

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

**İNVAZİV *CANDIDA* İNFEKSİYONUNUN  
PANFUNGAL POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU  
İLE ERKEN TANISI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Sebahat TAŞ**

**TEZ YÖNETİCİSİ**

**Yrd. Doç. Dr. Feza OTAĞ**

**MERSİN-2007**

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

**İNVAZİV *CANDIDA* İNFEKSİYONUNUN  
PANFUNGAL POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU  
İLE ERKEN TANISI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Sebahat TAŞ**

**TEZ YÖNETİCİSİ**

**Yrd. Doç. Dr. Feza OTAĞ**

**MERSİN-2007**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince değerli bilgi ve tecrübelerini bana aktararak yetişmemde emeği geçen, her konuda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Mersin Üniversitesi Rektör Yardımcısı ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı hocam Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ'a, tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Feza OTAĞ'a, eğitimimde katkıları bulunan ve bizlere her konuda destek olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Sayın Doç. Dr. Gönül ASLAN'a, Sayın Doç. Dr. Candan ÖZTÜRK'e, Sayın Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU'na ve Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN'e teşekkür eder saygılarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan ve tanımaktan mutluluk duyduğum ve tez yazımı aşamalarında desteklerini görmüş olduğum ve birlikte çalıştığım asistan, biyolog ve laborant arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, beni bugünlere getiren anneme, babama, zor anlarımda sabır ve sevgisinden güç aldığım eşim Dr. Hüseyin TAŞ'a ve hayatıma sonsuz katkılarından dolayı sevgili oğlum Erenalp'e teşekkür ederim.

Temmuz-2007

Dr. Sebahat TAŞ

## İÇİNDEKİLER

ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET (Abstract)	6
1. GİRİŞ VE AMAÇ	7
2. GENEL BİLGİLER	9
2.1. Tarihçe	9
2.2. Taksonomi	10
2.3. Morfoloji ve Üreme Özellikleri	10
2.4. Antijenik Yapı	12
2.5. Virülans Faktörleri	13
2.6. Patogenez	13
2.7. Risk Faktörleri	14
2.8. <i>Candida</i> infeksiyonlarında Lokal ve Sistemik Direnç	16
2.9. Hastane İnfeksiyonları ve <i>Candida</i> lar	18
2.10. Laboratuvar Tanısı	19
2.11. Tiplendirme Yöntemleri	23
2.12. Antifungaller ve etki mekanizmaları	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
4. BULGULAR	42
5. TARTIŞMA	51
6. KAYNAKLAR	56
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	69
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ	70
TABLolar DİZİNİ	71

## ÖZET

*Candida*ların neden olduğu infeksiyonlara son 30 yılı aşkın bir süredir giderek artan bir sıklıkta rastlanmaktadır. Bu infeksiyonlar altta yatan ciddi hastalığı olan hastalar için mortalite ve morbiditenin önemli nedenleri arasında yer almaktadır. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar bütün infeksiyonlara ve mantar infeksiyonlarına duyarlıdır. Nötropenik hastalarda *Candida* infeksiyonları çeşitli klinik tablolar ortaya çıkarabilir. Kandidemi bu tablolar içinde en öldürücü ve tedavisi en zor olanıdır. Hastaların invaziv *Candida* infeksiyonlarının tanısı, mantarın kültür ile izolasyonu, antijen ve antikorun serolojik olarak araştırılması, invazyonunun histopatolojik olarak gösterilmesi veya mantar nükleik asitlerinin moleküler yöntemler ile gösterilmesi ile konabilir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) bu grup hastalarda fungemiun hızlı gösterilmesi ve çok duyarlı oluşu nedeni ile tercih edilmektedir. Bu amaçla 3 yıllık süreçte (01.01.2004–01.01.2007) nötropenik ateşi olan, ateş etyolojisi araştırılan, yoğun bakım ünitelerinde yatan ve uzun süre hastanede kalan fungemi açısından riskli hastaların periferik kan kültürlerinde üreme saptananlarından periferik kan örnekleri alınarak moleküler yöntemler (PZR) ile invaziv mantar infeksiyonlarının erken tanısı amaçlanmıştır.

Kültüründe maya üremesi olan 71 hastaya ait 75 kan örneğinin 29'unda (%38.6) ve kültürde üremesi olmayan 12 hastanın 2 tanesinde (%16.6) mantar DNA'sı pozitif bulunmuştur.

Bu yöntemin kandidemi tanısı konmasında duyarlılığı yüksek, maliyeti düşük ve invaziv kandidoz tanı süresini kısaltarak saatler düzeyine düşürdüğü için hızlı sonuç verebilen ve tedavi takibinde de kullanılabilir bir yöntem olarak özellikle nötropenik hasta grubunda rutin olarak uygulanabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Invaziv mantar infeksiyonu, *Candida* türleri, panfungal PZR, nötropenik ateş

## İNGİLİZCE ÖZET (Abstract)

Infections caused by *Candida* have substantially increased in incidence over the past three decades. These infections are significant causes of morbidity and mortality for severely ill patients. Immun deficiency patients are sensitive all infections and fungal infections. *Candida* infections cause different clinic features in neutropenic patients. Candidemia is the most lethal and difficult one in these clinical features. Isolation of fungus from culture, detection of antigen and antibody by serological methods, detection of invasion by histopathological techniques or detection of fungus by nucleic acid amplification techniques have been used in diagnosis of invasive *Candida* infections. PCR has been used in *Candida* infections because of its sensitivity and rapidity. In this study, in 3 years periods (01.01.2004-01.01.2007), patients who has fungemia risk such as febril neutropenia, searched for ethiology of fever, patients in intensive care units, a long time hospitalized patients' bloods have been studied for early diagnosis of invasive *Candida* infections by molecular techniques is aimed.

75 blood samples belonging to 71 patients have been studied. 29 (38,6%) samples found culture positive and 2 (16,6%) found PCR positive while they were culture negative.

We consider PCR is sensitive, cheap, fast and easy for surveillance of patients taking antifungal therapy in this study.

**Key Words:** Invasive fungal infections, *Candida* species, panfungal PCR, febril neutropenia

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mantar infeksiyonları hastalarda hızlı gelişen, öldürücü ve tedavisi zor klinik tablolar oluşturmaktadır. Hematolojik ve solid organ malignitelerinin ve bunların tedavisinde kemoterapötiklerin kullanımının artması, immun yetmezliği, otoimmün hastalıkları ve bağ dokusu hastalıkları olan hastaların yaşam sürelerinin uzaması; büyük cerrahi girişimlerin sık yapılması ve bunların uzun sürmesi; organ transplantasyonlarının daha sık yapılması; hemodiyaliz ünitelerinin artması, gelişmiş yoğun bakım üniteleri, mekanik ventilatör kullanımı nedeniyle genel durumu bozuk hastaların daha uzun yaşatılabilmesi; geniş spektrumlu ve çok sayıda antibiyotik kullanımının artması, yeni ve çok yönlü tedavi edici stratejiler ve protez kullanımının yaygınlaşması sonucunda fırsatçı hastane kaynaklı infeksiyonların sıklığının artmasına, buna bağlı olarak da hastanede kalış süresinin uzamasına ve mortalite oranının yükselmesine neden olmuştur. Fırsatçı hastane kaynaklı patojenler arasında da en önemli yeri mantarlar almıştır<sup>1, 2, 3</sup>. Tıbbi ve cerrahi tedavilerdeki son gelişmeler hastanelerde takip edilen hasta profilini değiştirmektedir. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar bütün infeksiyonlara ve mantar infeksiyonlarına duyarlıdır. Nötropenik hastalarda *Candida* infeksiyonları çeşitli klinik tablolar ortaya çıkarabilir<sup>2</sup>. Fungemi bu tablolar içinde en öldürücü ve tedavisi en zor olanıdır. Sistemik *Candida* infeksiyonu daha çok *Candida* türlerinin steril kabul edilen beyin omurilik sıvısı, kan, plevra ve periton sıvılarında, safra veya doku biyopsilerinde tespit edilmesi ile tanı konmaktadır.

İmmün sistemi baskılanmış hastalarda mantar infeksiyonlarının klinik görünümü oldukça karmaşık, erken tanısı zor ve tanısında kullanılan laboratuvar yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri düşüktür. Bu hastaların yaşamını sürdürebilmesi için kandidemi veya sistemik kandidozun erken tanısının ve tedavisinin yapılması gerekmektedir<sup>4</sup>. Hastaların invaziv *Candida* infeksiyonlarının tanısı, mantarın kültür ile izolasyonu, antijen ve antikoru serolojik olarak araştırılması, invazyonunun histopatolojik olarak gösterilmesi veya mantar nükleik asitlerinin moleküler yöntemler ile gösterilmesi ile konabilir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) bu grup hastalarda fungeminin hızlı gösterilmesi ve çok duyarlı oluşu nedeni ile tercih edilmektedir<sup>5, 6</sup>.

Standart laboratuvar yöntemleri ile kan kültürlerinde mikroorganizmaların identifikasyonu zaman almakta ve bazen de tanı başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Son yıllarda kültür yöntemlerine başvurmadan klinik örneklerde mikroorganizmaların identifikasyonu için moleküler tekniklere dayalı yöntemler geliştirilmiştir. Bu çalışma fungal yükün az olduğu düşünülen erken dönemde bile PZR ile kandidemi tanısının konabileceğini göstermektedir. Uygulanan PZR tekniği 1 ml kanda 100 maya hücresi bulunması halinde pozitif sonuç vermektedir. Yapılan başka çalışmalarda uygulanan DNA saflaştırılması yöntemi değişmeksizin sadece türe özgül primerler ile duyarlılığın 10 maya hücresi/ml'ye kadar indirilebildiği bildirilmektedir<sup>7, 8, 9</sup>. Tanı amaçlı yapılan PZR özgüllüğü çoğaltım için uygun bir hedef dizisi seçilerek sağlanabilmektedir. Özgüllük, hedef dizi ve farklı cins veya türlerin DNA dizileri arasındaki uyuma bakılarak belirlenir. Tüm mantarlarda ortak olan bir genin çok iyi korunmuş bir bölgesi PZR için hedef seçildiğinde infeksiyonun mantardan kaynaklandığını gösterir. rRNA genleri oldukça korunmuş bölgeler içermektedir. Bu amaçla bizde ITS 1-4 primerlerini kullanarak tüm mantarlar için ortak gen bölgesini çoğaltarak görüntülemeyi amaçladık. Üç yıllık süreçte (01.01.2004–01.01.2007) nötropenik ateşi olan, ateş etyolojisi araştırılan, yoğun bakım ünitelerinde yatan ve uzun süre hastanede kalan fungemi açısından riskli hastaların periferik kan kültürlerinde üreme saptananlarından periferik kan örnekleri alınarak panfungal PZR ile invaziv *Candida* infeksiyonlarının erken tanısı amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2. 1. TARİHÇE

Mantar infeksiyonlarına ilişkin bilinen en eski belge MÖ 2000–1000 arasına tarihlenen Hindu kutsal yazıtında (Samhita) bulunmaktadır ve ayakta misetomadan söz eder. *Candida*lara ait esaslı bilgiler 19. yüzyılda toplanmaya başlamıştır. Kandidozun tarihçesi MÖ. 4. yüzyıla İstanköylü Hipokrat (Hippocrates MÖ 460–337)'a kadar uzanmakla birlikte etkenin keşfi, tifüslü bir hastanın ağızdaki pamukçuk lezyonundaki kazıntıda mantarı gözlemleyen Langenbeck tarafından 1839 (19. yüzyıl) yapılmıştır. Klasik kitaplarda pamukçuğa ait ilk tanımı 18. yüzyılda Rosen von Rosenstein'in 1771 yılında ve Underwood'un 1784 yılında yaptığı yazılmıştır. 1853'de Robin *Candida albicans*'ı pamukçuklu şahısların lezyonlarında incelemiş ve basit bir kültürünü de elde etmiştir. Pamukçukta mikroorganizmanın ilk keşfi Langenbeck tarafından yapılmış olsa da o gördüğü mantarı tifüs etkeni sanmıştır. Mantarı pamukçuğun etkeni olarak ilk tanımlayan 1842 yılında Gruby olmuştur. İlk sınıflandırma 1913'te Castellani ve Chalmers tarafından yapılmış ve *Monilia* cinsi altında 33 tür belirtilmiştir. 1948'de Unat, Bethesda'daki National Institutes of Health'de Mikrobiyoloji Enstitüsünün İnfeksiyon Hastalıkları Bölümü viroloji laboratuvarında çalışırken mikoloji laboratuvarında çalışan Dr. Emmons'u tanımış ve 1955'de çıkardığı Tıbbi Mikoloji Ders Kitabının önsözünde "Bir zamanlar dünyada, ancak birkaç kişinin bildiği zannedilen, fakat aslında hiç kimsenin içinde emniyetle dolaşamadığı karanlık ve karmakarışık bir alem iken, son zamanlarda bunun sistemli bir şekilde düzenlenmiş, aydınlık ve herkesin kolaylıkla yürüyebileceği bir ilim sahası olduğu ilan edilmiştir. Onu bu hale getirenler biyolojinin kaidelerini tanıyan, fizyolojik değişimleri ve mutasyonları anlayan mikrobiyologlar olmuştur" sözüne yer vermiştir. Ülkemizde ilk kez, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesine bağlı Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi Prof. Dr. Enver Tali Çetin ve arkadaşları, tarafından kurulmuş ve araştırmacıların yararlanacağı bir mantar kültür koleksiyonu oluşturulmuştur<sup>10, 11</sup>.

## 2. 2. TAKSONOMİ

*Candida*lar eşeyli ve eşeysiz sporları aracılığıyla ürerler, üreme şekilleri temel alınarak sınıflandırılır. *Candida*lar *Deuteromycota (Fungi imperfecti)* şubesinin *Blastomycetes* sınıfının *Cryptococcales* takımındaki *Cryptococcaceae* ailesi içinde sınıflandırılan, blastosporlarla çoğalan, yalancı hif yapan, nadiren gerçek hif yapan ve eşeyli şekilleri *Hemiascomycetes* sınıfında bulunan bir grup anamorf mayadır<sup>12, 13</sup>.

*Candida*ların bugün için 200 kadar türü bulunmaktadır. Bunların yaklaşık %20'si insanlarda infeksiyon oluşturabilmektedir. Bu cins içerisinde *C. albicans* (Robin Berkhout 1923) infeksiyonlardan en sık izole edilen türdür. İnsanlarda hastalık oluşturabilen diğer önemli türler ise; *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei* ve *C. glabrata*'dır ve %50-70 en sık etkenlerdir. Ancak bunların dışında *C. lusitaniae*, *C. lipolytica*, *C. zeylanoides*, *C. norvegensis*, *C. fomatata*, *C. utilis*, *Saccaromyces cerevisiae*, *C. rugosa*, *C. fabianii*, *C. dubliniensis* gibi türler de sık olmamakla birlikte infeksiyonlardan izole edilebilmektedir<sup>13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21</sup>. Bugünkü yaklaşım; artan santral venöz kateter, injeksiyon, radyasyon, kemoterapi, antibiyotik ve steroid kullanımı, cerrahi girişimler, organ nakilleri, malignite, ciddi yanıklar, intravenöz sıvı tedavisi, hematolojik hastalıklar ve AIDS gibi bireyin bağışıklık sistemini baskılayan çeşitli sebeplerle diğer *Candida* türlerinin de patojen olabileceği yönündedir<sup>14, 22, 23, 24</sup>.

## 2. 3. MORFOLOJİ VE ÜREME ÖZELLİKLERİ

*Candida* türleri tek hücreli, hücre duvarında kitin ve selüloz içeren ökaryotik organizmalardır. Klinik örneklerde ve kültürlerde 4-6 µm arasında değişen boyutlarda, küre şeklinde, ovalimsi veya silindirik olabilen, tomurcuklanan blastokonidyum veya blastosporlar şeklinde hücreler olarak görülürler. Tomurcuklanarak meydana gelen yavru hücre ana hücrenin benzeridir. Ana hücreden ayrılmayı başaramayan yavru hücreler yalancı hif şeklinde zincirler oluştururlar. Nadiren *C. albicans*'da gerçek hif oluşumu görülmektedir<sup>13, 22</sup>.

*Candida* türlerinin çoğu yaygın olarak kullanılan bakteriyolojik ve mikolojik kültürlerde iyi ürerler. Koloniler genellikle 24 saatte belirmesine rağmen, belirgin üreme genellikle 48-72 saat arasında olmaktadır. Önemli özelliklerinden biri 37°C'de üreyebilmeleridir. Özellikle patojen olanlar 25-37°C'de, saprofit olanlar ise daha düşük ısıda üreme özelliklerine sahiptir. Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyerinde oda ısısında ve 37°C'de üreyip genellikle hamur kıvamında, kirli beyaz veya krem renginde kolonileri düzgün veya buruşuk kenarlı, nemli, krem görünümünde ve tipik olarak maya kokulu koloniler oluşturur. Koloninin besiyeri üzerinde kalan bölümü blastokonidyumlar tarafından oluşturulurken, yüzeyin altında kalan kısımlar da ise yalancı hifler bulunur. Mayaların üreyebilmesi için besiyeri ortamında amonyum tuzu, biotin, fosfat, glukoz ve serbest metallerin (Fe, Zn, Ca gibi) bulunması, ortam pH'sının 2-8 arasında olması yeterlidir. *Candida* türleri kemoheterotrofturlar, organik azot ve karbon kaynağına ihtiyaçları vardır. Besinlerini buldukları ortamdaki rahatça alabilmeleri için ortamın nem oranının %95-100 arasında olması gerekmektedir. *Candida* türleri, oksijen varlığında spesifik karbonhidratları tek karbon kaynağı olarak kullanabilirler.

