

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MATRİKS ARACILI LAZER DEZORBSİYON İYONİZASYON
UÇUŞ ZAMANI KÜTLE SPEKTROMETRESİ (MALDI-TOF MS)
İLE TIBBİ ÖNEMİ OLAN MAYA MANTARLARININ
TANIMLANMASI**

DUDU ÇUHADAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU

Konya-2019

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MATRİKS ARACILI LAZER DEZORBSİYON İYONİZASYON
UÇUŞ ZAMANI KÜTLE SPEKTROMETRESİ (MALDI-TOF MS)
İLE TIBBİ ÖNEMİ OLAN MAYA MANTARLARININ
TANIMLANMASI**

DUDU ÇUHADAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

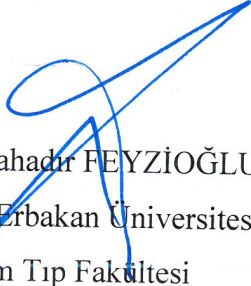
Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU

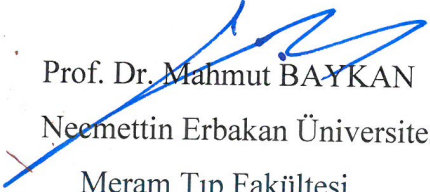
Konya-2019

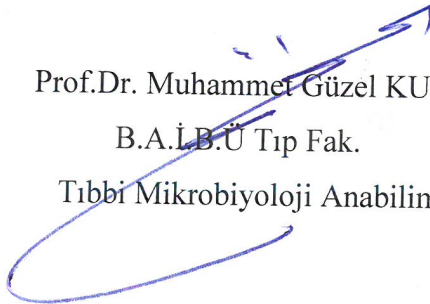
TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Dudu ÇUHADAR' ın “**Matriks Aracılı Lazer Dezorbsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS) İle Tıbbi Önemi Olan Maya Mantarlarının Tanımlanması**” başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya/ 14.06.2019


Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi
Temel Bilimler Bölümü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Mahmut BAYKAN
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi
Temel Bilimler Bölümü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Muhammet Güzel KURTOĞLU
B.A.İ.B.Ü Tıp Fak.
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

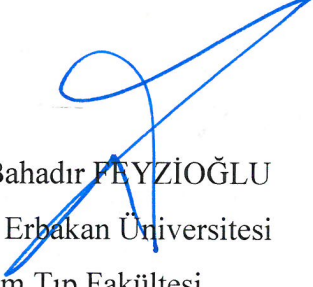
Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 16.07./2019 tarih ve 15./07. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

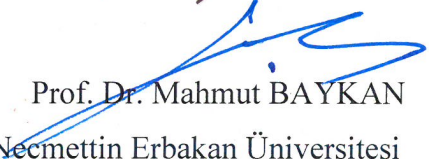

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK
Enstitü Müdürü

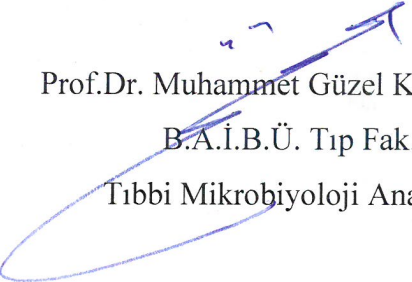
APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled "**Identification of Yeasts with Medical Importance by Matrix-Mediated Laser Discharge Ionization Flight Time Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)**" by Dudu ÇUHADAR that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of **Master of Science** in the Department of **Medicinal Microbiology**, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan


Konya, Turkey/ 14.06.2019


Doç. Dr. Bahadır FRYZİOĞLU
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi
Temel Bilimler Bölümü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Mahmut BAYKAN
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi
Temel Bilimler Bölümü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Muhammet Güzel KURTOĞLU
B.A.İ.B.Ü. Tıp Fak.
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.



Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK
Director of Institute of Health Sciences

BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

10.05.2019

DUDU ÇUHADAR



[Assignment](#)[Students](#)[Grade Book](#)[Libraries](#)[Calendar](#)[Discussion](#)[Preferences](#)

About this page

This is your assignment inbox. To view a paper, select the paper's title. To view a Similarity Report, select the paper's Similarity Report icon in the similarity column. A ghosted icon indicates that the Similarity Report has not yet been generated.

Dudu Çuhadar

Inbox | Now Viewing: new papers ▼

[Submit File Online Grading Report](#) | [Edit assignment settings](#) | [Email non-submitters](#)

[Delete](#) [Download](#) [move to...](#)

<input type="checkbox"/>	Author	Title	Similarity	web	publication	student papers	Grade	response	File	Paper ID	Date
<input type="checkbox"/>	Dudu Çuhadar	Dudu Çuhadar Y.Lisans Tez Kaynaksız	16% 	8%	5%	11%	--	--	download paper	1128227020	10-May-2019

Doç. Dr. Bahadır KÖYZİOĞLU
E.Ü. Meram Tıp Fak. Hast.
İbni Mikrobiyoloji A.B.D. Öğr. Üyesi
Dip. Tes. No: 7215-110997

TEŞEKKÜR

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı' na bağlı Mikoloji Laboratuvarında yaptığım "Matriks Aracılı Lazer Desorbsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi (MALDI-TOF MS) ile Tıbbi Önemi Olan Maya Mantarlarının Tanımlanması" konulu tez çalışmanın her aşamasında bilgi ve görüşleriyle benden yardımını esirgemeyen danışmanım, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Bahadır FEYZİOğLU' na, bölümün diğer kıymetli hocalarından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mahmut BAYKAN' a Sayın Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR' e, Doç. Dr. Metin DOğAN' a, Öğr. Üyesi Dr. Fatma ESENKAYA TAŞBENT' e, Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına, yüksek lisans sürecinde bana ilgi ve desteğini esirgemeyen ailem ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dudu ÇUHADAR

Konya/2019

İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak</i>	<i>i</i>
<i>Tez onay sayfası</i>	<i>ii</i>
<i>Tez beyan sayfası</i>	<i>iv</i>
<i>İntihal Raporu</i>	<i>v</i>
<i>Teşekkür Sayfası</i>	<i>vi</i>
<i>İçindekiler</i>	<i>vii</i>
<i>Şekiller Listesi</i>	<i>x</i>
<i>Tablolar Listesi</i>	<i>xi</i>
<i>Kısaltmalar</i>	<i>xii</i>
<i>Özet</i>	<i>xiv</i>
<i>Abstract</i>	<i>xvi</i>
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Tarihçe</i>	3
2.2. <i>Mantarların Genel Özellikleri</i>	4
2.3. <i>Taksonomi</i>	4
2.4. <i>Morfolojik Yapıları ve Üreme Şekilleri</i>	5
2.5. <i>Candida Hücresel Yapı</i>	7
2.5.1. <i>Hücre Sitoplazması</i>	7
2.5.2. <i>Hücre Membranı</i>	7
2.5.3. <i>Hücre Duvarı ve Antijenik Özellikleri</i>	7
3. PATOGENEZ ve VİRULANS FAKTÖRLER	8
3.1. <i>Patogenez</i>	8
3.2. <i>Virulans Faktörleri</i>	9
3.2.1. <i>Adherens (Tutunma)</i>	10
3.2.2. <i>Enzimler</i>	10

3.2.3. Toksinler	11
3.2.4. Biyofilm.....	12
3.2.5. Dimorfizm	12
3.2.6. Fenotipik Değişim	13
3.2.7. Siderofor Üretimi	14
4. EPİDEMİYOLOJİ.....	14
5. CANDIDA	15
5.1. Tıbbi Önemi Olan Candida Türleri	15
6. CANDIDA ENFEKSİYONLARI (KANDİDİYAZ)	20
6.1. Yüzeysel Kandidiyaz	20
6.2. Sistemik Kandidiyaz	21
7. ÖRNEKLERİN ALINMASI TAŞINMASI, SAKLANMASI ve LABORATUVAR TANI YÖNTEMLERİ.....	26
7.1. Örneklerin Alınması Taşınması ve Saklanması	26
7.2. Laboratuvar Tanı Yöntemleri	26
7.2.1. Örneklerin Direkt İncelenmesi.....	26
7.2.2. Kültür	28
7.2.3. Candida' ların İdentifikasyonu	29
7.2.3.1. Çimlenme Borusu (Germ Tüp) Testi	29
7.2.3.2. Mısırunlu Tween 80 Agar Besiyerinde Morfolojik Görünüm.....	30
7.2.3.3. Karbonhidrat Asimilasyon Testi	31
7.2.3.4. Nitrat Asimilasyon Testi	31
7.2.3.5. Karbonhidrat Fermantasyon Testi	31
7.2.3.6. Üreaz Testi	32
7.2.3.7. Hızlı Tanımlama Testleri	32
7.2.3.8. Kromojenik Besiyerleri.....	32
7.2.3.9. MALDI-TOF MS	32

7.2.4. <i>Kültür Dışı Tanı Yöntemleri</i>	35
7.2.4.1. <i>Serolojik Yöntemler</i>	35
7.2.4.2. <i>Moleküler Tanı</i>	36
8. MATERYAL ve YÖNTEM	38
8.1. <i>Candida Türlerinin Tanımlamasında Kullanılan Yöntemler</i>	39
8.1.1. <i>VITEK-2 Compact System İle identifikasyon</i>	39
8.1.2. <i>MALDI-TOF MS Yöntemi İle İdentifikasyon</i>	42
9. BULGULAR	42
10. TARTIŞMA ve SONUÇ	45
11. KAYNAKLAR	54
12. ÖZGEÇMİŞ ve EKLER	62

ŞEKİLLER LİSTESİ

Resim 1. Mantar hücresinin mikroskopik görünümü.....	8
Resim 2. MALDI-TOF MS cihazı.....	36
Resim 3. VITEK-2 Compact cihazı.....	40
Resim 4. VITEK-2 Compact System çalışma yöntemi.....	41
Resim 5. MALDI-TOF MS System çalışma yöntemi.....	42



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı.....	43
Tablo 2. İzole edilen örneklerin geldiği servislere göre dağılımı.....	44
Tablo 3. Hastalardan alınan örneklere göre türlerin dağılımı ve karşılaştırılması....	45



KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

AIDS: Acquired Immune Deficiency Syndrome

BHI: Beyin kalp infüzyon agar

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

BT: Bilgisayarlı Tomografi

CDC: Center for Diseases Control and Prevention

CFU: Colony Forming Unit

CO₂: Karbondioksit

DM: Diabetes Mellitus

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EIA: Enzim immünoassay

EMB: Eosin Methylene Blue

EORTC/MSG: Avrupa Kanser İnvazif Fungal Enfeksiyon Kooperatif Grubu-Ulusal Alerji ve Bulaşıcı Hastalıklar Mikrobiyoloji Çalışma Grubu

FA: Formik asit

HIV: Human Immunodeficiency Virus

IFA: İndirekt Floresan Antikor

KOH: Potasyum hidroksit

Kv: Kilovat

MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption/ionization- Time of Flight-Mass Spectrophotometry

MR: Manyetik Rezonans

NNIS: National Nosocomial Infection Surveillance

PAMP: Pathogen associated molecular pattern

PAS: Periyodik asit schiff

PCR: Polymerase Chain Reaction

Ph: Power of Hydrogen

PNA-FISH: Peptide Nucleic Acid Fluorescence İn Situ Hybridization

PRR: Patern recognition receptor

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

rRNA: Ribozomal ribonükleik asit

RIA: Radyoimmünoassay

RİA: Rahim içi araç

SABHI: Sabouraud beyin kalp infüzyon agar

SAP: Salgısal Asit Proteaz

SARAMIS: Spektral Arşiv ve Mikrobiyal Tanımlama Sistemi

SDA: Sabouraud Dekstroz Agar

USG: Ultrasonografi

UV: Ultra viyole

WO-1: White-opaque

ÖZET

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Matriks Aracılı Lazer Dezorbsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (Maldı-Tof Ms) İle Tıbbi Önemi Olan Maya Mantarlarının Tanımlanması

Dudu ÇUHADAR

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/KONYA-2019

Mantar etkenleri sindirim, solunum ve ürogenital sistemi başta olmak üzere normal flora üyesi olarak veya bir kolonizasyon unsuru olarak, insan ve hayvanların mukoza ve derisinde yaygın olarak bulunurlar. Öte yandan, direkt patojen olarak veya çevresel ve bireysel koşulların organizmanın aleyhine değiştiği durumlarda fırsatçı patojen olarak, hafif enfeksiyondan sistemik ağır enfeksiyonlara kadar değişebilen durumlara yol açabilirler. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda yüksek morbidite ve mortaliteye yol açtığı için bu mantar enfeksiyonlarına sebep olan türlerinin erken ve güvenilir tanımlanması önemlidir. Böylece, uygun ve zamanında yapılmış antifungal tedavi ile morbidite ve mortalite oranları en aza indirilebilmektedir.

Mantar türlerinin tanımlanması için geçmişten günümüze klinik mikoloji laboratuvarlarında çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bu klasik yöntemlere ilave olarak son yıllarda kimyasal spektroskopi ve kütle analizi yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle, Matrix-assisted laser desorption/ionization- Time of Flight-Mass Spectrophotometry (MALDI-TOF MS) tabanlı sistem, mantar türlerinin rutin tanımlanması için ilginç bir alternatif olmuştur. Aslında çok yeni sayılmayacak bu yöntemin mikroorganizma tanımlanmasında kullanımı yeni bir trend oluşturmuştur. Bakteriyel tanımlamada çok sayıda çalışma ve başarılı sonuçların ardından fungal tanımlama için de benzer yaklaşımlar oluşmaya başlamıştır.

Araştırmamızda, klinik mikoloji laboratuvarlarının tanı algoritmasında MALDI-TOF MS kullanımının belirlenmesini amaçladık. Rutin tanımlamanın bir parçası olarak, kullanımı standardize edilmiş onaylı ticari bir sistem olan VITEK-2 sistem ile MALDI-TOF MS sistemini eş zamanlı olarak tanımlama performanslarını belirledik. Bu çalışmada, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden elde edilen, 158 *Candida* spp. izolatu kullanıldı.

VITEK-2 ile yapılan tür tanımlamasında izolatların 83 (%52.6)' ü *C.albicans*, 27 (%17.1)' si *C.glabrata*, 21 (%13.2)' i *C.parapsilosis*, 9 (%5.7)' u *C.kefyr*, 9 (%5.7)' u *C.krusei*, 7 (%4.4)' si *C.tropicalis*, 2 (%1.3)' si *C.dublinskiensis* olarak tanımlandı. MALDI-TOF MS ile ise 77 (%48.7)' si *C.albicans*, 28 (%17.8)' i *C.glabrata*, 20 (%12.7)' si *C.parapsilosis*, 11 (%6.9)' i *C.kefyr*, 11 (%6.9)' i *C.krusei*, 8 (%5.1)' i *C.tropicalis*, 2 (%1.3)' si *C.dublinskiensis*, 1 (%0.6)' i *C.membranifaciens* olarak tanımlandı.

Araştırmamızın sonucunda; iki sistem benzer tanımlama performansı sergilemiştir. *Candida* türlerinin tanımlamasında tatmin edici sonuçlar elde ettiğimiz MALDI-TOF MS sistemi, kısa çalışma süresi ve düşük sarf maliyeti ile önemli avantajlar sunmuştur. Cihaz, program ve bakım/değişim maliyetlerinin makul seviyelere inmesi durumunda, klinik mikoloji laboratuvarlarının tanı algoritmasında MALDI-TOF MS kullanımının yaygınlaşacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: *Candida* spp; MALDI-TOF MS; VITEK-2

ABSTRACT

REPUCLIC of TURKEY

NECMETTIN ERBAKAN UNIVERSITY

HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Identification of Yeasts with Medical Importance by Matrix-Mediated Laser Discharge Ionization Flight Time Mass Spectrometry (Maldi-Tof Ms)

Dudu ÇUHADAR

DEPARTMENT OF MEDICAL MICROBIOLOGY

M.Sc. THESIS / KONYA-2019

Fungal agents are commonly found in digestive, respiratory and urogenital systems, as members of normal flora or as an element of colonization, in the mucosa and skin of humans and animals. On the other hand, as a direct pathogen or as an opportunistic pathogen when environmental and individual conditions change against the organism, they can lead to conditions ranging from mild infection to systemic severe infections.

Early and reliable identification of the species that cause these fungal infections is important, especially since it leads to high morbidity and mortality in immunocompromised patients. Thus, morbidity and mortality rates can be minimized by appropriate and timely antifungal therapy. Various methods have been used in clinical mycology laboratories from past to present for identification of fungal species. In addition to these classical methods, chemical spectroscopy and mass analysis methods have been used in recent years. In particular, the Matrix-assisted laser desorption / Ionization-Time of Flight-Mass Spectrophotometry (MALDI-TOF MS) based system has been an interesting alternative to the routine identification of fungal species. In fact, this method is not considered very new in the definition of microorganisms but it has created a new trend. After several studies and successful results in bacterial identification, similar approaches have begun for fungal identification. In our study, we aimed to determine the use of MALDI-TOF MS in the diagnostic algorithm of clinical mycology laboratories. We have simultaneously

identified the performance of the VITEK-2 system, which is a standardized commercialized system for use as part of the routine identification, and the MALDI-TOF MS system.

