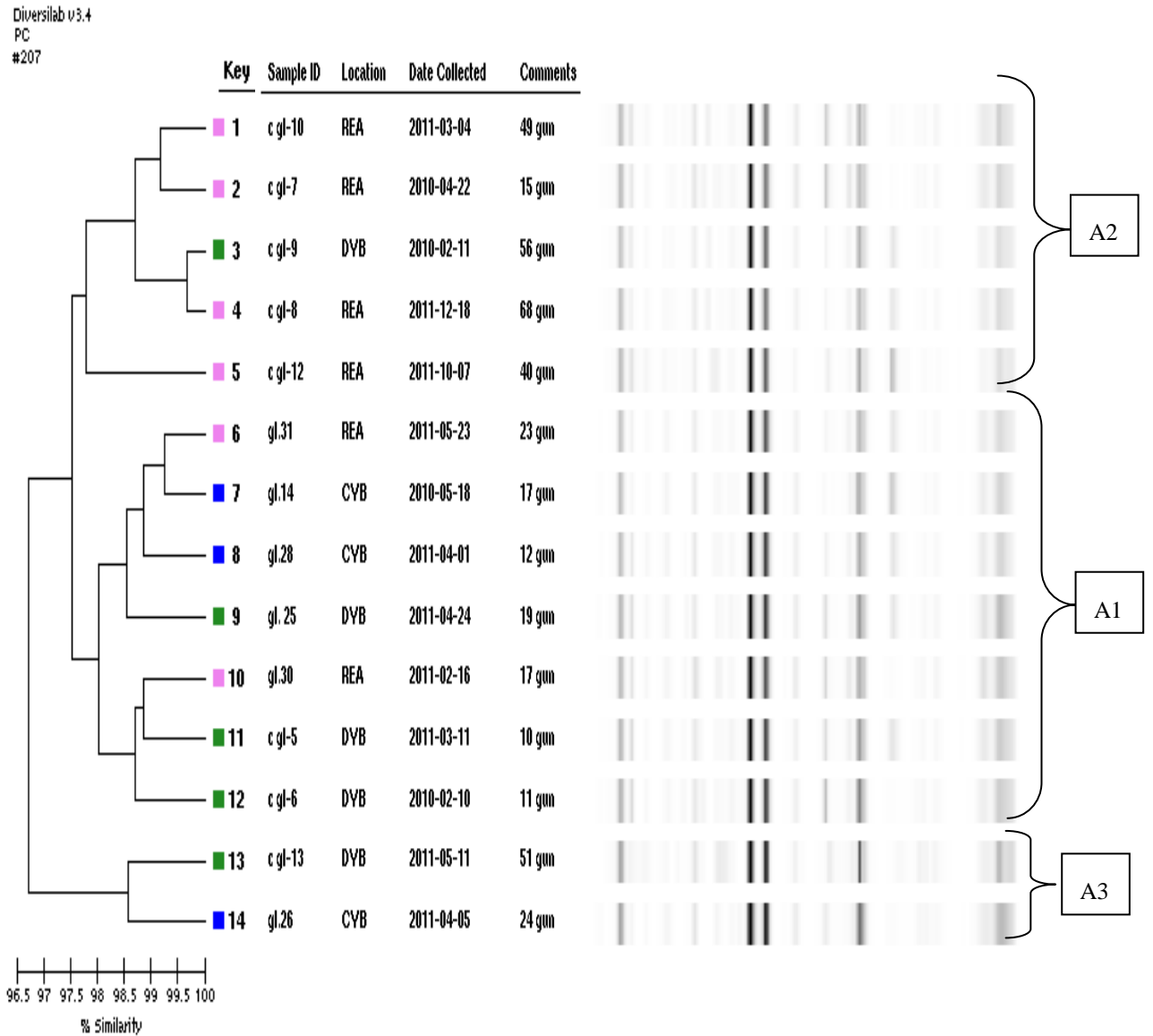
Şekil 4.17. *C. glabrata* ana klonlarına ait dendrogram



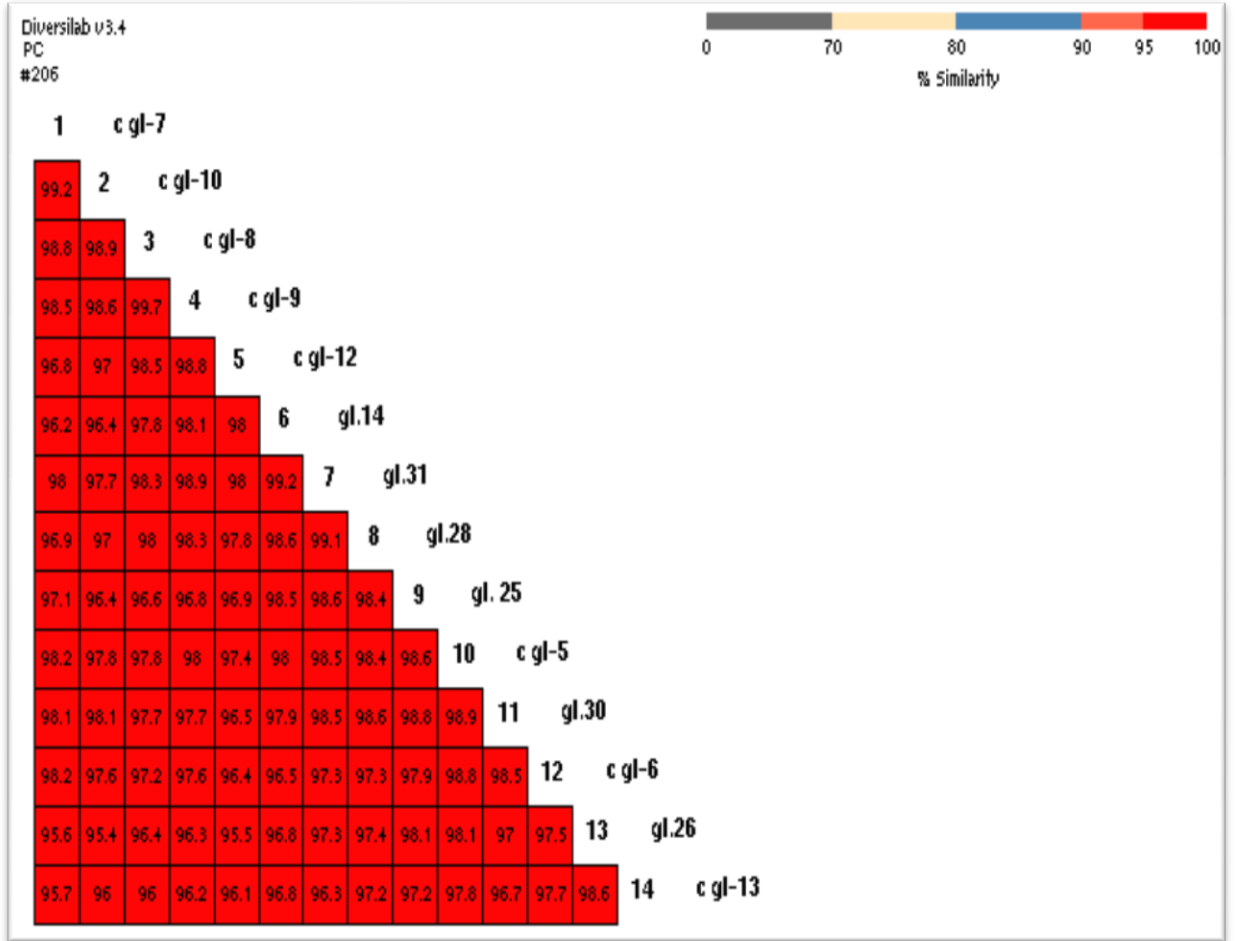
Şekil 4.18. *C. glabrata* ana klonlarına ait benzerlik matrisi

A Klonu

A ana klonu 14 suşla en büyük klonu oluşturmuştur. Klondaki ilk suş 10.02.2010 tarihinde DYB’nde yatan bir hastadan izole edilmiştir. Klondaki son suş ise 18.12.2011 tarihinde REA’nda yatan hastadan izole edilmiştir. A klonunu oluşturan *C. glabrata* suşu, REA (n: 6), DYB (n: 5), CYB (n: 3)’nde Şubat-2010 ve Aralık 2011 tarihleri arasında varlığını sürdürmüştür. (Şekil 4.19)



Şekil 4.19. *C. glabrata* A ana klonuna ait dendrogram



Şekil 4.20. *C. glabrata* A ana klonuna ait benzerlik matrisi

- **A1 Alt klonu**

7 suş içermektedir. Bu klondaki ilk suş 10.02.20120 tarihinde DYB’de yatan hastadan izole edilmiştir. Son suş ise 23.05.2011 REA’da yatan hastadan izole edilmiştir.