Klinik örneklerden izole edilen *C. krusei* ve *C. lipolytica* suşları dışındaki *Candida* türlerinin üreaz enzim aktivitesi yoktur. Üreaz enzim aktivitesi olan *Cryptococcus neoformans*'ın kafeik asit içeren substrata fenol oksidaz enzim aktivitesi göstermesi, *Rhodotorula* türlerinin pigmentli olması, *Trichosporon* türlerinin artrospor oluşturmaları ile, çeşitli biyokimyasal testlerle ve ayırıcı besiyerleri ile ayrılır. Koloninin besiyeri üzerinde kalan bölümü blastokonidyumlar tarafından oluşturulurken, yüzeyin altında kalan kısımlar da ise yalancı hifler bulunur<sup>12, 13, 15, 25, 26</sup>.

*Candida* hücreleri besince fakir bir ortam olan mısırunlu jelozda yedek besin depolayan klamidosporeler oluşturur. Hiflerin içinde (ara klamidospore), kenarında (yan klamidospore) veya uçlarında (uç klamidospore) gelişebilen, büyük (8-12 mm), yuvarlak ve kalın duvarlı bu oluşumlar, açlığa ve diğer değişik şartlara karşı hücre canlılığını korumaya yönelik uyum sağlarlar. Mısırunlu jelozda *C. albicans*'ın 4 değişik morfolojik şekil oluşturarak ürettiği görülür. Bunlar; 1) Yalancı hif, 2) Blastosporeler (Blastokonidiler), 3) Klamidosporeler, 4) seyrek olarak gerçek hiflerdir<sup>12, 15, 25</sup>.

Klamidosporlar *C. albicans*'ın en belirgin özelliğidir. *C. tropicalis*'in bazı kökenleri ve *C. dubliniensis* de klamidospor yaparlar. *C. tropicalis*'in klamidosporları *C. albicans*'a ait klamidosporlardan bir süspansör hücrenin bulunmamasıyla farklılık gösterir ve *C. tropicalis* sonraki pasajlarında klamidosporlarını kaybeder. Buna karşılık klamidospor oluşumu *C. albicans*'da sabit bir özelliktir. Ayrıca *C. tropicalis*'e ait klamidosporlar morfolojik olarak gözyaşı damlasına benzerler ve daha küçüktürler. *C. dubliniensis*'e ait olanlar daha çok süspansör hücreye tutunmuş kümeler halindedir<sup>12</sup>.

Çimlenme borusu (germ tüp) testi *C. albicans*'ı diğer *Candida*'lardan ayırt etmek için kullanılan diğer bir testdir. *C. albicans*'ın maya hücreleri 37°C'de 2-3 saatte fasulye filizine benzer çimlenme borusu oluştururlar. *C. albicans* kökenlerinde pozitif olan bu deneyin diğer sık rastlanan hiçbir *Candida* türünde aynı şartlarda görülmemesi tanı açısından oldukça önemlidir<sup>12, 15, 27, 28</sup>.

## 2. 4. ANTİJENİK YAPI

*Candida* hücre duvarı antijenik ögeler bulundurur. *Candida* hücre duvarı en fazla %80-90 karbohidratlardan, %5-15 protein ve %2-5 lipidlerden oluşur. Karbohidratların ise %20-30'u mannan, %50-60'ı beta-glukan ve % 0.6-3'ü kitin ve kitozan polimerlerinden meydana gelir. *C. albicans*'da polisakkarit içeriğinin %40'ı potent immunojen olan mannandır. Mannan'ın yapısal farklılığına göre A ve B olmak üzere iki serotipi bulunmaktadır. *C. albicans*'da mannan dışında antijenler de saptanmıştır. Bunların içinde en önemlileri salgısal proteazlar, enolaz ve ısı şok proteinleridir. Doğumdan itibaren *Candida* ile temastan dolayı çoğunlukla serumda mantara karşı hem özgül antikorlar hem de hücre sel bağışıklık oluşmaktadır<sup>15, 29, 30</sup>.

Sistemik *Candida* infeksiyonlarında çeşitli *Candida* antijenlerine karşı artan oranda antikor düzeyleri tespit edilmiştir. Ayrıca bu hastalarda hücre duvarı mannanı, lateks aglütinasyon veya EIA (Enzim immunoassay) ile gösterilebilmektedir<sup>15, 25</sup>.

## 2. 5. VİRÜLANS FAKTÖRLERİ

Farklı *Candida* türlerinin konağı farklı derecelerde hastalandırma yeteneğı vardır. Diğer yandan deneyler *C. albicans* kökenleri arasında da konağı hastalandırabilme derecesinde farklılıkların olabileceğı yani virülans farklılıklarının varlığını ortaya koymuştur<sup>31</sup>. Hücre duvarı, adezyon ve hücre dışı proteolitik enzim üretimi en önemli üç virulans faktörüdür. Özellikle konakçı epitel ve endotel hücrelerine adezyon (bağlanma), proteinaz enziminin üretimi, germ tüp oluşturma en önemli virulans faktörleridir. Ayrıca fosfolipaz enzimi, toksinler, fenotip değışimi, hücre duvarı ve yüzey değışimi ile hidrofobisite gibi faktörler de virulans ve patogeneizde önemli rol oynamaktadır<sup>32, 33, 34, 35</sup>.

## 2. 6. PATOGENEZ

Doğada, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde yaygın bir şekilde bulunan *Candida* türleri patolojik potansiyeli olan fırsatçı mikroorganizmalardır. İnsanların mukokütanöz membranlarında flora üyesi olarak yer almaları yanında toprak ve birçok bitkiler üzerinde de canlılıklarını sürdürebilirler. Mikroorganizmanın topraktan izolasyonu fekal kontaminasyon olarak kabul edilir. Temel özellikleri fırsatçı nitelikte olmalarıdır ve gelişmelerinde uygun olmayan konak faktörleri önemli yer tutmaktadır<sup>28, 33</sup>.

*Candida* türleri normal flora elemanı olduğı için, gelişen infeksiyon çoğı kez endojen kaynaklıdır. Genellikle infeksiyondan önce kolonize olan mantar sayısı artar ve kolonizasyonu infeksiyon izler<sup>15, 36</sup>.

*Candida*'lar yüzeysel ve derin infeksiyonlar olmak üzere başlıca iki grup infeksiyona neden olurlar. Yüzeysel kandidozlar deri ve mukozaları, derin kandidozlar ise iç organ ve sistemleri tutan infeksiyonlardır<sup>15</sup>.

İnfeksiyonun ilk aşamasını *Candida*'ların mukoza epitel ve endotel hücrelerine yapışması oluşturur. *C. albicans*'ı bu cins içerisinde en sık karşılaşılan tür olarak öne çıkaran özelliklerin başında mukoza yüzeylerine yapışma yeteneğinin fazla olması gelmektedir<sup>31</sup>. Yüzeysel kandidozlarda *Candida* deri veya mukozadaki bir çatlaktan yalancı hifleri ile doku içerisine girer; enzimleri sayesinde yalancı hifler ve bunlardan tomurcuklanan

blastokonidyumlar ile epitelyum hücreleri içine girerek invazyonunu gerçekleştirir.

Derin veya sistemik infeksiyonlarda önce gastrointestinal sistemde bir kolonizasyon vardır. Gastrointestinal mukozayı geçerek veya başka bir yolla kana karışan *Candida*lar özellikle bağışıklık sistemi yetersiz hastalarda hemen her organ ve sisteme yerleşebilmektedirler. Böbrekler, göz, deri, karaciğer, dalak, kalp ve beyin zarları sıklıkla tutulan organlardır<sup>15</sup>.

Yüzeysel ve derin kandidozlarda predispozan faktörler<sup>15</sup>.

- Derinin maserasyonu
- Diabetes mellitus
- Hücresel immun yetmezlikler
- Geniş etki alanlı antibiyotikler
- Kortikosteroidler ve başka immunsupresif ilaçlar
- Nötropeni (malignite veya malignitenin tedavisi nedeniyle)
- Bazı ameliyatlara (organ transplantasyonları, kalp veya gastrointestinal kanal ameliyatlara)
- Ciddi yanıklar
- Damar kateterleri
- AIDS
- Kronik yatağa bağlayıcı hastalıklar
- Damardan narkotik kullanımı

## 2. 7. RİSK FAKTÖRLERİ

Maligniteler, immun yetmezlikler, otoimmün hastalıkları ve bağ dokusu hastalıkları olan hastaların yaşam sürelerinin uzaması; büyük cerrahi girişimlerin sık yapılması ve bunların uzun sürmesi; organ transplantasyonlarının daha sık yapılması; gelişmiş yoğun bakım üniteleri nedeniyle genel durumu bozuk hastaların daha uzun yaşatılabilmesi; geniş spektrumlu ve çok sayıda antibiyotik kullanımının artması ve protez kullanımının yaygınlaşması sonucunda fırsatçı hastane kaynaklı infeksiyonların sıklığı da

artmıştır. Fırsatçı hastane kaynaklı patojenler arasında da en önemli yeri mantarlar almıştır<sup>22, 23, 37 38, 39, 40, 41</sup>.

Kandidemi gelişimiyle ilgili, çeşitli kaynaklarda belirtilen risk faktörleri aşağıda sıralanmıştır<sup>13, 37, 38, 39, 42, 43, 44, 45</sup>.

- 1) Gastrointestinal kolonizasyonun artması
  - Antimikrobik kemoterapi (Kandidemi öncesi iki hafta içinde geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı)
  - Antiasit ve/veya H<sub>2</sub> reseptör blokörleri ile tedavi
  - İleus
  - Diyareler
- 2) Parenteral hiperalimentasyon (önceki 30 gün içinde intravenöz hiperalimentasyon). Hiperalimentasyon sıvıları intravasküler hiperglisemik ortam sağlayarak *Candida* infeksiyonlarının gelişmesini kolaylaştırır.
- 3) Sistemik konak savunmasının bozulması
  - Kortikosteroid tedavisi
  - Nötropeni (1000/mm<sup>3</sup> altında nötrofil sayısı)
  - Diabetes mellitus
  - Böbrek yetmezliği
  - Malign hastalıklar
  - Sitotoksik kemoterapi
  - İmmünsüpresif tedavi
  - Hasarlı mukozal bariyer (kemoterapi ve radyoterapi sonrası maserasyona bağlı doku invazyonu gelişebilir).
- 4) İnvazif girişimler
  - Santral venöz kateterler (SVC), üriner kateterler, arteriyel kateterler
  - Endotrakeal tüp
  - Hemodiyaliz
- 5) Hastaya bağlı faktörler
  - Yaş (ileri yaş veya prematürite)
  - Cinsiyet
- 6) Kan ürünü transfüzyonu

- 7) Yoğun bakım ünitesinde kalmak (yoğun bakım hastalarında hastane infeksiyonları diğer hastalara oranla 5-10 kat daha fazladır)
- 8) Kan biyokimyasındaki değişiklikler
  - Azotemi
  - Hiperglisemi (transplantasyondan önce gelişen ve insülin tedavisi gerektiren 2 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 3 gün içerisinde antifungal profilaksi uygulanması
  - Yoğun bakım tedavisi altında olmak
  - Herhangi bir nedenle cilt veya mukoza bütünlüğünün bozulması
  - Solid organ transplantasyonu
  - Önceden antifungal kullanımı

## 2. 8. CANDIDA İNFEKSİYONLARINDA LOKAL VE SİSTEMİK DİRENÇ

### Doğal Direnç

Sistemik infeksiyon için ilk engel epitelyum hücreleridir. Mukoza epitel hücreleri doğal ve kazanılmış bağışıklığı sitokinleri ve membran aracılığı ile düzenler. Fagositik hücreler *Candida* ve diğer mantar infeksiyonlarına dirençte oldukça önemlidir.

*C. albicans*'ın blastospor ve hifaları PNL(Polimorf nüveli lökositler)'in oksidatif ve non-oksidatif mekanizmaları ile yok edilir. Kullanılan oksidanlar arasında hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri, hipoklorik asitler, defansinler, lizozim, serum proteazlar ve kloraminler sayılabilir. PNL'in bu işlevi TNF, IFN $\gamma$ , IL-2, IL-8, CSF gibi sitokinlerle artar. Hipoklorik asit ve kloramin sentezi yine kendi sentez ettiği miyeloperoksidaz (MPO) enzimi sayesinde olur. Miyeloperoksidaz, klorid iyonunun hidrojen peroksit tarafından oksidasyonunu kataliz eder ve söz konusu ürünler ortaya çıkar. Özellikle, MPO ve hidrojen



peroksid gibi fungusidal moleküller, PNL'in *C. albicans*'ı öldürmesi için gereklidir. Buna karşı diğer *Candida* türleri non-oksidatif mekanizmalarla yok edilebilmektedir. Non-oksidatif mekanizmada, antifungal aktiviteye sahip bazı protein ve peptidler rol oynar. PNL'in azürofil granüllerinde bulunan antimikrobiklerin *Candida* türlerine karşı aktivite gösterebildikleri ve bazılarının *C. albicans*'ı doğrudan öldürebildikleri, yine aynı granüllerde bulunan katepsin G'nin de antifungal aktivitesinin bulunduğu kaydedilmiştir. PNL ve makrofaj sistemik infeksiyondan korunmada önemlidir. Nötrofil fonksiyon bozuklukları olan ve nötropenisi olan hastalarda invazif ve sistemik kandidoz insidansının artmış olması bunun en iyi göstergesidir<sup>46</sup>.

### **Sıvısal İmmünite**

Antikor aracılı korunma oldukça tartışmalıdır.

B hücre anomalisi olan kişiler sistemik ve mukozal kandidoza karşı daha duyarlı değillerdir. Serumda *C. albicans*'a karşı spesifik IgG, IgA antikorları bulunur. Özgül antikorların olumlu ve olumsuz etkilerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır<sup>46</sup>.

### **Hücre aracılıklı immünite:**

Lenfositlerin *Candida* infeksiyonlarındaki rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Aktive lenfositlerden salınan lenfokin benzeri maddelerin *C. albicans* üzerinde toksik etkisi bulunduğu öne sürülmüştür. *Candida* antifijenlerine karşı T-lenfosit yanıtının başlamasında ve makrofajlar ile lenfositlerin aktivasyonunda lenfosit-makrofaj etkileşimi önemli rol oynar. Kronik mukokutenöz kandidozlu hastalarda hücre aracılıklı immünite bozukluklarının bulunuşu, hücre aracılıklı immünitenin *Candida* infeksiyonlarına karşı dirençte önemli olduğu düşündürmektedir<sup>15</sup>.

## 2. 9. HASTANE İNFEKSİYONLARI VE CANDIDALAR

Hastane infeksiyonu hastaneye ilk yatışta mevcut olmayan ya da kuluçka süresi içinde bulunmayan, hastanede kalma süresi içinde ortaya çıkan infeksiyon olarak tanımlanmaktadır. Fırsatçı patojen mantarlarla oluşan hastane infeksiyonlarının görülme sıklığı giderek artış göstermektedir. Kateter yüzeyinde oluşturduğu biyofilm nedeniyle özellikle santral venöz kateteri olan, parenteral beslenen hastalarda *C. parapsilosis*'e bağlı fungemi gelişiminde artış olmuştur.<sup>39, 47, 48</sup>

Pfaller ve ark 1997 yılında Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Güney Amerika'yı içine alan 34 merkezde yaptıkları araştırmada kandidemiye neden olan 306 etkenin %53.3'ünü *C.albicans*, %46.7'ini non-*albicans Candida* bulmuşlardır. Non-*albicans Candida*lar içinde de en sık *C. parapsilosis* bulunmuştur. Bu oran Amerika Birleşik Devletleri'nde %43.8 non-*albicans Candida* ve en sık *C. glabrata*, Kanada'da %47.5 non-*albicans Candida* ve en sık *C. parapsilosis*, Güney Amerika'da %59.5 non-*albicans Candida* ve en sık *C. parapsilosis* olarak belirtilmiştir<sup>49</sup>. Hastanemizde Otağ ve ark.'nın 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada en sık fungemi etkeni olarak *C. parapsilosis* (%51.86) izole edilmiştir<sup>50</sup>.

Son 30 yılda hastane kaynaklı mantar infeksiyonlarında belirgin bir artış görülmüştür<sup>23</sup>. "National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS)" verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yapılan bir çalışmada 1980'li yıllarda %0.2 olan mantar infeksiyonu görülme sıklığı 1990'larda %0.38'e çıkmıştır<sup>1</sup>. *Candida* türleriyle oluşan hastane kaynaklı fungeminin hastanede kalış süresini ortalama 30 gün uzatmakta ve %40'a yakın bir oranda mortaliteye neden olmaktadır<sup>51</sup>.

Bu artışın başlıca sebebi; hastanede yatan hasta popülasyonundaki değişikliklerdir. Kanser ve immun sistem yetmezliği olan hastaların seyrindeki düzelmeler, yoğun bakım ünitelerinin gelişmesi, organ nakillerinin daha fazla yapılması hastaların yaşam ömrünün uzamasına neden olmuş ancak bu hastalarda mantar görülme sıklığını da arttırmıştır<sup>39</sup>. Almanya'da 49 hastanede, 1995-2002 yılları arasında 24179 vakayı kapsayan bir çalışmada kan kültürü infeksiyonu %77 oranında tek mikroorganizmaya bağlı olarak meydana gelmiştir. Mikroorganizmaların %65'i Gram pozitiflere, %25'i Gram negatiflere

ve %9.5'i mantarlara bağlı oluşmuştur. Mortalite %27 oranında grlmştir. En fazla %31 oranında koagülaz negatif stafilokoklar, %20 *S. aureus*, %9 *Enterokok* ve %9 oranında *Candida* türleri bulunmuştur<sup>52</sup>. En sık görülen hastane kaynaklı hematojen kandidoz etkeni *C. albicans*'dir. ABD'de yapılan bir çalışmada 1980-1990 yılları arasındaki 24227 hematojen *Candida* enfeksiyonunun etkeni %76 oranında *C. albicans* olarak bulunmuştur<sup>39</sup>.