In this study, 158 *Candida* spp. obtained from clinical samples sent to Necmettin Erbakan University Meram Medical Faculty Hospital Laboratory isolate was used. In VITEK-2 identification, 83 (52.6%) of the isolates were *C.albicans*, 27 (17.1%) were *C.glabrata*, 21 (13.2%) were *C.parapsilosis*, 9 (5.7%) were *C.kefyr*, 9 (5.7%) were *C.krusei*, 7 (4.4%) *C.tropicalis*, 2 (1.3%) were defined as *C.dublinsiensis*. In MALDI-TOF MS, 77 (48.7%) were *C.albicans*, 28 (17.8%) were *C.glabrata*, 20 (12.7%) were *C.parapsilosis*, 11 (6.9%) were *C.kefyr*, 11 (6.9%) were *C.krusei*, 8 (5.1%) were *C.tropicalis*, 2 (1.3%) were *C.dublinsiensis* and 1 (0.6%) was defined as *C.membranifaciens*. As a result of our research; the two systems exhibited similar identification performance. The MALDI-TOF MS system, where we obtained satisfactory results in the identification of the *Candida* species, provided significant advantages with short operating time and low consumption cost. We believe that the use of MALDI-TOF MS in the diagnostic algorithm of clinical mycology laboratories will become more widespread if device, program and maintenance / exchange costs decrease to reasonable levels.

Key Words: *Candida* spp; MALDI-TOF MS; VITEK-2

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Şimdiye kadar yaklaşık 100.000 mantar türü tanımlanmış olup bunların 250-300 kadarının insanlarda hastalık oluşturduğu tespit edilmiştir. Daha önceleri tanımlanıp kontaminasyon olarak kabul edilen türlerin, uygun koşullarda patojen olabilecekleri kabul edilmiştir. Mantarlar, bir yandan deri de yapmış olduğu enfeksiyonlarla görüntü bozukluğu nedeniyle insanlarda yaşam kalitesini düşürürken, bir yandan da immün sistemi zayıflamış hastalarda ölüme kadar ilerleyebilen sistemik enfeksiyonlar oluşturmaktadır ve bu nedenlerden dolayı her geçen gün önem kazanmaktadır (Yücel 2002, Pfaller ve ark. 2014).

Mantar etkeni türler sindirim, solunum ve ürogenital sistemi başta olmak üzere normal flora üyesi olarak veya bir kolonizasyon unsuru olarak, insan ve hayvanların mukoza ve derisinde yaygın olarak bulunurlar. Bu mantarlardan olan *Candida*' lar doğada yaygın bulunmaktadır ve yaklaşık 200 tür içermektedirler. Aynı zamanda *Candida*' lar mantar enfeksiyonlarına neden olan en önemli türler olarak bilinmektedirler (Pfaller ve ark. 2014).

C. albicans ise en sık tespit edilen, en önemli enfeksiyon etkeni olan türdür. Son yıllarda, en önemli patojenik *Candida* türlerinin (*C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata*) taksonomisi, yakın ilişkili yeni türlerin ortaya çıkması sebebiyle büyük değişikliklere uğramıştır. Bundan dolayı da tanınması zor tür çeşitleri ortaya çıkmıştır. Bu yeni türlerin tanımı klinik olarak anlamlı görünmektedir, çünkü bunlar virulans ve ilaç direncinde farklılık gösterebilirler. (Winn ve ark. 2006; Criseo ve ark. 2015) .

Ancak *Candida* enfeksiyonlarının her geçen gün artmasına karşın bu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek antifungal ajan sayısı yetersiz kaldığı görülmektedir. Çeşitli *Candida* türlerinin antifungal ilaçlara duyarlı veya dirençli olması göz önünde bulundurularak, bu *Candida*' ların tür tanımından sonra tedavinin düzenlenmesi önerilmektedir (Segal ve Elad 2005, Criseo ve ark. 2015).

Günümüzde HIV enfeksiyonu, solid organ veya hematopoetik kök hücre nakli, hematolojik maligniteler ve immün supresyona neden olan hastalıkların öne çıkmasıyla invaziv mantar enfeksiyonlara duyarlı popülasyon sayısı her geçen gün artmaktadır (Sütçü ve Salman 2016). Böylece *Candida* enfeksiyonuna yakalanan hastalara en kısa zaman diliminde ve kesin tanı (tür bazında) konulması, bunun

beraberinde uygulanacak uygun bir antifungal tedavi, iyileşmede başarının önünü açacaktır. Bu yüzden patojenik türlerin hızlı ve güvenilir bir şekilde identifikasyonu, özellikle de antifungallerin duyarlılığının türle ilişkili olması nedeniyle oldukça önemlidir (Criseo ve ark. 2015)

Geçmişte, bazı Candida türlerini tanımlamak için farklı ticari kitler ve otomatize sistemler üretilmiş, bazı türlerin tanımlanabilmesi için de moleküler yöntemlere gerek duyulmuştur. Gittikçe artan Candida türlerini tanımlamak amacıyla geçmişten günümüze kadar bazı testler ya tek başına ya da tanıda başarıyı yakalamak amacıyla birlikte uygulanmaktadır. Fakat bu yöntemlerle mantar türleri 2 gün ila birkaç hafta gibi bir sürede tanımlanmıştır (Sullivan ve ark. 1996, Iriart ve ark. 2012).

Son zamanlarda bu klasik yöntemlere ilaveten kimyasal spektroskopi ve kütle analizi yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. “Matrix assisted laser desorption ionization- time of Flight -Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)” kütle spektrometri yöntemi son sistem teknoloji olarak bilinmektedir. Bakteriyolojiden daha az oranda olsa da MALDI-TOF MS yöntemi, yakın zaman önce tanısal mikoloji iş akışında devrim yaratmıştır (Wieser ve ark. 2012; Posteraro ve ark. 2013).

Bu tez çalışmamızda amaç; hastanemizde yatan hastalarda enfeksiyon etkeni olan invaziv Candida izolatlarını hızlı ve doğru bir şekilde tür düzeyinde VITEK-2 ve MALDI-TOF MS yöntemleri ile çalıştıktan sonra cihazların tür tanımlamadaki performanslarının karşılaştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Mikoloji sözcüğü Yunanca şapkalı mantar anlamına gelen mykes kelimesinden gelmektedir. İlk çağlardan beri mantarların çeşitli hastalıklara neden olabileceği düşünülmüştür. En önemli tür olan *Candida*'lara ait ilk bilgilerin Hipokrates ve Galen'e kadar uzandığı kaynaklarda görülmektedir. Ancak diğer alanlarda da olduğu gibi mantarlarla ilgili esaslı bilgiler 19. yüzyılda toplanmaya başlanmıştır. *Candida*'ların neden olduğu hastalıklarla ilgili bilinen ilk bulgular, M.Ö. 4.yüzyıla İstanköy'lü Hipokrat'ın (Hippocrates) Epidemics kitabında yer almaktadır. Bu kaynaktan bahsedilene benzer nitelikte iki hastada ortaya çıkan oral kandidiyaz vakasını (pamukçuk) 1665' de Galen ve Peppy tanımlamıştır. 1771 yılında ise Rosenstein ve Rosens oral kandidiyazın yenidoğan bebeklerde oluşabilen bir hastalık olduğunu ileri sürmüşlerdir (Kiraz 1996; Willinger ve ark. 2014). Veron ise 1835' te ilk kez özofagus kandidiyazını tarifleyerek bu hastalığın yenidoğan bebeklere doğum esnasında geçtiğini öne sürmüştür. 1843' de bu organizmayı *Oidium albicans* olarak isimlendiren Charles Robin, üretmeyi de başarmıştır. Ayrıca 1890'da Zopf tarafından önerilen *Monilia albicans* ismi ile 1923 yılında Berkhout tarafından önerilen *Candida albicans* ismi ile aynı mantar için 100' den fazla eş anlamlı isim kullanılmıştır. Kısacası, *Candida albicans*'ın adlandırılmasındaki süreç hem karmaşık hem uzun sürmüştür. Berkhout tarafından önerilen *Candida albicans* ismi 1954' de Paris'de düzenlenen sekizinci Botanik Kongresi'nde kabul görmüştür (Unat 1995; Yücel 1999).

Langanbek 1839 yılında oral lezyonlu bir hastadan mayayı üretmiş. Bennett, 1844 yılında balgamda, Wilkinson ise 1849' da vulvovajinal kandidiyaziste etkeni göstermiştir (Winn ve ark. 2006). Robin 1853 de *Candida albicans*'ı pamukçuklu hastaların lezyonlarında incelemiş, 1861'de Zenker, sistemik kandidiyaz olgusu bildirmiştir. Castellani 1. Dünya Savaşı sırasında patojen mayaları araştırmış ve *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis* türlerini tarif etmiştir (Yücel 1999).

1950' li yıllarda enfeksiyonların ortaya çıkmasını önlenmek için özel organizasyonların olması gerektiği vurgulanmıştır. Ancak ilk komiteler İngiltere ve ABD' de 1970' li yıllarda oluşturulmuştur. Center for Diseases Control and Prevention (CDC) ve National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS), hastane

enfeksiyonları ile ilgili ulusal çapta veri hazırlamaya yönelik olarak geliştirilen öncü organizasyonlardır. Bu verilerle, 20. yy. başlarında Candida' ların birçok organda hastalıklara sebep olduğu gösterilmiştir. Candida enfeksiyonlarının geçmişine bakıldığında diğer birçok hastalıkta olduğu gibi klinik tanımlamanın ön planda aldığı, etkene yönelik tanımlamanın ise çok sonradan oturtulduğu görülmüştür (Yücel 2002; Edwards 2010).

2.2.Mantarların Genel Özellikleri

Mantarları ve mantar hastalıklarını inceleyen bilim dalı mikoloji olarak bilinmektedir. Mantarların oluşturduğu enfeksiyonlara ise mikoz denir. Mantarlar, Mantarlar Alemi (Kingdom Fungi) olarak bir alemde sınıflandırılırlar. Mantarlar ökaryotik organizmalardır. Fakat glukan ve kitinden oluşan sert bir hücre duvarına, ana sterol içeriği olarak kolesterol yerine ergosterolün bulunduğu bir hücre zarına sahip olmaları nedeni ile diğer ökaryotlardan farklıdırlar.

Çevresel örneklerde mantarlara oldukça sık rastlanmaktadır. Gıda maddelerinin üzerindeki küfler bunun tipik bir örneğidir. Esas amacı organik materyalleri parçalamak olan ve her an her yerde bulunabilen bir organizma grubunu temsil eden mantar türleri endüstriyel amaçlı olarak da kullanılabilen mikroorganizmalardır. Nemli ortamda ve bakterilerin aksine genellikle asidik ortamlarda üremeyi severler. Organik madde gereksinimlerini saprofitik, simbiyotik, kommensal ve parazitik olarak sağlayan heterotrof türlerdir. Tekli veya çoklu hücreler şeklinde organize olabilmektedirler.

Seksüel ve/veya aseksüel olarak üreyebilme özelliklerine sahiptirler. Bazıları fakültatif anaerob ve bazıları da zorunlu anaerob olmakla birlikte mantarların çoğu aerobik solunum yapmaktadır. Mantarlar, morfolojik yapılarına göre küf ve maya olmak üzere iki temel grupta incelenirler. Bazı mantarlar ise insan vücut ısısında maya, doğal ortamlarda ise küf şeklindedir. Isıya bağlı olarak yapı değişikliği gösteren bu mantarlar termal dimorfik mantarlar olarak adlandırılır (Kiraz 1996; İnci 1999).

2.3.Taksonomi

Taksonomi; dünya üzerinde yaşayan organizmaların değişik etkenlere göre sınıflandırılması ve elde edilen bilgilerle kategorilere ayrılarak isimlendirilmesidir. Taksonomi, bilim dünyasında sınıflandırma olarak da tanımlanmaktadır (İnci 1999).

Taksonomisi yapılan mantarlar binominal sisteme (ikili adlandırma) göre iki sözcük halinde yazılırlar. Binomial sistemde ilk isim cins (genus), ikinci isim ise tür (species) adı olup canlıların sınıflandırılmasında büyük kolaylık sağlamıştır. Ayrıca taksonomi de bazı ekler alarak (Bölüm:-mycota, Alt bölüm:-mycotina, Sınıf :-mycetes, Alt sınıf: -mycetidae, Takım:- ales, Alt takım:-ineae, Aile: -aceae, Alt aile:-oideae) isimlendirilirler (İnci 1999; Hazen ve Howell 2003).

Mantarların eşeyli formdaki spor oluşturmaları ve bunların üreme şekilleri taksonomik sıralamada temel alınmaktadır. Ayrıca geçmişte aseksüel formdaki (anamorf) mantarların tanımlanmasında kullanılan Deuteromycota adlı yapay sınıflandırma günümüzde kullanılmamaktadır. Bazı mantarların seksüel şeklinin (telemorf) yapılarının yokluğunda bile anamorf yapılarına göre sınıflandırmak mümkün olmuştur (*C.kefyr*' in telemorfu *Kluyveromyces Marxianus*, *C.famata*' nın telemorfu *Debaryomyces hansenii*, vs.) (Hazen ve Howel 2003; Brand ve Warnock 2011). Buradan *Candida* türlerinin ilişkisiz (heterojen) türlerin bir karışımı olduğu görülmektedir. *Candida*' lar taksonomik sıralamada mantarlar alemi, Ascomycota bölümü, Hemiascomycetes sınıfı, Saccharomycetales takımı, Candidaceae ailesi içinde bulunur (De Hoog ve ark. 2000). Yaklaşık 200 *Candida* türü olmasına rağmen tıbbi önemi olan türlerin sayısı azdır. İdentifikasyonu yapılan türler arasında *C.albicans* hemen hemen tüm *Candida* enfeksiyonlarında en sık tespit edilen türdür. *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. famata (Candida flareri)*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C.rugosa*, *C.utilis*, *C. lipolytica*, *C.inconspicua*, *C. ciferrii*, *C. haemulonii*, *C.kefyr (C. pseudotropicalis)*, *C. norvegensis*, *C. viswanathii*, *C. zeylanoides* tıbbi önemi olan diğer türlerdir. Tıbbi bakımdan önemli olan türlere hergün yenileri eklenmektedir (De Hoog ve ark. 2000; Kurtzman ve ark. 2011).

2.4. Morfolojik Yapıları ve Üreme Şekilleri

Mantarlar, beslenmelerini absorpsiyon ile gerçekleştiren, fotosentez yapamayan ve klorofil içermeyen çok veya tek hücreli ökaryotik mikroorganizmalardır. Mantarların farklı çevre koşullarına uyum sağlamaları hücre çeperinde içermiş oldukları kitin ve selüloz sayesinde. Bakterilerin aksine mantarlar, yüksek şeker konsantrasyonlarına dirençli olarak üreyebilirler (Kiraz 1996, Broks ve ark. 2001). Mayoz (eşeyli) ve mitoz (eşeysiz) bölünme özelliği taşırlar. Mayalar ve küfler olmak üzere iki grupta değerlendirilirler. Oda ısısı (20°C -

25°C) küfler, 35°C – 37°C’ de mayalar için idealisi seviyeleridir. Bazı türler her iki koşul da da üreyebilirler ki bunlara dimorfik (iki yapılı) mantarlar adı verilmektedir. Mayalar, tomurcuklanarak (*Candida* spp.) veya bölünerek (*Schizosaccharomyces pombe*) çoğalan tek hücreli mantar grubunda yer alırlar. Maya mantarları, kapsüllü veya kapsülsüz olabilirler. Tüm maya mantarları gram boyama yöntemiyle boyanıp gram pozitif özellik gösterirler. Küf mantarları ise gram negatif boyanma eğilimi gösterirler (Kiraz 1996; Koneman ve ark. 1997).

Candida’ ların tür düzeyinde tanımlanmasında morfolojik değerlendirmeler oldukça önemlidir. *Candida* türlerinin identifikasyonu hem makroskopik hem de mikroskopik özellikler birlikte değerlendirilerek yapılmaktadır. *Candida* türleri, ökaryotik hücre yapısında ve tek hücreli, 4-6 µm boyutlarında, besiyerinde ürediklerinde yuvarlak, opak, kremi, sarı, hamur benzeri veya mukoid tarzda koloniler oluştururlar. Bazı türlerin seksüel formları bulunsa da genellikle tomurcuklanarak çoğalırlar. Maya mantarları katı besiyerinde 25-37 °C’ de 2-10 gün içinde ürerler (Kiraz 1996; Oz ve Kiraz 2011).