- **A2 Alt klonu**

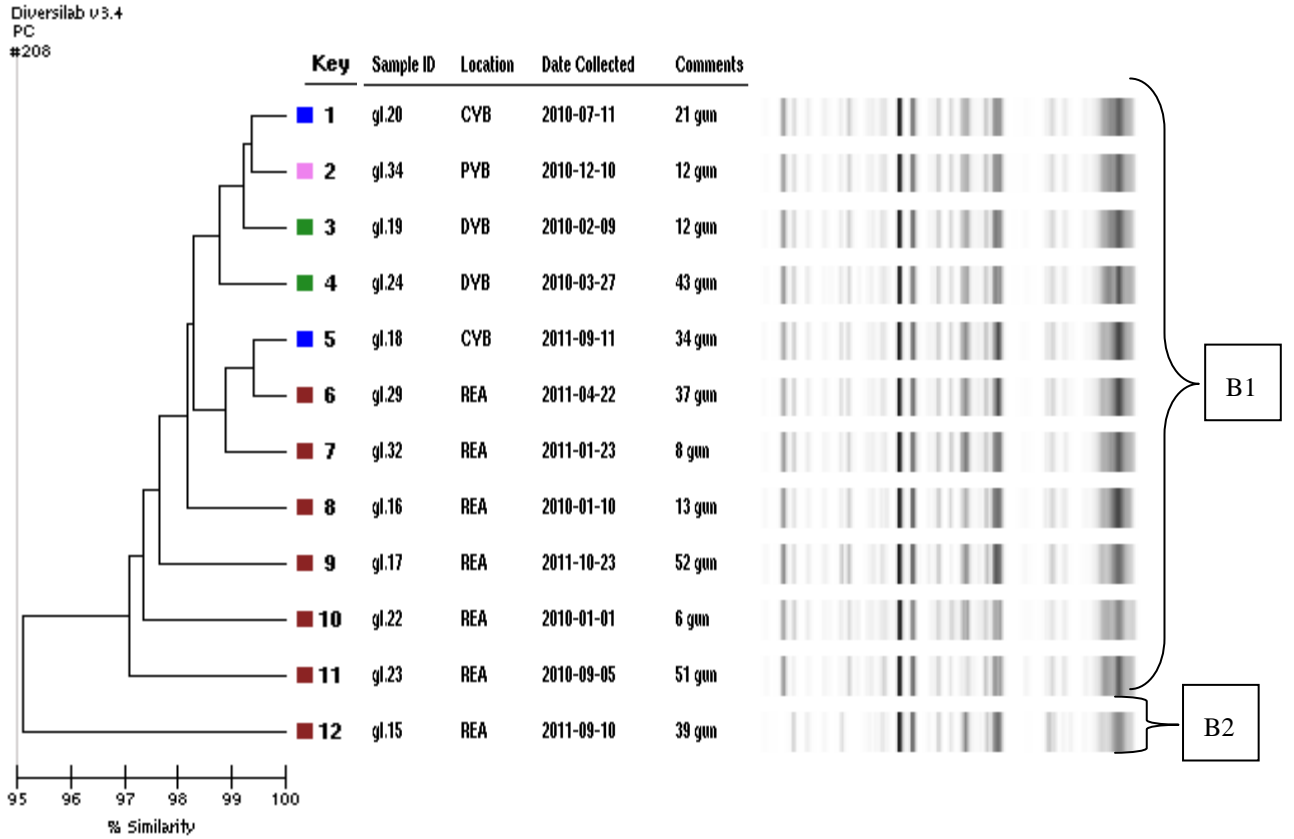
5 suş içermektedir. Bu klondaki ilk suş 11.02.2010 tarihinde DYB’nde yatan hastadan izole edilmiştir. Son suş ise 18.12.2011 tarihinde REA’da yatan hastadan izole edilmiştir.

- **A3 Alt klonu**

2 suş içermektedir. Bu klondaki ilk suş 05.04.2011 tarihinde DYB’nde yatan hastadan izole edilmiştir. Diğer suş ise 11.05.2011 tarihinde CYB’nde yatan hastadan izole edilmiştir.

B klonu

12 suş içermektedir. Klondaki ilk suş 01.01.2010 tarihinde REA’da yatan hastadan izole edilmiştir. Son suş ise 23.10.2011 tarihinde REA’da yatan hastadan izole edilmiştir. B klonunu oluşturan *C. glabrata* suşu REA (n: 7), CYB (n: 2), DYB (n: 2), PYB (n: 1) Ocak-2010 ve Ekim 2011 tarihleri arasında varlığını sürdürmüştür (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. *C. glabrata* B ana klonuna ait dendrogram

- **B 1 Alt klon**

11 suş içermektedir. İlk suş 10.01.2010 tarihinde REA’da yatan hastadan izole edilmiştir. Son suş ise 23.10.2011 tarihinde REA’da yatan hastadan izole edilmiştir.

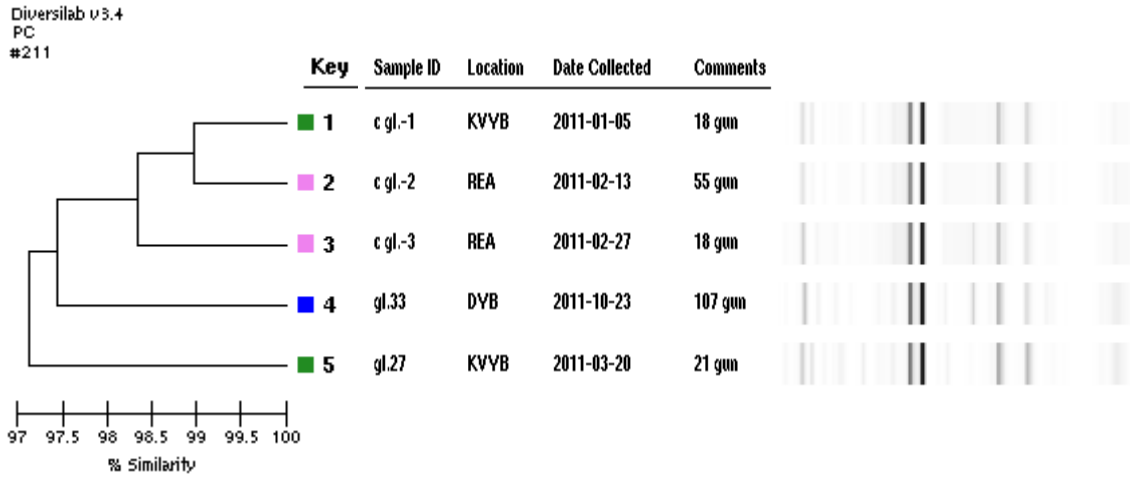
- **B2 Alt Klonu**

Tek suş içermektedir. 10.09.2011 tarihinde REA’da yatan hastadan izole edilmiştir.

C klonu

5 suş içermektedir. İlk suş 05.01.2010 tarihinde KVYB’nde yatan hastadan izole edilirken son suş 23.10.2011 tarihinde REA’da yatan hastadan izole edilmiştir.

Suşlara ait dendogram ve benzerlik matrisi Şekil 4.22 ve Şekil 4.23’de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. *C. glabrata* C ana klonuna ait dendogram



Şekil 4.23. *C. glabrata* C klonuna ait benzerlik matrisi

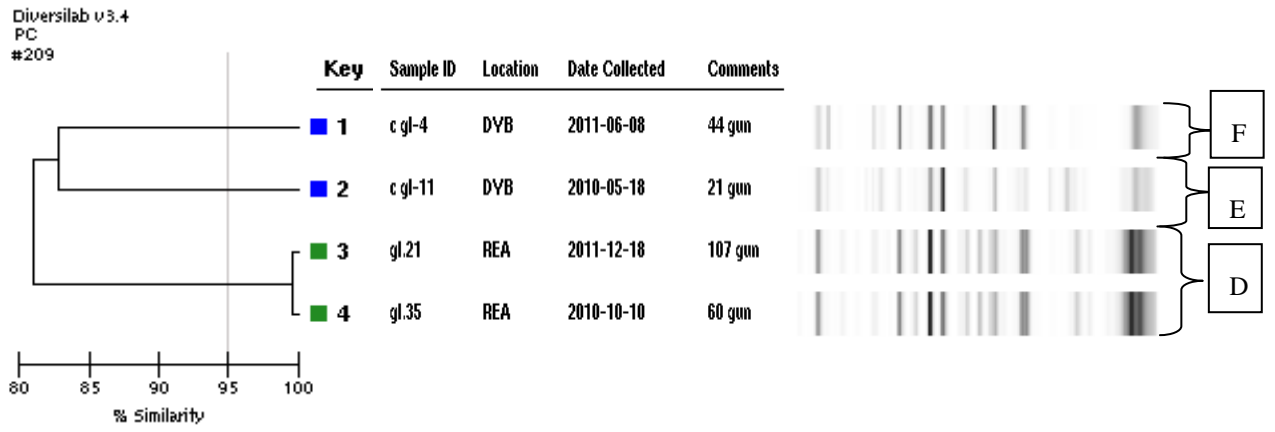
D, E, F Klonu

D klonu, 2 suş (gl 35 ve gl 21 numaralı hastalar) içermektedir. İlk suş 10.10.2010 tarihinde REA’da yatan hastadan izole edilmiştir. Diğer suş ise 18.12.2011 tarihinde REA’da yatan hastadan izole edilmiştir.

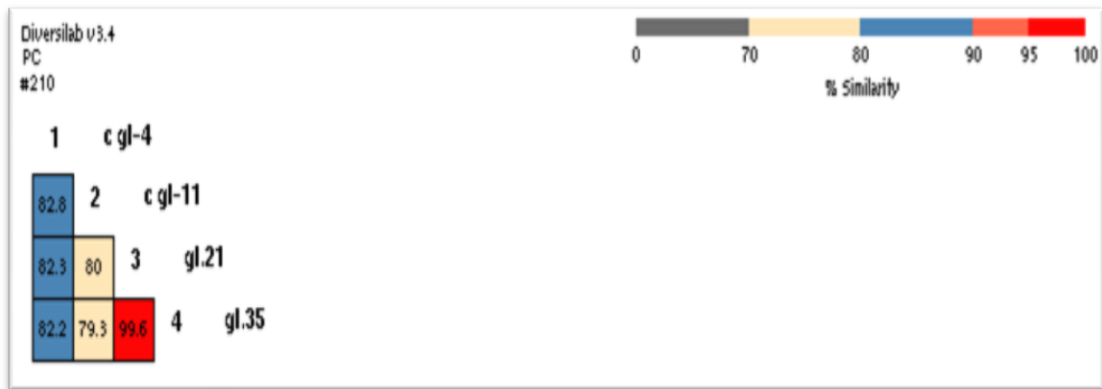
E klonu, tek (gl 11 numaralı hasta) suş içermektedir. 18.05.2010 tarihinde DYB’nde yatan hastadan izole edilmiştir.