## 2. 10. LABORATUVAR TANISI

*Candida* infeksiyonlarının tanısı klinik bulgular ve laboratuvar sonuçlarının birlikte değerlendirilmesine bağlıdır<sup>53</sup>.

*Candida*'lar üst solunum yolu ve gastro-intestinal sistemin normal flora elemanları olduklarından dolayı laboratuvarda izole edildiklerinde etken patojen açısından değerlendirilmeleri zordur. Boğaz sürüntüsü, balgam, trakea ve bronş salgıları, gastrik sıvı, dışkı örnekleri gibi normal floralı bölgelerden izolasyonu hastanın klinik durumu ile birlikte değerlendirilmelidir<sup>25</sup>. Balgam ağızdaki *Candida*'lar ile kontamine olabildiğinden balgam kültürlerinin değerlendirmesinde bronkoskopi ile alınan bronş sekresyonları kolonizasyonu veya infeksiyonu ortaya çıkarma açısından daha güvenilir örneklerdir<sup>53</sup>. Normalde steril olan kan, beyin omurilik sıvısı, eklem, plevra ve perikard sıvılarından *Candida* izole edilmesi infeksiyonu gösterir<sup>25</sup>.

### 2. 10. 1. Mikroskopik inceleme:

Boyasız ıslak preparatlarda, hiflerin ve tomurcuklanan maya hücrelerinin görülmesiyle çok çabuk sonuç alınabilmektedir. Derinin kat yerleri kandidozunda *Candida albicans*'ın sıklıkla kolonizan olması nedeniyle deri kazıntı örneğinin mikroskopik incelenmesinde blastosporların görülmesi önemlidir<sup>53</sup>. Floresan mikroskopunda kalkoflor beyazı boyası ile inceleme boyasız preparatlardan daha iyi sonuç vermektedir. Kalkoflor beyazı fungal elementlerdeki sellulozu ve kitini boyar. UV ışığı altında floresan verir. Tek dezavantajı uygun ultraviyole filtreli floresan mikroskobu gerektirmesidir. Sitoloji

preparatları Gram boyası ile, fungemili hastaların kan yayma preparatları Giemsa veya Wright boyası ile histoloji preparatları Gomori'nin metanamin gümüş boyası ile boyanarak incelenmektedir<sup>25</sup>. Preparatlarda yalancı hiflerin görülmesi *Candida*'nın dokuya invazyonunu ve infeksiyonun işareti olarak kabul edilir<sup>15</sup>.

## 2. 10. 2. Kültür:

Tüm örnekler antibiyotikli SDA besiyerine ekilerek oda ısısında (22-26°C) ve 37°C inkübe edilirler. *Candida* türleri genellikle 24 saat içerisinde koloni oluştururlar ancak 48 saatte kolonileri daha belirgindir. Mısırunu-Tween 80 besiyerine ekim yapıldığında yalancı veya gerçek hif yapıp yapmadığı, blastokonidyumların büyüklüğü, şekli ve dizilimleri ayrıca klamidospore oluşturup oluşturmadıkları saptanabilir<sup>15</sup>. Primer kültürde karışık *Candida* türlerinin tanımlanmasında kullanılan kromojenik besiyerleri de bulunmaktadır. Kromojenik substratlar besiyerinde bulunan karbonhidratlara, aminoasitlere veya fosfatlara tutturulmuştur. Kromojenik substratlar kromoforlardan veya floroforlardan oluşur. Hedef mikroorganizma kendine özgü enzimlerle bu substratları kullandığı zaman kromoforlar veya floroforlar mikroorganizma içinde serbest kalır ve mikroorganizma kolonileri renkli gözlemlenir<sup>54, 55, 56, 57</sup>.

*Candida* normal koşullarda ağız ve gastro-intestinal sistemin normal florasında yer aldığı için balgam ve gaita örneklerinden izolasyonu infeksiyon tanısı için yeterli değildir. Bu nedenle *Candida*'nın bulunduğu florayı içeren örneklerden yapılan kültürler dikkatle yorumlanmalıdır<sup>15</sup>.

Pozitif kan kültürleri, sistemik *Candida* infeksiyonları veya enfekte damariçi kataterlere bağlı geçici kandidemiyi gösterir. Damariçi katater ucunun kültüründe *Candida* üremesi, üreme yoğunluğuna bakılmaksızın sistemik *Candida* infeksiyonları açısından değerlendirilmelidir<sup>15, 53</sup>.

### 2. 10. 3. Serolojik testler:

Derin kandidoz kuşkusunda *Candida* antikor ve antijenlerini aramaya yönelik serolojik testler kullanılmaktadır. Ancak bu testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü düşük bulunmaktadır<sup>15</sup>.

Hasta serumu ve vücut sıvılarında anti-*Candida* antikorlarını, *Candida* antijenlerini, metabolitlerini ve hücre duvarı komponentlerini tespit eden testler geliştirilmiştir<sup>53, 58</sup>.

Anti-*Candida* antikorlarını saptamak için kullanılan immunolojik testler genel olarak *Candida* hücre duvar mannanını hedef almaktadır. Bu testler, mannanın sağlıklı kişilerde de saptanabilmesinden dolayı, aynı zamanda immun sistemi baskılanmış hastalarda yeterli antikor yanıtı oluşmadığı için duyarlılık ve özgüllüğü düşük bulunmuştur<sup>59</sup>.

*Candida*'ların normal flora üyesi olmalarından dolayı, sağlıklı kişilerde de antikor cevabı gelişmesine neden olmakta bu ise özgül antikorların serolojik testler ile saptanmasının önemini azaltmaktadır. Kolonizasyon veya yüzeysel enfeksiyona bağlı olarak oluşmuş antikorlar derin kandidozda oluşmuş antikordardan ayırt edilemezler. Ayrıca immun sistem yetmezlikli hastalarda antikor yanıtı zayıf olabileceğinden hatalı negatifliklere yol açabilir<sup>25, 15</sup>. Antikor ölçen testlerde özgüllük ve duyarlılığı en yüksek olan testler, immunoblot ve enzim immünoassay (EIA) yöntemlerine dayalı testlerdir<sup>25</sup>.

Serolojik tanıda antikorların saptandığı bu yöntemin dezavantajlarından dolayı, konak bağışıklık durumunun etkilemediği, antijen aramaya yönelik testler daha önemli duruma gelmiştir. Özellikle immun sistem yetmezlikli hastalarda antijen saptayan testler daha fazla önem kazanmıştır. *C. albicans*'ın 47 ve 48 kDa protein antijenlerini ölçen testlerdeki gelişmeler umut vericidir. Bunun yanı sıra mannan antijeni EIA ile %65-70 duyarlılıkta ve %100 özgüllükte saptanabilmektedir<sup>25</sup>.

Serolojik olarak antikor tarama testleri özellikle *Candida* enfeksiyonlarının tanısında; bu maya cinsinin normal flora üyesi olması, bunun yanında *Candida* antijenlerinin immünojenitesinin düşük olması hem de bu enfeksiyonun görüldüğü hasta grubunun genellikle immun yetmezliği olan hasta grubu olması nedeniyle yeterli antikor yanıtı oluşmamaktadır<sup>59</sup>.

## 2. 10. 4. Moleküler yöntemler:

Tanısal mikrobiyolojide temel hedef, etkenin en kısa sürede saptanıp tanımlanması ile hasta tedavisinde önemli gelişmeler sağlamaktır<sup>59</sup>.

Mantarların izolasyon ve tür tanısında en son olarak tanıda uzun süreye gereksinim olması nedeniyle tanıyı daha kısa sürede sonlandıracak moleküler yöntemleri gündeme getirmiştir.

Klinik örneklerden *Candida* izolasyonu ve *Candida* infeksiyonlarının erken tanısı için PZR yöntemi kullanılmaktadır. Geleneksel kültür yöntemlerinde fungal yükün çok az olduğu balgam, BOS ve kan gibi örneklerden dissemine fungal infeksiyon tanısında PZR testi kültür yöntemlerinden daha duyarlı bulunmuştur<sup>25</sup>. Yeni geliştirilen kültüre dayalı lizis-santrifügasyon yöntemi ile yapılan karşılaştırılmalı çalışmalarda, bu yöntemin duyarlılığı %25-75 arasında bulunmuştur<sup>7</sup>. Yapılan çalışmalarda 100 µl kan, idrar, balgam gibi hasta materyalinde  $\pm 10$  maya hücresinin saptanabildiği rapor edilmiştir<sup>7, 8, 9</sup>. PZR temelli tanının geleneksel kan kültür yönteminden daha duyarlı olduğu ve nötropenik hastalarda yapılan bir çalışmada ise %97.5 gibi yüksek negatif prediktif değere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle fungal yükün çok az olduğu, kültür ve serolojik tanının yetersiz olduğu durumlarda PZR yönteminin çok etkin olduğu görülmektedir<sup>60</sup>. Buna göre PZR testi optimal tanı yaklaşımı olabilir, çünkü; 1) halen geçerli olan kültüre dayalı yöntemlerden daha duyarlıdır, 2) bir çok mantar türüne uygulanabilir, 3) çeşitli örneklerde çalışılabilir<sup>25</sup>.

Moleküler yöntemler sadece klinik örnekten mantarı tanımlamak için değil ayrıca tür tayini, ilaç direnci ve epidemiyolojik tiplendirme amacıyla da kullanılmaktadır.

Mantarların epidemiyolojik tiplendirilmeleri için, genomik DNA'nın restriksiyon endonükleaz (RE) ile kesimini takiben Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), DNA'nın doğrudan PFGE ile incelenmesi (elektroforetik karyotiplendirme), southern hibridizasyon analiz, AP-PZR gibi DNA bazlı ve immunoblot finger printing, hücresel proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi, multilokus enzim elektroforezi gibi protein bazlı yöntemler kullanılmaktadır.

## 2.11. TIPLENDİRME YÖNTEMLERİ

Mantar infeksiyonlarının klinik önemi bilinmesine rağmen mantar ile kolonizasyon ve infeksiyonun patogenezi, geçiş şekli ve epidemiyolojisi hakkında bilinenler sınırlıdır. Normal flora üyesi olan *C. albicans* gibi mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanması, etken organizmanın bulaş kaynağının izlenmesinde, kolonizasyon ve infeksiyon ayrımının yapılmasında yetersiz kalır. Bu tür organizmalar için tür düzeyinin de altında tiplendirmeye gereksinim vardır<sup>61</sup>.

Epidemiyolojik çalışmaların yapılış amaçları ve ideal bir epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri aşağıda özetlenmiştir.

### Epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinin başlıca amaçları<sup>61, 62</sup>

- 1- Salgının kaynağının belirlenmesi
- 2- Geçiş yollarının belirlenmesi
- 3- Re-aktivasyonun yeni bulaştan ayırt edilmesi
- 4- Hastane infeksiyonları ve toplumsal kaynaklı infeksiyonların belirlenmesi
- 5- Epidemiyolojik sürveyans ve kontrol yöntemlerinin değerlendirilmesi

### İdeal epidemiyolojik tiplendirme yönteminin özellikleri<sup>61</sup>

- 1- Standardize olmalı
- 2- Doğru ve tekrarlanabilir olmalı
- 3- Stabil olmalı
- 4- Benzer ancak identik olmayan mikroorganizmaların ayrımında yeterli duyarlılığa sahip olmalı
- 5- Uygulanabilir ve ucuz olmalı
- 6- Epidemiyolojik çalışmalarda kanıtlanmış değeri olmalı

*C. albicans* için bu özelliklerin tümünü karşılayan ideal bir tiplendirme yöntemi henüz yoktur. Her yöntemin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Tiplendirme yöntemi izolatları sadece birbirinden ayırabilme özelliğine sahiptir<sup>61</sup>.

*Candida*'ları tiplendirmede kullanılan fenotipik yöntemler; serotiplendirme, morfotiplendirme, resistotiplendirme, biyotiplendirme, öldürücü maya

tiplendirilmesi, hücresel proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi ile analizi, immunoblot finger printing, multilokus enzim elektroforezi'dir. Genotipik yöntemler ise; genomik DNA'nın restriksiyon endonükleaz ile analizi, southern hibridizasyon analizi, pulsed-field jel elektroforez (elektroforetik karyotiplendirme), baz dizi analizi, nükleik asit çoğaltma yöntemleridir<sup>61</sup>.

## **Fenotipik yöntemler:**

### **1. Serotiplendirme:**

*C. albicans* suşlarının tiplendirilmesinde, serotiplendirme yöntemi ilk kez 1931 yılında uygulandığı bilinmektedir. Ancak *C. albicans* ile diğer *Candida* türleri arasında çapraz reaksiyonların görülmesi bu yöntemin en önemli dezavantajı olarak görülmüştür. *C. albicans* suşları serotiplendirme ile önce A ve B serotipinde ayrılmış daha sonra sık görülmeyen C serotipi 1969 yılında bunlara eklenmiştir<sup>63</sup>. Yapılan çalışmalarda A serotipinin flusitozine duyarlı, B serotipinin ise dirençli olduğu görülmüştür. Serotiplendirme yöntemi ayrılabilirlik indeksinin düşük olmasından dolayı *C. albicans* suşlarını tiplendirmek için uygun bir yöntem olarak görülmemiştir<sup>61</sup>.

### **2. Koloni morfolojisi ile tiplendirme:**

*C. albicans*'ın farklı koloni morfolojileri olduğu ilk kez 1935 yılında tanımlanmıştır. *C. albicans*'ın morfolojik olarak tiplendirilmelerinde farklı metodlar kullanılmıştır. İlk çalışmalarda malt ekstrakt agara *C. albicans* suşları çizgi şeklinde ekilmiş ve 15 ayrı morfolojik tip tanımlanmıştır. Daha sonraları bu yöntem geliştirilmiş bir kodlama sistemi uygulanarak, çizgi ekimde koloniler kenar ve çizgi yüzeyi olarak başlıca iki açıdan değerlendirilmeye alınmıştır. Koloni kenarları dağılım, genişlik ve yapı yönünden, koloni yüzeyi ise; topografi, kalite, derinlik-gevşeklik özelliklerine göre değerlendirilmiştir. Bu kodlama sisteminin tekrarlanabilirliğini 2.5 yıl sonra araştıran araştırmacılar %84 aynı



kodlamayı bulmuşlardır. Bu yöntem ile 446 suş 50 farklı morfolojik tipe ayrılmış ve ayrılabilirlik indeksinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Yine aynı kaynakta, yapılan diğer bazı çalışmalarda da yüzey görünümü, rengi ve kenar durumlarına göre tiplendirme yapılabileceği belirtilmiştir<sup>61</sup>. *C. albicans*'ın morfolojileri genellikle değişmediği için, özel alet ve ekipmanın gerekmediği, ucuz ve yönteme göre değişmekle beraber 100'den fazla morfortip ayrımı yapılabilen bu yöntem epidemiyolojik çalışmalar için uygun görülmektedir<sup>64</sup>.

### 3. Rezistotiplendirme:

*C. albicans*'ın rezistotiplendirme ile tiplendirilmesi ilk defa 1979 yılında uygulanmıştır. Yöntemin esası çeşitli inhibitör maddelerin bilinen farklı konsantrasyonlarında hazırlanan katı besiyerlerinde, *C. albicans*'ın üreyip ürememesine göre suş ayrımının yapılmasına dayanır. İnhibitör madde olarak malaşit yeşili, borik asit, setrimit, sodyum arsenat, bakır sülfat, akrilamid, 4-kloro-reserkinol, sodyum selenit, gümüş nitrat, klorheksimit, 5-florositozin, sodyum periyodat gibi kimyasallar farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Bu yöntemin ayırım gücü değişik çalışmalarda farklılık göstermektedir<sup>61, 65</sup>.

### 4. Biyotiplendirme:

Hücre dışı enzim veya karbon kaynaklarının asimilasyonunu esas alan bir yöntemdir<sup>61</sup>. Farklı karbon maddelerinin asimilasyonuna dayanan tiplendirme çalışmalarının sonuçları kullanılan karbon maddelerine göre değişmektedir. Karbon kaynağı içeren ticari kitler kullanılarak yapılan biyotiplendirme çalışmalarında ayrılabilirlik indeksinin düşük olduğu görülmüştür<sup>66</sup>. Enzim değişikliğine göre yapılan biyotiplendirme çalışmalarında valin anil amididaz, sistin anil amididaz, alfa-glukozidaz, N-asetil-beta-glukoz aminidaz gibi enzimlerin kullanılmış ve *C. albicans* A, B, C, D olmak üzere dört değişik serotipe ayrılmıştır. Bu çalışmada ve bu konuyla ilgili yapılan benzer çalışmalarda yöntemin tekrarlanabilirliği yüksek olmasına karşın ayırım gücü zayıf bulunmuştur<sup>61</sup>.