Maya hücrelerinin tomurcuklanması sonucunda oluşan yavru hücreler bazen ana hücreden ayrılmazlar. Bu yavru hücreler uç uca dizilerek hif görünümü oluştururlar. Hif görünümü oluşturan bu yapılar psödohif (yalancı hif) adı verilmektedir. Gerçek hif yapısında ise hücre duvarları birbirine paraleldir ve boğumlanma görülmez (Kiraz 1996, İnci 1999, Tümbay 1999). Yalancı hiflerin ucunda, ortasında ya da yanında yerleşim gösterebilen, yuvarlak kalın duvarlı, çevre koşullarına dirençli bir yapı olan klamidiaspor oluşturabilirler. *Candida* türlerinde blastokonidyum, yalancı hif, klamidiaspor, germ tüp ve askospor oluşumu tür tanımında kullanılan özelliklerdir. *Candida* türlerinin identifikasyonu için önemli mikroskopik özellikler şunlardır;

1. Organizmanın büyüklüğü ve şekli,
2. Tomurcuğun yapıştığı yerin morfolojisi ve tomurcuk sayısı,
3. Bir kapsülün varlığı veya yokluğu,
4. Hücre duvarının kalınlığı,
5. Yalancı hiflerin varlığı,
6. Artrokonidyumların varlığı

Uygun şekilde hazırlanmış ve boyanmış bir örneğin dikkatlice incelemesinde önemli bilgilere ulaşmak mümkündür (Kiraz 1996).

2.5. Candida Hücresel Yapı

2.5.1. Hücre Sitoplazması

Candida hücresinin sitoplazmasında; membranla çevrili bir nükleus ve nükleus içerisinde çekirdekçik ve lineer kromozomlar bulunur. Ayrıca bunların yanında mitokondri, golgi cisimciği, 80 S ribozomları, yağ, protein, karbonhidrat vezikülleri ve olgun hücrelerde vakuoller de bulunmaktadır. Ayrıca mantarların yaşamında önemli rolü olan ve sitoplazmada bulunan hücre iskeleti, hücre duvarı ve hücre membranı ile bağlantılıdır. İskelet komponentlerinden olan mikrotübüller; membranın hareketliliğinde, aktin; sitoplazmik akışkanlıkta, miyozin ise aktinle birlikte organellerin hareketliliğinde rol oynarlar. Hücre iskeleti; mitoz bölünme, mayoz bölünme, tomurcuklanma, bazı enzimlerin düzenlenmesinde de rol almaktadır (Kiraz 1996; İnci 1999).

2.5.2. Hücre Membranı

Hücre membranı; moleküllerin iç ve dış ortamlara transferinde rol alan otoenzimler, kitin sentetaz gibi duvar komponentlerinin sentezinde rol alan enzimler ile *C. albicans'* in maya-hif dönüşümü ve hifal uçtan uzaması için gerekli olan sinyal iletiminde rol alan fosfolipaz C, adenilat siklaz, proteaz gibi enzimleri içerir. Ayrıca fosfatidil serin, fosfatidil etanolamin, fosfatidil kolin ve fosfatidil inozitol gibi fosfolipidler de hücre membranında bulunurlar. Candida' ların hücre membranındaki lipidlerin % 20' si steroldür ve bu sterollerin %95' i ise antifungal ilaçların birinci hedefi olan ergosterolden oluşmaktadır (Kiraz 1996; Whiteway ve Bachewich 2007).

2.5.3. Hücre Duvarı ve Antijenik Özellikleri

Hücre duvarı, mantar hücrelerinin büyüklüğünü ve şeklini tayin eder. Hücreleri çevresel koşulların olumsuz etkisinden koruyan, antijenik özellik gösteren ve bazı enzimleri içermeleri nedeniyle de fizyolojik aktiviteye sahip sert bir yapıda olduğu için osmotik basınca da karşı koyacak güçtedir (Kiraz 1996). Çeşitli moleküllerin hücre içine ve dış ortama taşınmasında, maya formundan hif formuna geçişte rol oynar. Hücre duvarı yaklaşık olarak %80-90 karbonhidrat, %5-15 protein ve %2-5 lipitten oluşmaktadır. Karbonhidratlar ise %20-30 mannoprotein , %50-60 beta gluklan ve %0,6-9 kitinden oluşur. Hücre duvarı komponentlerinin en önemlisi

olan mannan, Candida antijenleri ve virulans faktörleri arasında önemli bir değere sahiptir. Hücre duvarının özellikle en dış kısmı olmak üzere farklı kısımlarında da bulunan mannoproteinler adezyonda rol oynamaktadır ve enfeksiyonların serolojik tanısında hızlı ve erken sonuç veren uygun bir antijendir. Mannanın yapısal değişiklikleri ile tür ve alt tür ayrımı yapılır. Mannan hücresel ve humoral sistemi baskılayarak enfeksiyonun devamlılığını sağlar. β glukanlar hücre duvarının bütünlüğünden sorumludur. Maya ve hif formlarında dallanmış β -1,3 ve β -1,6 glikoz polimerleri bir arada bulunurlar. Kitin ise karbonhidratların % 0,5-3 gibi az bir kısmını oluşturmasına rağmen hücre canlılığı için önemli bir polimerdir (Kiraz 1996; Çerikoğlu 2002; Whiteway ve Bachewich 2007).



Resim 1: Mantar hücresinin mikroskopik görünümü

3. PATOGENEZ ve VIRULANS FAKTÖRLER

3.1. Patogenez

Konak savunma mekanizmaları ve mikroorganizmaların virulansı Candida enfeksiyonlarının gelişiminde önemli rol oynar. Candida türleri doğada yaygın olarak bulunmakla birlikte, insanların gastrointestinal sistem, deri, mukoza, üretra ve vajina normal flora üyeleri arasında da bulunurlar. İmmün sistemi sağlıklı bireyler, çevresindeki ve normal florasında bulunan mantarlara sürekli olarak maruz kalmalarına karşın mantar enfeksiyonu geçirme ihtimalleri çok düşüktür. Sağlam deri ve mukozaların da Candida enfeksiyonu gelişimini önlemedeki rolü büyüktür. Candida türleri, immünitesi bozulmuş ve predispozan faktörlerin varlığında fırsatçı patojen olarak karşımıza çıkarlar (Segal ve ark. 2005, Kuştimur 1994). Candida enfeksiyonunun patogenezini; adezyon, kolonizasyon ve invazyonu içeren zincirden oluşmaktadır. İlk aşama, mantarın konak dokusuna adherensi ile başlar. Sonra

oluşacak enfeksiyon öncesi florada bulunan mantarlar sayıca bir artış göstererek kolonizasyon oluştururlar ve kolonizasyonu da enfeksiyon izleyebilir. Enfeksiyon oluşumunda konağa ve patojene ait faktörler arasındaki denge önemlidir. Candida türleri, bir yandan deri de yaptığı enfeksiyonlarla daha çok yüzeysel enfeksiyonlara neden olurken bir yandan da bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda yaşamı tehdit eden ciddi enfeksiyonlara neden olurlar (Kuştımur 1994; Çerikoğlu 2008).

Normal bakteriyel flora, derinin ve gastrointestinal sistem mukozasının bütünlüğü ve hücrel ve humoral bağışıklık, konağı Candida enfeksiyonlarına karşı koruyan başlıca savunma mekanizmaları olarak kabul edilebilir (Kuştımur 1994). Yüzeysel maserasyona sebebiyet veren her türlü olay sağlıklı kişilerde de Candida enfeksiyonuna izin verir. Böyle durumda mantar hücreleri mukozaya saldırdığı zaman makrofajlar, dendritik hücreler, monosit, vs. yapılar tarafından konak yanıtı verilir. Bu yanıt; doğal yanıt hücreleri ile ilişkili PRR (pathern recognition receptor) reseptörlerinin, mikroorganizmaların korunmuş yapısı olan PAMP (pathogenassociated molecular pattern)' ı tanımları ile verilir. Mantarlara ait PAMP yapıları ise mannan, β -glukan, kitin ve protein yapılarıdır. T ve B lenfositleri de deri ve mukozada Candida türlerinin sistemik enfeksiyon oluşturmaya engel olurlar. Bu nedenle Candida' ların enfeksiyon oluşturabilmesi için hastada bir takım risk faktörlerin olması gerekmektedir. Bu konak risk faktörleri; hücrel immün yetmezlikler, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, bağışıklık sistemi baskılayan ilaçlar, diabetes mellitus gibi kronik hastalıklar, metabolik hastalıklar, düzensiz beslenme, nötropeni, organ transplantasyonu, malignite, kemoterapi uygulaması, uzun süreli takılı olan intavasküler kateter varlığı, intravenöz ilaç kullanımı, ileri yaş, vb. olarak sıralanabilir (Kuştımur 1994; İnci 1999; Kiraz 1999).

3.2. Virulans Faktörleri

Candida' lar bir takım özellikleri sayesinde konağın bağışıklık sistemini yenerek hastalık oluşturur. Virulans faktörler olarak adlandırılan bu özellikler, Candida' ların enfeksiyon oluşturdukları konakta, konağın savunma sistemlerine karşı kendilerini korumak üzere oluşturdukları mikrobiyal ürünler olarak bilinmektedir. Virulans faktörler konak hücreleri işgal ederek hücre membranının yapısını ve hücrelerin fonksiyonlarını bozarak hücre ölümünü gerçekleştirirler ve böylece konak dokuya yayılmaya başlarlar (Kuştımur 1994; Çerikoğlu 2012). Enfeksiyon yapabilmeleri için konak faktörlerinin uygun olması gerekse de,

mantarlarda farklı virülans faktörler görülmektedir. Virülans faktörlerden bazıları; adezinler, proteazlar, fosfolipaz, toksinler, hücre duvarı bileşenleri olarak sayılabilir (Culter 1991; Çerikoğlu 2012).

3.2.1. Adherens (Tutunma)

Candida enfeksiyonlarında ilk aşama, organizmanın konak hücre ve dokulara çeşitli proteinlerle tutunması ile başlar. *Candida* türleri hücre çeperine mannoproteinler, β -1,6 ve β -1,3 glukan ve kitin aracılığıyla tutunurlar. *Candida*' ların sahip olduğu bu tabaka, konak yüzeyine tutunmayı ve *Candida* kolonizasyonunu sağlamaktadır (Çerikoğlu 2012). Mantar hücrelerinin konak hücrelere bağlanabilmesi hücrelerin birbiriyle ilişkisiyle açıklanabilir. Mantar hücreleri negatif yüzey potansiyeline sahiptir. Bu sebeple birbiri ile yaklaşan iki ayrı hücre aynı negatif yüzey potansiyeline sahip olduğu için birbirlerini iterler. Ancak bu itme potansiyeline karşı mantarların yüzeyinde yer alan özgül hidrofobik moleküller, nonspesifik olarak negatif yüke sahip iki yüzeyin itici kuvvetlerine karşı koyar ve yüzeyindeki mukoza hücrelerine yaklaşırlar. Sonuçta, yüzeyde yer alan ligandlar mukoza hücresi yüzeyindeki reseptörlere geri dönüşüm olmaksızın antijen-antikor ilişkisine benzer bir şekilde özgül bir bağlanma gerçekleştirir (Culter 1991; Çerikoğlu 2012). Mantar hücre yüzeyinde hidrofobik maddelerin varlığı, adezinlerle birlikte konak hücre yüzeyine tutunmayı destekler. Ayrıca tutunma, biyofilm oluşumuna zemin hazırladığı için enfeksiyon gelişiminde önemli bir adımdır. *Candida* hücresinin yüzeye tutunmasında konağa ait immünolojik faktörler; gebelik, diyabet, hormonal durumdur. Ayrıca *Candida* hücresinin yüzey özelliklerinin, morfolojisinin, ısının ve ortam pH'nın da rolü büyüktür (Culter 1991; Huffnagle ve ark. 2000; Çerikoğlu 2012) . Konağa tutunma yeteneği en fazla olan *C.albicans*' ır. *C.tropicalis* ve *C. krusei* türlerinde de konağa tutunma yeteneği vardır. *C.glabrata*, *C.parapsilosis* ve *C.kefyr* türlerinin tutunma yetenekleri daha zayıftır. Fibronektin, laminin reseptörleri, fibrinojen bağlayan protein, mannoprotein ve adezin bilinen adezyon molekülleridir (Critchley ve Kouglas 1978; Çerikoğlu 2012).

3.2.2. Enzimler

Fosfolipazlar, konak hücre zarının başlıca kimyasal bileşenlerinden olan membran fosfolipitlerini, hidrolize ederek epitel hücrelerine tutunmada ve hücrenin

invazyonunda önemli rol alırlar. Hücre dışı fosfolipazlar, konak hücreyi tahrip ederek hücrenin yüzeysel yapılarını değiştirirler. Böylece adezyonu ve penetrasyonu kolaylaştırarak virülansa katkı sağlamış olurlar. Fosfolipaz aktivitesi en çok kan kültürlerinden izole edilen Candida' lar da saptanmıştır. Fosfolipaz aktivitesi gösteren türler arasında ilk sırayı *C.albicans* almakla birlikte, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.lusitaniae* ve *C.krusei* türlerinde de fosfolipaz etkinliği görülmüştür (Kuştımur 1994; Arıkan 1998). Salgisal asit proteazlar (SAP), karboksil ya da asit proteinaz olarak da isimlendirilirler. Aspartik proteazlar olan bu enzimler; konak hücre yüzeyini ve hücreler arası yapılarını parçalayarak mikroorganizmanın adezyon ile invazyonuna yardımcı olurlar . Üretilen hücre dışı proteazlar, kollajen, keratin, albumin, hemoglobün gibi proteinleri parçalayarak organizmanın deride kolonize olmasını ve dokulara yayılımını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca bu enzim mantar hücrelerinin ayrıca sitokin, kompleman, immunoglobülin gibi önemli savunma proteinlerinden kurtulmasına ve hedef hücre membran bütünlüğünü bozmasına yol açmaktadır (Arıkan 1998). Candida türlerinin konak doku hasarı, hidrolitik enzimlerin çevreye salınımı ile kolaylaşmaktadır. Bunlara örnek olarak, lipaz, esteraz ve fosfataz ve hemolizinler Candida türleri patogeneğinde rol oynayan diğer önemli enzimlerdir. *C.albicans* başta olmak üzere Candida türlerinin esteraz, fosfolipaz, proteinaz gibi enzimleri üretme yeteneği vardır. Hemolizinler, birçok patojen Candida türü tarafından üretilmekle birlikte virülansa olan katkısı net bilinmemektedir (Kuştımur 1994; Arıkan 1998; Çerikoğlu 2012).

3.2.3. Toksinler

C.albicans' ın endotoksin benzeri maddelerle birlikte hemolizin de ürettiği bilinmektedir. *C. albicans*' ın toksinleri; düşük ve yüksek molekül ağırlıklı toksinler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Yüksek molekül ağırlığına sahip olan toksinler; glikoproteinler ve kandidotoksin olmak üzere iki çeşittir. Bunlar hücre duvarında bulunurlar. Glikoprotein toksinler, toksik bileşikler olarak karbonhidrat (glikoz, mannoz) ve protein içerir. Kandidotoksin; farmakolojik, sitotoksik, immunolojik, enzimatik ve enfeksiyonu artırıcı etkileriyle birçok aktivite gösterir. Düşük molekül ağırlığına sahip olan toksinler; ölümcül etkinlikle yakından ilgilidirler.

İnvaziv kandidozlu hastalarda görülen enfeksiyonların, çoğu zaman gram negatif bakteri enfeksiyonlarından ayırt edilememesi, Candida toksinlerinin patogeneindeki rolünün kanıtı olabilir. (Kuştımur 1994; Çerikoğlu 2012).

3.2.4. Biyofilm

Candida türleri en önemli virülans faktörlerinden birisi biyofilm olarak adlandırılan mikrobiyal topluluklar oluşturmaktadır. Biyofilm, matriks ile örtülü, birbirine ve bir yüzeye veya bir ara yüzeye hareketsiz olarak tutunmuş halde yaşayabilen bir topluluktur. Endokardit gibi ciddi enfeksiyonlar biyofilm kaynaklı olabilmektedir (Çerikoğlu 2012). Bunun dışında biyofilm oluşumuna tıbbi gerece bağlı oluşan enfeksiyonlarda sık rastlanılmaktadır. Candida biyofilmleri farklı kateterlerde (santral venöz kateter, üriner kateterler), endotrakeal tüp, stent ve şantlar (santral sinir sistem şant), implantlar (kalp kapakcık), protezler (trakeo-özofageal konuşma, eklem, dental protezler) ve rahim içi araç (RİA) gibi çoğu tıbbi gereçlerde görülebilmektedir. Biyofilmi organize eden mikroorganizma topluluklarında, DNA dizisi olan genlerin fonksiyonel protein yapılarına dönüşmesinin düzenlenmesinde Quorum Sensing (hücre-hücre iletişimi)' in rolünün olduğu bilinmektedir. Hücre-hücre iletişimi sayesinde biyofilmin olduğu bölgede ve çevresinde enfeksiyonun kontrolü sağlanmaktadır. Hücre-hücre iletişimini sağlayan moleküllerin, hif gelişimine yardımcı olmak, hif gelişimini ve biyofilmi inhibe etmek gibi görevleri vardır. Candida türlerinin yabancı cisimlere slime (glikokaliks) faktörü aracılığı ile tutunması sonucunda hem sürekli bir enfeksiyon odağı gibi rol oynaması hemde vücudun savunma mekanizmalarından ve antifungal tedavinin etkisinden kurtulabilmesi mantar enfeksiyonları açısından oldukça önemli bir durumdur. Ayrıca Als 3 proteini de biyofilm oluşumunda oldukça gereklidir (Yücesoy ve Karaman 2004; Douglas 2006). Candida türlerinin biyofilm kalınlıkları 25-450 µm arasında değişmektedir. Ortam şartları, ph ve oksijen gibi çevresel faktörler ile fungal tür ve izolatlar, biyofilm oluşumunu ve matriks içeriğini etkilemektedir. Farklı Candida türlerinin, hatta farklı *C. albicans* suşlarının bile biyofilm oluşturma oranları farklıdır. *C. albicans* diğer türlere göre daha yoğun biyofilm yapmaktadır. *C. albicans* dışında *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. kefyr*, *C. krusei* suşları da biyofilm oluşturabilmektedir (Çerikoğlu 2012; Yücesoy ve Karaman 2004).