F klonu, tek (gl 4 numaralı hasta) suş içermektedir. 18.06.2011 tarihinde DYB’nde yatan hastadan izole edilmiştir.

Suşlara ait dendogram ve benzerlik matrisi Şekil 4.24 ve Şekil 4.25’te gösterilmiştir.



Şekil 4.24 D, E, F klonuna ait dendrogram



Şekil 4.25. D, E, F klonuna ait benzerlik matrisi

5. TARTIŞMA

Son yıllarda *Candida* türlerinin neden oldukları infeksiyonlarda artış olmakla birlikte, bu infeksiyonlara neden olan türlerin çeşitliliğinde de değişiklikler görülmeye başlanmıştır. Endojen kaynaklı olması nedeniyle, hala nozokomiyal fungal infeksiyonlarda ilk sırayı *C. albicans* almakla birlikte, antifungal tedaviye daha zor yanıt verdiği bilinen *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* gibi ADC türleriyle karşılaşma oranı hızla artmaktadır (5). National Nosocomial Infection Surveillance System (NNISS)'in raporuna göre fungal infeksiyonlar 1980 yılından itibaren on yılda %0,2 den %3.8'e yükselmiştir. Bu artışa epidemiyolojik faktörler, risk faktörleri, mortalite, yeni etkenler, tanı zorluğu, antifungal tedavideki gelişmeler (yeni antifungaller ve klinik kullanımları, tedavi maliyetleri, antifungal ajanlara direnç gelişimi, istenmeyen etkiler, kombine tedavi gereksinimlerinin otaya çıkışı) gibi pek çok faktörün katkısı vardır.

YBÜ'de gelişen fungal infeksiyonlar arasında en sık kan dolaşımı infeksiyonları ve üriner sistem infeksiyonları (ÜSİ) görülmektedir. Kandidemilerin %75-80'i hastane kökenli olup, bunların da %25-50'si YBÜ'de ortaya çıkmaktadır. Türkiye'de *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*, *C. albicans*'tan sonra en sık kandidemi yapan türlerdir. *C. parapsilosis* daha çok deri ve mukozadan kaynaklanan kandidemiye yol açmaktadır. Bu tür, kateter ve implantlarda biyofilm oluşturma ve hastane ortamında kalıcılığı yanında bebek ve yenidoğan infeksiyonlarıyla bilinmektedir (149). Bir ünite de kan kültüründe *C. parapsilosis* üremesi infeksiyon kontrolünün eksikliği yönünden bir gösterge olarak kabul edilmektedir. Bu durum; kateter bakımında bozukluk, infeksiyon kontrol önlemlerinde yetersizlik ve immün yetmezliği olmayan hastalarda dışarıdan bulaşın varlığını belirtmektedir (150). ÜSİ'de de en önemli risk faktörü üriner kateter varlığıdır. İdrarda *Candida* varlığı (kandidüri); kontaminasyon, kolonizasyon veya infeksiyonun bir belirtisi olabilir. *C. tropicalis* ve *C. glabrata* gibi albicans dışı türler sıklıkla idrardan izole edilmektedir (87).

YBÜ'de yatış, özellikle de süre uzadıkça artan invazif girişimler nedeniyle doğal bariyerlerin kırılarak infeksiyon oluşmasına zemin hazırlamaktadır (87). Hastanemizde 2003-2005 yılları arasında yapılan bir çalışmada invazif *Candida* infeksiyonu olanların % 24.7 (215/872)'si YBÜ'de izlenen hastalardır. *Candida* infeksiyonlarının sistemlere göre dağılımı incelendiğinde hastanemizde ilk sırada ÜSİ, ikinci sırada kandideminin yer aldığı

görülmüştür (74). Yapılan bu çalışmada *Candida* suşlarının tür dağılımları *C. albicans* (398, %45.6) başta olmak üzere sırasıyla 162'si *C. tropicalis* (%18.6), 93'ü *C. glabrata* (%10.6), 130'u *C. parapsilosis* (%14.9), 33'ü *C. kefyr* (%3.8), 21'i *C. krusei* (%2.4), sekizi *C. inconspicua* (%0.92), 12'si *Geotrichum capitatum* (%1.38), dördü *Pichia ohmeri* (%0.46), dördü *Trichosporon asahii* (%0.46), ikisi *Saccharomyces cerevisiae* (%0.2), ikisi *C. lusitaniae* (%0.2) ve birer suş (%0.12) olmak üzere *C. rugosa*, *C. haemulonii* ve *Rhodococcus mucilaginosa* olarak saptanmıştır. Zer ve ark. YBÜ'den gelen %54'ü idrar, %11'i kan ve %28'i trakeal aspirat olan örneklerden izole ettikleri *Candida* suşlarıyla yaptıkları çalışmada tür dağılımını; %56.09 *C. albicans*, %11.21 *C. tropicalis*, %10.24 *C. parapsilosis*, %5.83 *C. glabrata*, %4.39 *C. kefyr*, %3.41 *C. lusitaniae*, %2.92 *C. famata*, %2.92 *C. krusei* ve %2.92 *C. guilliermondii* olarak belirlemişlerdir (151). YBÜ'den gönderilen, %58'ini idrar, %7'sini kan, %15'ini solunum örneklerinin oluşturduğu kültürlerden izole edilen 320 maya suşunu inceleyen bir çalışmada tür dağılımı; %65.6 *C. albicans*, %11.3 *C. parapsilosis*, %8.8 *C. glabrata*, %7.8 *C. tropicalis* olarak bulunmuştur (152).

Yapılan çalışmalarda idrar ve kan kültürlerinden izole edilen *Candida* spp. içinde *C. albicans*'ın en sık saptanan tür olduğu dikkati çekmektedir. ADC türleri içinde en sık saptananlar *C. parapsilosis*, *C. glabrata* veya *C. tropicalis*'tir (74, 153). *Candida* türlerinin sıklık sıralaması, çalışmanın yapıldığı hasta grubunun özelliklerine ve coğrafi lokalizasyona göre değişiklik göstermektedir. Otağ ve ark.'nın yaptığı çalışmada, kateter idrar örneklerinden en sık izole edilen ADC türleri *C. tropicalis* ve *C. glabrata* olarak bulunmuştur (74). Erdem ve ark. yaptığı çalışmada en fazla alınan örnekler idrar ve kan örnekleri olup *C. glabrata* (%14) ve *C. tropicalis* (%11.4) ADC türleri arasında en fazla saptananlar olmuştur (154).

Son yıllarda yapılan Bir çok çalışmada kandidemi etkenlerinde belirgin derecede bir değişiklik olduğu ve ADC'lere bağlı kandidemi oranının yaklaşık %50'lere ulaştığı ifade edilmiştir (149, 153). European SENTRY programına göre ABD'deki kandidemilerin %44'ü, Latin Amerika ülkelerindeki kandidemilerin %59'u, Avrupa ve Kanada'daki kandidemilerin ise %47'sinden ADC'ler sorumlu tutulmuştur (153). Duran ve ark. beş yıllık retrospektif çalışmada ise ADC'lere bağlı kandidemi oranını (%64.2) *C. albicans*'a bağlı kandidemi oranından (%35.8) daha fazla bulmuşlardır. Ayrıca çalışmada en sık kandidemi etkeni olarak *C. parapsilosis* (%41.5) saptanmıştır (155). Otağ ve ark.'nın

yaptıkları iki farklı çalışmada kandidemilerin %76,2'sinden ADC'ler sorumlu tutulmuştur ve kandidemi etkenleri arasında *C. parapsilosis* ilk sırada yer almıştır (74,109). Singhi ve ark. (156) sadece PYBÜ inceledikleri çalışmada ADC'ye bağlı kandidemi oranı %70,3 ve en sık etken olarak *C. tropicalis* (%48,4)'i bulunurken bizim çalışmamızda PYB'de *C. parapsilosis*'in etken olduğu kandidemi oranı %33,4 olarak bulunmuştur.

Kandidemi gelişimini kolaylaştıran risk faktörlerinin araştırıldığı çalışmalarda YBÜ'de yatma, antibiyotikler, damar içi kateter, hemodiyaliz, cerrahi operasyon, gastrointestinal perforasyon, immünsüpresif ilaç, TPN, nötropeni veya DM varlığı risk faktörleri olarak bildirilmiştir (71, 149). Keskin ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, kandidemi saptanan hastaların %70.7'sinde SVK varlığı, %46.3'ünde eşlik eden bir hastalık, %26.8'inde operasyon öyküsü, %31.7'sinde invazif girişim öyküsü ve tüm hastalarda antibiyotik kullanım öyküsü olduğunu belirlemişlerdir (157) Çalışmamızda kandidemi risk faktörlerini TPN %90.9, SVK varlığı %84.8, antibiyotik kullanımı %66.6 olarak belirlenmiştir. Fransa'da 2002'de yapılan bir çalışmada hastaların %60'ında SVK mevcut olup, kandidemilerin birincil kaynağı gösterilmiştir (158).