## 5. Öldürücü maya tiplendirilmesi:

Öldürücü mayalar duyarlı mikroorganizmanın hücre duvarına spesifik olarak bağlanarak antimikrobiyal etkili ekzotoksin salgılaya özelliğine sahiptirler.Öldürücü maya tiplendirilmesi *C. albicans* suşlarının tiplendirilmesinde ilk kez Polonelli ve arkadaşları tarafından 1983 yılında tanımlanmıştır. Bu yöntemle 25 farklı tip belirlenmiştir<sup>67</sup>. Öldürücü maya tiplendirmesi çeşitli bakterilerin tiplendirilmesinde de kullanılmaktadır<sup>61</sup>.

## 6. Protein yapılarına göre tiplendirme:

Bir hücrenin protein profilinin elektroforetik polimorfizmi ilk defa 1972 yılında tanımlanmıştır. Bu yöntem maya proteinlerinin poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) sonucu oluşan farklı protein profillerinin gösterilmesine dayanır. Yöntemin ayırım gücü farklı proteinlere karşı oluşturulmuş monoklonal antikolar kullanılarak artırılmaya çalışılmıştır<sup>61</sup>. Daha sonra geliştirilen multilokus enzim profili (izoenzim profili) yöntemi ile her organizma için hücresel enzimlerin elektroforetik protein farklılıkları gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda yöntemin ayırım gücü yeterli bulunmuştur<sup>68</sup>.

## Genotipik yöntemler

### 1. Pulsed Field Jel Elektroforez Sistemi (PFGE)

Yaklaşık bir megabazdan (Mb) daha büyük doğrusal çift iplikli DNA molekülleri geleneksel agaroz jel elektroforezinde görüntülenememektedir. Bunun nedeni jelin por büyüklüğünün doğrudan DNA'nın jelde göç edebilmesi için yeterli olmamasıdır. 1984 yılında maya kromozomlarını ayırt etmek için geliştirilen PFGE yöntemi ile 5 Mb boyutundaki DNA parçaları jel üzerinde görüntülenebilmiştir. Bu yöntemde, DNA molekülleri belirli zaman aralıklarında

birbirine farklı açıda elektiriksel alanların etkisine bırakılır. Büyük DNA molekülleri farklı açılardan gelen elektrik akımının etkisiyle agaroz jel üzerinde çözülerek göç eder<sup>62</sup>.

PFGE'nin türleri yüksek ayırım gücü, tekrarlanabilirlik özelliği ve yorumlama kolaylığı ile bugün moleküler tanı ve epidemiyolojide önemli bir araç olmuştur. Bu yöntemle DNA'nın elektroforetik karyotiplendirmesi, restriksiyon analizi, ribotiplendirme yapılabilmektedir<sup>69</sup>. Bununla birlikte PFGE yönteminin kültürü yapılabilen organizmalara uygulanabildiği, yöntemin oldukça uzun sürdüğü (yaklaşık 4-5 gün) ve pahalı özel araçlara ihtiyaç duyulan bir uygulama olduğu unutulmamalıdır.

## 2. PFGE-Elektroforetik karyotip analizi

*C. albicans*'ın eşeyli siklusunun bulunmaması genetik araştırmaların sınırlı kalmasına neden olmuştur. Kromozom büyüklüğündeki DNA molekülünün genetik ayırımının (elektroforetik karyotiplendirme) PFGE yöntemi ile gösterilmesi ilk kez 1984 yılında Schwartz ve Cantor tarafından gerçekleştirilmiştir<sup>61</sup>. Elektroforetik karyotiplendirme metodu suş ayırımı için yeterli çeşitlilik gösterir.

## 3. Restriksiyon Enzim Analizi (Restriction Fragment Length Polymorphism) (RFLP)

Bir veya daha fazla restriksiyon enzimi ile çift iplikli genomik DNA'nın kesildikten sonra agaroz jel elektroforezinde kesilen parçaların ayrıştırılması ve jelde görülen bant paternlerinin karşılaştırılması temeline dayanır<sup>69</sup>. Bu yöntemde, sıvı veya katı besiyerinde üretilen mikroorganizmalar, düşük erime ısıyla agaroz karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir. Agaroz içine karıştırılan maya hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak (in situ-lysis) DNA izolasyonu yapılır. PFGE için genomik DNA tüm olarak gerekli olduğundan, DNA'da kırılmalara yol açan geleneksel DNA izolasyonu bu yöntem için uygun değildir. Agaroz içindeki maya DNA'sı nispeten az sayıda ve

büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi ile kesime uğrattılır. Daha sonra bu DNA kalıpları agaroz jel içerisinde PFGE sistemi ile elektroforeze tabi tutulur. PFGE sistemi ile uygulanan elektrik akımı ile 10-800 kilobazlık DNA parçaları net olarak ayırt edilmesine imkan sağlamaktadır<sup>62</sup>. Bu yöntemin ayırım gücü kullanılan restriksiyon enzimine bağlıdır<sup>70</sup>.

## **Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri:**

### **1. Restriction Fragment Length Polymorphism (PZR-RFLP):**

Restriksiyon enzimleri (RE), özgül olarak DNA'yı belirli bölgelerden keserek genellikle 1000-20.000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir. PZR-RFLP için sıklıkla kullanılan enzimler arasında *SfiI*, *SmaI*, *ApaI*, *Hind III* sayılabilir. PZR-RFLP ile önce özel bir genomik bölge amplifiye edilir. Daha sonra amplifiye edilen bu bölge restriksiyon enzimleri ile kesilir ve agaroz jelde geleneksel elektroforeze tabi tutulur. Bu yöntemle alt-tiplendirme daha kısa sürede ve yüksek güvenilirlikte yapılabilmektedir<sup>71</sup>.

### **2. Arbitrarily Primed PZR (AP-PZR) Analizi:**

“Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) olarak da bilinen bu yöntemin temel prensibi, hedef bölge olmaksızın rastgele seçilmiş kısa primerler kullanılarak genomik DNA'daki benzer bölgelerin amplifikasyonunun sağlanmasıdır. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki (baz çifti) bantların oluşmasına neden olur. Kullanılan primerler genellikle 9-10 bazlık, kısa primerlerdir ve G-C'ce zengindir. primerlerin bağlanma ısıları düşürülerek (40-50°C) hem kendilerine özgü bölgelere, hem de özgül olmayan bölgelere bağlanmaları sağlanmaktadır. Aynı tür içindeki farklı suşlarda bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları değişik olacağından, agaroz jel

elektroforezinde amplifiye edilen parçaların sayısı ve büyüklüğü de farklılık gösterecektir. Çoğalan ürünleri görüntülenmesi ile türe özgü “finger print”ler oluşur. Bu yöntem *Candida*’ların tiplendirilmesi için ilk defa 1992 yılında kullanılmıştır. Uygulama kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilmesi yöntemin avantajıdır. En önemli dezavantajı hanüz standardizasyonun sağlanamamış olması ve tekrarlanabilirliğinin düşük olmasıdır<sup>69, 71</sup>.

## 2. 12. ANTİFUNGALLER

Yirminci yüzyılın başında mantar infeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilecek uygun antifungaller bulunmamaktaydı. 1951 yılında bulunan polien bir antibiyotik olan nistatin oral ve topikal, 1956’da bulunan diğer bir polien antibiyotik olan Amfoterisin B (AMB) sistemik tedavide kullanılmaya başlanmıştır. 1957’de sitostatik madde olarak sentezlenen flusitozin tek başına kullanıldığında direnç gelişimine sebep olduğundan AMB ile birlikte kullanılmaya başlandı. 1958’de griseofulvin yüzeysel mikozların oral tedavisinde etkili bulundu.

1960’lı yıllardan itibaren antifungal etkili azol türevleri, sırasıyla benzimidazol, klotrimazol, mikonazol, ekonazol, ketokonazol, flukonazol ve itrakonazol kullanıma sunuldu<sup>72</sup>.

Son yıllarda yeni geliştirilen antifungaller iki grup içinde yer almıştır. Bunlar, azol bileşikleri olan vorikonazol, posakonazol, ravukonazol, albakonazol, isovukonazol ve ekinokandinler içinde yer alan kaspofungin, mikafungin ve anidulafungindir<sup>73</sup>.

Antifungal ilaçların geliştirilmesinin temelinde iki önemli strateji bulunmaktadır. Bunlardan biri kullanılan antifungallerin daha geniş spektrumlu ve daha düşük toksisiteye sahip olan türevlerinin geliştirilmesi, diğeri ise memeli hücrelerine zarar vermeden seçici toksisite sağlayacak hedeflerin bulunmasıdır. Mantarların da ökaryotik hücre yapısına sahip olması seçici toksisitenin sağlanmasını zorlaştırmaktadır<sup>66, 74, 75</sup>.

1950’li yılların sonlarına doğru kullanıma giren AMB uzun yıllar boyunca sistemik mantar infeksiyonlarının tedavisinde tek seçenek olmuştur. Mantar hücre duvarında bulunan ergosterolle bağlanıp duvar geçirgenliğini bozarak

etkisini gösterir<sup>66</sup>. Ancak yol açtığı şiddetli nefrotoksisite kullanımını kısıtlamaktadır<sup>74</sup>.

Antifungal ilaçlar toksik etkilerini, mantar hücresinin zarına, duvarına, sitoplazmasına, mikrotübüler proteinlerine bağlanarak gösterirler. Bu etki “fungostatik” (üremeyi durdurucu) veya “fungusit” (öldürücü) olabilir.

Azoller lanosterolün ergosterole dönüşümünde gerekli enzim olan sitokrom P-450 enzimine bağımlı C-14 alfa demetilaz enzimini inhibe ederek etkisini gösterir<sup>72</sup>.

Ergosterol fungal plazma membranında bulunan başlıca steroldür. Başta hücre zarının akışkanlığı, bütünlüğü, kitin sentezi gibi zarında bulunan enzimlerin fonksiyonunun düzenlenmesi gibi hücresel olaylarda önemlidir. Bir nükleozit analogu olan flusitozin dışındaki antifungal ilaçlar, ya AMB gibi hücre zarındaki ergosterole bağlanarak veya azoller gibi ergosterol biyosentezinin çeşitli basamaklarını inhibe ederek etkilerini gösterirler<sup>72</sup>.

Antibakteriyellere göre, antifungal ajanlara direnç mekanizmaları konusundaki bilgilerimiz oldukça sınırlıdır. Bunun önemli nedenlerinden biri son otuz yıla kadar sistemik tedavi gerektirecek mantar infeksiyonlarının oldukça nadir görülmesi, bu amaçla yalnızca AMB kullanılması ve en önemlisi fungal etkenlerin yakın zamana kadar önemli patojenlerden kabul edilmemesidir<sup>76</sup>. Örneğin 1950-1970 yılları arasında kandidoza bağlı ölüm hızı sabit kalmış bunun yanında 1970’li yıllardan sonra hasta yaşamını uzatmaya yönelik gelişen tıbbi uygulamalara bağlı olarak bu infeksiyonun görülme sıklığını da artırmıştır. Fungal infeksiyonlardaki bu artış antifungallere karşı direnç gelişimine ve bunların yol açtığı toksik etkilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bunun sonucunda fungal infeksiyonlara karşı etkili ve güvenli yeni ajanların araştırılması ivme kazanmıştır<sup>66</sup>.

1980’lerin sonları ve 1990’ların başlarında daha etkin ve daha düşük toksisitesi olan imidazol ve triazol grubu ilaçlar, lokal ve sistemik fungal infeksiyonların tedavisinde kullanıma girmiştir<sup>74</sup>.

## Antifungal Direnç

Antifungal direnç mekanizmasını anlamak için in vitro dirençli suşları belirlemek gerekir. Dirençli suşların doğru olarak belirlenebilmesi için in vivo hayvan deneyleri ve serum ilaç konsantrasyonları ile klinik sonucu bilinen suşlarla yapılan çalışmaları gerektirir<sup>76</sup>. Derin mikozlardaki artış ve bununla beraber antifungallerin yaygın kullanılması sonucunda bu ilaçlara direnç geliştiği, direncin altında yatan nedenlerin araştırılması ve direncin yayılmasını önleyecek yöntemler geliştirilmesine olanak sağlamıştır<sup>74</sup>.

Mantarlar için standart antifungal duyarlılık testlerinin geliştirilmesi amacıyla 1982 yılında NCCLS tarafından ilk çalışmalar başlatılmıştır<sup>77</sup>. 1996 yılında alt komite tarafından antifungal ilaçlar için uygulanması önerilen değişiklikleri içeren mayalar için refere yöntemleri kapsayan NCCLS M27-A belgeseli hazırlanmıştır. Küf mantarları için ise NCCLS M38-P refere edilen yöntemdir<sup>76</sup>. Yapılan çok merkezli ve kapsamlı çalışmalar sonucunda 1997 yılında NCCLS tarafından maya mantarları için standart mikrodilüsyon duyarlılık yöntemi önerilmiştir<sup>77</sup>.

Antifungal ilaçlara yanıtta birçok faktör önemlidir; bunlar başlıca klinik faktörler, mantar hücresi ile ilgili faktörler ve moleküler faktörlerdir. Klinik faktörler; hastanın bağışıklık durumu, ilacın farmakolojik yapısı veya mikozun tipi ve derecesi ile ilgili, mantar hücresi ile ilgili faktörler; direnç genlerinin doğal dirençli türlerin gen ekspresyonu yoluyla duyarlı kökenlere aktarılması sonucu dirençli fenotipler ortaya çıkması, moleküler faktörler; sitoplazma zarının engelleyici işlevinin bozulması, makromolekül sentezinin baskılanması, ergosterol sentezinin baskılanması veya mikrotübüller ile etkileşim biçimindedir<sup>66, 78</sup>.

*Candida* izolatlarında AMB direnci oldukça nadirdir. AMB tedavisine klinik olarak yanıtızsızlık varsa bunun nedeni daha çok konağın bağışıklık sistemi ile ilgili faktörlerin düzelmemesinden kaynaklanır. Kesin direnç sınırları belirlenmemiş olsa da *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *Trichosporon beigeli*, *C. pseudohaemulonii* ve *C. parapsilosis* suşları AMB'ye karşı azalmış duyarlılık göstermektedir<sup>24, 77, 79, 80, 81</sup>.

Amfoterisin B'nin aksine, *Candida* suşları için flukanazol MIC değerleri geniş bir aralıkta yer almakta ve dirençli ve duyarlı suşlar daha kolay

ayırılabilir. *C.krusei* ve *C. glabrata* flukanazole karşı doğal direnç göstermektedir<sup>82</sup>. Antifungal direnç primer ve sekonder olarak ayrılabilir. *C. lusitaniae* ve *Pseudoallescheria boydii* kökenleri AMB'ye, Mucorales'de yer alan mantarlar flukonazol'e doğal direnç gösterirler. *C. krusei* için elde edilen MIC değerlerinin yorumlanmasında MIC değeri ne olursa olsun *C. krusei* suşları flukanazole dirençli kabul edilir. Buna "primer direnç" denir. Bazı durumlarda antifungal maddeye başlangıçta duyarlı olan mantarların daha sonra duyarlılıklarında azalma ortaya çıkabilir veya antifungale karşı direnç gelişebilir. Buna da "sekonder direnç" denir. Flukanazole karşı kazanılmış direnç *C. albicans* başta olmak üzere birçok *Candida* türünde gösterilmiştir. Özellikle HIV (+) hastalardaki orofaringeal kandidozlar kazanılmış direnç oluşturmaktadırlar<sup>76, 83, 84</sup>. Edinilmiş direnç klinik tedavi ve infeksiyonun seyri açısından çok daha önemlidir. Klinik başarıyı doğrudan etkileyen bir unsurdur. Azollere karşı dirençte birkaç mekanizma rol almaktadır. Bunlarda biri, ilacın aktif pompa ile dışarı atılması böylece fonksiyonunu kaybetmesi, daha çok görülen diğer bir mekanizma 14- $\alpha$ -sterol demetilaz enziminde mutasyon olmasıdır. Mutasyon sonucunda ilaç enzime bağlanamamakta ve etkisiz kalmaktadır. Diğer bir mekanizma da enzimin aşırı sentezlenmesi ve ilacın etkisiz kalmasıdır<sup>76</sup>. Bazı mantarlar antifungal maddenin etkisine "tolerans" adını alan başka bir direnç şekli gösterirler. Kısaca fungusid özellikteki antifungal fungistatik özellik taşıyor hale geçer. Dolayısıyla bazı mantarlar bu ilacın etkisini fungistatik olduğu noktaya kadar tolere ederler<sup>7, 77, 78</sup>.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

#### 3. 1. HASTALAR

Nötropenik ateşi olan, ateş etyolojisi araştırılan, kemoterapi tedavisi görüp nüksle gelen, yoğun bakım ünitelerinde yatan ve uzun süre hastanede kalan kandidemi için riskli grup oluşturan hastalar;

1. Grup: periferik kan kültürlerinde üreme saptanan 71 hasta,
2. Grup: kan kültürü BACTEC otomatik kan kültür sistemi ile pozitif sinyal verdiği halde üreme olmayan 12 hasta değerlendirmeye alındı.