3.2.5. Dimorfizm

Dimorfizm, mantarın farklı koşullarda maya ve hif formu arasında geçiş yapabilmesinin tanımıdır. Morfolojik değişim farklı durumlara göre blastospor, germ

tüp, psödohif hif ve gerçek hif yapıların oluşumunu kapsamaktadır (Kuştımur 1994; Yücesoy ve Karaman 2004). *C.albicans* ve *C. dubliniensis* için dimorfizm; tek hücreli maya formundan hif ve yalancı hif olarak adlandırılan psödohif formlarına geçişin tanımıdır. Bu geçiş, mukozadaki koşullara benzerlik gösteren ve 37°C'nin altındaki sıcaklık, asidik ve serum bulunmayan bir ortam maya formunda üremeyi indüklerken, 37°C sıcaklık, nötr ph ve ortamda serum varlığı hif şeklinde üremeyi indükler. *C.albicans*, normalde deri ve mukozalarda kommensal olarak bulunmakla birlikte, konağa özgül bazı yapıların değişmesiyle maya formundan hif formuna geçerek hastalığa neden olurlar. Bazı araştırmacılar tarafından *C. albicans* maya, bazıları tarafından dimorfik, yine bazı araştırmacılar tarafından da hem maya hücreleri hem de çimlenme borusu ve psödohif oluşturabildikleri için polimorfik olarak sınıflandırılmaktadırlar (Kiraz 1996; Çerikoğlu 2012). *C. albicans* izolatlarında mayadan hifal forma dönüşümde, çevresel faktörler ve çeşitli genler önemli rol oynamaktadır. RBF1 geninin maya-hif geçişinde temel rolü vardır. Mayalar dokuda yayılım yaparken, hifler dokuda ileri hasar yapar. Ayrıca hifal hücreler endoteller tarafından fagositozu indükleyerek, *Candida* hücrelerinin kan dolaşımından kaçmasını sağlarlar. *C. albicans'* in hif oluşturabilme yeteneği de konak dokulara penetrasyon ve fagositozdan kaçabilme özelliklerini kazandıran önemli bir virulans faktörüdür (Çerikoğlu 2012).

3.2.6. Fenotipik Değişim

Fenotip değişim ile hücre morfolojisi, antijen özelliği, adezyon, oksidanlara ve nötrofillere duyarlılık, antifungal duyarlılık, aspartik proteinaz salgısında artış gibi bazı durumlarda değişim olabilir. Fenotipik değişimler sayesinde enfeksiyon sürecinde daha virulan ve etkin olurlar. Fenotipik değişim, *Candida'* ların konaktaki koşullara uyumunu kolaylaştırır. *C. albicans* suşlarından bazıları özgül sentetik besiyerinde düzgün, halka, yıldız, çizgili, şapka, buruşuk, tüylü gibi farklı görünümde koloniler meydana getirerek fenotipik değişim gösterirler. Sonucunda kolonilerin görüntülerinde, metabolik, biyokimyasal, moleküler ve hücre yüzeyi özelliklerinde değişiklikler ortaya çıkar. Bu değişimlerle bazı suşlarda beyaz-opak dönüşüm olarak adlandırılan varyant koloni morfolojileri ortaya çıkmaktadır. Bu süreçte beyaz, oval ve düzgün koloniler, gri ve buruşuk kolonilere dönüşmektedir. *C. albicans* WO-1 (White-opaque) suşunda gözlenen yuvarlak tomurcuklanan hücrelerden oluşan beyaz kubbeli koloniden, büyük, uzun, asimetrik tomurcuklanan

hücrelerden oluşan gri ve buruşuk koloni haline dönüşüm en tipik örnektir (Kiraz 1999; Çerikoğlu 2012).

3.2.7. Siderofor Üretimi

Siderefor demir içeren ve demirin taşınmasında görevli olan mikrobiyal maddedir. Mantarlar da üremeleri için demire ihtiyaç duyarlar. Demirin eksikliği veya yokluğu durumunda, düşük molekül ağırlıklı sideroforları üreterek, patojenik özelliklerini arttırmış olurlar (Howard 1999).

4. EPİDEMİYOLOJİ

Doğada geniş alanda bulunan *Candida* türleri hayvanların ve insanların sindirim sistemi normal florasında, toprak, su ve bazı bitkilerde de yaygın olarak bulunabilirler. Sağlıklı insanların deri ve mukozalarında normal flora üyesi olarak bulunmakla birlikte herhangi bir sebeple konak bağışıklık sisteminin bozulmasıyla patojenite özelliği kazanarak enfeksiyon yapmaya başlayabilirler. Bundan dolayı çoğunlukla insanların ağız, yutak veya gastrointestinal sistem ve vajina mukozasındaki maya flosanının aşırı çoğalması endojen enfeksiyonların kaynağı haline gelebilir. *Candida* enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu da zaten endojen kaynaklıdır (Tümbay 1999; Yeğenoğlu 2002). Bu mantarlar insanlara ilk olarak doğum yolu veya hemen ardından diğer kaynaklar ile geçerek normal flora ve mukozal yüzeylere kolonize olur. Daha çok gastrointestinal sistemde kolonize olmakla birlikte, üretra, vajina, tırnak altında ve deride de bulunurlar. *C.albicans* floradan en sık izole edilen patojen türdür (Yeğenoğlu 2002; Ural 2004) . Çoğu endojen kaynaklı enfeksiyon olmasına rağmen az oranda da olsa ekzojen kaynaklı enfeksiyonlar da olabilir ve bazı çalışmalarda kontamine materyallerle salgın olduğu görülmüştür. Yeni doğan bebeklerde tespit edilen oral kandidiyaz annedeki vajinal kandidoz ile doğrudan ilgilidir. Nozokomiyal *Candida* enfeksiyonları, insanların ağız ya da sindirim sistemindeki maya florasının aşırı çoğalması sonucunda ortaya çıkar ve bu da diğer enfeksiyonlar için en önemli basamağı oluşturur (Tümbay 1999). Özellikle yoğun bakım ünitesi sağlık çalışanlarının elleri, *Candida* türlerinin nozokomiyal bulaşmasında en önemli kaynaktır. Son zamanlarda geniş etki spektrumlu antibiyotik ve steroid ilaç kullanımı, kemoterapi tedavileri, DM artması, solid organ transplantasyonları, yaygın damar içi kateterizasyon ve flukonazol

kullanımı gibi sebeplerle albicans dışı Candida' ların etken olarak izolasyonlarında artış saptanmaktadır (Tümbay 1999; Yeğenoğlu 2002; Çerikoğlu 2012).

5. CANDIDA

Bu çalışmanın konusu olan Candida' lar fırsatçı patojenlerdir. Fırsatçı mantar enfeksiyonlarının sıklığı geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süre, kanser ve immünoşüpresif ilaçların yaygın kullanımı, organ transplantasyonu ve AIDS vakalarındaki artış sebebiyle son yıllarda giderek artmaktadır. Çevresel ve bireysel koşulların hastanın aleyhine geliştiği durumlarda yüzeysel hafif enfeksiyondan sistemik ağır enfeksiyonlara kadar değişen klinik tablolara neden olabilirler (Yücel 2002).

Candida türleri doğada yaygın görülen ve insanı en çok etkileyen patojenlerdir. İnsan ve hayvanların sindirim kanalı normal florasında, birçok bitkide, insan mukoza ve derisinde bulunurlar. Normal florada bulunan Candida türleri bağışıklık sistemi bozulmuş hastalarda yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara yol açabilirler. *C.albicans* tüm kandidoz formlarından en sık izole edilen tür olmuştur. Son zamanlarda invaziv tıbbi gereçlerin (eklem protezleri, kateter, yapay kalp kapakçıkları gibi) kullanımı giderek artmaktadır. Bu tıbbi gereçlerin yol açtığı mantar enfeksiyonlar hastaların morbidite ve mortalitesini giderek arttırmaktadır. Tıbbi gereçlerin mantar enfeksiyonları çoğunlukla patojenik Candida türleri, özellikle de *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C. glabrata* ve *C.parapsilosis* ile meydana gelmektedir (Yücel 2002; Segal ve Elad 2005).

5.1. Tıbbi Önemi Olan Candida Türleri

C. albicans

Candida albicans, normal insan mikrobiyotasının bir üyesidir. Ömür boyu zararsız bir komensal olarak bulunabileceği gibi bazı durumlarda, yüzeysel enfeksiyonlardan yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara kadar değişen durumlara yol açabilir. Bu mantarın patojenik potansiyeline katkıda bulunan çeşitli faktörler bulunmaktadır (Kiraz 1996, Tümbay 1999). Bunlar arasında konak hücrelere tutunma ve invazyona aracılık eden moleküller, enzimlerin salgılanması, maya-hif geçişi, biyofilm oluşumu, fenotipik değişim gibi bazı özellikleri bulunur (Kuştımur 1994). *C. albicans*, hücre duvarındaki mannan antijeninin yapısal farklılığına göre, A ve B olmak üzere iki serotipe ayrılmıştır. İmmün sistemi sağlam

bireylerde eşit dağılım görülürken, immün sistemi bozulmuş hastalarda serotip B' nin prevalansı daha yüksektir (Rinaldi 2000). *C. albicans*; SDA besiyerinde krem renginde, yumuşak kıvamlı, bazen balmumu görüntüsünde, S tipi düzgün koloniler oluşturur. Ayrıca kanlı agar ve EMB agar besiyerinde yıldız şeklinde çıkıntılar oluşturabilir. Mikroskopik incelemede oval blastosporlar ve pseudohifler görülür (Kiraz 1999; Hazen ve Howell 2003).

C. tropicalis

Candida tropicalis, *Candida non albicans* grubunun en yaygın patojenik maya türü olarak tanımlanmıştır. *C. albicans*' in öncülüğünde ikinci en ölümcül tür olarak kabul edilmektedir. Hematolojik malignitesi olan nötropenik hastalarda önemli bir patojendir. Ayrıca bu tür, *C. albicans*' ı geride bırakan çok güçlü bir biyofilm üreticisi olarak kabul edilmiştir. Bundan dolayı epitelyal ve endotelyal hücelere oldukça yapışkandır. Azoller, polienler ve ekinokandinlere karşı antifungal direnci olduğu bilinmektedir (Unat 1995; Kiraz 1196; Kothavade ve ark. 2010). *C. tropicalis*; SDA besiyerinde kremsi beyaz renkte, yumuşak, kenarları bazen düzgün bazen pürtüklü koloniler oluşturur. Mikroskopik incelemede, oval blastosporlar ve bol miktarda uzun yalancı hifler görülür (Rippon 1999).

C. dubliniensis

Candida dubliniensis, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ile enfekte olmuş bireyler ve AIDS hastalarının oral kavitelelerinden öncelikle elde edilen, konvansiyonel yöntemlerle *C. albicans* olarak tanımlanan ve A serotipine dahil edilen bazı *Candida* suşlarının farklı özellikler taşıdığına anlaşılması ile yakın zamanda (1995 yılı) tarif edilmiş yeni bir türdür. *C. dubliniensis* izolatları, rutin olarak kullanılan kültür ortamlarında 30 ve 37 °C' de iyi gelişir. *C. albicans*' tan, 45°C'de üreyememesi, kromojenik agarda daha koyu bir yeşil renk oluşturması, klamidosporların daha çok olması, ksiloz, trehaloz testi aktivitesinin olmaması ile ayrılır. Güçlü bir biyofilm üreticisi bu tür epitelyal ve endotelyal hücelere oldukça yapışkandır. *C. dubliniensis*' in önemli bir özelliği de flukonazole dirençli olmasıdır. *C. dubliniensis*; SDA besiyerindeki kolonileri, *C. albicans* tarafından oluşturulanlara benzer kremsi beyaz bir renkte, parlak ve düz kolonilerdir (Sullivan ve Coleman 1998; Rippon 1999).

C. krusei

Candida krusei, flukonazole doğal dirençli bir türdür ve özellikle hematolojik maligniteli hastalarda önemli bir hastane kaynaklı kandidoz etkenidir. *C. krusei* enfeksiyonlarının giderek artan önemine karşın bu mikroorganizmanın genetik farklılıkları ve moleküler epidemiyolojisi ile ilgili bilgiler sınırlıdır. *C. krusei*; SDA besiyerinde yassı, kuru, krem rengi, kenarları düzensiz koloniler oluşturur. Mikroskopik incelemede ovalimsi blastokonidyumları görülür (Tümbay 1999; Pfaller ve ark. 1996).

C. parapsilosis

Candida parapsilosis, onikomikoz gibi yüzeysel enfeksiyonlardan endokardit gibi invazif sistemik enfeksiyonlara kadar uzanan geniş bir yelpazede hastalık oluşturabilmektedir. Özellikle yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde görülmekle birlikte kandidemilerin en yaygın etkenlerinden biridir. Slime oluşturabilmesi önemli bir virulans özelliğidir. Ekinokandinlere karşı duyarlılıkları azdır. *C. parapsilosis*; SDA besiyerinde krem renginde, yumuşak ve çevresi dantel görümlü koloniler yapar. Mikroskopik incelemede bol miktarda yalancı hif üretir ve bu en önemli ayırt edici mikroskopik özelliğidir (Tümbay 1999; Trofa ve ark. 2008).

C. glabrata

Candida glabrata'nın *C. albicans*'tan sonra ikinci sıklıkta izole edilen tür olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle, yenidoğanlardaki idrar yolu enfeksiyonlarında, ileri yaş grubunda ve solid tümörlü hastalarda insidansı daha yüksektir. *C. glabrata*; SDA besiyerinde nispeten küçük olan nispi büyüklükleri hariç, diğer *Candida* türlerinkilerden bazen ayırt edilemeyen parlak, pürüzsüz, krem renkli koloniler oluştururlar. Mikroskopik incelemede ise küçük yuvarlak, elipsoid maya hücreleri görülür (Pfaller 1996; Paul ve ark. 1999).

C. kefyr (C. pseudotropicalis)

Candida kefyr, hematolojik maligniteler (HM) olan hastalarda ortaya çıkan bir patojendir. Ayrıca *C. kefyr* vajinal, üriner ve gastrointestinal sistem enfeksiyonları ve pulmoner enfeksiyonlara neden olmaktadır. *C. kefyr*; SDA besiyerinde beyaz, krem veya pembe renginde, yumuşak görünümde S tipi koloniler oluşturur. Kökenlerin birçoğunda yalancı hif üretilir. Uzun eliptik ve silindirik blastosporlar oluşturarak birbirine paralel dizilim gösterir (Rinaldi 2000; Kocabay ve ark. 2005).

C. guilliermondii

Candida guilliermondii, en sık onikomikoz ile ilişkii olan nadir bir Candida türüdür ve nadiren invaziv mantar enfeksiyonun bir nedeni olarak görülür. Nadir bir invaziv kandidiyaz nedeni olmasına rağmen, *C. guilliermondii* türünün antifungal ajanlara karşı azalmış duyarlılık gösterdiği bilinmektedir. Bazı izolatları amfoterisin B' ye dirençlidir. Olgu sunumları ve küçük anketler dışında, epidemiyolojisi ve antifungal duyarlılık profili hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. *C. guilliermondii*; SDA besiyerinde beyaz renkte tereyağmsı görünümde, kenarları düz veya pürtüklü koloniler oluşturur (De Hoog ve ark. 2000; Pfaller ve ark. 2006).

C. lusitaniae

Candida lusitaniae, nadir bir kandidemi sebebidir. Bazı izolatların amfoterisin B' ye dirençli olmasıyla dikkat çekicidir. *C. lusitaniae*; SDA besiyerinde beyaz ile krem arası renkte, yumuşak ve mat görünümde koloniler oluşturur. Mikroskopik incelemede oval blastokonidyumlar görülür (Tümbay 1999; De Hoog ve ark. 2000; Pietrucha-Dilanchian 2001).