Nozokomiyal kandidüri gelişimini kolaylaştıran risk faktörlerini inceleyen çalışmalarda genel olarak DM, antibiyotik kullanımı, uzun süreli üriner kateter varlığı, YBÜ'de yatış, yaş, kadın cinsiyet, damar içi kateter kullanımı, immünsüpresif ilaç kullanımı, idrar akımının kesintiye uğraması, radyasyon tedavisi ve genitoüriner tüberküloz risk faktörleri olarak saptanmıştır (87). Acar ve ark.'nın yaptığı çalışmada hastaların %56.3'ünde kandidüri saptanmış olup, 14 (%29.1) olgu kolonizasyon olarak değerlendirilmiş, bu hastalara sadece sonda değişimi yapılmış, 13 olguya ise tedavi verilmiştir (152). Nayman ve ark.'nın yaptığı çalışmada kandidüri gelişimi ile ilişkili risk faktörleri; üriner sistem girişimi, üriner kateter kullanımı, immünsüpresyon, antibiyotik kullanımı ve yoğun bakımda yatış olarak bulunmuştur. Buna karşılık operasyon öyküsü, DM ve renal yetmezlik ile ilişki saptanmamıştır (159). Çalışmamızda kandidüri için en önemli risk faktörünün antibiyotik kullanımı (%92.3), YBÜ'de ortalama kalış süresi 31 gün olduğu tespit edilmiştir. Acar ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, infeksiyon tanısı konulan olguların %69'unun üç veya daha fazla sayıda geniş spektrumlu antibiyotik kullandığı, %89.6'sının tanı konulduğunda 10 günden daha uzun süredir YBÜ'de yattığı tespit edilmiştir. Hastaneye yatış nedenleri incelendiğinde, infeksiyon/sepsis ve malignite en sık görülenler olup, eşlik eden hastalıklar açısından ise DM ve kardiyovasküler

hastalıklar (KVH) ilk iki sırada yer almıştır (160). Cömert ve ark. yaptığı çalışmada da DM ve malignite en sık görülen altta yatan hastalıklar olarak bildirilmiştir (152). Çalışmamızda *C. glabrata*'nın neden olduğu kandidürde DM (%54.2) en önemli risk faktörü olarak belirlenmiştir. Alvarez-Lerma ve ark.'nın yaptığı çalışmada YBÜ'de 7 günde fazla kalmanın kandidüri gelişimi için risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir (86).

Bir çalışmada mortalite için bağımsız risk faktörleri ileri yaş (65 yaş ve üzeri), yoğun bakımda yatış ve malignite olarak belirlenmiştir (161). Nguyen ve ark.'nın yaptıkları çalışmada ileri yaş, kortikosteroid tedavisi, antibiyotik kullanımı, kateter varlığı ve hemodiyaliz mortalite üzerine etkili risk faktörleri olduğu bildirmiştir (162).

Yapılan bir çalışmada hastaların %59.9'u kadın %40.1'i erkek hastalardan oluşmaktadır. Bu hastaların yaş ortalaması 64.5 olarak tespit edilmiştir (163) Çalışmamızda *C. glabrata*'nın etken olduğu kandidürili hastaların %85.7'si kadın, %14.3'ü erkek hastalardı ve bu hastaların yaş ortalaması 60.8 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızla uyumlu olarak bazı çalışmalarda çocuklarda nadiren idrardan *C. glabrata* izole edilmiştir (164). Bir çok çalışmada kandidürinin kadınlarda daha sık görüldüğü rapor edilmiştir (165, 166). Knoke ve ark. çalışmalarında *C. glabrata*'nın en çok idrardan izole edildiğini göstermiştir (164). Raporların çoğu idrardan en sık izole edilen ikinci maya türü olduğunu göstermiştir (167, 168). Hastanemizde yapılan çalışmada da idrardan en sık izole edilen ADC türleri *C. tropicalis* ve *C. glabrata* olarak tespit edilmiştir (74).

Hastane infeksiyonlarında, infeksiyonu önlemek ve kontrol stratejileri geliştirmek için izolatların ve kaynağının epidemiyolojik olarak tanımlanması önemlidir (169). Genotipik düzeyde tiplendirme yapan yöntemler, *Candida* gibi fenotipik yöntemlerle epidemiyolojik olarak değerlendirmesi zor olan mikroorganizmalar için önemli avantajlar sağlar. Fenotipik bir yöntem olan antifungallere karşı duyarlılık paternlerinin karşılaştırılması, nozokomiyal *Candida* infeksiyonlarının değerlendirilmesinde sınırlı bir fonksiyona sahiptir. Etkili bir moleküler yöntem, aynı suşu bağımsız suşlar içerisinde tanıyabilmeli, ilişkili izolatları kümeleştirmeli ve tamamen ilişkisiz suşları ayırt edebilmelidir. Fungal infeksiyonların moleküler epidemiyolojik analizi için RFGE (Rotating-Field Gel Electrophoresis), RAPD-PZR, MLST (Multilocus sequence typing) ve mikrosatellit analizi gibi yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemlerden RAPD-PZR analizi, kolay uygulanabilir olması ve kısa sürede sonuç vermesi gibi özellikleri nedeniyle diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır. Ancak bu yöntemin, sadece laboratuvarlar arası değil,

aynı laboratuvar içinde dahi tekrarlanabilirliğinin düşük olması bir dezavantajdır. Standardizasyonu sağlamak için, aynı termal döngü cihazında, standart bir amplifikasyon protokolüyle uygulanmalı, tüm izolatlar birlikte çalışılmalıdır. Bu dezavantajına rağmen, RAPD-PZR analizinin *Candida* izolatlarında ayırım gücü ve tiplendirme etkinliği yüksektir (170).

Hastane infeksiyonları ve salgınlarında suşlar arasındaki ilişkinin saptanması, bulaş kaynağı açısından önem taşımakta ve bu amaçla moleküler genotiplendirme yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (171). Çalışmamızda, uygulama kolaylığı ve daha az zaman alması nedeniyle birçok araştırmacı tarafından tercih edilen RAPD-PZR yöntemi kullanılmıştır (172, 173). Bu yöntemin en önemli dezavantajı, elde edilen DNA paternlerinin, MgCl₂ konsantrasyonu, DNA ekstraksiyonu, amplifikasyon parametreleri ve ısı döngü cihazı tipine bağlı olarak değişiklik gösterebilmesidir. Birçok araştırmacı, RAPD-PZR yönteminin standardize edilmesi durumunda tekrarlanabilirliğinin artacağını ve kullanılan primerlere bağlı olarak ayırım gücünün yükseleceğini bildirmekte; az sayıda suşun değerlendirildiği küçük ölçekli epidemiyolojik araştırmalarda kullanılabileceğini vurgulamaktadırlar (174). Yapılan çalışmalarda, yoğun bakım hastalarında, mikozların sadece endojen kaynaklı olmadığı, çeşitli risk faktörleriyle de hastaya geçebildiği epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir (10, 106). Ergon ve ark. *C. albicans* ile meydana gelen infeksiyonların sıklıkla endojen kaynaklı olduğunu saptamışlar, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* izolatlarında ise yetersiz bant elde ettikleri için suşların yayılımı konusunda yorum yapamamışlardır (175). Bir başka çalışmada, bir yıllık sürede idrardan izole edilen *C. glabrata* suşları genetik olarak farklı bulunmuş ve sonuç olarak endojen kazanımın çapraz infeksiyondan daha yaygın olduğu belirtilmiştir (176). Han ve ark. tarafından *C. tropicalis*'in etken olduğu idrar yolu infeksiyonu salgınının moleküler epidemiyolojisi, RAPD-PZR analizi kullanılarak araştırılmış; yoğun bakım ünitesindeki hastalardan izole edilen *C. tropicalis* suşlarının tümünde aynı bant paternleri tespit edilmiş ve bütün suşların aynı klondan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (177). Çalışmamızda hastanemizin YBÜ'de yatan 65 hastanın idrar kültürlerinden izole edilen *C. glabrata*, *C. tropicalis* suşlarının RAPD-PZR analizi ile moleküler epidemiyolojik incelemesi yapılmıştır. 35 *C. glabrata* suşundan ikisi ana klon (A ve B) olmak üzere toplam 3 farklı klon belirlenmiştir (A-C). A klonunda 25 (% 71,4) suş, B klonunda 9 (%25,7) suş ve C klonunda 1 (%2,9) suş saptanmıştır. *C. glabrata* suşları arasında iki yaygın klon belirlenmiştir. 30 *C. tropicalis*

suşunda 2 farklı klon profili saptanmıştır. A klonu 29 (%96,6) suş ve B klonu 1 (%0,4) suş olarak belirlenmiştir. YBÜ’de yatan 33 hastanın SVK kan örneğinden izole edilen *C. parapsilosis* suşlarının RAPD-PZR analizleri sonucunda ise ikisi ana klon (A ve B) olmak üzere toplam 3 farklı klon (A-C) elde edilmiştir. A klonu 27 (%81,8) suş, B klonu 4 (%12,2) suşta, C klonu 2 (%6) suşta saptanmıştır. Paternlerin incelemesi sonucunda *C. parapsilosis* için üç klondan, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* için ise iki klondan ekzojen yayılım olduğu düşünülmüştür.

Hastane infeksiyon etkeni olarak *Candida* suşları arasındaki klonal ilişkiyi tespit etmeye yönelik yapmış olduğumuz bu çalışmada, 68 *Candida* (35 *C. glabrata* ve 33 *C. parapsilosis*) suşu Rep-PZR yöntemi kullanılarak genotiplendirilmiş ve bu suşların birbirleriyle klonal ilişkileri karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda Rep-PZR analizi ile 35 *C. glabrata* suşundan ikisi ana klon (A ve B) olmak üzere toplam 6 farklı klon (A-F) elde edilmiştir. A ana klonu *C. glabrata*’ların 14 (%40)’ünün toplandığı en büyük klon olarak tespit edilmiştir. 33 *C. parapsilosis* suşundan ikisi ana klon (A ve B) olmak üzere toplam 3 farklı klon (A-C) elde edilmiştir. A ana klonu *C. parapsilosis*’lerin 29 (%87,8)’ünün toplandığı en büyük klon olarak tespit edilmiştir. YBÜ’de yatan hastalardan izole edilen *Candida* suşlarının yüksek oranda aynı klondan olması bu ünitelerde bulaş olabileceğini göstermektedir.