#### 3. 2. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

##### Kullanılan Cihazlar

- BACTEC 9120 otomatik kan kültür sistemi (Becton Dickinson)
- mini API bakteri otomasyon sistemi (bioMerieux, France)
- PZR cihazı (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler)
- Güvenlik kabini (II. Seviye, Nuare Biological Safety Cabinets)
- Elektroforez Güç kaynağı (Biometra, P30)
- Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
- Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich, Mikro 200 R)
- Mikrodalga Fırın (Beko, MD 1500)
- Derin Dondurucu (Uğur)
- Etüv (Memmert)

- Otoklav (Nüve, OT 020)
- Hassas Terazî (Scaltec)
- Buzdolabı (Ariston, ev tipi)
- Vorteks (NM-110)
- Yatay çalkalayıcı (IKA, Werke Typ VX2)
- Su banyosu (Nüve, BM 402)
- Distile su cihazı (Nüve, NS 108)
- Elektrik ocağı (Beko, 0.710)
- Mikropipet Seti (Gilson, PİPETMAN-P10, Biohit Proline P100-P1000)
- EDTA'lı 2ml'lik kapaklı steril cam tüp
- 10 ml'lik kapaklı steril düz cam tüp

### **Kullanılan Besiyerleri ve Ticari Kitler**

- BACTEC Plus+Aerobik/F, (Becton Dickinson)
- BACTEC Peds Plus/F, (Becton Dickinson)
- API 20 C AUX, (bioMérieux)
- ATB ID 32 C, (bioMérieux)
- %5 koyun kanlı Columbia agar, (Merck)
- Eozin metilen blue (EMB) agar, (Merck)
- Çikolata agar, (Merck)
- CHROMagar Candida agar, (BBL, Becton Dickinson)
- Saburaud dekstroz agar (SDA), (Merck)

### **Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- Tris-Hidroklorid (Sigma, T-5941, Lot 31 K5466)
- Etilen diamin tetra asetik asit disodyum salt dihydrate (EDTA) (Sigma, E5134)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck, L51736210)
- Magnezyum klorid (MgCl<sub>2</sub>) (Promega, A351H)
- Sodyum klorid (NaCl<sub>2</sub>) (Riedel-de Haën, Lot 33000/ 13423)

- Agaroz (Sigma, A-5093)
  - Taq DNA Polimeraz (Promega, M1245)
  - 10X PZR Buffer (Mg free) (Promega, M190G)
  - Etanol absolut (Riedel de Haän/ Lot 32221)
  - İsopropil alkol (Merck, K-32883695 405)
  - $\beta$ - merkaptoetanol (Sigma, 024K0117)
  - Lyticase (Sigma, L4276)
  - Proteinaz K (Sigma P2308 lot 065 K8603)
  - Potasyum asetat (Sigma K1190)
  - dNTP Mix (Sigma, Deoxynucleotide set DNTP-100)
  - Distile su
  - 100 bç Marker (Msp I Sigma D-4797)
  - 100 bç Marker (Hae III, Fermentas MBI)
  - DNase, RNase Free Su
  - Brom fenol mavisi
  - Etidyum bromid
  - Primerler (Ella Biotech GmbH)
- ITS-1: TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
- ITS-4: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

### 3. 3. ÇALIŞMA YÖNTEMİ

#### Kan kültürü

Çalışma kapsamındaki tüm hastalar kan kültürü istenen hastalardan seçilmiş olup bu hastaların periferik kan örnekleri, yetişkinlerde BACTEC Plus+Aerobik/F, çocuklarda BACTEC Peds Plus/F kan kültür şişelerine doğrudan inoküle edildi ve BACTEC 9120 otomatik kan kültür sisteminde bir hafta süre (7X24 saat) ile takip edildi. Pozitif sinyal veren şişelerin üreme zamanları not edildi, Gram boyamaları yapıldı.

## Kan örneklerinin toplanması

1. grup: Gram boyama sonucu maya hücreleri görülen hastalardan, 2 ml'lik EDTA'lı tüplere periferik kan örnekleri alınarak -20°C'de saklamaya alındı.

2. grup: Gram boyama sonucu mikroorganizma görülmeyen hastaların BACTEC şişelerinden 2 ml kan alınarak -20°C'de saklamaya alındı.

## Kültür ve suşların identifikasyonu

Pozitif sinyal veren şişelerin Gram boyama ile maya hücresi görülenlerinden %5 koyun kanlı Columbia agar, EMB agar, çikolata agar, CHROMagar Candida ve antibiyotiksiz SDA'ya kültürleri yapıldı. 37°C'de 24–48 saat süreyle inkübe edildi.

Pozitif sinyal verdiği halde kültürde üreme olmayan kan örneklerinden 48 saat sonra tekrar ekim yapıldı.

Üreyen maya kolonileri konvansiyonel yöntemlerle ve hazır ticari kitler kullanılarak tür düzeyinde tanımlandı:

a. Maya kolonilerinin 0.5 McFarland salindeki süspansiyonlarından bir öze dolusu insan serumuna inoküle edilerek 2 saat süreyle 37°C'de inkübasyonu süresinde “çimlenme borusu” varlığı takip edildi.

b. Maya kolonilerinden mısırunu-Tween 80 agara çizgi ekimi yapılarak oda ısısında 48–72 saat inkübasyonu süresinde “klamidospor” varlığı takip edildi, hif ve blastokonidyumların yapıları incelendi.

c. CHROMagar Candida besiyerinde üreyen maya kolonilerindeki renk değişikliği incelendi. Yeşil renkli koloniler *C. albicans*, çelik mavi renkli koloniler *C. tropicalis*, kuru, tüylümsü ve pembe renki koloniler *C. krusei*, süt beyaz renkli koloniler *C. parapsilosis* olarak değerlendirildi.

d. SDA besiyerinde üreyen maya koloni görüntüleri tanıya yardımcı olması açısından incelendi.

e. Yukardaki yöntemlerle (a, b, c ve d) sonuç alamadığımız durumlarda API 20C AUX veya ATB ID 32C hazır ticari kitler kullanıldı. Mini API cihazı ve bilgi işlem menüsündeki mikroorganizma tanımlama bölümünden yararlanıldı.

## Polimeraz zincir reaksiyonu

Mantar DNA'sı elde etmek amacıyla hastalardan toplanan kan örneklerine uygulandı.

### a. Primerlerin Seçimi:

Tüm mantarlara özgü ITS-1 ve ITS-4 primerleri seçildi:

ITS-1: TCC GTA GGT GAA CCT GCG G

ITS-4: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

### b. Gerekli çözeltilerin hazırlanması:

#### - Eritrosit parçalama stok tamponu (ELB):

- 10 mM Tris 0,604 gr
- 5 mM MgCl<sub>2</sub> 2,380 gr
- 10 mM NaCl<sub>2</sub> 0,292 gr

Tartılan kimyasal maddeler 500 ml distile su ile eritildi. +4°C'de koyu renkli şişelerde muhafaza edildi.

#### - Lökosit parçalama stok tamponu (LLB):

- 10 mM Tris 604 gr
- 10 mM EDTA 1,60 gr
- 50 mM NaCl<sub>2</sub> 1,440 gr
- %0,2 SDS 1,0 ml
- 200 µg/ ml proteinaz K

Tartılan kimyasal maddeler 500 ml distile su ile eritildi. +4°C'de koyu renkli şişelerde stok olarak muhafaza edildi. Proteinaz K kullanım sırasında taze olarak eklendi.

- **Sferoblast parçalayıcı stok tampon:**

- 50 mM Tris 3,02 gr
- 1 mM EDTA 0,18 gr
- %0,2 β- merkaptoetanol 1 ml
- Litikaz (Lyticase) 100 µl'de 2 U

Tartılan kimyasal maddeler 500 ml distile su ile eritildi. +4°C'de koyu renkli şişelerde muhafaza edildi. Kullanım sırasında stok tamponun 500 µl'sine 100 µl'de 2 U/ bulunacak şekilde litikaz eklendi.

- **%10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS)**

- SDS 10 mg

Tartılan kimyasal maddeler 90 ml distile su ile eritildi. İyice çalkalandı.

- **5 M Potasyum asetat**

- **İsopropil alkol (İPA)**

- **%70'lik Etil alkol**

- %98'lik Etil alkol 70 ml

Ölçülen etil alkol 30 ml distile su ile karıştırıldı.

- **Elektroforez yürütme tamponu (Tris-Borate-EDTA) (1XTBE)**

- Tris base 108 gr
- Borik asit 55 gr
- Na<sub>4</sub>EDTA 9.3 gr

Tartılan maddeler 1lt suya pH 8.3 olarak ayarlanarak tamamlandı. 10X TBE tampon stok solüsyonundan distile su ile seyreltilerek hazırlanmış olan 1X TBE tamponu elektroforez yürütme tamponu olarak elektroforez tankına konularak kullanıldı.

## - Etidyum bromid

## - %1,5 Agarose Jel Solüsyonu

30 ml 1X TBE tampon içerisine 0,45 gr agaroz mikrodalga fırında eritildikten sonra 0,3 µl etidyum bromid ilave edildi.

## c. DNA ekstraksiyonu

DNA eldesi için van Burik ve ark<sup>85</sup> ile Einsele ve ark<sup>86</sup>'nın kullandıkları yöntemler üzerinde Kalkancı ve ark<sup>87</sup>'nin yaptığı değişikliklerle oluşturdukları yöntem kullanılmıştır:

Eksi 20°C'de EDTA'lı tüp içerisinde saklanan kanlar +4°C'ye alınarak bir gece bekletildi. Daha sonra 37°C'de 2 saat bekletildi. Her bir EDTA'lı tüp içerisindeki kan örneklerinden 10 ml'lik düz tüpe 1,5 ml. si aktarılıp üzerine 1:3 oranında ELB eklendi. Yatay çalkalayıcıda oda ısısında 2500–3000 devirde 10 dakika çalkalandı. 6000 rpmX15 dakika santrifüj edildi. Üst kısım döküldü. Çökeltiye 1000 µl LLB ve 200 µg/ ml proteinaz K eklendi. 65°C'de 2 saat etüvde bekletildi. 10000 rpmX5 dakika santrifüj edildi. Üst kısım atıldı. Mantar hücre duvarı çökeltiye 100 µl'sinde 2 U/litikaz bulunan parçalama taponundan 500 µl eklenerek parçalandı. 37°C'lik etüvde 90 dakika bekletildikten sonra her bir örnek 2'şer dakika vortekslendi. Oluşan sferoblastlar üzerine 50 µl %10'luk SDS'den eklenerek hücre çekirdeklerinin parçalanması sağlandı. Vortekslenerek 60°C'lik benmaride 20 dakika ve kaynayan su içerisinde 5 dakika bekletildi. Protein çöktürülmesi için 200 µl 5 M potasyum asetat eklenip, karışım buzda 25 dakika bekletildi. 13000 rpmX10 dakika santrifüjlendi. Üst kısım yeni tüpe alındı. Nükleik asitlerin çöktürülmesi için 600 µl İPA eklenerek vortekslendi. 30°C'de 30 dakika bekletildi. 13000 rpmX30 dakika 4°C'de santrifüjlendi. Üst kısım döküldü. Yıkanmaları için 600 µl %70'lik etil alkol kullanıldı. 13000 rpmX15 dakika santrifüjlenerek üst kısımdaki alkol tamamen boşaltıldı. DNA pelletleri oda ısısında kurutulduktan sonra, 30 µl distile su ile sulandırıldı.

**d. PZR reaksiyon karışımı:**

	<b>Son konsantrasyon</b>	<b>Son hacim</b>
H <sub>2</sub> O	1X	16.4 µl
10X tampon	1X	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> ( 25 mM)	2 mM	2 µl
dNTP ( 10 mM)	30 µM	0.3 µl
ITS-1(100 µM)	1.2 µM	0.3 µl
ITS-4 (100 µM)	1.2 µM	0.3 µl
Taq ( 5U/µl)	0.04 U/µl	0.2 µl
DNA		3 µl
<b>Toplam Hacim</b>		<b>25 µl</b>

**e. Amplifikasyon programı:**

<b>Reaksiyon aşaması</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>	<b>Döngü Sayısı</b>
Ön ısıtma (Başlangıç denatürasyonu)	94°C	5 dakika	1
Denatürasyon	94°C	20 saniye	40
Primer bağlanması	58°C	45 saniye	40
Zincir uzama	72°C	90 saniye	40
Son uzama	72°C	7 dakika	1
Muhafaza	4°C	∞	∞



**f. Agarose jel elektroforez:**

Amplifikasyonla elde edilen PZR ürünün 8 µl'sine 3/4 oranında brom fenol mavisi eklendi. %1,5'lik etidyum bromid ile boyanan agaroz jel içindeki kuyucuklara yerleştirilerek 1X TBE tampon ile doldurulmuş tank içinde 80 V'ta 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu.

**g. Sonuçların gözlenmesi:**

Elektroforez işlemi sonunda elde edilen bantlar Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France) kullanılarak UV ışığı altında görüntülenip fotoğrafları çekildi.

## 4. BULGULAR

### 4. 1. HASTA VE *CANDIDA* İZOLATLARI

Yaş ortalaması 49.31 olan hastaların (en küçüğü 2 aylık, en büyüğü 86 yaşında) 46'sını (%55,4) erkekler, 37'sini (%44,6) kadınlar oluşturdu.

83 hastanın 42'si çeşitli kliniklerin yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ); 15'i reanimasyon, 6'sı genel cerrahi, 6'sı iç hastalıkları, 4'ü beyin cerrahi, 4'ü nöroloji, 4'ü plastik ve rekonstrüktif cerrahi, 1'i göğüs hastalıkları, 1'i üroloji, 1'i kardiyovasküler cerrahi servisinde, kalan 41 hastanın 10'u hematoloji, 8'i onkoloji, 4'ü genel cerrahi, 4'ü pediatri, 2'si pediatrik onkoloji 2'si beyin cerrahisi, 2'si iç hastalıkları, 2'si kardiyovasküler cerrahi, 2'si üroloji, 1'i dermatoloji, 1'i göğüs hastalıkları, 1'i plastik ve rekonstrüktif cerrahi servisinde yatan hastalardı. Bunların 25'inde (%30) malignite tablosu hakimdi.

Kan kültürleri en erken 12 saatte, en geç 88 saatte pozitif sinyal (ort. 36 saat) verdi. Pozitif sinyalle otomatize sistemden çıkarılan kan kültür şişelerinden yapılan Gram boyaması sonucunda 83 hastanın 71'inde maya hücreleri görüldü.

Pozitif şişelerden %5 koyun kanlı Columbia agar, EMB agar, çikolata agar, CHROMagar Candida ve SDA besiyerine ekim yapılan kültürlerde maya kolonileri 24–72 saatte üreme gösterdi.

Birinci grup hastaların kan kültürlerinin konvansiyonel yöntemlerle yapılan tiplendirmesinde 54 (%72) *C. parapsilosis*, 11 (%14.7) *C. albicans*, 4 (%5,3) *C. tropicalis*, 3 (%4) *C. glabrata* ve birer *Geotricum capitatum* (%1,3), *C. lipolytica* (%1,3) ve *C. guilliermondii* (%1,3) izole edildi.

Pozitif sinyal verdiği halde kültürde üreme olmayan kan örneklerinden 48 saat sonra tekrar ekim yapıldı, fakat ikinci yapılan ekimlerde de üreme olmadı.

Kültüründe maya üremesi olan 71 hastaya ait 29 (%38.6) kan örneğinde ve kültürde üremesi olmayan 12 hastanın 2 tanesinde (%16.6) mantar DNA'sı pozitif bulundu.

Tüm hastalara antibiyotik tedavisi, birinci grup hastaların 38'ine (%53,5) antifungal tedavisi uygulanmıştır. Bu hastaların 12'sinden antifungal tedavi almadan önce kan alınmış olup, bunların sadece 4'ünde PZR pozitif bulundu. 9 hastadan antifungal tedaviye başlandığı gün kan alındı ve bunların 3 tanesinde PZR pozitif bulundu. Pozitif bulunan bu hastalardan birinde 6. gün alınan 2. kan örneğinde pozitiflik devam etmiştir. Bu hasta ile beraber 18 hastadan en kısıası 2 günlük antifungal kullanımı sonrası olmakla birlikte aralıklarla 50 günlük antifungal kullanımı sonrası kan alınan hasta olmuştur. Bu hastaların 5'inde PZR pozitif bulundu. Bu 5 hastanın 3'ünde en fazla 6 günlük antifungal kullanımı sonrası PZR pozitifliği bulunmuştur. Diğer iki hastanın birinde 19 günlük flukanazol kullanımı, diğerinde 10 günlük AMB kullanımı mevcuttu.

İkinci grup hastalardan PZR için periferik kan örnekleri toplanmamıştır. Bu hastaların 4'üne antifungal tedavisi uygulanmıştır. Antifungal kullanımının 2. gününde kan kültürü pozitif olan hastanın PZR'si pozitif bulunmuştur. Diğer PZR'si pozitif bulunan hastaların antifungal kullanım öyküsü yoktur.

Hastaların 4'ünden farklı zamanlarda 2 kan örneği alındı. Bu hastaların ilkinden (Tablo 1, H50) antifungal kullanımının ilk ve 6. günleri alınan kan örneklerinde PZR pozitif bulundu. Antifungal kullanımı olmayan diğer bir hastadan (Tablo 1 ve 2, H52) 10 gün arayla alınan iki kan örneğinin PZR'si pozitif bulundu. Tablo 2, H33 no'lu hastadan antifungal kullanımının 9. ve 22. gününde alınan kan örneklerinin PZR sonuçları negatif bulundu. Sonuncusundan (Tablo 1 ve 2, H65) antifungal kullanımının 2. gününde alınan kan örneğinin PZR'si pozitif bulunurken, 15. gününde alınan kan örneğinin PZR'si negatif bulundu.

Risk grubunda yer aldığı için periferik kan kültürü ile beraber PZR için kan örneği aldığımız bir hastanın hem kan kültürü hem PZR sonucu negatif bulundu (Tablo 2 devam'da H70).

Birinci grup içinde antifungal tedavi almayan 33 hastanın 16'sının PZR sonucu pozitif bulundu. Bunların 13'ünden *C. parapsilosis* izole edildi.