C. lipolytica

Candida lipolytica, ancak insanlarda ortaya çıkan ve nadir görülen patojenik bir türdür. İntravasküler kateterizasyon yoluyla kan dolaşımına, özellikle hastanede yatış sırasında immün sistemi baskılanmış hastalarda santral venöz sisteme yerleşebilir. *C. lipolytica*; SDA besiyerinde krem renginde kenarları düzgün koloniler oluşturur. Mikroskopik incelemede kısa zincirli, yalancı hifler boyunca uzanan blastokonidyumlar görülür (Liu ve ark. 2013).

C. famata (Candida flareri)

Candida famata, fizyolojik olarak *C. guilliermondii* ile ayrılamamaktadır. İnsanlarda nadir bulunan enfeksiyon etkenidir. *C. famata*, invaziv kandidiyazisin %0.2 - %2'sini oluşturur. Ekinokandinler ve azollere karşı duyarlılığı düşüktür. *C. famata*; SDA besiyerinde krem renginde yumuşak koloniler oluşturur. Mikroskopik incelemede elipsoidal, tomurcuklu blastosporlar görülür, yalancı ve gerçek hif oluşturmaz (Tümbay 1999; Beyda ve ark. 2013).

C. zeylanoides

Candida zeylanoides, fizyolojik özellikleriyle *C. albicans*' a benzemektedir. *C. zeylanoides*, insan patolojisinde nadiren yer alan bir türdür. 1989-1998 yılları arasında, Wollongong NSW' de bu türe bağlı iki onikomikoz vakası görülmüştür. *C. zeylanoides*; SDA besiyerinde krem renginde, nemli, parlak ve bazen de kıvrım şeklinde koloniler oluşturur. Mikroskoptaki incelemede, yalancı hifler ve fuziform blastosporlar görülmektedir (Crozier 1993; Tümbay 1999).

C. rugosa

Candida rugosa, bazı coğrafi bölgelerde enfeksiyon nedeni olarak ortaya çıkan bir türdür. Yapılan çalışmalarda invaziv mantar enfeksiyonlarının nedeni olan nadir bir tür olarak görülmüş ve bundan dolayı *Candida rugosa* yakın zamanda ortaya çıkan “gelişmekte olan” bir fungal tür olarak gösterilmiştir. En fazla Latin Amerika bölgesinde ve kandidemi sebebi olarak görülmüştür. Bu türün sebep olduğu olgulardaki en fazla görülen risk faktörlerinin yanık yarası ve nistatin profilaksisi kullanımı olduğu bildirilmiştir. Azole karşı düşük duyarlılığa sahip *Candida* türüdür. *C. rugosa*; SDA besiyerinde krem renginde yumuşak koloniler oluşturur. Mikroskopik incelemede, ovalimsi blastokonidyumlar görülür (Pfaller ve ark. 2006).

6. CANDIDA ENFEKSİYONLARI (KANDİDİYAZ)

6.1. Yüzeysel Kandidiyaz

Oral Kandidiyaz

Oral Candida enfeksiyonları immün sistemi baskılanmış kişilerde görülür. Bunlarda en sık etken *C. albicans'* tir. Thrush/pamukçuk olarak bilinen pseudomembranöz oral kandidiyaz, daha çok kanser hastalarında, AIDS' li hastalarda ve süt emen bebeklerde görülür. Lezyonlar dişeti, dil ve ağız içi yüzeylerde krem benzeri beyaz lezyonlarla karakterizedir ve ağrısız seyreder. Atrofik kandidiyaz, akut ve kronik faz da seyreder. Akut atrofik kandidiyaz, genellikle geniş spektrumlu antibiyotik ve kronik steroid kullanan hastalarda, oral mukozanın herhangi bir yerinde görülebilmekle birlikte çoğunlukla dilin dorsumunu ve damağı tutar, eritemli ve ağrılıdır. Kronik atrofik kandidiyaz, genellikle ağızdaki protezler ile ilişkili olarak orataya çıkar. Dudak kenarlarında ağrılı ve eritemli fissürler görülebilir (Angular chelitis). Kandidal lökoplaki, azda olsa belli oranda kansere çevrilebilmesi nedeni ile önemli bir hastalıktır. Genelde bağışıklık sistemi zayıflamış olan kişilerde görülmekle birlikte yaşlı ve yenidoğanlarda görülme riski daha fazladır (Özdemir ve Bilen 2015).

Candida Özofajiti

Oral kandidoza bağlı olarak oluşabildiği gibi ondan bağımsız olarak da ortaya çıkabilir. Genellikle AIDS' li ve bazı kanser tedavisi alan hastalarda görülmektedir. Hastalarda ağrılı, güç yutma ve diğer bakteriyel özofajitlerden ayırt edilemeyen septomlar görülür. Candida özofajiti tanısını koyabilmek için endoskopi yapılması, eşliğinde biopsi örneğinin alınıp incelenmesi gerekmektedir. Endoskopi esnasında yoğun inflamasyon ve pamukçuk benzeri beyaz lezyonlar görülmektedir (Tümbay ve Karakartal 1994).

Vulvovajinal Kandidiyaz

Candida, kadınların %25' inde normal vajen florası içinde kolonize halde bulunmaktadır. Ancak herhangi bir patonetiye durumunda enfeksiyonların %89-%92' sinden *C. albicans*, çok az oranda da olsa diğer türler (*C. glabrata* ve *C. tropicalis*) sorumludur. Üreme çağına gelmiş ve immün sistem yetmezliği olan kadınların yaklaşık %75' ini etkileyen bir patojendir. Genellikle cinsel ilişki ile bulaştığı bilinmesine rağmen, ortaya çıkması için cinsel ilişki şart değildir. DM, gebelik ve

geniş spektrumlu antibiyotik, sıkı ve sentetik iç çamaşırı kullanılması önemli risk faktörleridir. Vajinal bölgede yanma, ödem, kaşıntı olup beraberinde beyaz renkli süt keşiği kıvamında ve kötü kokulu bir akıntı görülmektedir (Tümbay ve Karakartal 1994; Kutlugül 2009).

Kronik Mukokutanöz Kandidoz

Hücre sel bağışıklığın bozulması sonucu ortaya çıkan özellikle *C. albicans*' in etken olduğu kompleks bir mantar enfeksiyonudur. T lenfositlerinin eksikliğinde, genellikle çocukluk döneminde başlayan ve tedavisi uzun sürebilen, saçlı deri, cilt, tırnak ları tutan bir Candida enfeksiyonudur. Bu sendromda tırnaklarda kalınlaşma, tırnak diplerinde kızarıklık ve ödem oluşumu izlenirken, deride de eritemli lezyonlar görülmektedir. Genelde sistemik ve yayılımcı özelliği olmayan bir enfeksiyondur (Tümbay ve Karakartal 1994; Kılıç 2005).

Candida Dermatitisi

İntertrigo, deri kıvrımlarında, derinin sıcak ve nemli kat bölgelerinde (meme altı, anüs çevresi, koltuk altı ve parmak araları) görülür. DM, obezite ve immün sistem bozukluğu olan hastalar bu enfeksiyon için riskli gruptadırlar. Lezyonlar, veziküller ve püstüller şeklinde olup maserosyana kadar ilerleyebilir. Enfeksiyon bölgesinde çok şiddetli acı ve kaşınma olabilir. Diyaper döküntüsü ise bebeklerde bez ile temas eden, tüm perianal bölgeye yayılan ve muhtemelen GİS kaynaklı olduğu düşünülen enfeksiyondur (Tümbay ve Karakartal 1994).

6.2. Sistemik Kandidiyaz

Kandidemi

Sistemik kandidozun en sık karşılaşılan şeklidir. Hastalardan alınan kan kültüründe Candida türlerinin izole edilmesi ile tespit edilir. Kan kültüründe üreyen maya mantarları kontaminasyon olarak değerlendirilemeyecek kadar önemlidir. Kandidemi, toplum kaynaklı bir enfeksiyon olarak sık görülmez, daha çok hastane kaynaklı bir komplikasyon olarak ortaya çıkmaktadır. Kandidemi mutlaka tedavi edilmelidir. Ancak kandideminin klinik belirti ve bulgularının spesifik olmaması nedeniyle tanı ve tedavisi zorlukla yapılmaktadır. Kandidemi, tüm hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonları arasında üçüncü, yoğun bakım ünitelerinde ise dördüncü sırada yer almaktadır. Kanseri hastaları, DM olanlar ve SVK kullanılan hastalar kandidemi açısından yüksek riske sahiptirler. Kandidemi enfeksiyonu sebebiyle oluşan

ölüm hızı %46-75 gibi yüksek bir seviyede olup, altta yatan hastalıkların ciddiyeti ile bağlantılıdır. Bu enfeksiyonların mortalite oranları tanı ve tedavi olanaklarına rağmen %50' ye ulaşabilmektedir. *C. albicans*, kandidemi etkeni olarak tüm dünyada ilk sırayı alan türdür (Wilke 2007; Gudlaugsson ve ark. 2003).

Yaygın (Dissemine) Kandidoz

Dissemine kandidoz, *Candida* enfeksiyonunun birbirine komşu olmayan organlarda ortaya çıkması sonucu oluşur. Bu organlara bulaşma dolaşım sistemiyle meydana gelmektedir. Klinik belirtileri; geniş etkili antibiyotik tedavisine rağmen düşmeyen ateş (>38 0C, günde birden fazla yükselip düşme, bazen >40 0C), yaygın şekilde karın ağrısı, bulantı ve kusma, karaciğer, dalak ve böbrekler de tutulum olabilmesi nedeniyle alkalen fosfataz yüksekliği ve hastanın vücudundaki bazı bölgelerinde *Candida* izole edilmesidir. Tanı; kan kültürü, karaciğer biyopsisi, MR, BT ve USG sonuçlarına göre koyulmaktadır. Akut lösemi ve nötropenik hastalar yaygın kandidoz açısından riskli gruptadır (Tümbay 1994; Masood 2005).

Solunum Sistemi Kandidiyazisi

Solunum sistemi *Candida*' ları, bazen alerji ile ilgili durumlarda, bazen bronşit veya pnömoni belirtileriyle seyreder, plevra boşluğuna açılarak ampiyeme sebep olabilir. Genelde altta ciddi bir hastalığı olan kişilerde görülebilmektedir. Antibiyotikler ve steroidler veya diğer hazırlayıcı bir sebep olmadan beliren ve ölümlü biten ivergen bronkopnömoni de gelişebilir. Bronş kandidiyazisi öksürük, balgam atma gibi belirtiler gösterir, süregendir, radyoloji bulgularında bronş çevresinde kalınlaşmalar ve çizgi halinde fibröz tabaka bulunur. Akciğer kandidiyazı hafif ateş, öksürük, ayrıca balgamla (kanlı olabilir) belirti gösterir. Muayenede bronkopnömoni veya pnömoni bulguları saptanabilir (Unat 1995).

Kandidüri ve Üriner Sistem Kandidozları

Üriner sistem enfeksiyonunun sebebi genellikle bakteriler olmakla birlikte az oranda da olsa mantarlar neden olmaktadır. Bunlar arasında da *Candida* türleri ilk sırayı almaktadır. *C.albicans* ise en sık görülen patojen türdür. Üriner sistem kandidozu, üriner sistem ile böbreğin *Candida* enfeksiyonlarını birlikte kapsamaktadır. Kandidüri normal popülasyonda nadiren saptanan bir hastalıktır. Hastalardan alınan idrar örneklerinden yapılan kültür testinde *Candida* tespit edildiğinde, sadece üriner sistem enfeksiyonu olarak değil; kontaminasyon,

kolonizasyon veya sistemik kandidoz olabileceği düşünülerek ayrımının iyi yapılması gerekmektedir. Çünkü; kandidüri kontaminasyon veya kolonizasyon gibi genellikle tedavisi gerekmeyen bir bulgu olabileceği gibi üriner sistem enfeksiyonu ya da tedavisi yaşamsal önem taşıyan yaygın bir sistemik kandidoz enfeksiyon bulgusu olabilir (Tümbay 1994). Candida üremesi tespit edilen hastalardan, tekrar ve uygun bir koşulda alınan idrar örneklerine yapılan kültürde kandidüri görülüyorsa kontaminasyon olasılığı yüksektir. Candida türlerinin insanların normal cilt florasında bulunduğu göz önünde alınarak değerlendirme yapılmalıdır. Kolonizasyon olma olasılığı sağlıklı kişilerde nadirdir. Özellikle idrar sondası takılan hastalar olmakla birlikte, DM olan hastalar, geniş spektrumlu antibiyotik kullananlar, yaşlılar, kanser hastaları, hamileler mukozalarında kolonizasyon olma olasılığı bulunan riskli gruptaki kişilerdir. Hastalarda risk faktörlerinden bulunması, klinik muayene bulgularının normal olması ve idrar da lökosit bulunmaması kolonizasyonu destekleyebilir. Tekrar alınan idrar örneklerinde kandidüri bulgusu tespit edilirse bu bulgunun kolonizasyon ve enfeksiyon açısından değerlendirilmesi gereklidir. Bakteriyel üriner sistem enfeksiyonu için kullanılan koloni sayısı ve lökosit tespiti gibi kriterler, Candida' ları ayırt edici özellikteki bir kriter değildir. Hastalarda düzeltilebilir faktörlerin (sonda değiştirilmesi, DM kontrolü veya kullandığı antibiyotiklerin kesilmesi) değiştirilmesiyle birlikte tedavi gerekmeden kandidüri kaybolabilir. Ancak böbrek transplantı ve immunsupresyon, nötropeni, lösemi, kemik iliği transplantasyonu, üriner sistem bozukluğu gibi nedenlerin bulunduğu sistemik mikoz açısından riskli gruptaki hastalarda kandidüri saptandığında, derin bir kandidoz şüphesi kesinlikle ekarte edilmemelidir (Tümbay 1994; Sobel ve ark. 2000; Kartal 2009).

Gastrointestinal Sistem Enfeksiyonu

Sağlıklı bireylerin GİS normal florasında bazı Candida türleri bulunmaktadır. Bu Candida' lar gastrointestinal sistemde hastanın immün sistemi baskılandığında mukozada enfeksiyona sebep olabilir. Özofagustan sonra mide enfeksiyonunun en çok geliştiği organdır. Ayrıca, mide de enfeksiyon geliştiği zaman yaygın mukoza tutulumu da olmaktadır. Gastrointestinal sistemdeki tutulum derin ülserlere, perforasyonlara ve kanamaya yol açabilir. Perforasyon oluşan hastalarda yaygın bir şekilde enfeksiyon meydana gelebilir. En çok kanser hastalarında

görülmekle birlikte hastalarda yapılan endoskopik incelemede midede, ince ve kalın bağırsakta beyaz plaklar ve ülserler görülmektedir (Tümbay 1994).

Kardiyak Endokarditi

En sık *C. albicans* olmakla birlikte, *C. albicans'* dan başka diğer türlerinde (*C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* gibi) endokardit ve perikardit vakalarına neden olduğu bildirilmiştir. Kalpte perikard, miyokard ve endokard fungal enfeksiyonun oluşacağı yerlerdir. Bu enfeksiyonda vejetasyonlar büyük olabileceği için diğer organlara emboli atma oranı yüksektir. Kalp ameliyatından sonra çok defa endokardit vakaları görülebilmektedir (Unat 1995).

Santral Sinir Sistemi Kandidiyazisi

Santral sinir sistem (SSS) enfeksiyonları yaşamı tehdit eden ve yüksek mortalite ile giden bir hastalıktır. Genellikle dissemine kandidozun etkisiyle ortaya çıkmaktadır. En sık görülen akut menenjit ve beyin absesi enfeksiyonlarında en çok *Candida* türleri izole edilirler. *Candida* menenjiti geçiren hastalarda başka organlarda tutulum olmakla birlikte, beyin parenkimide etkilendiyse mikroabseler şeklinde tutulum görülür. Özellikle travma, kemoterapi almak, solid organ transplantasyonu, kortikosteroid kullanımı, ağır yanık vakaları, kafa kırığı (pnömokoksis menenjit), alkol kullanımı gibi risk faktörlerinin varlığı SSS enfeksiyonunun gelişmesini kolaylaştırıcı faktörlerdir (Tümbay 1994; Gudlaugsson ve ark. 2003)

Osteomyelit ve Artrit Kandidiyazisi

Açık kırık kemik yaralanması olanlarda, yeni doğmuş bebeklerde, kanser ve DM hastalarında osteomyelit ortaya çıkabilir. Osteomyelit, nadir görülmekle birlikte enfeksiyon geliştiği zaman ciddi klinik seyirlidir. Radyoloji incelemesi ile bulunan bulgular sağlıklı olmayan ve genelde kan kültürleri negatif olan osteomyelit enfeksiyonunun tanısı kemik biyopsisi incelemesi sonrası konulabilmektedir. *Candida* artriti de en sık lösemi hastalarında görülür. Bu enfeksiyon sonucu hastalıklı eklem çevresi zarar gördüğü için hastaların eklem yerlerinde tutulumlar meydana gelir. Eklem yerlerinden alınan sıvı (sinoviyal) da *Candida* üretilmesi tanı için önemlidir (Tümbay 1994; Gudlaugsson ve ark. 2003).