Tayvan’da yapılan bir çalışmada 53 *C. albicans* suşunun genotiplendirilmesinde PFGE ve Rep-PZR olmak üzere 2 moleküler yöntem karşılaştırılmıştır. PFGE yöntemiyle 38 farklı klon, Rep-PZR yöntemiyle 31 farklı klon saptanmıştır. İki yöntem arasında düşük uyum bulunmuş. PFGE ‘nin ayırım gücünün yüksek olduğu belirlenmiş (178). Viyana’da yapılan bir çalışmada Rep-PZR’ın *C. parapsilosis* suşlarının genotiplendirilmesinde ayırım gücünün düşük olduğu bu nedenle *C. parapsilosis* salgınlarını araştırmak için ayırım gücü yüksek moleküler yöntemlerinin kullanılması gerektiğini öneriyor (179). Çalışmamızda Rep-PZR ve RAPD-PZR yöntemleri karşılaştırıldı. Sonuçlarımıza göre; *C. parapsilosis* suşlarının genotiplendirilmesinde iki yöntem arasında önemli bir fark bulunamadı. Çin’de yapılan bir çalışmada; MLST ve Rep-PZR yöntemleri karşılaştırılmış. 34 *C. glabrata* suşunda 17 farklı klon tespit edilmiş. İstatiksel analizler sonucunda Rep-PZR’ın ayırım gücü yüksek bulunmuş (180). Çalışmamızda Rep-PZR analizi ile 35 *C. glabrata* suşundan ikisi ana klon (A ve B) olmak üzere toplam 6 farklı klon (A-F) elde edilmiştir. A ana klonu (n: 14) *C. glabrata*’ların toplandığı en büyük klon olarak tespit edilmiştir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Yaptığımız bu çalışma ile hastanemiz YBÜ'lerinde yatan kateterize hastalardan izole edilen *Candida* suşlarının klonal dağılımını iki farklı moleküler yöntem kullanarak karşılaştırdık.

Çalışmamızda, kalıcı kateter, TPN ve genişlemiş spektrumlu antibiyotik kullanımı, YBÜ'de yatış süresinin uzun olması infeksiyon gelişiminde önemli risk faktörleri olarak belirlendi. Hastalara zorunlu olmadıkça aletli girişimler (sonda, kateter vb.) uygulanmamalı, eğer uygulanacaksa steril şartlarda ve deneyimli kişiler tarafından yapılmalı, kullanım süreleri olabildiğince kısa tutulmalıdır. Yoğun bakım ihtiyacı olmayan hastaların YBÜ'de tutulmaması ve yatış süresinin kısa tutulmasıyla *Candida* infeksiyonları azaltılabilir. Hastalardan alınan çeşitli klinik örneklerle, çevresel örneklerin birlikte epidemiyolojik analizinin yapılarak ekzojen odağın tespit edildiği daha ileri çalışmalar planlanmalıdır. Hastane infeksiyonlarını azaltmak için, ekzojen kaynağın tespiti ve alınan önlemlerle infeksiyon zinciri kırılması önemli bir adım olacaktır.

Çalışmamızda *Candida* suşlarına ait klonların hastane infeksiyonlarına neden olduğunu ve özellikle reanimasyonda bu klonlara ait suşların kümелendiğini tespit ettik. Elde edilen klonlara göre hastalar arası suşların bulaş derecesinin yüksek olduğu ve aynı klonun hastane ortamında uzun süre kalabildiği görülmektedir. Yaptığımız moleküler tiplendirme ile hastanemizde daha etkili bir korunma ve kontrol önlemlerinin alınması gerekliliği ortaya konulmuştur. Moleküler yöntem olarak kullanılan RAPD-PZR ve Rep-PZR analizleri sonucunda *C. glabrata* suşlarının klonal ayrımında Rep-PZR DiversiLab sistemi başarılı bulundu. *C. parapsilosis* suşlarının klonal ayrımında iki moleküler yöntem arasında önemli bir fark bulunamadı. *C. tropicalis* suşlarında ise aynı sistemle yeterli DNA izole edilemediğinden Rep-PZR yönteminde sonuç alınamamıştır. *Candida* suşlarında prosedüre kit içeriğinde verilmeyen "Zymolase" enziminin eklenmesiyle DNA ekstraksiyonundan daha iyi sonuç alındığını belirten çalışmalar mevcuttur (178). Moleküler tiplendirme yöntemleri rutin uygulamada kullanımı, genellikle bu yöntemlerin uzun zaman alması, yoğun emek gerektirmesi ve maliyetinin yüksek olmasından dolayı yaygın değildir. Rep-PZR DiversiLab yöntemi uygulaması kolay, zaman yönünden diğer yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç verebilen bir yöntemdir, sonuçların değerlendirilmesi ve klonların yorumlanması kolaydır. Ayrıca, elde edilen verilerin

veritabanı oluşturularak sonraki çalışmalarla karşılaştırılma imkanı vardır. Ancak, maliyetinin yüksek olması önemli bir dezavantajdır. İyi standardize edilmiş, tekrarlanabilirliği olan, ayırım gücü yüksek bu sistemin kütüphanesi sıklıkla izole edilen *Candida* türleri ile sınırlı olup kimi türlerde ekstraksiyon sorunu yaşanabilmektedir. Sonuç olarak yeniden önem kazanan ADC türleri için farklı ekstraksiyon prosedürlerinin oluşturulması Rep-PZR DiversiLab sistemi ile daha iyi sonuçlar alınmasını sağlayacaktır.

Sonuç olarak; konvansiyonel moleküler tiplendirme yöntemi olarak anılan RAPD için *Candida* türlerinden farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen DNA, istenilen primerlerle amplifiye edilebilmektedir. Yarı otomatik DivesiLAB/Rep-PZR sistemi sadece kendi ekstraksiyon ve PCR kitiyle çalışan kapalı bir ticari sistemdir. Elde ettiğimiz bulgular sonucunda bazı *Candida* türlerinde RAPD-PZR yöntemi ile Rep-PZR DiversiLab yöntemi yöntemin ayırım gücünde önemli bir fark bulunamamıştır.

7. KAYNAKLAR

1. **Ergüt Sezer B, Arman D.** Yoğun bakım ünitesinde gelişen fungal infeksiyonlar. *Yoğun Bakım Dergisi*, **2010**; 9(3):121-128.
2. **Yüksekkaya Ş, Fındık D, Arslan U.** Yoğun Bakım Ünitesinde Yatan Hastaların İdrarlarından İzole Edilen *Candida* Türlerinin Moleküler Epidemiyolojisi ve Antifungal Duyarlılıkları. *Mikrobiyol Bul*, **2011**; 45(1): 137-149.
3. **Alangaden GJ.** Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am*, **2011**; 25: 201–225.
4. **Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD.** Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, **1994**; 32:452.
5. **Fridkin SK, Jarvis WR.** Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev*, **1996**; 9: 499–511.
6. **Kuştimur S.** Kandida patogenezinde rol oynayan faktörler. *Mikrobiyoloji bülteni*, **1994**; 28 175-181.
7. **Koneman EW, Auren SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Wilm WC.** Mycology. In: Diagnostic Microbiology, 5th ed. Philadelphia, *Lippincott*, **1997**; 983-1069.
8. **Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ.** Emerging and Emerged Pathogenic *Candida* Species: Beyond the *Candida albicans* Paradigm. *PLoS Pathog*, **2013**; 9(9).
9. **Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, Rodloff A, Fu W, Ling TA; Global Antifungal Surveillance Group.** Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. *J Clin Microbiol*, **2010**; 48(4):1366-77
10. **Pfaller MA, Diekema DJ.** Epidemiology of invasive Candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, **2007**; 20: 133–163.
11. **Guarro J, GeneJ, Stchigel AM.** Developments in Fungal Taxonomy. *Clin Microbiol Rev*, **1999**; 12: 454-500.
12. **Calderone RA.** Introduction and historical perspectives. *Candida and Candidiasis* (Calderone R., ed), pp. 15–25. ASM Press, Washington, DC 2002.
13. **Martin MV.** Germ-tube formation by oral strains of *Candida tropicalis*. *J Med Microbiol*, **1979**; 12: 187–194.
14. **Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD.** *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*, **1999**; 12: 80–96

15. **Kurtzman CP, Fell JW.** The yeasts: a taxonomic study, 4th edn. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, **1998**.
16. **Vazquez JA, Sobel JD.** Clinical Mycology: Candidiasis, Edited by DISMUKES WE, PAPPAS PG, SOBEL JD. Oxford University press, **2003**; 143-187.
17. **Bialkova A, Subik J.** Biology of the pathogenic yeast *Candida glabrata*, *Folia Microbiol*, **2006**; 51 (1):3-20.
18. **Lim CS, Rosli R, Seow HF, Chong PP.** *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2012**; 31:21–31.
19. **Butler G, Rasmussen MD, Lin MF.** Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, **2009**; 459: 657–662.
20. **Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD.** *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*, **2008**; 21: 606–625.
21. **Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacsér A, Tomaska L.** Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet Rev*, **2009**; 55:497-509.
22. **Ghannoum MA, Abu-Elteen KH.** Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses*, **1990**; 33:265-82
23. **Schaller M, Borelli C, Korting H.C., Hube B.** Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, **2005**; 48 : 365-367.
24. **Ghannoum MA.** Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*, **2000**; 13(1) : 122-143.
25. **Yang YL.** Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect*, **2003**; 36: 223- 228.
26. **Henriques M, Gasparetto K, Azeredo J, Oliveira R.** Experimental methodology to quantify *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. *Biotechnol Lett*, **2002**; 24: 1111–1115
27. **Verstrepen KJ, Klis FM.** Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **2006**; 60(1) : 5- 15.
28. **Klotz SA, Gaur NK, Lake DF, Chan V.** Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins *Als5p* and *Als1p*. *Infect Immun*, **2004**; 72(4): 2029- 2034.
29. **Zhao X, Pujol C, Soll DR, Hoyer LL.** Allelic variation in the contiguous loci encoding *Candida albicans* ALS5, ALS1 and ALS9. *Microbiol*, **2003**; 149: 2947- 2960.
30. **De Las Penas A, Pan SJ, Castano I, Alder J, Cregg R, Cormack BP.** Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev*, **2003**; 17: 2245–2258.