Hastaların hepsine invaziv girişim uygulanmış olup, 1. grup hastalardan 14 hasta, 2. grup hastalardan 2 hasta olmak üzere toplam 16 hasta mekanik ventilatöre bağlanmıştır. 2. hasta grubunda PZR pozitif bulunan 2 hastanın mekanik ventilatöre bağlanma öyküsü bulunmamaktadır.

Tüm hastaların hastanede kalış süreleri 6 gün ile 6 ay arasında değişmek olup, hastaların 45'i (%54,2) iyileşme ile sonuçlanmıştır. İyileşme ile sonuçlanan hastaların 38'i (%84,4) PZR ile DNA tespit etmediğimiz hastalardan oluşmuştur.

**Tablo 1. Kan kültürü pozitif, PZR pozitif hastaların özellikleri**

Hasta	Kültür	Klinik	Cins/ Yaş (yıl)	Yatış süresi (gün)	BACTEC* pozitifliği	Klinik gidiş	Örnek ** toplama	Antifungal/ süre***	Tanı	Jel no
H1	Ctrop	PRC YBÜ	K/15	107	60.	tab	2.	AB/6	Trafik kazası	1
H2	Ctrop	BC YBÜ	E/42	38	27.	tab	8.		Subaraknoid kanama	2
H16	Cpara	Ort	K/71	121	27.	ex	-2		Aort yetm.,Trafik kazası	3
H25	Calb	ÜroYBÜ	E/50	30	19.	ex	0.		Mesane Tm	4
H27	Cpara	BC YBÜ	E/71	38	26.	ex	6.	F/4	Subaraknoid kanama	5
H28	Calb	Hemato	K/30	57	36.	tab	0.	F7-19AB/3	AML	6
H32	Cpara	Rea	E/38	10	4.	ex	4.		Aort anevrizması	7
H34	Cpara	İH YBÜ	K/7	33	17.	ex	2.	AB/1,F/4	Pankreas yaralanması	8
H36	Cpara	Hemato	E/64	51	44.	tab	4.		NHL	9
H38	Gcap	Hemato	K/39	32	28.	ex	3.,0.		AML	10
H41	Calb	GH YBÜ	E/69	57	13.	tab	4.	AB/-2	SVH	11
H43	Cpara	Onko	K/64	25	11.	ex	3.		Rektum selim Ca	12
H44	Cpara	Nöro YBÜ	E/70	50	11.	tab	2.		SVH	13
H45	Cpara	Onko	E/52	27	17.	tab	3.	AB/-1	Larinks Ca	14
H49	Ctrop	Hemato	E/81	28	23.	ex	1.		MDS, AML	15
H50	Cpara	Rea	E/21	34	15.	ex	3.	AB/0	Trafik kazası	16
H50	Cpara	Rea	E/21	34	15.	ex	9.	AB/-6	Trafik kazası	17
H52	Cpara	Rea	K/56	41	13.	ex	4.		Addison krizi	18
H52	Cpara	Rea	K/56	41	13.	ex	14.		Addison krizi	19
H55	Cpara	Rea	E/55	42	10.	ex	2.		Özofagus Ca	20
H57	Cpara	Nöro YBÜ	K/80	18	11.	ex	1.	AB/0	Subaraknoid kanama	21
H59	Cpara	GC YBÜ	E/56	28	13.	ex	2.	AB/5	Pankreas başı Ca	22
H60	Cpara	GC YBÜ	E/59	26	3.	tab	3.		İnce barsak Tm	23
H61	Cpara	PRC YBÜ	K/54	35	7.	tab	3.		Yüzde malign Ca	24
H62	Cpara	İH YBÜ	K/64	17	11.	ex	1.	AB/0	Akut böbrek yetmezliği	25
H65	Cpara	Rea	K/82	40	32.	tab	3.	AB/-2	Meningiom	27
H68	Cpara	Rea	E/66	67	60.	tab	0.		Akciğer Ca	28
H69	Cpara	Rea	K/59	26	16.	ex	0.		Enfekte diabetik ayak	29
H71	Cpara	Rea	E/62	35	26.	ex	4.		Kolon Ca	29

**Tablo 2.** Kan kültürü pozitif, PZR negatif hastaların özellikleri

Hasta	Kültür	Klinik	Cins/ Yaş (yıl)	Yatış süresi (gün)	BACTEC* pozitifliği	Klinik gidiş	Örnek ** toplama	Antifungal/ süre***	Tanı
H3	Ctrop	Ped onko	E/4	55	6.	tab	1.	F/0-AB/4	ALL
H4	Cpara	PRC	E/51	186	11.	tab	4.		Sakral kordoma
H5	Cglab	Onko	K/56	57	41.	tab	6.	AB/16	Orofarinks Ca
H6	Calb	Ped	E/1	51	45.	tab	6.	F/1	Kalp yetmezliği
H7	Cpara	Ped	E/2ay	6	1.	tab	4.		Bronşiolit
H8	Calb	GC YBÜ	E/73	46	37.	tab	3.		Özofagus Ca
H9	Cpara	Onko	E/49	30	13.	tab	4.	AB/0	Özofagus Ca
H10	Calb	Onko	K/35	48	31.	tab	4.		Karsinomatozis peritonei
H11	Cpara	İH YBÜ	E/61	44	15.	tab	-1		Nekrotizan pankreatit
H12	Cglab	Hemato	K/55	96	34.	tab	4.	AB/-11	KML
H13	Cpara	Nöro YBÜ	K/80	39	28.	tab	5.	AB/-8	SVH
H14	Cpara	KVC	K/66	33	18.	tab	7.	F/-14	Kronik akciğer hastalığı
H15	Cpara	PRC YBÜ	E/33	48	13.	ex	1.	AB/1	Ateşli silah yaralanması
H17	Calb	Üro	K/49	33	19.	tab	0.	AB/0	Mesane Tm
H18	Cpara	GC	E/62	52	38.	ex	5.		Mezotelyoma
H19	Cpara	GH	K/44	37	15.	tab	4.		Behçet hastalığı
H20	Cpara	Hemato	E/29	69	21.	tab	3.	AB/1	AML
H21	Calb	Derm	E/77	34	30.	tab	5.	F/-12	Psöriazis
H22	Cpara	Nöro YBÜ	K/81	50	24.	ex	0.	F/4	SVH
H23	Cpara	Rea	K/50	17	10.	ex	6.		Trafik kazası
H24	Cpara	KVC YBÜ	K/39	41	36.	tab	3.		Aort koartasyonu
H26	Cpara	Ped Onko	E/5	61	1.	tab	2.	AB/-18	NHL, Burkitt lenfoma
H29	Cpara	Onko	K/61	67	56.	tab	3.		Meme Ca

**Tablo 2. Devam**

Hasta	Kültür	Klinik	Cins/ Yaş (yıl)	Yatış süresi (gün)	BACTEC* pozitifliği	Klinik gidiş	Örnek ** toplama	Antifungal/ süre ***	Tanı
H30	Cguil	Onko	E/12	112	48.	tab	13.	F/-50AB/20	AML
H31	Cpara	Onko	E/62	40	25.	ex	5.	AB/2	Pankreas periampuller Tm
H33	Cpara	Rea	E/68	47	9.	ex	3.	AB/-9	Myastenia gravis
H33	Cpara	Rea	E/68	47	9.	ex	3.	AB/-22	Myastenia gravis
H35	Cpara	PRC YBÜ	K/74	156	130.	ex	2.		Dekübit ülseri
H37	Clipo	İH YBÜ	K/44	30	11.	tab	4.	AB/-11	Kronik böbrek yetmezliği
H39	Cpara	Rea	E/86	15	14.	ex	2.		Akut kolesistit, sepsis
H40	Calb	Üro	K/42	14	3.	tab	4.	AB/-7	Sağ hidronefroz
H42	Cpara	İH YBÜ	K/90	16	11.	tab	4.		Kronik böbrek yetmezliği
H46	Cpara	Rea	E/56	32	21.	ex	5.	AB/-12	Özofagus Ca
H47	Cpara	GC YBÜ	E/65	34	19.	ex	2.	AB/1	Pankreas periampuller Tm
H48	Cpara	Rea	E/55	47	35.	ex	7.		KOAH
H51	Cpara	Rea	E/20	40	12.	tab	2.	AB/-13	Trafik kazası
H53	Cpara	BC	E/84	86	79.	ex	4.		Düşme
H54	Cpara	GC YBÜ	E/81	15	10.	tab	3.		Duodenum ülser perforasyon
H56	Cpara	Rea	E/18	86	4.	tab	4.	AB/3	Subdural hematom
H58	Calb	İH YBÜ	K/38	26	9.	tab	4.	AB/-9	Kronik pankreatit
H63	Calb	KVC	K/57	34	31.	ex	3.	AB/0	Mitral yetmezlik
H64	Cpara	BC YBÜ	E/51	51	16.	tab	3.	AB/0	T10 Fraktür
H65	Cpara	BC YBÜ	K82	40	32.	tab	1.	AB/-15	Meningiom
H66	Cpara	GC YBÜ	E/68	135	26.	ex	3.	AB/-20	İleus
H67	Cglab	GC	K/28	45	15.	tab	3.		Crohn hastalığı
H70	negatif	Hemato	K/25	57	negatif	tab		AB/0	AML

**Tablo 3.** BACTEC pozitif, kan kültürü negatif, PZR negatif/pozitif hastaların özellikleri

Hasta	Klinik	Cins/	Klinik	Antifungal/	Tanı	PZR	Jel no
		Yaş (yıl)	gidiş	süre			
H72	GC	K/65	ex		Nekrotizan pankreatit	neg	1
H73	BC	K/47	ex		Subdural hematoma	neg	2
H74	Ped	K/2	tab		Akut böbrek yetmezliği	neg	4
H75	İH	E/26	ex		Testis tm, akciğer metastazı	neg	5
H76	Ped	E/4	tab	AB/-12	Sistemik mantar inf	neg	6
H77	Hemato	E/60	ex	AB/-14	MDS	neg	7
H78	Hemato	K/37	tab	AB/-17	AML-M2	neg	8
H79	Hemato	E/36	ex	AB/2	ALL	poz	3
H80	Hemato	E/32	tab		NHL	neg	9
H81	İH	K/62	tab		Kronik böbrek yetmezliği	neg	10
H82	GC	E/54	tab		Trafik kazası	neg	12
H83	Ped	K/6	tab		Karaciğer yetmezliği	poz	11

H, Hasta; E, Erkek; K, Kadın; Tab, Taburcu; Ex, Exitus; F Flukanazol; Ab, Amfoterisin B; neg, Negatif; poz, Pozitif,

*Cpara, C.parapsilosis; Ctrop, C.tropicalis; Calb, C. albicans; Cglab, C.glabrata; Cguil, C. guilliermondii; Clipo, C. lipolytica; Gcap, Geotricum capitatum*

BC, Beyin Cerrahi; GC, Genel Cerrahi; GH, Göğüs Hastalıkları; Hemato, Hematoloji; İH İç Hastalıkları; KVC, Kardiyovasküler Cerrahi; Onko, Onkoloji; Ort, Ortopedi; Ped, Pediatri; Rea, Reanimasyon; Üro, Üroloji; YBÜ, Yoğun Bakım Ünitesi;

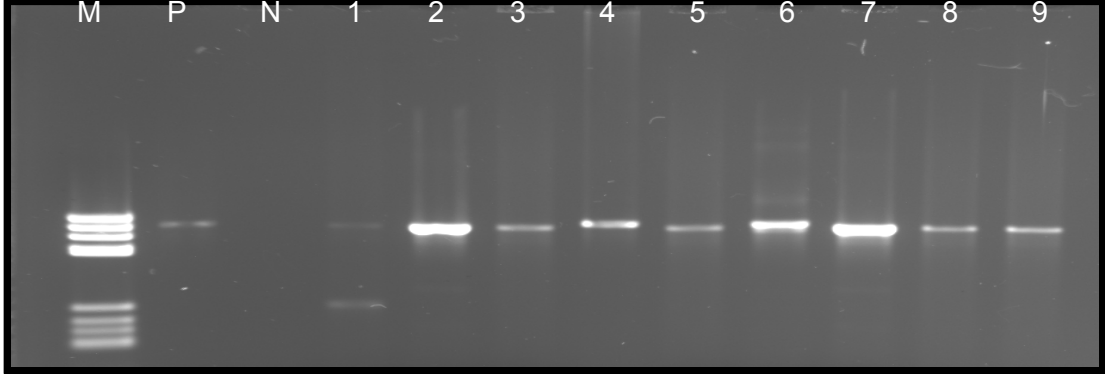
ALL, Akut lenfositik Lösemi; AML, Akut Myeloblastik Lösemi; KML, Kronik Lenfoblastik Lösemi; NHL, Non-Hodgkin Lenfoma; MDS, Myelodistrofik Sendromu; KOAH, Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı; SVH, Serebrovasküler Hastalık;

\* Hasta yatışının kaçınıcı gününde kan kültürü pozitifliği olduğunu gösterir.

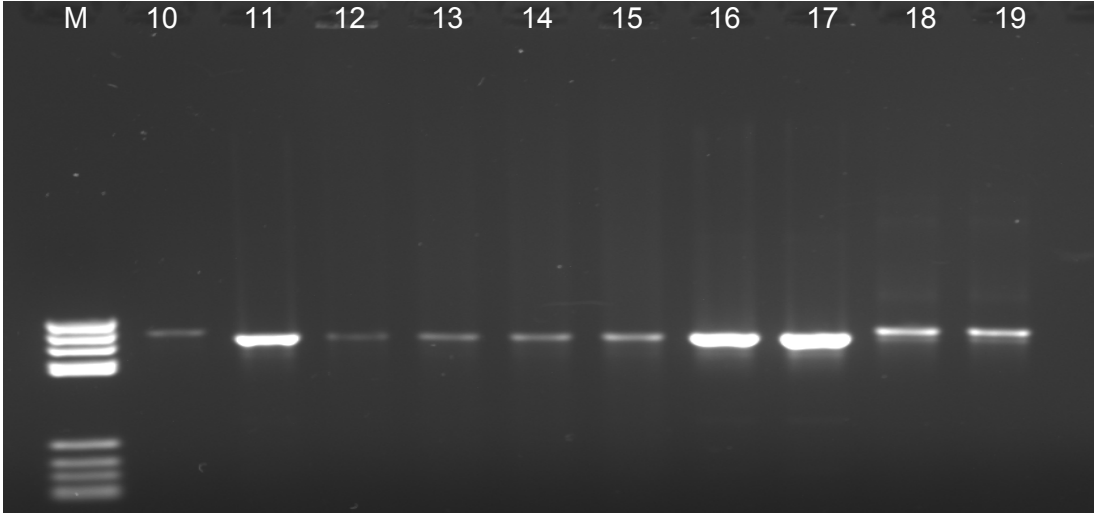
\*\* BACTEC pozitifliğinin kaçınıcı gününde PZR için kan örneği alındığını gösterir.

\*\*\* Antifungal/süre, Antifungal adı/(-); kullanımdan sonra, kullanım süresi, Ör; AB/ -2: Amfoterisin B kullanımından 2 gün sonra PZR için kan örneği alındı

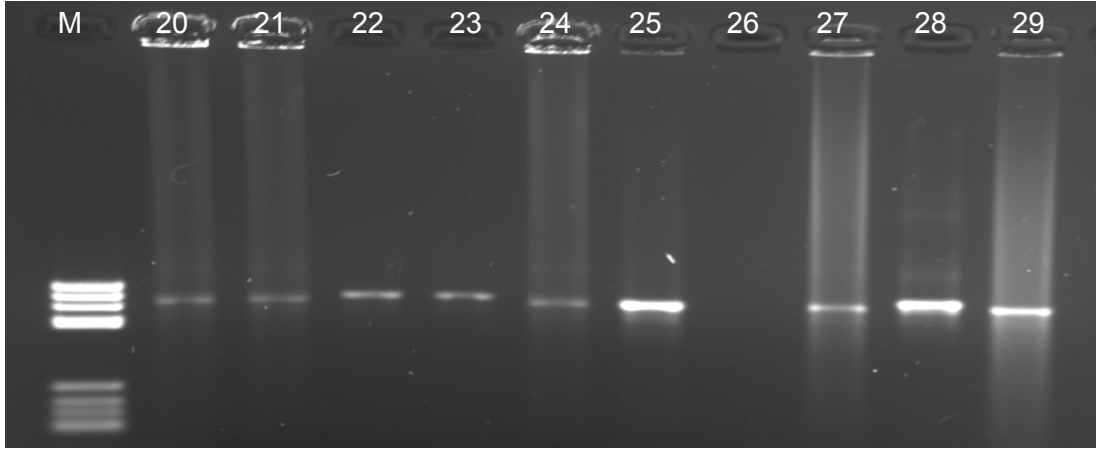




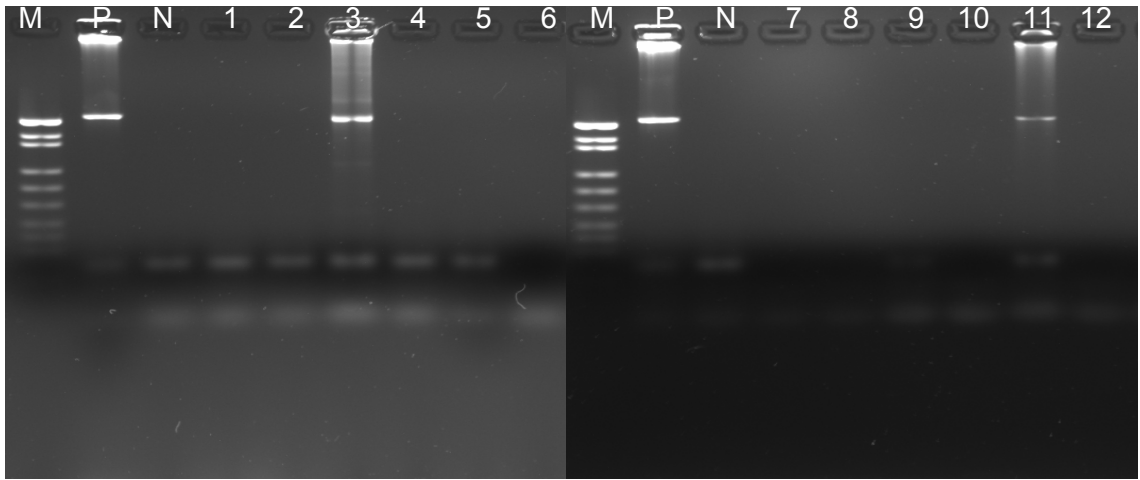
**Şekil 1.** BACTEC otomatize kan kültür sisteminde pozitif sinyal / kültürde üremesi olanlar. M; ölçek (Marker, Hae III, Fermantas MBI), P; pozitif kontrol, N; negatif kontrol, 1-9; H 1, 2, 16, 25, 27, 28, 32, 34, 36



**Şekil 2.** BACTEC otomatize kan kültür sisteminde pozitif sinyal / kültürde üremesi olanlar. M; ölçek (Marker, Hae III, Fermantas MBI), P; pozitif kontrol, N; negatif kontrol, 10-19; H 38, 41, 43-45, 49, 50, 52, 52, 55.