Göz (Oküler) Enfeksiyonları

Bakteriyel enfeksiyonlara göre nadir görülmelerine karşılık enfeksiyon oluşturmaları durumunda ciddi klinik tablo ortaya çıkartırlar. Enfeksiyonlara en sık neden olan tür *Candida albicans*' tır. Korneanın inflamatuvar tutulumu sonucu keratit; göz kapaklarındaki travmayı takiben Candida' nın gözün içinde yayılımı sonucunda ise endoftalmit ortaya çıkar. En önemli risk faktörleri arasında korneal travmalar, immüsupresyon, kortikosteroid kullanımı, kontakt lens kullanımı, cerrahi girişimler, antibakteriyal ilaç kullanımı sıralanabilir (Tümbay 1994; Gudlaugsson ve ark. 2003).



7.ÖRNEKLERİN ALINMASI TAŞINMASI, SAKLANMASI ve LABORATUVAR TANI YÖNTEMLERİ

7.1. Örneklerin Alınması Taşınması ve Saklanması

Candida türlerinin mikroskopik ve koloni morfolojileri birbirlerine benzediği için onların ayırımı laboratuvarında çeşitli fizyolojik testlerle yapılır. Candida' ların hızlı tanımlanabilmesi ve idendifikasyonlarının yapılabilmesi için örnekler, uygun ve steril şartlarda laboratuvar ortamına gönderildikten sonra bir dizi işleme tabi tutulur. Candida enfeksiyonu kuşkusu olduğunda örneklerin alınması veya laboratuvara gönderilmesinde özel işlemlere gerek duyulmamakla birlikte, örnekler alınıp laboratuvara gönderildiğinde bazı mantarların üst düzeyde enfeksiyöz olabileceği veya rutin olmayan üreme koşulları gerektirebileceği ekarte edilmemelidir. Kuşkulu etyolojik etkene ait bu tür bilgiler, örneklerin işleme alınmasından önce laboratuvar birimine bildirilmesi gerekmektedir. Örnekler laboratuvara iki saatten önce ulaşmalıdır. Gecikme durumunda steril olan örnekler 37°C' de saklanmalıdır. Normal flora ile kontamine olma olasılığı yüksek örnekler ise +4°C' de saklanmalıdır. Candida' lar normal buzdolabı ısısına dayanıklıdır (Kiraz 1999; Mikoloji ünitesi test rehberi 2013).

7.2. Laboratuvar Tanı Yöntemleri

Mantar enfeksiyonlarının tanısında direkt mikroskopik inceleme, boyalı preparatlar ve kültür yöntemleri gibi klasik yöntemler önemini korumaktadır. Ancak febril nötropenik hastalarda invaziv mantar enfeksiyonlarla sık karşılaşılmaktadır. Bu hastalarda nötropeni varlığı nedeniyle invaziv tanı yöntemlerinin yeterince uygulanamaması ve kültür sonuçları çıkana kadar geçen süre tedavide önemli gecikmelere yol açmaktadır. Bu nedenle invaziv mantar enfeksiyonlarda tanı klinik bulgular, radyolojik ve laboratuvar bulgularının birleştirilmesi esasına dayanmaktadır. Mikoloji laboratuvarına en sık gönderilen örnekler, solunum yolu örnekleri (balgam, bronkoalveolar lavaj, vs), steril vücut sıvıları (beyin omurilik sıvısı, periton sıvısı, vs), doku-biyopsi, eksuda, irin, idrar, kan, göz (kornea kazıntı, vs), saç, tırnak, deri kazıntısı örnekleridir (Kiraz 1999; Mikoloji ünitesi test rehberi 2013).

7.2.1. Örneklerin Direkt İncelenmesi

Klinik bir örnek, işleme alınmadan önce, uygun bir şekilde direkt olarak incelenmelidir. Bu inceleme, laboratuvar çalışanına ve klinisyene bir ön

identifikasyon yapma olanağı sağlayacak ve belirli patojen mayaların varlığını veya yokluğunu saptamada yardımcı olacaktır. Ayrıca örneğin tanısı açısından hızlı ve ucuz bir yöntemdir. Bir örnekteki mantarların ilk gözlenmesinde, ıslak preparat veya GRAM boyama, GİEMSA, kalkofor beyazı, metilen mavisi, WRİGHT, periyodik asit schiff (pas), methenamin gümüş boyası ile boyanan preparatlar ve %20' lik KOH gibi evrensel yöntemler kullanılmaktadır. Ancak, kapsül saptamak için hazırlanan çini mürekkebi preparasyonu gibi diğer yöntemler, yalnız mayalar için kullanılmaktadır. Bu preparasyon, idrar, BOS ve benzeri santrifüjlenen örnekleri ve bunların kültürlerini incelemek için kullanılmaktadır. Bu yöntem, mürekkebin homojen dağılımını sağlayamayan balgam veya benzeri örnekler için genelde yararlı değildir (Kiraz 1999; Mikoloji ünitesi test rehberi 2013; Willinger ve ark. 2014).

KOH (potasyum hidroksit) ile inceleme mantar enfeksiyonlarının tanısında en kullanışlı yöntemdir. Mantar şüpheli örneğin incelenmesinde %20' lik konsantrasyonda KOH ile hazırlanmış preparat tercih edilmektedir (Segal ve Elad 2005). KOH, konak hücrenin keratinize yapılarını sindirirken mantarlara zarar vermediği için mikroskopta mantar elemanlarını görmek mümkün olmaktadır. Preparatı hazırlamak için örnekten bir miktar alınarak, bir damla KOH çözeltisi ile lam üzerinde karıştırılır, 20-30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra incelenir. İnceleme sonucunda tomurcuklanan maya hücreleri, hif ya da yalancı hiflerin görülmesi tanıda değerlidir. Direkt mikroskopik incelemede negatif sonuç, mantar enfeksiyonu olasılığını ortadan kaldırmamaktadır. Bu yöntemin dezavantajı; hif yada maya formlarına benzer yapıların oluşması nedeniyle deneyim gerektirmesi ve bekletildikçe kristal yapıların oluşması sonucu değerlendirmenin zorlaşmasıdır (Kiraz 1999, Segal ve Elad 2005, Willinger ve ark. 2014). Mukozal enfeksiyonlarının (oral, vajinal, v.s) direk mikroskopik incelemesinde keratinolitik olan KOH' dan ziyade, tuzlu su, kalkoflor veya laktofenol pamuk mavisi ile ıslak preparat ya da GRAM, GİEMSA, metilen mavisi boyayarak inceleme tercih edilmektedir (Segal ve Elad 2005). Gram boyama ile incelemede maya hücreleri ve yalancı hifler pozitif olarak boyanır. Mukoza yüzeylerinde Candida türleri kolonize olarak bulunabildikleri için direkt incelemede mayaların yanısıra hiflerin görülmesi enfeksiyonun göstergesi olarak değerlendirilebilir. Ayrıca lam lamel arası preparatların yapılmasında kullanılan KOH çözeltisine %40 dimetil sülfoksit katılarak eritici kabiliyeti artırılması önerilmiş ve yapılan çalışmalarda yöntemin

özellikle tırnak örnekleri için daha iyi olduğu gözlemlenmiş (Yücel ve Sezgiç 1998; Kiraz 1999).

Kalkoflor beyazı, mantar hücre duvarında bulunan β 1-3 ve β 1-4 polisakkaritlerine özellikle selüloz ve kitine bağlanarak, filtre edilmiş UV ışığı altında mavi-yeşil floresans verir ve mantarın saptanmasını kolaylaştırır. Floresans boyama ile inceleme hızlı ve duyarlı bir yöntemdir. Ancak floresans mikroskobu gerektirmesi, kollajen liflerin floresan vermeleri ile hif olarak değerlendirilebilmesi dezavantajlarıdır (Kiraz 1999).

PAS ve methenamin gümüş boyası, mantarların boyanmasında kullanılan kimyasaldır. Çünkü mantarlar dokuda en iyi methenamin gümüş boyası ile gösterilmektedir. Mantar elemanları sarı ya da yeşil bir zemin üzerinde siyah renkte ve çok belirgin olarak görünürler. Ancak bu boyalar mikrobiyoloji laboratuvarlarından çok histoloji ve patoloji laboratuvarlarında kullanılan özel boyalardır (Tümbay 1994; Kiraz 1999).

Laktofenol pamuk mavisi; içerisindeki anilin boyası mantar hücrelerinin dış duvarını boyayarak mantarların mikroskopta görünebilirliğini artırır.

Çini mürekkebi; Kapsüllü mayaların görüntülenmesinde kullanılır. Kapsül çini mürekkebi içine almadığından mayanın etrafında şeffaf bir zon izlemesini sağlar. Örneklerde Cryptococcus aramalarında çini mürekkebi sık kullanılmaktadır (Tümbay 1994; Kiraz 1999).

7.2.2. Kültür

Sistemik mantar enfeksiyonların tanısında etkenin izole edilmesi için hastalardan alınan örneklerin kültürünün yapılması altın standart yöntem olarak bilinmektedir. Candida' lar hem normal florada hem de patojen olarak bulunabildikleri için; kontaminasyon, kolonizasyon ya da sistemik enfeksiyon açısından kültür sonuçları dikkatle değerlendirilmelidir. Candida türlerinin izole edilmesinde primer besiyeri olarak Sabouraud dekstroz agar (SDA) besiyeri kullanılmaktadır. SDA besiyerinde, maximum fungal gelişme yüksek karbohidrat varlığında sağlanır. SDA besiyerinde bakterilerin gelişmesi düşük pH ile baskılanmaktadır. SDA besiyerinden başka Emmons modifiye SDA, beyin kalp infüzyon agar (BHI), Sabouraud beyin kalp infüzyon (SABHI) agar, inhibitör mold agar, mycosel/ mycobiotic agar gibi besiyerleri kullanılmaktadır. Klinik

materyallerin türüne göre besiyerleri uygun olarak seçilmelidir. Eğer bakteri kontaminasyonu yüksek bir materyalden izolasyon yapılacak ise hazırlanan besiyerlerine uygun bir antibiyotik (sikloheksimit, kloramfenikol, gentamisin) katılması önerilmektedir. Bu sayede besiyerleri daha seçici hale getirilir. Ancak bazı Candida suşları birtakım antifungal ajanlara duyarlı ya da dirençli olabildikleri için değerlendirmede bu hususun göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Kültür için besiyerine ekilen örnekler oda ısısında (22-26°C) ve 37°C' de inkübasyona bırakılır. Genellikle 24-72 saat arasında üremektedirler (Yıldırım 1999; Kiraz 1999; Tümbay 1999; Sutton 2007). Kan kültürü yönteminde ise; Septi-Check (BD Diagnostic system), ESP sistemi (Trek Diagnostic), BacT/ALERT sistemi (BioMérieux), BACTEC (BD Diagnostics Sparks) VersaTREK (Trek Diagnostic Systems) gibi ticari sistemleri kullanılmaktadır. Ayrıca kan kültürlerinde lizis santrifügasyon yöntemi uygulanmasının duyarlılığı oldukça fazladır (Tümbay 1999; Segal 2005).

7.2.3. Candida' ların İdentifikasyonu

Candida türlerinin konvansiyonel yöntemlerle tanımlanması; makroskopik olarak morfolojik karakterlerin incelenmesi (besiyerinde oluşturdukları koloni görünümü ve rengi), mikroskopik olarak morfolojik karakterlerin incelenmesi (hif veya yalancı hif oluşumu, germ tüp ve klamidospore oluşturma yeteneği, blastosporların yapısı ve yerleşim şekilleri) ve biyokimyasal özelliklerin (karbonhidrat fermantasyon ve asimilasyonu, nitrat asimilasyon, üreaz testleri) değerlendirilmesi ile yapılır (Kiraz 1999; Neppelenbroek ve ark. 2014).

7.2.3.1. Çimlenme Borusu (Germ Tüp) Testi

Candida' ların tanımlanmasında ilk adım olan bu testin uygulanması kolaydır ve test oldukça hızlı sonuç verir. Ayrıca *C.albicans'* in diğer Candida' lardan ayrılmasını sağlaması ile değerli bir testtir. Test için koloniden öze ile az miktarda alınarak 0.5 ml insan serumu veya tavşan plazması içeren bir tüp içerisinde karıştırılır, ardından 35°C' de en fazla 3 saat inkübe edilir. Süre sonunda süspansiyonundan lama bir damla damlatılır ve lamel ile kapatılarak mikroskopta 40X' lik objektif ile inceleme yapılır. Germ tüp, maya hücresinin 3-4 katı uzunlukta olan filamentöz bir çıkıntıdır (Yıldırım 1999) . Candida hücrelerinden çıkış noktasında boğum olmaması en önemli özelliğidir. Bu özellik, germ tüp ile psödohif ayrımını sağlar. *C. albicans* ve *C.dublinskiensis* türlerinin %95-97'sinde germ tüp oluşur.

C.albicans serumda 37°C’de iki-üç saatlik inkübasyon sonunda hücrelerden boğum oluşturmaksızın uzayan germ tüp oluşturur. *C. albicans*' in yaklaşık %5' i çimlenme borusu oluşturmamaktadır. *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei*' de ise pseudo germ tüp oluşumu görülebilir. *C.dublinsiensis*, fenotipik özellikleri *C. albicans*' a benzeyen ve *C. albicans*' tan kesin ayrımı moleküler yöntemlerle mümkün olan bir türdür. Bu nedenle, germ tüp oluşturan suşlar rutin mikoloji laboratuvarlarında genellikle *C. albicans* olarak tanımlanır (Yıldıran 1999; Yücel ve Kantarcıoğlu 2000).

7.2.3.2. Mısırunlu Tween 80 Agar Besiyerinde Morfolojik Görünüm

Candida türlerinin morfolojik olarak tanımlanmalarında mısır unu-tween 80 agar gibi besin açısından fakir besiyerleri kullanılır. Candida türlerinin hif, psöдохif, blastospor ve klamidospore üretme gibi özellikleri değerlendirilerek, türlerin birbirlerinden ayırt edilebilmesi sağlanmaktadır. Bu test için koloniden öze ile küçük bir miktar alınıp besiyeri yüzeyine yan yana çizgiler şeklinde ekim yapılır ve çizgilerin üzeri örtülecek şekilde steril bir lamel ile kapatılır. Besiyeri 25°C’ de 24-72 saat inkübasyona bırakılır. *C.albicans*, yalancı hif, gerçek hif, septum üzerinde üzüme benzer görünümde blastospor kümeleri ve yedek besin depolayarak çevresel koşullara dayanıklı yapı olan klamidospore oluşturur. *C.tropicalis*, bol miktarda yalancı hif oluşturur. Bu hif boyunca boğum yerlerinde tek tek veya gruplar halinde dizilmiş yuvarlak ve oval blastosporlar görülür. *C.krusei*' de yalancı hifler ve yanlarında küme şeklinde dizilim gösteren uzamış blastosporlar bulunmaktadır. *C.parapsilosis*, yalancı hif, bunun etrafında tek tek bazen kümeler yapan blastokonidyumlar ve arada büyük hifler bulunması ile karakterizedir. *C.glabrata*, hif veya yalancı hif oluşturmaz. *C. kefyr*, yalancı hifler ve uzun blastokonidyumlar oluşturur. *C.guilliermondii*, az sayıda, kısa ve ince yapıda yalancı hifler ve bunların boğumları üzerinde küçük blastosporların oluşturduğu kümeler bulunur. *C. lusitaniae*, kıvrık ve zincir şeklinde dizilim gösteren yalancı hifler ve yanlarında uzun blastokonidyumlar bulunmaktadır. Bu şekilde Candida türleri blastokonidyumların özelliklerine, yalancı hif boyunca dizilimlerine ve besiyeri morfolojilerine göre birbirinden ayırt edilebilirler (Tümbay 1999; Hazen ve Howell 2003).

7.2.3.3. Karbonhidrat Asimilasyon Testi

Bu test *Candida*' ların, tek karbon kaynağı olarak bir karbonhidratı, oksijen varlığında (asimilasyon) kullanabilme özelliklerini ortaya koyar. Bu sayede *Candida*' ların tür düzeyinde tanımlanabilmesini sağlarlar. Ancak bu yöntem zaman alıcı ve emek gerektiren bir yöntem olduğu için günümüzde bu yöntemin yerini güvenilir ticari kitler ile yarı otomatize ve tam otomatize sistemler almıştır. Ticari tanımlama sistemleri ile yaygın ve sık görülen mayaların tanımlanmasında nadir rastlanan türlere göre daha büyük oranda başarı sağlanmaktadır (Hazen ve Howell 2003).