31. **Hoyer LL, Fundyga R, Hecht JE, Kapteyn JC, Klis FM, Arnold J.** Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-albicans *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics*, **2001**; 157: 1555–1567.
32. **Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL.** *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res*, **2006**; 6: 979–986.
33. **Al-Fattani MA, Douglas LJ.** Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol*, **2006**; 55: 999–1008.
34. **Mukherjee PK, Chandra J.** *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Update*, **2004**; 7: 301–309.
35. **Donlan RM, Costerton JW.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, **2002**; 15: 167–193.
36. **Kumamoto CA.** *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol*, **2002**; 5:608–611.
37. **Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Chang T, Fries BC.** Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Appl Environ Microb*, **2007**; 73: 1697–1703.
38. **Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J.** Silicone colonisation by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. *J Med Microbiol*, **2010**; 59: 747–754
39. **Silva S, Hooper SJ, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J, Williams DW.** The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. *Clin Microbiol Infec*, **2010**; 17: 264–272.
40. **Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP, Ryang DW.** Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol*, **2002**; 40: 1244–1248.
41. **Redding SW, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Sadkowski L, Fothergill AW, Rinaldi MG, Eng TY, Patterson TF.** *Candida glabrata* oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation treatment for head and neck cancer. *J Clin Microbiol*, **2002**; 40: 1879–1881.
42. **Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinski T, Azeredo J, Oliveira R.** Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia*, **2010**; 169: 175–182
43. **Nosek J, Holesova Z, Kosa P, G'acser A, Tomaska L.** Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet*, **2009**; 55: 497–509.
44. **Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA.** Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immün*, **2002**; 70: 878–888.
45. **Lattif AA, Mukherjee PK, Chandra J, Swindell K, Lockhart SR, Diekema DJ, Pfaller MA, Ghannoum MA.** Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol*, **2009**; 300: 265–270.

46. **Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J.** Adherence and biofilm formation of non- *Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol*, **2011**; 19: 241–247.
47. **Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B.** *Candida albicans* proteinases and host/ pathogen interactions. *Cell Microbiol*, **2004**; 6: 915- 926.
48. **Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ.** *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, **2013**; 62: 10–24.
49. **Hube B, Naglik J.** *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiol*, **2001**; 147: 1997- 2005.
50. **Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J.** *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev*, **2012**; 36: 288–305.
51. **Merkerova M, Dostal J, Hradilek M, Pichova I, Hruskova- Heidingsfeldova O.** Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from *Candida parapsilosis*. *FEMS Yeast Res*, **2006**; 6: 1018–1026.
52. **Togni G, Sanglard D, Falchetto R, Monod M.** Isolation and nucleotide sequence of the extracellular acid protease gene (ACP) from the yeast *Candida tropicalis*. *FEBS Lett*, **1991**; 286: 181–185.
53. **Zaugg C, Borg-von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D, Monod M.** Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun*, **2001**; 69: 405–412.
54. **Negri M, Silva S, Henriques M, Oliveira R.** Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2012**; 31:1399–1412.
55. **Cafarchia C, Romito D, Coccioli C, Camarda A, Otranto D.** Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. *Med Mycol*, **2008**; 46: 429–434.
56. **Yücel A, Kantarcioğlu AS.** Pathogenicity determinants of *Candida*. *Cerrahpaşa J Med*, **2000**; 31 (3): 172-186.
57. **Park M, Do E, Jung WH.** Lipolytic Enzymes Involved in the Virulence of Human Pathogenic Fungi. *Mycobiology*, **2013**; 41(2): 67-72.
58. **de Brito Costa EM, dos Santos AL, Cardoso AS, Portela MB, Abreu CM, Alviano CS, Hagler AN, de Araújo Soares RM.** Heterogeneity of metallo and serine proteinases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2003**; 38: 173- 180.
59. **dos Santos AL, de Carvalho IM, da Silva BA, Portela MB, Alviano CS, de Araújo Soares RM.** Secretion of serine peptidase by clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2006**; 46: 209- 220.

60. **Yıldırım M, Mumcuoğlu İ, Kurşun Ş, Koldaş K, Yetener V, Balaban N.** İnfeksiyon Etkeni Olarak İzole Edilen *Candida albicans* ve Non-*Albicans Candida* Suşlarındaki Bazı Virulans Faktörlerinin Karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **2009**; 39 (3-4):62-68.
61. **Luo G, Samaranayake LP, Yau JY.** *Candida* Species Exhibit Differential In Vitro Hemolytic Activities. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39(8):2971-4.
62. **Manns JM, Mosser DM, Buckley HR.** Production of a Hemolytic Factor by *Candida albicans*. *Infect İmmün*, **1994**; 62(11):5154-6.
63. **Jayatilake JA, Samaranayake YH, Cheung LK, Samaranayake LP.** Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and nonalbicans *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med*, **2006**; 35: 481–491.
64. **Gow NA, Brown AJP, Odds FC.** Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol*, **2002**; 5: 366–371.
65. **Enger L, Joly S, Pulol C, Simonson M, Pfaller MA, Soll R.** Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39: 658–669.
66. **Miller MG, Johnson AD.** White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*, **2002**; 110: 293-302.
67. **Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP.** National surveillance of nosocomial bloodstream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **1998**; 31:327-332.
68. **Pfaller MA, Castanheira M, Messer AS, Moet GJ, Jones RN.** Variation in *Candida spp.* distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Diagn Micr Infec Dis*, **2010**; 68: 278–283.
69. **Samaranayake LP, Fidel PL, Naglik JR, Sweet SP, Teanpaisan R, Coogan MM, Blignaut E, Wanzala P.** Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis*, **2002**; 8: 151–16.
70. **Hagerty JA, Ortiz J, Reich D, Manzarbeitia C.** Fungal infections in solid organ transplant patients. *Surg Infect*, **2003**; 4: 263–271.
71. **Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari M, Rosso R, Viscoli C.** Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis*, **2006**; 6: 21.
72. **Colombo AL, Perfect J, DiNubile M, Bartizal K, Motyl M, Hicks P, LupiADCci R, Sable C, Kartsonis N.** Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized doubleblind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. *Eur J Clin Microbiol*, **2003**; 22: 470–474.
73. **Colombo AL, Guimaraes T, Silva LRBF, Monfardini LPDA, Cunha AKB, Rady P, Alves T, Rosas RC.** Prospective Observational Study of Candidemia in Saõ Paulo, Brazil: Incidence Rate, Epidemiology, and Predictors of Mortality. *Infect Cont Hosp Ep*, **2007**; 28: 570–576.

74. **Otağ F, Aslan G, Şen S, Özturhan H, Emekdaş G.** 2003-2005 Süresinde Klinik Örneklerden İzole Edilen Maya Türlerinin Değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, **2005**; 19(4): 435-443.
75. **Krcmery V, Barnes AJ.** Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect*, **2002**; 50: 243–260.
76. **Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Sanza LT, Huie S, Yeo SF, Brandt ME, Warnock DW.** Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol*, **2004**; 42: 1519–1527.
77. **Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R.** Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Ag*, **2006**; 27: 359–366.
78. **Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S.** The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis*, **1997**; 24:1122–1128.
79. **Isenberg HD, Tucci V, Cintron F, Singer C, Weinstein GS, Tyras DH.** Single-source outbreak of *Candida tropicalis* complicating coronary bypass surgery. *J Clin Microbiol*, **1989**; 27: 2426–2428.
80. **Vazquez JA, Dembry LM, Sanchez V, Vazquez MA, Sobel JD, Dmuchowski C, Zervos MJ.** Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study. *J Clin Microbiol*, **1998**; 36(2):421-6.
81. **Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, Alonso-Tarres C, Rodríguez-Tudela JL, Pahissa A.** Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*, **2006**; 44: 1681–1685.
82. **Bonassoli LA, Bertoli M, Svidzinski TIE.** High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect*, **2005**; 59: 159–162.
83. **Messer SA, Jones RN, Fritsche TR.** International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *J Clin Microbiol*, **2006**; 44: 1782–1787.
84. **Brito LR, Guimaraes T, Nucci M, Rosas RC, Almeida PL, Matta DA & Colombo AL.** Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol*, **2006**; 44: 261–266.
85. **Voss A, Hollis RJ, Pfaller MA, Wenzel RP, Doebbeling BN.** Investigation of the sequence of colonization and candidemia in non neutropenic patients. *J Clin Microbiol*, **1994**; 32: 975–980.
86. **Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, Le 'on C, Palomar M, Jord'a R, Carrasco N, Bobillo F.** Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. *Intens Care Med*, **2003**; 29: 1069–1076.