**Şekil 3.** BACTEC otomatize kan kültür sisteminde pozitif sinyal / kültürde üremesi olanlar. M; ölçek (Marker, Hae III, Fermantas MBI), P; pozitif kontrol, N; negatif kontrol, 20-29; H 57,59-62, 65, 68, 69, 71.



**Şekil 4.** BACTEC otomatize kan kültür sisteminde pozitif sinyal/kültürde üremesi olmayanlar. M; ölçek (Marker, Msp I Sigma, D-4797), P; pozitif kontrol, N; negatif kontrol, 3 ve 11; pozitif hastalar (H79 ve H83), 1, 2, 4-6, 7-10, 12; negatif hastalar.

## 5. TARTIŞMA

İnsanlarda infeksiyon oluşturabilen en sık görülen patojen mantarlar olan *Candida* türleri, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda invaziv olmayan yüzeysel infeksiyonlardan, derin dokuları tutan sistemik infeksiyonlara kadar geniş hastalık spektrumuna sebep olurlar. Yüzeysel kandidoz ağız boşluğu, farinks, özofagus, barsaklar, mesane ve vajinayı kapsayan mukozalar, tırnak ve deriyi tutarken; derin kandidozun sıklıkla gözlendiği organlar böbrekler, karaciğer, dalak, beyin, gözler ve kalptir. *Candida*lar bu organları tutarak derin yerleşimli sistemik infeksiyon ve kandidemi gibi çeşitli infeksiyonlara neden olmaktadır<sup>59, 88</sup>.

Yüzeysel infeksiyonların tanısı genel olarak konabilmektedir. Ancak invaziv hastalıkların klasik olarak kültüre dayalı olan tanısında problemler yaşanabilmektedir. İnvaziv *Candida* infeksiyonları hastanın hayatını ciddi biçimde tehdit eden ve tedavisinin çok hızlı başlanması gereken infeksiyonlardır. İnvaziv hastalıkların erken tanısı hayati önem taşıdığı halde kültür ile en erken 2 günde sonuç alınabilmekte ve etken patojen çoğu zaman üretilmemektedir<sup>88</sup>.

Yaptığımız çalışmada, bir haftalık takibe programlanmış BACTEC 9120 otomatik kan kültür sisteminde bir hafta süre ile takip edilen kan kültürleri en erken 12 saatte, en geç 88 saatte (ort. 36 saat) pozitif sinyal vermiştir. Kültürünün üremesi en erken 24 saatte olan maya hücrelerinin identifikasyonu iki günü geçmektedir. Pozitif sinyal verdiği halde Gram boyamada maya hücresi saptanamayan kandidemi olguları da bulunmaktadır. Iwen ve ark.'nın, ESP II otomatik kültür sistemi (TREK diagnostic Systems, Inc.) ile kan kültürlerini takip ettiği 142 kandidemi için riskli gruptaki hastanın kültür pozitifliğini, Gram boyama ve PZR ile karşılaştırdıkları çalışmalarında sadece 3 pozitif sinyal veren şişeden yapılan boyamada maya hücresi saptanmamıştır<sup>89</sup>.

Uyguladığımız moleküler yöntem, 7,5 saatlik DNA eldesi, 2 saatlik DNA çoğaltılmasını takip eden 30 dakikalık elektroforez aşamalarından oluşmaktadır. Kan örneği laboratuvara ulaştıktan sonra 10 saat içinde hastaya sonuç verilebilmektedir. Geçici kandidemi olasılığı hatırlatılarak klinisyenin en hızlı şekilde tedaviye başlaması önerilmektedir.

Bu durum invaziv kandidoz tanısında PZR yöntemlerinin geliştirilmesine neden olmuştur. İnvaziv kandidoz tanısında en büyük önem primer patojen ajan olan *C. albicans*'ı saptama yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik olmakla birlikte *albicans* dışı *Candida* türleri, *Aspergillus*, *Pneumocystis carinii* ve *Cryptococcus* gibi diğer patojenler ile ilgili gelişmeler de vardır<sup>90</sup>.

Mantar infeksiyonlarının tanısında ilk PZR yöntemlerinden biri 1990 yılında Buchman ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır. Çoğaltım için hedef olarak *Candida* türlerinin ergosterol biyosentezinde yer alan sitokrom P450 L1A1 (lanosterol-14 $\alpha$ -demetilaz) gen kodu seçilmiştir. Duyarlılık 100  $\mu$ l örnekte 10 maya hücresi olarak saptanmıştır. Cerrahi travmalı 6 hastanın kan, yara akıntısı, balgam ve idrarına PZR uygulanmış ve 15 pozitif sonuç alınmıştır. Ancak bu PZR'in özgüllüğü değerlendirilmemiş ve PZR pozitif klinik örnekleri başka bir yöntem ile karşılaştırılması yapılmamıştır<sup>91</sup>.

Uyguladığımız PZR tekniği 1 ml kanda 100 maya hücresi bulunması halinde pozitif sonuç vermektedir. Yapılan başka çalışmalarda uygulanan DNA saflaştırılması yöntemi deşışmeksizin sadece türe özgül primerler ile duyarlılığın 10 maya hücresi/ml'ye kadar indirilebildiği bildirilmektedir<sup>92</sup>.

Fujita ve ark. ise, *Candida* türlerinin PZR yöntemi ile çoğaltılan DNA'larını saptamak amacıyla bir enzim immunoassay geliştirmişlerdir. İlk önce 5.8 rDNA geni ve buna bitişik ITS bölgesinden kaynaklanan primerler kullanarak *Candida* türlerini tespit eden bir üniversal PZR tanımlamışlardır. Daha sonra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. glabrata*'nın PZR ürünlerini spesifik olarak tespit etmek için ITS-2 bölgesinden seçilen özgül problemleri olan bir enzim immunoassay kullanmışlardır. Etidyum bromid boyası yerine kullanılan kolorimetrik saptama duyarlılığı millitrede 10<sup>2</sup> hücreden 10 hücreye kadar artırmıştır<sup>93</sup>.

Van Burik ve ark. kan serileri veya kemik iliği transplantasyonu uygulanan hastalardan sağlanan tam kan örneklerini test etmek için iki major fungal organizmanın small-subunit rRNA gen dizisini tespit eden yeni bir panfungal PZR yöntemi geliştirmişlerdir. Panfungal primerlerle çoğaltılmadan sonra 580 baz çifti içeren bir PZR ürünü tanımlanmış ve hibridizasyonda 245 baz çiftinden oluşan bir bölüm prob olarak kullanılmıştır. PZR testinin tespit alt sınırı 1 ml kan için ortalama 4 organizma olarak saptanmıştır<sup>85</sup>. Van Deventer ve ark. 1995 yılında küçük subunit rRNA genindeki V<sub>4</sub> bölgesini PZR

için hedef olarak seçmişlerdir. Duyarlılığı southern blotting ve türe özgül problar ile 1 ml kanda 10–15 maya hücresi olarak saptamışlardır. PZR ve kan kültürü karşılaştırıldığında PZR kullanımı ile pozitif örnek sayısında kan kültürüne nazaran büyük bir artış göstermişlerdir (PZR %89–100, kültür %44–100). Bu yöntem ile sadece *C. albicans* araştırılmış olmasına rağmen araştırmacılar, değişik problar kullanılarak bu yöntemin diğer türlerin saptanmasında da kullanılabilceğini belirtmişlerdir<sup>8</sup>.

Holmes ve ark., 5S rRNA ve bitişik transkribe olmayan interjenik spacer (IGS)'dan kaynaklanan iki primer seti tanımlamışlardır. Primer setlerinden biri *C. albicans* ve 5 *albicans* dışı türden 105 baz çifti içeren bir ürün çoğaltırken 2 set sadece *C. albicans*'dan 684 baz çifti içeren bir ürün çoğaltmıştır. Duyarlılık tanımlanmış olan PZR'larla karşılaştırılabilir bir düzey olan 1 ml kanda 15 maya hücresi olarak saptanmıştır<sup>94</sup>.

Bu da bize fungal yükün az olduğunu düşündüğümüz erken dönemde bile PZR ile *Candida* izolasyonu ve tür tayinini yapabileceğimizi göstermektedir<sup>95</sup>. Fakat derin kandidozda kültür ve özellikle kan kültürü genellikle negatif sonuç vermektedir. Lizis santrifügasyon yöntemi gibi yeni geliştirilen teknikler ile kan kültürünün bu grup hastalarda %50 olarak bildirilen duyarlılığını yükseltememiştir. 66 pozitif kan kültürün sadece 20 tanesi pozitif bulunmuş (%30) fungemisi olan 20 hastanın 14'ü bu yöntem ile pozitif bulunmuş (%70), standart kan kültür sistemi ile bu oran 20 hastada 16 (%80) bulunmuştur. Her iki sistem ile yalnızca 10 hasta ortak pozitif bulunmuştur. Üstelik lizis santrifügasyon yönteminin yüksek oranda yanlış pozitiflik problemi bulunmaktadır<sup>96</sup>. Bu nedenle mortalitesi yüksek olan ve erken tanının sağaltımında önemli olduğu kandidemi tablosunda moleküler yöntemlerin kullanılması önerilmektedir<sup>9</sup>. Morrel ve ark kan kültürünün mantarların izolasyonunda ekonomik olmadığını bildirmişlerdir<sup>97</sup>. Kalkancı ve ark nötropenik hasta grubunda yaptıkları çalışmada panfungal PZR yönteminin oldukça hesaplı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Bu yöntem için en büyük tutar DNA çoğaltılması sırasında kullanılan primerler ve taq DNA polimeraz enzimine aittir. Böyle olunca pahalı olduğu düşünülen moleküler yöntemlerden PZR'ın bu grup hastalarda diğer incelemeler ile karşılaştırıldığında oldukça ucuz olduğu görülmektedir<sup>87</sup>.

PZR yöntemi kandidemi tanısı yanında antifungal tedavinin takibinde de kullanılabilir<sup>98, 99</sup>. Kalkancı ve ark çalışmaları sırasında PZR pozitif bulunan hasta örneklerinden birinde *Candida* DNA'sının AMB başlanması onuncu gününde, tedaviye flukanazol eklenmesinden sonraki beşinci günde negatifleştiğini görmüşlerdir<sup>87</sup>. Çalışmamızda bir hastadan antifungal tedavisinin 2. gününde alınan kan örneğinde mantar DNA'sı pozitif bulunmuş aynı hastanın antifungal tedavi sonrası 15. günde alınan kan örneğinde mantar DNA'sının negatifleştiği görülmüştür ve hasta taburcu edilmiştir. Başka bir hastadan alınan kan kültürü örneğinde tedavi öncesi DNA pozitifliği AMB tedavisinin 6. gününde tekrar pozitif bulunmuştur. Antifungal kullanımının 2. gününden 50. gününe kadar değişik zamanlarda kan örnekleri alınan 18 hastamızın 5'inde PZR pozitif bulundu; 3 hastadan 6. günde, flukanazol kullanan bir hastadan 19., AMB kullanan hastadan 10. gün kan örnekleri alınmıştır. Bu hastaların 5'inde PZR pozitif bulundu. Bu 5 hastanın 3'ünde en fazla 6 günlük antifungal kullanımı sonrası PZR pozitif bulunmuştur. Diğer iki hastanın biri 19 günlük flukanazol kullanımı sonrası alınan kan örneğinde, diğeri 10 günlük AMB kullanımı sonrası alınan kan örneğinde PZR pozitifliği bulundu.

*Candida parapsilosis* son yıllarda önemli hastane kaynaklı patojenler arasında yer aldığı ve kandidemilerin %7 ile 10'unu oluşturduğu hatta bazı merkezlerde bu oranın %30-50'lere ulaşan oranlarda izole edildiği bildirilmiştir. *C. parapsilosis* yüksek glikoz konsantrasyonunda daha iyi proliferasyon gösteren ve akrilik yüzeylere daha iyi penetre olmakta ve ekzojen kökenli hastane enfeksiyonuna neden olmaktadır. Deride sıklıkla kolonize halde bulunmaktadır. Sağlık çalışanlarının ellerinde mayaların tanımlanması ile ilgili çalışmalarda en sık *C. parapsilosis* izole edilmiştir<sup>50, 100, 101</sup>. Kateter yüzeyinde oluşturduğu biyofilm nedeniyle santral venöz kateteri bulunan hastalarda daha sık soyutlanmaktadır<sup>38, 48, 102, 103</sup>. PZR ile DNA'sını negatif bulduğumuz 45 hastaya ait kan kültürününün 30'unda (%73,33) *C. parapsilosis*, 8'inde (%13,33) *C. albicans*, 3'ünde (%6,66) *C. glabrata* ve 1'er tanesinde *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* ve *C. lipolytica* üremesi olmuştur. PZR ile negatif bulduğumuz diğeri bir hastanın da kan kültürü negatif bulunmuştur. Yatan hastalardan kan kültürleri için örnek alınırken daha çok kateter yolunun kullanılması kan kültürlerinden üreyen *C. parapsilosis*'in izolasyon oranını artırmaktadır.

Tek bir enzim kullanarak uygun yöntem kullanıldığında kısa sürede altı önemli *Candida* tür düzeyinde de tanımlanabilmektedir<sup>104,105</sup>.

Serolojik tanının tartışmalı sonuçlar verdiği nötropenik hasta grubunda en avantajlı yöntem PZR olarak görülmektedir<sup>106</sup>. Bu yöntemin kandidemi tanısı konmasında duyarlılığı yüksek, invaziv kandidoz tanı süresini kısaltarak saatler düzeyine düşürdüğü için hızlı sonuç verebilen ve tedavi takibinde kullanılabilen bir yöntem olarak özellikle nötropenik hasta grubunda rutin olarak uygulanabileceği kanısına varılmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

1. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Reviews 1996; 9(4): 499-511.
2. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(9): 3640-3645.
3. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, Calandra T, Glauser MP, Tauber MG, Pittet D. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. Clin Infect Dis 2004 1; 38(3): 311-320.
4. Richardson MD, Kokki MH: New perspectives in the diagnosis of systemic fungal infections. Annu Med 1999; 31(5): 327-335.
5. Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, Crokaert F. Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay. J Clin Microbiol 2004; 42(7): 3159-3163.
6. Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, Duchateau V, Rodriguez-Villalobos H, Aoun M, Crokaert F. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. J Clin Microbiol 2003; 41(7): 3293-3298.
7. Hopfer RL. Use of molecular biological techniques in the diagnostic laboratory for detecting and differentiating fungi. Review. Arch Med Res 1995; 26(3): 287-292.



8. van Deventer AJ, Goessens WH, van Belkum A, van Vliet HJ, van Etten EW, Verbrugh HA. Improved detection of *Candida albicans* by PCR in blood of neutropenic mice with systemic candidiasis. J Clin Microbiol 1995; 33(3): 625-628.
9. Miyakawa Y, Mabuchi T, Fukazawa Y. New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1993; 31(12): 3344-3347.
10. Yücel A. *Candida*'ların dünü. *Candida* mikrobiyolojisi ve enfeksiyonları simpozyumu, (Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., ed) Eskişehir, 2002: 3-29.
11. Yücel A. Medical mycology: Yesterday and Today. Cerrahpaşa J Med 1999; 30 (2): 191-198.
12. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *C. albicans*'ın Taksonomisindeki Önemli Bazı Değişiklikler. Cerrahpaşa J Med 1999; 30: 236-2.
13. Koç AN. Tıbbi bakımdan önemi olan *Candida* türlerinin mikolojik özellikleri. *Candida* mikrobiyolojisi ve enfeksiyonları simpozyumu, (Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., ed) Eskişehir, 2002: 3-29.
14. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. Clin Microbiol Reviews 1995; 8(4): 462-478.
15. Tümbay E: *Candida* Türleri, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, (Ustaçelebi, Ş., ed), Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 1081-1086.
16. Hilmioğlu S. Yeni Patojen Mantarlar. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi. (Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş., ed), İzmir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 1999; 36: 77-86.