87. **Binelli CA, Moretti ML, Assis RS, Sauaia N, Menezes PR, Ribeiro E, Geiger DC, Mikami Y, Miyaji M, Oliveira MS, Barone AA, Levin AS.** Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. *Clin Microbiol Infect*, **2006**; 12: 538–543.
88. **Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, Gallis HA, McKinsey DS, Karchmer AW, Sugar AM, Sharkey PK, Wise GJ, Mangi R, Mosher A, Lee JY, Dismukes WE.** Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. *Clin Infect Dis*, **2000**; 30: 14–18.
89. **Miranda LN, van der Heijden IM, Costa SF, Sousa AP, Sienna RA, Gobara S, Santos CR, Lobo RD, Pessoa VP Jr, Levin AS.** *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect*, **2009**; 72: 9–16.
90. **Berrouane YF, Herwaldt LA, Pfaller MA.** Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. *J Clin Microbiol*, **1999**; 37(3): 531-537.
91. **Caggiano G, Puntillo F, Coretti C, Giglio M, Alicino I, Manca F, Bruno F, Montagna MT.** *Candida* colonization index in patients admitted to an ICU. *Int J Mol Sci*, **2011**;12(10):7038-47.
92. **Pittet D, Monod M, Suter PM.** *Candida* colonisation and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg*, **1994**; 220:751-58.
93. **León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Alvarez-Lerma F, GarADCho-Montero J, León MA; EPCAN Study Group.** A bedside scoring system ("Candida score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit Care Med*, **2006**; 34(3):730-7.
94. **León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Galván B, Blanco A, Castro C, Balasini C, Utande-Vázquez A, González de Molina FJ, Blasco-Navalproto MA, López MJ, Charles PE, Martín E, Hernández-Viera MA; Cava Study Group.** Usefulness of the "Candida score" for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in non neutropenic critically ill patients: a prospective multicenter study. *Crit Care Med*, **2009**; 37(5):1624-33.
95. **Özenci H.** *Candida albicans*'a karşı lokal ve sistemik direnç. *Candida mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyum Kitabı* (Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., ed) Eskişehir, 2002: 151-155.
96. **Pabuççuoğlu U.** Kandidiazis. *Mikozlar Patogenez ve Patoloji*. İzmir: İzmir Güven&Nobel Tıp Kitabevi, **2000**; 63-75.
97. **Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH.** *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*, **2010**; 59: 873–880.
98. **Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ.** In vitro susceptibilities of clinical isolates of *Candida* species, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus* species to itraconazole: global survey of 9,359 isolates tested by clinical and laboratory standards institute broth microdilution methods. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43: 3807–3810.
99. **Küçüköğlü K.** Antifungal Tedavide Son Gelişmeler. *Ankara Ecz. Fak. Derg*, **2008**; 37 (1) 63 - 90.

100. **Sóczó G, Kardos G, McNicholas PM, Balogh E, Gergely L, Varga I, Kelentey B, Majoros L.** Correlation of posaconazole minimum fungicidal concentration and time kill test against nine *Candida* species. *J Antimicrob Chemoth*, **2007**; 60: 1004–1009.
101. **Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J.** Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemoth*, **2000**; 46: 171–179.
102. **Chen SC, Slavin MA, Sorrell TC.** Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs*, **2011**; 71(2):253.
103. **Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J, LupiADCCI R, Sable C, Kartsonis N, Perfect J; Caspofungin Invasive Candidiasis Study Group.** Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med*, **2002**; 347(25):2020-9.
104. **Hawser SP, Douglas LJ.** Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Ch*, **1995**; 39: 2128–2131.
105. **Bachmann SP, Ramage G, VandeWalle K, Patterson TF, Wickes BL, López-Ribot JL.** Antifungal Combinations against *Candida albicans* Biofilms In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, **2003**; 47(11):3657-9.
106. **Pfaller MA.** Nosocomial Candidiasis: Emerging Species, Reservoirs, and Modes of Transmission. *Clinical Infectious Diseases*, **1996**; 22:889-94.
107. **Soll DR.** The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev*, **2000**; 13: 332–70.
108. **Rho J, Shin JH, Song JW, Park MR, Kee SJ, Jang SJ, Park YK, Suh SP, Ryang DW.** Molecular Investigation of Two Consecutive Nosocomial Clusters of *Candida tropicalis* Candiduria Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *The Journal of Microbiology*, **2004**; 80-86.
109. **Horasan Ş E, Ersöz G, Göksu M, Otağ F, Kurt ÖA, Karaçorlu S, Kaya A.** Increase in *Candida parapsilosis* fungemia in critical care units: A 6-Years Study. *Mycopathologia*, **2010**; 170:263–268.
110. **Majid Z, Mahmoudabadi AZ.** Invasive candidiasis; a review article. *Jundishapur Journal of Microbiology*, **2009**; 2(1): 1-6.
111. **Yıldırım ŞT.** Fungal Hastane İnfeksiyonları: Tanı. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, **2004**; 8: 168-171.
112. **van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA.** *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Critical Reviews in Microbiology*, **2009**; 35(4): 283–309.
113. **Ener B.** Fungal Hastane İnfeksiyonları: Epidemiyoloji ve Kontrol. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, **1998**; 2: 150-155
114. **Kumar RS, Ganvir S, Hazarey V.** *Candida* and calcofluor white: Study in precancer and cancer. *J Oral Maxillofac Pathol*, **2009**; 13(1):2-8.

115. **Nassar A, Zapata M, Little JV, Siddiqui MT.** Utility of reflex Gomori methenamine silver staining for *Pneumocystis jirovecii* on bronchoalveolar lavage cytologic specimens: a review. *Diagn Cytopathol*, **2006**; 34(11):719-23.
116. **Mary E. Brandt, David W. Warnock.** Laboratory aspects of medical mycology. In Clinical Mycology. Edited by Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD. Oxford University Press, **2003**; 3-22.
117. **Otağ F, Aslan G, Şen S, Emekdaş G.** Fungemi etkeni *Candida* türlerinin hızlı tanısında CHROMagar *Candida* besiyerinin kullanımı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **2006**; 36(4): 200-4.
118. **Ellepola ANB, Morrison CJ.** Laboratory diagnosis of invasive Candidiasis. *J Microbiol*, **2005**; 43: 65–84.
119. **Byadarahally Raju S, Rajappa S.** Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *ISRN Dent*, **2011**; 487-92.
120. **Buschelman B, Jones RN, Pfaller MA, Koontz FP, Doern GV.** Colony morphology of *Candida* spp. as a guide to species identification. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **1999**; 35(1):89-91.
121. **Hoppe JE, Frey P.** Evaluation of six commercial tests and the germ-tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **1999**; 18: 188–191.
122. **Cárdenes CD, Carrillo-Muñoz AJ, Arias A, Rodríguez-Alvarez C, Torres-Lana A, Sierra A, Arévalo MP.** Comparative evaluation of four commercial tests for presumptive identification of *Candida albicans*. *J Microbiol Methods*, **2004**; 59: 293– 297.
123. **Huppert M, Harper G, Sun SH, Delanerolle V.** Rapid methods for identification of yeasts. *J Clin Microbiol*, **1975**; 2(1):21-34.
124. **Marinho SA, Teixeira AB, Santos OS, Cazanova RF, Ferreira CA, Cherubini K, de Oliveira SD.** Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PZR. *Braz J Microbiol*, **2010**; 41(2):286-94.
125. **Madhavan P, Jamal F, Chonh PP.** Laboratory Isolation and Identification of *Candida* species. *Journal of Applied Sciences*, **2011**; (16): 2870-2877.
126. **Brandt ME, Warnock DW.** Laboratory aspect of medical mycology . In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD, ed. Clinical Mycology. First edition. Oxford University Press, **2003**; p.3- 22.
127. **Ilkit M, Hilmioglu S, Tasbakan M, Aydemir S.** Evaluation of Albicans ID2 and Biggy agar for the isolation and direct identification of vaginal yeast isolates. *J Med Microbiol*, **2007**; 56(Pt 6):762-5.
128. **Baixench MT, Taillandier A, Paugam A.** Clinical and experimental evaluation of a new chromogenic medium (OCCA, Oxoid) for direct identification of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. *Mycoses*, **2006**; 49(4):311-5.
129. **Pfaller MA, Houston A, Coffmann S.** Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol*. **1996** Jan;34(1):58-61.

130. **Yeo SF, Wong B.** Current status of nonculture methods for the diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev*, **2002**; 15: 464-485.
131. **Budtz J, Orgensen E.** Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. Diagnosis of oral candidosis. *Acta Odontologica Scandinavica*, **1990**; 48: 37-43.
132. **Yeğenoğlu Y.** İnvaziv mantar hastalıklarının mikolojik tanısı. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, **2007**;70:23-28.
133. **McLintock LA, Jones BL.** Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haemato-oncology patients. *Br J Haematol*, **2004** Aug;126(3):289-97.
134. **Wheat LJ.** Antigen detection, serology, and molecular diagnosis of invasive mycoses in the immunocompromised host. *Transpl Infect Dis*, **2006** Sep;8(3):128-39.
135. **Lehtonen L, Anttila VJ, Ruutu T, Salonen J, Nikoskelainen J, Eerola E, Ruutu P.** Diagnosis of disseminated candidiasis by measurement of urine D-arabinitol/L-arabinitol ratio. *J Clin Microbiol*, **1996** Sep;34(9):2175-9.
136. **Del Bono V, Delfino E, Furfaro E, Mikulska M, Nicco E, Bruzzi P, Mularoni A, Bassetti M, Viscoli C.** Clinical performance of the (1,3)- β -D-glucan assay in early diagnosis of nosocomial *Candida* bloodstream infections. *Clin Vaccine Immunol*, **2011** Dec;18(12):2113-7.
137. **Willinger B.** Laboratory diagnosis and therapy of invasive fungal infections. *Curr Drug Targets*, **2006** Apr;7(4):513-22.
138. **Trnovsky J, Merz W, Della-Latta P, Wu F, Arendrup MC, Stender H.** Rapid and accurate identification of *Candida albicans* isolates by use of PNA FISHFlow. *J Clin Microbiol*, **2008** Apr;46(4):1537-40.
139. **Shepard JR, Addison RM, Alexander BD et al.,** Multicenter evaluation of the *Candida albicans/Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. *Journal of Clinical Microbiology*, **2008**; 50-55.
140. **Pfaller MA, Herwaldt LA.** The clinical microbiology laboratory and infection control: Emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. *Clin Infect Dis*, **1997**; 25:858-70.
141. **Saghrouni F, Ben Abdeljelil J, Boukadida J, Ben Said M.** Molecular methods for strain typing of *Candida albicans*: a review. *J Appl Microbiol*, **2013**; 114(6):1559-74.
142. **Akyol V, Cerikcioğlu N.** *Candida parapsilosis* klinik izolatlarının morfolojilerinin tanımlanması, genotiplendirilmesi ve farklı morfolojilerde bazı virulans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, **2010**; 44(4):605-17.
143. **Köksal F.** Moleküler Biyolojik Tiplendirme Yöntemlerinin Hastane İnfeksiyonlarında Kullanımı. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, **1999**; 3: 189-195.
144. **Chen, KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY.** Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. *J Med Microbiol*, **2005**; 54:249-258.