17. Valenza G, Valenza R, Brederlau J, Frosch M, Kurzai O Identification of *Candida fabianii* as a cause of lethal septicaemia. *Mycoses* 2006; 49(4): 331-334.
18. Shin JH, Kook H, Shin DH, Hwang TJ, Kim M, Suh SP, Ryang DW. Nosocomial cluster of *Candida lipolytica* fungemia in pediatric patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19(5): 344-349.
19. İnci R, Hilmioğlu S. Nozokomiyal Fungal enfeksiyonlara yaklaşım. *Klimik Derg* 2000; 13: 28-13.
20. D'Antonio D, Violante B, Mazzoni A, Bonfini T, Capuani MA, D'Aloia F, Iacone A, Schioppa F, Romano F. A nosocomial cluster of *Candida inconspicua* infections in patients with hematological malignancies. *J Clin Microbiol* 1998; 36(3): 792-795
21. Chang CL, Park TH, Lee EY, Lim YT, Son HC. Recurrent self-limited fungemia caused by *Yarrowia lipolytica* in a patient with acute myelogenous leukemia. *J Clin Microbiol* 2001; 39(3): 1200-1201.
22. Guarro J, Gene J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Reviews* 1999; 12(3): 454-500.
23. Maertens J, Vreboos M, Boogaerts M. Assessing risk factors for systemic fungal infections. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2001; 10(1): 56-62.
24. Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Almela M, Mensa J, Sanchez F, Ayats J, Gimenez M, Saballs P, Fridkin SK, Morgan J, Rodriguez-Tudela JL, Warnock DW, Pahissa A; Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 2005; 43(4): 1829-1835.

25. Kuştimur S. *Candida* enfeksiyonlarının tanı yöntemlerinin değerlendirilmesi. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, (Özgüneş, İ.,Usluer, G., Çolak H., ed), Antalya, 1999: 72-74.
26. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Mayaların güvenilir ve hızlı tanısı için indikatörlü ve indikatörsüz oksanogram besiyerlerinin ve bir alternatif asimilasyon yönteminin karşılaştırılması. İnfek Derg 2002; 16(3): 349-359.
27. Nakamoto S. Germ Tube Formation of *Candida albicans* in Corn Meal Broth Using the non-Slip Glass incubation Method. Yonago Acta Medica 1998: 65-72.
28. Yıldırım ŞT. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, (Ustaçelebi, Ş.ed), Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 1129-1144.
29. Cerikcioğlu N. *Candida*ların ince yapısı. *Candida* mikrobiyolojisi ve enfeksiyonları simpozyumu kitabı, Eskişehir. 2002: 47-54.
30. Çolak Hasan. Hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonları. Klimik Derg 2000; 13: 11-15.
31. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida*ların patojenlik belirtgenleri. Cerrahpasa J Med 2000; 30: 172-186.
32. Kuştimur S. *Candida*'da virulans Faktörleri, 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi.(Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş.,ed), İzmir, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 1999; 36: 145-150.
33. Ener B. *Candida* Enfeksiyonlarının Patogenezi: Etkenin Rolü. *Candida* mikrobiyolojisi ve enfeksiyonları simpozyumu, Eskişehir. 2002: 65-71
34. Dağdeviren M, Çerikçioğlu N, Karavuş M. Hastanede yatan Fungemili hastalardan izole edilen *C. parapsilosis* kökenlerinin virülans faktörleri. Türk Mikrobiyol. Cem Derg 2003; 33: 315-322

35. Gülenç S, Karadenizli A, Kolaylı F, Bingöl R. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen maya türlerinde slime faktörü ve proteinaz aktivitelerinin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2000; 32: 235-238.
36. İnci R. *Candida* enfeksiyonlarının patogeneğinde konağın rolü. *Candida* mikrobiyolojisi ve enfeksiyonları simpozyumu kitabı, (Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., ed) Eskişehir, 2002: 71-83.
37. Ener B, Fungal Hastane Enfeksiyonları: Epidemiyoloji ve Kontrol Hast Enf Derg 1998; 2: 150-155.
38. Ener B. Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olarak Mantarlar. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, (Ustaçelebi, Ş.,ed), Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 1123-1127.
39. Verduyn Lunel FM, Meis JF, Voss A. Nosocomial fungal infections: candidemia. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34(3): 213-220.
40. Hoşoğlu S. Nozokomiyal Fungemiler. Hast Enf Derg 1998; 2: 224-229.
41. De Marie S. New developments in the diagnosis and management of invasive fungal infections. Haematologica 2000; 85(1): 88-93.
42. Bakir M, Cerikcioglu N, Barton R, Yagci A. Epidemiology of candidemia in a Turkish tertiary care hospital. APMIS 2006; 114(9): 601-10.
43. Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, Pallavicini FB, Viscoli C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. BMC Infect Dis 2006, 6: 21.
44. 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.

45. Chen TC, Chen YH, Tsai JJ, Peng CF, Lu PL, Chang K, Hsieh HC, Chen TP. Epidemiologic analysis and antifungal susceptibility of *Candida* blood isolates in southern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2005; 38(3): 200-210.
46. Özenci H. *Candida albicans*'a karşı lokal ve sistemik direnç. *Candida* mikrobiyolojisi ve enfeksiyonları simpozyumu kitabı, (Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., ed) Eskişehir, 2002: 151-155.
47. Clark TA, Slavinski SA, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs BA, Brandt ME, Webb RM, Currier M, Flowers RH, Fridkin SK, Hajjeh RA. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. J Clin Microbiol 2004; 42(10): 4468-4472.
48. Otağ F, Ersöz G, Doruk N, Erköse G, Erturan Z, Kaya A. Yoğun bakım ünitesi hastalarından kolonizasyon etkeni olarak soyutlanan *Candida* cinsi mantarlar. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34: 91-97.
49. 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; 36(7): 1886-1889.
50. Otağ F, Aslan G, Şen S, Özturhan H, Emekdaş G. 2003-2005 süresinde klinik örneklerden izole edilen maya türlerinin değerlendirilmesi. İnfek Derg 2005; 19(4): 435-443.
51. Uzun Ö. *Candida* mikrobiyolojisi ve enfeksiyonları simpozyumu kitabı, (Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., ed) Eskişehir, 2002: 117-124.
52. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases

from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis 2004; 39(3): 309-317.

53. Hilmioğlu S. *Candida* enfeksiyonunun Laboratuvar tanısı: Klasik Tanıda izlenecek Yol Ne Olmalı? *Candida* mikrobiyolojisi ve enfeksiyonları simpozyumu kitabı, (Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., ed) Eskişehir, 2002: 125-130.

54. Odds F C, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida* Species. J Clin Microbiol 1994; 32(8): 1923–1929.

55. Hospenthal DR, Murray CK, Beckius ML, Green JA, Dooley DP. Persistence of pigment production by yeast isolates grown on CHROMagar *Candida* medium. J Clin Microbiol 2002; 40(12): 4768-4770.

56. Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Direct isolation of *Candida spp.* from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*. J Clin Microbiol 2003; 41(6): 2629-2632.

57. Selvarangan R, Bui U, Limaye AP, Cookson BT. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. J Clin Microbiol 2003; 41(12): 5660-5664.

58. Philip A, Odabasi Z, Matiuzzi G, Paetznick VL, Tan SW, Warmington J, Rex JH, Ostrosky-Zeichner L. Syscan3, a kit for detection of anti-*Candida* antibodies for diagnosis of invasive candidiasis. J Clin Microbiol 2005; 43(9): 4834-4835.

59. Saraçlı MA. *Candida* enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında moleküler ve genetik tanı yöntemleri. *Candida* mikrobiyolojisi ve enfeksiyonları simpozyumu, (Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., ed) Eskişehir, 2002: 133-137.

60. Saraçlı MA. *Candida* enfeksiyonlarının tanısında moleküler yöntemler, X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi kitabı, Adana, 2001: 208-210.

61. Kiraz N: *Candida* türlerinin fenotipik ve genotipik tiplendirme, 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi. (Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş., ed), İzmir, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 1999; 36: 125-135.
62. Durmaz R. Moleküler Epidemiyolojinin Prensipleri, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, Ankara: Nobel Tıp Kitabevi Yayınları, 2001: 139-147.
63. Mercure S, Senechal S, Auger P, Lemay G, Montplaisir S. *Candida albicans* serotype analysis by flow cytometry. J Clin Microbiol 1996; 34(9): 2106-2112.
64. Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. J Clin Microbiol 1990; 28(9): 1903-1905.
65. Merz WG. *Candida albicans* strain delineation. Review. Clin Microbiol Rev 1990; 3(4): 321-334.
66. Bernhardt H, Zimmermann K, Knoke M. Fungal resistance. Infection. 1999; 27 suppl (2): 52-54.
67. Polonelli L, Archibusacci C, Sestito M, Morace G. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. Clin Microbiol 1983; 17(5): 774-780.
68. Lehmann PF, Kemker BJ, Hsiao CB, Dev S. Isoenzyme biotypes of *Candida* species. J Clin Microbiol 1989; 27(11): 2514-2521.
69. Kuştimur S. Mantarların Tanı ve Araştırmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler. Mikrobiyol Bült 2000; 34:89-192.
70. Mehta SK, Stevens DA, Mishra SK, Feroze F, Pierson DL. Distribution of *Candida albicans* genotypes among family members. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34(1): 19-25.

71. Yağcı A: Restriction fragment length polymorphism ve polimeraz zincir reaksiyon bazlı tiplendirme yöntemleri, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, (Durmaz, R. ed), Ankara: Nobel Tıp Kitabevi Yayınları, 2001: 149-160.
72. İnci R. Antifungal ilaçlar. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, (Ustaçelebi, Ş.,ed), Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 1155-1158.
73. Metin DY. Antifungal tedavide yenilikler, 5. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi kitabı. (Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Metin DY.,ed), Çanakkale: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 2007: 185-187
74. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. Clin Microbiol Rev 1999; 12(4): 501-517.
75. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Antifungallerin sistemik mantar enfeksiyonlarında kullanımı ve duyarlılık deneyleri: Genel Yönlendirme. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 2002; 33(4): 261-280.
76. Ener B. Antifungal Direnç. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi kitabı.(Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş.,ed), İzmir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 1999: 187-190.
77. Arıkan S. *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde duyarlılık testlerinin önemi. *Candida* mikrobiyolojisi ve enfeksiyonları simpozyumu kitabı, Eskişehir 2002: 161-167.
78. Rex JH, Rinaldi MG, Pfaller MA. Resistance of *Candida* species to fluconazole. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(1): 1-8.
79. Veldman BA, Verweij PE, Blijlevens NM. Successful treatment of liposomal amphotericin B refractory *Candida glabrata* fungaemia in a patient undergoing a stem cell transplantation. Neth J Med 2006; 64(4): 127-129.



80. Sugita T, Takashima M, Poonwan N, Mekha N. *Candida pseudohaemulonii* Sp. Nov., an amphotericin B-and azole-resistant yeast species, isolated from the blood of a patient from Thailand. *Microbiol Immunol* 2006; 50(6): 469-473.
81. McClenny NB, Fei H, Baron EJ, Gales AC, Houston A, Hollis RJ, Pfaller MA. Change in colony morphology of *Candida lusitanae* in association with development of amphotericin B resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(5): 1325-1328.
82. Arendrup MC, Fursted K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, Knudsen JD, Lundgren B, Schonheyder HC, Tvede M. Semination surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *J Clin Microbiol* 2005; 43(9): 4434-4440.
83. Clancy CJ, Yu VL, Morris AJ, Snyderman DR, Nguyen MH. Fluconazole MIC and the fluconazole dose/MIC ratio correlate with therapeutic response among patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8): 3171-3177.
84. Barchiesi F, Spreghini E, Fothergill AW, Arzeni D, Greganti G, Giannini D, Rinaldi MG, Scalise G. Caspofungin in combination with amphotericin B against *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(6): 2546-2549.
85. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36(5): 1169-1175.
86. Einsele H, Hebart H, Roller G, Loffler J, Rothenhofer I, Muller CA, Bowden RA, van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997; 35(6): 1353-1360.

87. Kalkancı A, Kuştimur S, Güneş İ, Otlu B. Nötropenik hastalarda *Candida* enfeksiyonunun polimeraz zincir reaksiyonu ile tanısı. İnfek Derg 2003; 17(2): 171-174
88. Reis E, Morrison C: Nonculture methods for diagnosis of disseminated candidiasis. Clin Microbiol Rev 1993; 6: 311-323.
89. Iwen PC, Freifeld AG, Bruening TA, Hinrichs SH. Use of a panfungal PCR assay for detection of fungal pathogens in a commercial blood culture system. J Clin Microbiol 2004; 42(5): 2292-2293.
90. Skladny H, Buchheidt D, Baust C, Krieg-Schneider F, Seifarth W, Leib-Mosch C, Hehlmann R. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. J Clin Microbiol 1999; 37(12): 3865-3871.
91. Buchman TG, Rossier M, Merz WG, Charache P. Detection of surgical pathogens by in vitro DNA amplification. Part 1. Rapid identification of *Candida albicans* by in vitro amplification of a fungus-specific gene. Surgery 1990; 108: 338-347.
92. Khan ZU, Mustafa AS. Detection of *Candida* species by polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and patients with suspected candidemia. Microbiol Res 2001; 156: 95-102.
93. Fujita S, Lasker BA, Lott TJ, Reis E, Morrison CJ: Microtitration Plate Enzyme Immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. J Clin Microbiol 1995; 33(4): 962-967.
94. Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, Jenkinson HF: Detection of *Candida albicans* other yeasts in blood by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32: 228-231.

95. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory : phenotypical methods. *Med Mycol* 2001; 39: 9-33.
96. Creger RJ, Weeman KE, Jacobs MR, et al. Lack of utility of the lysis-centrifugation blood culture method for detection of fungemia in immunocompromised cancer patients. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 290-293.
97. Morrell RM Jr, Wasilauskas BL, Steffee CH. Performance of fungal blood cultures by using the isolator collection system: is it cost-effective? *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3040-3043.
98. Tavanti A, Lupetti A, Ghelardi E, et al. Molecular monitoring of *Candida albicans* infections in liver transplant recipients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20: 544-553.
99. van Deventer AJ, Goessens WH, van Belkum A, van Etten EW, van Vliet HJ, Verbrugh HA. PCR monitoring of response to liposomal amphotericin B treatment of systemic candidiasis in neutropenic mice. *J Clin Microbiol* 1996; 34(1): 25-28
100. Strausbaugh LJ, Sewell DL, Ward TT, Pfaller MA, Heitzman T, Tjoelker R. High frequency of yeast carriage on hands of hospital personnel. *J Clin Microbiol* 1994; 32(9): 2299-2300.
101. Strausbaugh LJ, Sewell DL, Tjoelker RC, Heitzman T, Webster T, Ward TT, Pfaller MA. Comparison of three methods for recovery of yeasts from hands of health-care workers. *J Clin Microbiol* 1996; 34(2): 471-473.
102. Pittet D, Li N, Woolson RF, Wenzel RP. Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: a 6-year validated, population-based model. *Clin Infect Dis* 1997; 24(6): 1068-1078.
103. Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis* 1996; 22(2): S89-94.

104. Breki G, Ersz G, Otaĝ F, zturhan H, Şen S, Sylemez F, Akalın H, zkul Y, Emekdaş G. Kan kültürü pozitif rneklerde RFLP ve nested PCR yöntemi ile *Candida* türlerinin belirlenmesi. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Antalya, 2007: P 01-007: 294

105. Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. Jpn J Infect Dis 2006; 47(3): 225-229.

106. Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J, Poulain D. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. J Clin Microbiol 1999; 37(5): 1510-1517.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AP-PZR</b>	: Arbitrarily Primed PZR
<b>Bp (Bç)</b>	: Base Pair (baz çifti)
<b>CSF</b>	: Colony Stimulating Factor
<b>EIA</b>	: Enzim Immunoassay
<b>GVH</b>	: Graft Versus Host
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	: Interferon Gama
<b>Ig</b>	: Immunglobulin
<b>IL</b>	: Interlökin
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>Mb</b>	: Megabaz
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>MPO</b>	: Miyeloperoksidaz
<b>NCCLS M27-A</b>	: Antifungal duyarlılık testi referans yöntemi
<b>NCCLS M38-P</b>	: Küfler için referans yöntem
<b>NCCLS</b>	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b>NNIS</b>	: National Nosocomial Infections Surveillance
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>PFGE</b>	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
<b>PNL</b>	: Polimorf Nüveli Lökositler
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RAPD</b>	: Random Amplified Polymorphic DNA
<b>RE</b>	: Restriksiyon Endonükleaz
<b>RFLP</b>	: Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>SDA</b>	: Sabouraud Dekstroz Agar
<b>TNF</b>	: Tümör Nekroz Faktör
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b><math>\mu</math>l</b>	: Mikrolitre

## ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

**Şekil 1.:** BACTEC otomatik kan kültür sisteminde pozitif sinyal / kültürde üremesi olanlar.

**Şekil 2.:** BACTEC otomatik kan kültür sisteminde pozitif sinyal / kültürde üremesi olanlar.

**Şekil 3.:** BACTEC otomatik kan kültür sisteminde pozitif sinyal / kültürde üremesi olanlar.

**Şekil 4.:** BACTEC otomatik kan kültür sisteminde pozitif sinyal / kültürde üremesi olmayanlar.

## TABLÖLAR DİZİNİ

**Tablo 1.:** Kan kültürü pozitif, PZR pozitif hastaların özellikleri

**Tablo 2.:** Kan kültürü pozitif, PZR negatif hastaların özellikleri

**Tablo 3.:** BACTEC pozitif, kan kültürü negatif PZR negatif / pozitif hastaların özellikleri