145. **Pounder JI, Williams S, Hansen D, Healy M, Reece K, Woods G. L.** Repetitive-sequence-PZR-based DNA fingerprinting using the DiversiLab system for identification of commonly encountered dermatophytes. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43:2141-2147.
146. **Wise MG, Healy M, Reece K, Smith R, Walton D, Dutch W, Renwick A, Huong J, Young S, Tarrand J, Kontoyiannis DP.** Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PZR. *J Med Microbiol*, **2007**; 56(6):778-787.
147. **Sumak M.** Fungemi Etkeni *Candida Albicans* ve Non-*Albicans* Ayırımında Kullanılan Çimlenme borusu Deney Süresinin Azaltılmasında Yöntemlerin Karşılaştırmalı Olarak Araştırılması. Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık bilimleri enstitüsü, Mersin, **2010**.
148. **Griffiths LJ, Anyim M, Doffman SR, Wilks M, Millar MR, Agrawal SG.** Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PZR. *J Med Microbiol*, **2006**;55(9):1187-1191.
149. **Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA.** Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. *Clin Infect Dis*, **2001**; 33: 177-86.
150. **Akalin H.** Kandidemilerde risk faktorleri ve risk değerlendirmesi. *ANKEM*, **2008**; 22(Ek 2): 270-4.
151. **Zer Y, Balcı I, Meriç G.** Identification and antifungal susceptibility of *Candida* isolated from intensive care unit patients. *New Microbiol*, **2002**; 25 (4): 489- 94.
152. **Cömert F, Kulah C, Aktas E, Eroglu Ö, Özlü N.** Identification of *Candida* species isolated from patients in intensive care unit and invitro susceptibility to fluconazole for a 3- year period. *Mycoses*, **2006**; 50: 52-57.
153. **Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Hollis RJ, Messer SA.** International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. The SENTRY Participant Group. *J Clin Microbiol*, **1998** Jul;36(7):1886-9.
154. **Erdem F, Tuncer Ertem G, Oral B, Karakoç E, Demiröz Ap, Tülek N.** *Candida* Türlerine Bağlı Nozokomiyal Enfeksiyonların Epidemiyolojik ve Mikrobiyolojik Açından Değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, **2012**; 46(4): 637-648.
155. **Durán MT, Velasco D, Canle D, Moure R, Villanueva R.** Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from blood cultures in a five-year period (1997-2001). *Enferm Infec Microbiol Clin*, **2003** Nov; 21(9):488-92
156. **Singhi SC, Reddy TC, Chakrabarti A.** Candidemia in a pediatric intensive care unit. *Pediatr Crit Care Med*, **2004** Jul; 5(4):369-74.
157. **Keskin E, Tunger O, Değerli K ve ark.** Kandidemi gelişen hastalarda çeşitli risk faktorlerinin değerlendirilmesi. XIII. Turk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 14-18 Mart **2007**, Antalya. Kongre Kitabı, s: 284.

158. **Richet H, Roux P, Champs CD, Esnault Y, Andreumont A**, French candidemia study group. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clin Microbiol Infect*, **2002**; 8: 405-12.
159. **Nayman Alpat S, Özgüneş İ, Ertem OT, Erben N, Doyuk Kartal E, Tozun M, Usluer G**. Kandidürisi Olan Hastalarda Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, **2011**; 45(2): 318-324.
160. **Acar A, Öncül O, Küçükardalı Y, Özyurt M, Haznedaroğlu T, Çavuşlu Ş**. Yoğun bakım unitelerinde saptanan *Candida* infeksiyonlarının epidemiyolojik özellikleri ve mortaliteye etki eden risk faktörleri. *Mikrobiyol Bul*, **2008**; 42(3): 451-61.).
161. **Garbino J, Kolarova L, Rohner P, Lew D, Pichna P, Pittet D**. Secular trends of candidemia over 12 years in adult patients at a tertiary care hospital. *Medicine (Baltimore)*, **2002**; 81(6):425-33.
162. **Nguyen MH, Peacock JE Jr, Tanner DC, Morris AJ, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Yu VL**. Therapeutic approaches in patients with candidemia. Evaluation in a multicenter, prospective, observational study. *Arch Intern Med*, **1995**; 155(22):2429-35.
163. **Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, Gallis HA, McKinsey DS, Karchmer AW, Sugar AM, Sharkey PK, Wise GJ, Mangi R, Mosher A, Lee JY, Dismukes WE**. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. The National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. *Clin Infect Dis*, **2000** Jan; 30(1):14-8.
164. **Knöke M, Schulz K, Bernhardt H**. Dynamics of *Candida* isolations from humans from 1992-1995 in Greifswald, Germany. *Mycoses*, **1997** Sep; 40(3-4):105-10.
165. **Kobayashi CC, de Fernandes OF, Miranda KC, de Sousa ED, Silva Mdo R**. Candiduria in hospital patients: a study prospective. *Mycopathologia*, **2004** Jul; 158(1):49-52.
166. **Achkar JM, Fries BC**. *Candida* Infections of the Genitourinary Tract. *Clin Microbiol, Rev* **2010**; 23: 253-273.
167. **Harris AD, Castro J, Sheppard DC, Carmeli Y, Samore MH**. Risk factors for nosocomial candiduria due to *Candida glabrata* and *Candida albicans*. *Clin Infect Dis*, **1999** Oct; 29(4):926-8.
168. **Macphail GL, Taylor GD, Buchanan-Chell M, Ross C, Wilson S, Kureishi A**. Epidemiology, treatment and outcome of candidemia: a five-year review at three Canadian hospitals. *Mycoses*, 2002 Jun; 45(5-6):141-5.
169. **Cerikcioglu N, Ilki A, Bilgen H, et al**. The relationships between candidemia and candidal colonization and virulence factors of the colonizing strains in preterm infants. *Turk J Pediatr*, **2004**; 46(3): 245-50.
170. **Marol S, Yücesoy M**. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. *Mycoses*, **2008**; 51(1):40-9.
171. **Gulay Z, Ergon C, Ozkutuk A, Yucesoy M, Bicmen M**. Anestezi yoğun bakım unitesi hastalarından izole edilen *Candida albicans* suşlarının antifungal ajanlara duyarlılığı ve moleküler epidemiyolojik izlemi. *Mikrobiyol Bul*, **2002**; 36(3-4): 309-16.
172. **Akyol V, Cerikcioglu N**. *Candida parapsilosis* klinik izolatlarının morfoloju, genotiplendirilmesi ve farklı morfoloju türlerinde bazı virulans faktörlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, **2010**; 44(4): 605-17.

173. **Costa-de-Oliveira S, Sousa I, Correia A, et al.** Genetic relatedness and antifungal susceptibility profile of *Candida albicans* isolates from fungaemia patients. *Med Mycol*, **2011**; 49(3): 248-52.
174. **Gil-Lamaignere C, Roilides E, Hacker J, Müller FM.** Molecular typing for fungi--a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin Microbiol Infect*, **2003** Mar;9(3):172-85.
175. **Ergon MC, Gulay Z.** Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from urine at an intensive care unit. *Mycoses*, **2005**; 48(2): 126-31.
176. **Schwab U, Chernomas F, Larcom L, Weems J.** Molecular typing and fluconazole susceptibility of urinary *Candida glabrata* isolates from hospitalized patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **1997**; 29(1):11-7.
177. **Han SH, Huh HJ, Lee MA, Chung WS.** Molecular epidemiologic study using randomly amplified polymorphic DNA and risk factor analysis for an outbreak of *Candida tropicalis* urinary tract infection. *Korean J Clin Pathol*, **2002**; 22(1): 15-20.
178. **Chen KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY.** Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. *J Med Microbiol*. **2005** Mar;54(Pt 3):249-58.
179. **Romeo O, Delfino D, Cascio A, Lo Passo C, Amorini M, Romeo D, Pernice I.** Microsatellite-based genotyping of *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates reveals dominance and persistence of a particular epidemiological clone among neonatal intensive care unit patients. *Infect Genet Evol*, **2013**; 105-8.
180. **Zhang W, Zheng B, Ying C, Wang Y, Zhang H, Yang J.** Application of REP-PCR in genotyping of *Candida glabrata*. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*, **2012**; 32(7).
181. **Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D & Azeredo J.** Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol*, **2009**; 47: 681–689
182. **Chen S, Tong Z, Lee O, Halliday C, Playford E, Widmer F, Kong F, Wu C & Sorrell T.** Clinician response to *Candida* organisms in the urine of patients attending hospital. *Eur J Clin Microbiol* 27: 201–208, **2008**

ÖZGEÇMİŞ

Efdal OKTAY, 18.10.1986 tarihinde Mersin ilinin Tarsus ilçesinde doğdu. Liseyi 2004 yılında Tarsus Mustafa Kemal Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2004 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2008 yılında mezun oldu. 2010 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Hala Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.