7.2.3.4. Nitrat Asimilasyon Testi

Karbonhidrat asimilasyon testine benzer. Mayaların nitrojen kaynağı olarak nitratı kullanma yeteneklerini ortaya koyan biyokimyasal bir testtir (Hazen ve Howell 2003).

7.2.3.5. Karbonhidrat Fermantasyon Testi

Candida' lar oksijensiz ortamda (fermentasyon) bir karbonhidratı tek karbon kaynağı olarak kullanabilme özelliklerine göre tanımlanmaktadır. Fermantasyon testi; genellikle sıvı medyum içeren tüplerde yapılır. Reaksiyon sonucu tüpte oluşan karbondioksit gazının ölçümü ve asit oluşumu ile değerlendirilen zor bir testtir. Test sırasında gaz oluşumu, fermantasyonunun kanıtıdır. Test, birçok *Candida* türünü, *Rhodotorula* ve *Cryptococcus* türlerinden ayırmada kullanışlıdır (Hazen ve Howell 2003).

7.2.3.6. Üreaz Testi

Bu test, mayanın üreaz enzimi aktivitesini araştırmak için kullanılır. Üreaz enzimine sahip mayalar üreyi amonyak ve karbondioksit (CO₂)' e parçalar. Amonyak ortamı alkali yapar. Üre ve Ph indikatörü olarak fenol kırmızısı içeren besiyerinde üreme olduğunda, üreaz enzimi var ise alkali ortamda fenol kırmızısının koyu pembe renge dönüşmesiyle sonuçlanır. Üreaz testi, *Trichosporon*, *Rhodotorulo* gibi mayalarla klinik önemi olan *Candida* türlerinin ayırımında kullanılır. *Candida*' ların çoğunda üreaz testi negatifken, *C. lipolytica* ve *C. krusei*' nin bazı suşları üreyi hidroliz edebilir (Hazen ve Howell 2003).

7.2.3.7. Hızlı Tanımlama Testleri

Hızlı tanımlama yöntemlerinden biri olan Trehaloz testi, *C. glabrata*'nın 3 saat gibi kısa süre içerisinde tanımlayabilmektedir. Ancak SDA ve kromojenik agar dışındaki besiyerlerinden alınan koloniler ile trehaloz testi yanlış pozitif sonuç verebilir. Hızlı tanımlama testleri, koloninin oluştuğu aynı gün içinde tanımlamayı sağlayan, kolay uygulanabilen, uzun sürede tanımlama yapabilen testlere alternatif olarak kullanılabilen yöntemdir (Hazen ve Howell 2003).

7.2.3.8. Kromojenik Besiyerleri

Türe özgü kromojenik substratlar içeren besiyerlerinde, farklı *Candida* türlerinin ürettiği ekzoenzimlerle bu substratlar reaksiyona girerler. Reaksiyon sonucu parçalanmış substratlardan farklı kromojenik ürünlerin salınması sonucu oluşan kolonilerin renkleri ve morfolojileri değerlendirilir. CHROMagar *Candida* (CHROMagar, France), *Candida* ID (BioMerieux, Fransa), CandiSelect (BioRad, Fransa), Hi Chrome (HiMedia Laboratories, Hindistan), Oxoid Cromogenic *Candida* Agar (OCCA, Basingstoke, İngiltere) gibi çok sayıda kromojenik besiyeri bulunmaktadır. Bu besiyerleri, sık rastlanan *Candida* türlerini erken dönemde belirleyerek yarar sağlamaktadır (Hazen ve Howell 2003; Otağ ve ark. 2006).

7.2.3.9. MALDI-TOF MS

“Proteom”, “Protein genom” kelimelerinden türetilmiş olup belli bir zamanda, belli bir hücre/doku/organizmada bulunan, gerekli tüm biyokimyasal tepkimeleri yürüten proteinlerin tamamını, “proteomik” ise proteomun yapı, yerleşim, miktar, doku ve hücrelerdeki işlev, diğer proteinlerle ve makro moleküllerle olan etkileşiminin incelenmesini ifade etmektedir. Proteom analizi olan “proteomiks” ise belli bir organizmada bulunan proteinlerin tamamını incelemek için kullanılan metodların tümünü ifade etmektedir. Kompleks protein karışımlarının incelenerek protein analizlerinin bu çaplı yapılmasına iki boyutlu jel elektroforezinin geliştirilmesi ile başlamıştır. Proteinler; birinci boyutta, izoelektrik odaklama metoduyla farklı pH değerlerindeki net yüklerine göre; ikinci boyutta, moleküler kütlelerine göre ayrılmaktadır. Bu proteinler çeşitli yöntemlerle boyandıktan sonra jel üzerinde her örneğe özgü bir proteom şeklinde izlenirler. Sonrasında yapılacak proteinlerin identifikasyonu için; elektroforetik yöntemler, iki yönlü sıvı kromatografik yöntemler, yüksek verimli mikrosekanslama yöntemleri ve kütle

spektrometrik yöntemleri kullanılmaktadır. Kütle spektrometreleri, manyetik veya elektriksel alanda hareket eden yüklü partikülleri, kolaylıkla hareket edebilen iyonlara dönüştürerek ve bu iyonları kütle/yük (m/z) oranına göre sıralayıp diğer yüklü partiküllerden ayırarak çözümleme esasına göre çalışan cihazlardır. Bütün kütle spektrometreleri üç fonksiyonel bölümden oluşmaktadır; iyonlaştırma ve iyonların gaz fazına geçişi, kütle/yük prensibine göre yüklü partiküllerin dağılımı ve dedektör bölümleri. Moleküller normalde yüklü değildir. İyonizasyon işlemi ile uyarılarak yüklü iyonize moleküller haline dönüşürler (Biberoğlu 2003; Yalınay Çıracak 2007; Kocagöz 2009).

Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Kütle Spektrometrisi

MALDI TOF kütle spektrometresinde molekülleri iyonize etmek için organik, aromatik ve zayıf asidik bir matriks kimyasalı kullanılmaktadır. Matriks; lazer ışınını tutup ortamın ısınmasını, moleküllerin buharlaşmasını, yüzeyden kolayca ayrılmasını ve hidrojen iyonlarını hücrelerden gelen moleküllere aktararak onların (+) yüklü olmasını sağlayan bir kimyasaldır. 4-hydroxy- α -cyanocinnamic acid (“alphacyano” veya 4HCCA), 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB), 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid (sinapinic acid) MALDI TOF MS sisteminde kullanılabilir matrikslerdir. İyonizasyon, morötesi (UV) ışınları ile sağlanmaktadır. MALDI diğer iyonizasyon yöntemlerine göre daha yumuşak bir iyonizasyon yöntemi olarak değerlendirilmektedir. Çünkü diğerleri DNA, protein gibi polimerleri parçalayabilir. Moleküllerin bütünlüğünün korunması, incelemenin korunması açısından önemlidir. Sonuçta moleküller morötesi ile ısıtılıp buharlaştırılarak yüzeyden ayrılır ve moleküller matriks kimyasalı ile etkileşimi sonrası proton olarak yüklü hale gelirler. Lazer enerjisi matriks moleküllerinin aktivasyonunu sağlayarak mikroorganizma-matriks kompleksinde mikro patlamalar meydana getirirler. Ardından bu moleküller iyonlaşırlar ve plaktan ayrılarak serbest hale geçerler. Matriks moleküllerinin fotoeksitasyonu ya da fotoiyonizasyonu, matriksten analite proton transferini yani analitin iyonizasyonu kolaylaştırmıştır. İyonizasyon işlemi sonrasında likit veya katı halde bulunan moleküller uyarılarak yüklü iyonize gaz molekülleri haline dönüştürülürler. Uçuş zamanlı kütle analizörlerinde, üretilen iyonların dedektöre ulaşmak için sabit bir mesafeyi katetmeleri gerekmektedir. Bu nedenle iyonlara yaklaşık uzunluğu 1 metre olan bir

tüp içerisinde hareket etmeleri için hızlandırıcı voltaj (20 kV) uygulanmıştır. Levhadan ayrılan iyonize analit molekülleri, uygulanan voltaj ile hızlandırılarak uçuş tüpü içerisinde dedektöre ulaşana kadar sürüklenirler ve kütle/ yük oranlarına göre ayrılırlar. Spektrofotometredeki vakum, iyonlarla hava moleküllerinin çarpışmasını engellemektedir. Bütün moleküllere aynı kinetik enerji verildiğinden, analit moleküllerinin uçuş tüpünü katetme süreleri, moleküllerin kütlesi ile orantılıdır. Moleküllerin uçuş zamanı, molekül ağırlıklarının belirlenmesi için kullanılmaktadır. Dedektöre ulaşan veriler işlenerek; önceden analiz edilerek tanımlanmış olan mikroorganizmaların tamamının profilleriyle kıyaslanır ve tepe noktaları 2000-20000 arasında değişen kütle spektrumlarıyla sonuçlanırlar. Kütle spektrumları; mikroorganizmanın türüne özgü olan parmak izleri olup tekrarlanabilirlikleri yüksektir. İdentifikasyon için; bu profile ait grafiksel görüntüler sistemin veri tabanındaki referans ile karşılaştırılarak organizmayla uyumuna göre mikroorganizmalar cins ve tür bazında tanımlanırlar (Biberoğlu 2003, Vella ve ark. 2013; Posteraro ve ark. 2013).

VITEK MS (BioMerieux, Fransa), AXIMA/SARAMIS database (AnagnosTec, Potsdam, Germany and Shimadzu), MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) ve ANDROMAS (Andromas) adı ile bilinen, MALDI-TOF-MS yönteminin uygulandığı dört tane ticari sistemi bulunmaktadır (Bader 2013; Willinger ve ark.2014).

MALDI-TOF MS tabanlı sistem, bakterilerin ve mantar türlerinin rutin tanımlanması için ilginç bir alternatif sunmuştur. Bu teknik, mikrobiyolojide benzersizliği ile doğru tür tanımlaması yaparak sadece birkaç dakika gibi bir sürede sonuç vermiştir. Ayrıca, tanımlanabilir mantar türlerinin yelpazesi giderek yayılmıştır. Bütün bunlar MALDI-TOF MS' in dünya çapında klinik laboratuvarlarda giderek daha fazla kullanılmasını sağlamıştır. MALDI-TOF MS yönteminde mikroorganizmalara ait biyomoleküllerin (şeker, peptid, protein) ve büyük organik moleküllerin (makromolekül, dendrimer, polimer) iyonize edildikten sonra elektrik ve/veya manyetik alandan geçirilerek protein profilleri çıkarılmaktadır. MALDI-TOF MS sistemi bu sayede her mikroorganizma için özgül olan proteinlerden kütle spektrometresine dayalı özgün bir çeşit parmak izini çıkararak bakteri, mantar ve virüs tanımlaması yapabilmektedir. MALDI-TOF MS günümüz konvansiyonel ve moleküler tanımlama yöntemlerine bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.

MALDI-TOF MS' in kullanımı tıp alanında mikrobiyoloji ile sınırlı kalmayıp çeşitli onkolojik hastalıklar, Alzheimer, romatoid artrit, ve bazı alerjik hastalıkların tanısında da kullanılmaktadır (Fensalau ve Demirev 2001, Doğan 2018).



Resim 2: MALDI-TOF MS cihazı

7.2.4. Kültür Dışı Tanı Yöntemleri

Mantar enfeksiyonu etkenlerinin tanımlanmasında, direkt mikroskopik inceleme ve kültür ile tanımlama günümüzde halen altın standart yöntemler olarak değerini korumaktadır. Ancak gerek zaman alıcı olması, gerekse her zaman olumlu sonuç vermemeleri, bazı türler açısından zor uygulanabilir ve yorumlanabilir olması nedeniyle, bu yöntemlerin ilave olarak daha hızlı, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek yeni tanı yöntemleri uygulanmaktadır.

7.2.4.1. Serolojik Yöntemler

Candida enfeksiyonlarının tanısına ve bu enfeksiyonların kategorik ayırımına yardımcı olmak amacıyla serolojik testlerden faydalanılabilir. Serolojik testler ya mantar antijenlerine karşı gelişen antikorları ya da mantar antijenlerinin ve metabolik ürünlerinin varlığını göstermeye yönelik hazırlanan testlerdir. Antijen ve antikorların birlikte değerlendirildiği kombine testlerden daha özgül sonuçlar alınmaktadır. Ayrıca tek örnekten elde edilen sonuçların duyarlılıklarının düşük olması nedeniyle

ardışık alınan birden çok örneğin sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi özgüllük ve duyarlılığı arttıracaktır. Mantar antijenlerinin veya metabolitlerinin aranmasına yönelik testler, invaziv mantar enfeksiyonlarının tanısı için daha değerlidirler. Bu amaçla ısıya duyarlı antijen, mannan, D-arabinitol ve enolaz araştırılmaktadır. Günümüzde en yaygın kullanılan mannan antijen testidir. Mannan antijen testi özgüllüğü yüksek bir testtir. Mannan, Candida hücre duvarının polisakkarit yapısındaki komponenti olup, dolaşımında sisteminde kısa bir süre kalır ve hızla temizlenir. Bu nedenle saptanabilmesi için hastadan sık kan örneği alınması gerekir. Değişik çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüğüne ilişkin farklı oranlar bildirilmektedir. Candida türlerine karşı oluşan antikörlerin araştırıldığı yöntemler; tüm hücre aglütinasyonu, lateks aglütinasyonu, indirekt immün floresans (IFA), enzim immünoassay (EIA) ve radyoimmünoassay (RIA) olarak sıralanabilir. Başlıca hedef alınan antikörler, anti-mannan antikörleridir. Enolaz, metallopeptidaz ve aspartik proteinaz gibi antijenlere karşı oluşan antikörler da testlerde kullanılacak diğer hedeflerdir. Ancak immün sistemi baskılanmış kişilerde yeterli antikör oluşmaması, pozitif antikör varlığının kolonizasyon ve enfeksiyonu ayıramaması, anti-mannan antikörünün dalak ve karaciğer tarafından hızla kandan uzaklaştırılması nedenleriyle antikör aranmasının tanısız duyarlılığı düşüktür. Candida metabolitlerinin araştırılmasının invaziv kandidoz için potansiyel bir tanı yöntemi olabileceği bildirilmektedir. Arabinitol; Candida' ların enfeksiyon esnasında hastanın vücut sıvılarına saldırdığı bir metabolitidir. Böbrek yetmezliği ve bazı klinik durumlarda serumda miktarı arttığı için D-arabinitol/kreatinin oranının değerlendirilmesi önerilmektedir. (1-3)- β -D-glukan Zygomycetes' ler hariç mantar hücre duvarının karakteristik bir birleşenidir. (1-3)- β -D-glukan konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan yöntem, atnalı (horsecrab shoe) yengecinin koagülasyon faktörü olan faktör G' nin glukani aktifleştirmesine dayanmaktadır. 1-3 β -D glukan testi, panfungal tanı yöntemi olarak 2008 yılında Avrupa' da yayınlanan bir klavuzda (EORTC/MSG) tanı kriterlerine eklenmiştir (Kalkancı 2005; Kuştimur 2013).

7.2.4.2. Moleküler Tanı

Geçmişte mantarların tanımlanmasında fenotipik ve biyokimyasal yöntemler kullanılırken, son yıllarda moleküler yöntemlerin kullanılmasında artış gözlenmiştir. Laboratuvarlarda, moleküler yöntemlerin kullanılmasında; patojen Candida türlerinin tanımlanmasında daha hızlı olması, birden fazla etkenin neden olduğu

enfeksiyonlarda organizmaları tür düzeyinde tanımlayabilmesi, sensitivitenin ve spesifitenin yüksek olması etkilidir. Candida' ların tanımlanmasında prob tabanlı veya amplifikasyon tabanlı birçok teknik geliştirilmiştir.

Bu yöntemlerin temel amacı, moleküler hedef kullanılarak genomdaki genetik bölgenin bulunmasıdır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve diğer benzer amplifikasyon yöntemleri, klinik örneklerde küçük miktardaki hedef DNA' yı belirlemeye izin vermiştir. PZR yöntemi ile kan örneklerinde 1 CFU/ml' ye kadar mantarlar belirlenmiştir. Prob tabanlı yöntemlerden biri olan Peptide Nucleic Acid Fluorescence İn Situ Hybridization (PNA-FISH) yöntemi ile kültür sonrasında florasanla işaretlenmiş oligonükleotid proplar kullanılarak Candida' ların tanımlanması yapılabilmektedir. Türe özgül rRNA dizisini hedefleyerek kan kültürlerinde *C.albicans'* in belirlenmesinde kullanılır. Candida türlerinin hızlı tanısına yönelik moleküler çalışmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. Özellikle akademik merkezlerdeki laboratuvarlarda sık kullanılmaktadır. Sistemik mantar enfeksiyonlarının tanısında PCR (Polymerase Chain Reaction) kullanımının kültür ve serolojik yöntemlere göre duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olmasına rağmen moleküler tanı yöntemlerinin her laboratuvarında bulunmaması ve yüksek maliyeti kullanımını sınırlandırmaktadır (Tümbay 1994; Kubar 2007).

8. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada; Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden *Candida* izole edilen 158 adet suş kullanıldı ve bir hastadan ikinci kez izole edilen aynı tür suş çalışmaya alınmadı. Tüm suşlar SDA besiyerine ekim yapılarak +4°C’de bekletildi. Bu suşlar kullanılacakları zaman, tekrar SDA besiyerine pasajlanarak canlandırıldı. Suşlar önce VITEK-2 Compact System ile ardından kütle spektrometri inceleme yöntemi olan MALDI-TOF MS ile çalışmaya alınarak tür tanımı gerçekleştirildi.

8.1. *Candida* Türlerinin Tanımlamasında Kullanılan Yöntemler

Kliniklerden laboratuvarımıza gönderilen çeşitli materyaller öncelikle %5 koyun kanlı agar (bioMerieux, Fransa) ve EMB (bioMerieux, Fransa) de işleme alındı. Üreme olanların, hem besiyeri görüntüsü hem gram boyamasının sonucunda maya mantarı olduğu saptananlar ileri işleme tabi tutuldu. Toz halinde bulunan karışımdan (hayvan dokusu peptik sindirimi (5g/l), kazeinin pankreatik sindirimi (5g/l), glukoz (40g/l), agar (15g/l)) 65 gram tartularak 1000 ml damıtık su içerisine ilave edildi ve 121°C olan otoklavda 15 dakika steril edildi. Aşırı ısıtmadan kaçınmak için süreye dikkat edildi. Otoklavdan çıkarılan besiyeri 45-50°C’ ye kadar soğutulup iyice karıştırıldıktan sonra 9 cm çaplı steril petri kutularına 12,5 ml kadar döküldü. Elimizde bulunan maya mantarı üreyen besiyerlerden, SDA (Sabouroud Dekstroz Agar) besiyerine pasajları yapıldı. Plaklar 37 °C’ de 48-72 saat inkübe edildikten sonra saf kültürleri elde edilen örnekler değerlendirilmeye alındı.

8.1.1. VITEK-2 Compact System İle identifikasyon

VITEK-2, büyüme temelli otomatik bir sistemdir. Sistemin VITEK-2 Compact, VITEK-2 ve VITEK-2 XL olmak üzere üç tane formatı bulunmaktadır. El değmeden otomatik kart dolumu yapma özelliğine sahip tek sistemdir. Bu cihazların hepsi suşları tanımlamak için aynı kolorimetrik reaktif kartları barındırır ve otomatik yorumlama gerçekleştirir. Antifungal test işleminde VITEK-2 Compact sistem, geniş MİC aralığı sayesinde düşük seviyelerdeki dirençleri tespit edebilme yeteneğine sahiptir. Dirençli (R) , orta duyarlı (I) ve duyarlı (S) olarak sonuç verebilen ve hiç bir otomatize sistemde olmayan özellik sayesinde diğerlerinden ayrılır. Bu sayede direnç oluşumu başlarken yakalanır ve düşük seviyedeki bu dirençlerin ileride geniş

spektrumlu dirençlere dönüşmemesi için gerekli antibiyotik kullanımına hemen başlanmış olur.

1. GN: Gram negatif bakteriler
2. GP: Gram pozitif bakteriler
3. YST: Maya ve maya benzeri organizmalar
4. BCL: Bacillus
5. NH: Neisseria

6. ANC: Aneorobik bakterilerin, tanımlamasında kullanılan reaktif kartlardır.

Bu kartlar hem endüstriyel hem de klinik laboratuvarların formatlarına uygundur. Reaktif kartların her birinde 64 adet kuyucuk bulunmaktadır. Bu kuyucuklarda kontrollerde dahil 46 biyokimyasal test bulunmaktadır. Kartların her iki tarafında optik olarak net bir film mevcuttur. Bu film sayesinde kartlar mühürlenmiş gibi muhafaza edilirken uygun oksijen iletimi seviyesini ayarlayarak, organizma-substrat arasındaki kontrolü sağlar. Kartlarda karbon kaynağı kullanımı, enzim aktiviteler, biyokimyasal metodlar için geliştirilmiş substratlar bulunmaktadır. Kartların üzerinde ürünün türü, lot numarası, son kullanma tarihi olan barkotlar bulunmaktadır.



Resim 3: VITEK-2 Compact cihazı

Biz çalışmalarımızı VITEK-2 Compact System (BioMe rieux, Inc.) ile yaptık. VITEK-2 Compact System izole edilen maya mantarlarının hem tanımlanmasında,

hem de antifungal duyarlılık testinin yapılmasında kullanılan bir yöntemdir. Koloninin oluştuğu aynı gün içerisinde (24 saatten az) identifikasyon sağlayan bir sistemdir. İdentifikasyon için VITEK-2 YST (bioMerieux, Fransa) kullanılırken, antifungal tanımlama yapmak için VITEK-2 AST-YS01 kartı kullanılmaktadır. YST kart en fazla 49 türü tanımlamaktadır. Cihaza identifikasyon için konulan süspansiyon kartlara otomatik aktarılır. Aktarım sonrası her kuyucuk için 15 dakikada bir renk değişimini optik okuyarak database ile analitik karşılaştırma yapmaktadır. Bu değerler cihazın ilk kartı okumasına oranlanarak yüzde değişimi bulunur. Tanımlama, identifikasyonu yapılacak suşun cihazın veri tabanında yer alan sayısal değerlendirmelerle gerçekleştirilir.

Bizimde çalıştığımız bu sistemde, izole ettiğimiz maya mantarlarını, tanımlanmak amacıyla öncelikle dispenserden 3.0 ml salin sıvısı (% 0.45 ila % 0.50 NaCl, ph 4.5-7.0) 12 x 75 mmpolistrene tüplere alındı. SDA besiyerinden taze koloniler pamuklu çubuk yardımıyla alındı. Bulanıklığı 2.0 Mc Farland (1.80-2.20 aralığı) olacak şekilde bio Merieux Densi Chek ile ölçülerek inokulum süspansiyonu hazırlandı. Üretici firmanın gönderdiği her biri 10 adet yer bulunan kasete hazırlanan süspansiyon ve VITEK YST kartları yerleştirildi. Doldurulmuş kaset, örnek numaraları sisteme manuel olarak girilip barkotları okutulduktan vakum kuyucuğuna konularak inkübasyona bırakıldı. VITEK-2 Compact System yaklaşık 18 saatlik bir inkübasyondan sonra tanımlamaları yaptı. Tanımlanamayan örnekler SDA besiyerine ekilip, taze koloniyi elde ettikten sonra yeniden aynı işlemleri yaparak cihaza yüklendi. Tanımlanma sonucunda örnekler değerlendirildi.



Resim 4: VITEK-2 Compact System çalışma yöntemi

8.1.2. MALDI-TOF MS Yöntemi İle İdentifikasyon

Çalışmaya başlamadan önce tüm izolatlar tekrar SDA besiyerine pasajlandı. Besiyerleri 48-72 saatlik bir süre inkübasyona bırakıldı. Sonrasında MALDI –TOF MS yöntemi ile incelemeye alındı. İdentifikasyon işlemine başlamadan önce MALDI-TOF kütle spektrumlarında standart olarak kullanılan, taze pasajlanmış E. coli ATCC 8739 standart suşu ile cihazın kalibrasyonu ve kontrolü yapıldı. Tanımlamak amacı ile mevcut bulunan suşların her birinden steril bir öze ile alındı. 48 adet kuyucuk bulunan “targer slayt” adı verilen metal bir plak üzerindeki kuyucuklara ince şekilde öze ile yayıldı. Hücre duvarını parçalayarak protein ekstraksiyonunu sağlamak amacıyla üzerine 0,5 µL VITEK-MS FA (Formik asit) ilave edildi ve ardından kısa bir süre beklenildi. Daha sonra üzerine matriks çözeltisi olarak 1µL matriks solüsyonu (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) eklendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Oda ısısında kurutularak kristalize hale gelen plak, cihaza yerleştirilerek lazer atışlarına maruz bırakıldı. Çalışmamızda MALDI-TOF-MS sistemi olarak VITEK- MS (Biomerieux, France) ticari sistemi kullanıldı. Bu suşlar, maya mantarlarının tanımlanması için üretici firma tarafından kurulmuş olan uygun veri tabanında, verilerin karşılaştırıldığı sivri pik dalga tekrarlarından oluşan işaretlerle sonucu verdi. Ölçümler üretici firmanın önerdiği ayarlar ile yapıldı ve kurulan yazılım ile sonuçlar değerlendirildi.



Resim 5: MALDI-TOF MS System çalışma yöntemi

9. BULGULAR

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi' nin farklı kliniklerinden Mikrobiyoloji Laboratuvarı' na sistemik mantar enfeksiyonu ön tanısı ile gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 158 Candida suşu değerlendirmeye alındı. Klinik örneklerin elde edildiği hastaların yaş ortalaması 39.39 ± 29.01 yaş, en küçük yaş 1 aylık ve en büyük yaş 82 olarak saptandı. Hastaların 73 (%46.2)' ü erkek, 85 (%53.8)' i kadın cinsiyettendi. Candida suşlarının elde edildiği hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı **Tablo 1'** de gösterilmiştir.

Tablo 1: Hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı

Yaş	Erkek N 73 (%46.2)	Kadın N 85 (%53.8)	Toplam N 158 (%100)
0-1	11 (%15.1)	10 (%11.8)	21 (%13.3)
1-18	14 (%19.2)	20 (%23.5)	34 (%21.5)
18-50	17 (%23.3)	29 (%34.1)	46 (%29.1)
50 ve üzeri	31 (%42.4)	26 (%30.6)	57 (%36.1)

Çalışmamızda hastanemiz laboratuvarına gönderilen, klinik örneklerden izole edilen ve Candida türünü temsil eden örnekleri kullandık. Bu klinik örneklerin 20 (%12.6)' si yoğun bakım ünitesinden, 52 (%33.0)' si cerrahi kliniklerden, 86 (%54.4)' sı dahili birimlerden gelen hastalara aitti. Candida suşlarının elde edildiği örneklerin geldiği servislere göre dağılımı **Tablo 2'** de gösterilmiştir.

Tablo 2: İzole edilen örneklerin geldiği servislere göre dağılımı

KLİNİK	Tanımlama yöntemi	C.albicans	C.glabrata	C.parapsilosis	C.kefyr	C.krusei	C.tropicalis	C.dublinsiensis	C.membranifaciens
Acil Yoğun Bakım N:20	VITEK-MS	10	3	3	1	1	2	-	-
	VITEK-2	12	4	3	-	-	1	-	-
Çocuk Cerrahisi N:8	VITEK-MS	8	-	-	-	-	-	-	-
	VITEK-2	8	-	-	-	-	-	-	-
Çocuk Hastahkları N:25	VITEK-MS	11	4	2	2	2	2	1	1
	VITEK-2	14	4	2	2	2	-	1	-
Dermatoloji N:1	VITEK-MS	1	-	-	-	-	-	-	-
	VITEK-2	1	-	-	-	-	-	-	-
Enfeksiyon Hastahkları N:11	VITEK-MS	6	4	1	-	-	-	-	-
	VITEK-2	6	3	1	-	1	-	-	-
Genel Cerrahi N:5	VITEK-MS	4	1	-	-	-	-	-	-
	VITEK-2	3	-	-	1	1	-	-	-
Göğüs Hastahkları N:25	VITEK-MS	12	5	4	2	2	-	-	-
	VITEK-2	13	5	4	2	1	-	-	-
Göz Hastahkları N:2	VITEK-MS	1	-	-	-	-	1	-	-
	VITEK-2	1	-	-	-	-	1	-	-
İç hastahkları N:15	VITEK-MS	9	2	1	1	1	-	1	-
	VITEK-2	9	2	1	1	1	-	1	-
Kadın Doğum N:8	VITEK-MS	3	2	1	1	1	-	-	-
	VITEK-2	3	2	2	-	-	1	-	-
Kalp Damar Cerrahisi N:2	VITEK-MS	2	-	-	-	-	-	-	-
	VITEK-2	2	-	-	-	-	-	-	-
Kulak-Burun Boğaz N:2	VITEK-MS	1	1	-	-	-	-	-	-
	VITEK-2	1	1	-	-	-	-	-	-
Nöroşirurji N:1	VITEK-MS	1	-	-	-	-	-	-	-
	VITEK-2	-	-	-	-	-	1	-	-
Ortopedi ve Travmatoloji N:4	VITEK-MS	1	1	1	-	-	1	-	-
	VITEK-2	1	1	1	-	-	1	-	-
Plastik Cerrahi N:6	VITEK-MS	2	1	1	1	1	-	-	-
	VITEK-2	2	1	1	1	1	-	-	-
T.Onkoloji N:9	VITEK-MS	-	2	3	2	2	-	-	-
	VITEK-2	-	2	3	2	2	-	-	-
Üroloji N:14	VITEK-MS	5	2	3	1	1	2	-	-
	VITEK-2	7	2	3	-	-	2	-	-
Toplam N:158	VITEK-MS	77	28	20	11	11	8	2	1
	VITEK-2	83	27	21	9	9	7	2	-

Çalışmamız sonucunda 24 (%15.2)' ü idrar, 40 (%25.3)' ı solunum, 73 (%46.2)' ü kan, 15 (%9.5)' i yara ve 6 (%3.8)' sı periton olan toplamda 158 örnekte maya mantarı ürediğini tespit ettik. VITEK-2 ile yapılan tür tanımlamasında izolatların 83 (%52.6)' ü *C. albicans*, 27 (%17.1)' si *C. glabrata*, 21 (%13.2)' i *C. parapsilosis*, 9 (%5.7)' u *C. kefy*, 9 (%5.7)' u *C. krusei*, 7 (%4.4)' si *C. tropicalis*, 2 (%1.3)' si *C. dubliniensis* olarak tanımlandı. MALDI-TOF MS ile ise 77 (%48.7)' si *C. albicans*, 28 (%17.8)' i *C. glabrata*, 20 (%12.7)' si *C. parapsilosis*, 11 (%6.9)' i *C. kefy*, 11 (%6.9)' i *C. krusei*, 8 (%5.1)' i *C. tropicalis*, 2 (%1.3)' si *C. dubliniensis*, 1 (%0.6)' i *C. membranifaciens* olarak belirlendi. Örneklere göre tanımlanan türlerin dağılımı ve karşılaştırılması **Tablo 3'** de gösterilmiştir.

Tablo 3: Hastalardan alınan örneklere göre türlerin dağılımı ve karşılaştırılması

Örnekler		İdrar	Solunum	Kan	Yara	Periton	Toplam
Tür		n:24 (% 15.2)	n: 40 (%25.3)	n:73 (%46.2)	n:15 (%9.5)	n:6 (%3.8)	n:158 (%100)
<i>C. albicans</i>	VITEK-MS	11	31	21	9	5	77 (%48.7)
	VITEK-2	13	31	26	8	5	83 (%52.6)
<i>C. glabrata</i>	VITEK-MS	4	3	19	2	-	28 (%17.8)
	VITEK-2	3	3	18	3	-	27 (%17.1)
<i>C. parapsilosis</i>	VITEK-MS	3	1	14	2	-	20 (%12.7)
	VITEK-2	3	1	15	2	-	21 (%13.2)
<i>C. kefy</i>	VITEK-MS	2	1	7	1	-	11 (%6.9)
	VITEK-2	1	3	4	1	-	9 (%5.7)
<i>C. krusei</i>	VITEK-MS	2	2	6	-	1	11 (%6.9)
	VITEK-2	2	1	5	-	1	9 (%5.7)
<i>C. tropicalis</i>	VITEK-MS	2	2	3	1	-	8 (%5.1)
	VITEK-2	2	1	3	1	-	7 (%4.4)
<i>C. dubliniensis</i>	VITEK-MS	-	-	2	-	-	2 (%1.3)
	VITEK-2	-	-	2	-	-	2 (%1.3)
<i>C. membranifaciens</i>	VITEK-MS	-	-	1	-	-	1 (%0.6)
	VITEK-2	-	-	-	-	-	- (%0)

10. TARTIŞMA ve SONUÇ

Candida türleri insanlar ve hayvanlarda, mukoza, gastrointestinal sistem ve solunum sisteminin normal florasında yer almaktadır. Bununla birlikte Candida türleri doğada yaygın görülen ve insanı en çok etkileyen fırsatçı patojenlerdir. 200' den fazla türü bulunan Candida türleri çevresel ve bireysel koşulların hastanın aleyhine olduğu durumlarda yüzeysel hafif enfeksiyondan sistemik ağır enfeksiyonlara kadar değişen klinik tablolara neden olabilirler. Enfeksiyona en sık neden olan tür *C.albicans*' tır. Bununla birlikte *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.lusitaniae*, *C.dublinsiensis* ve *C.guilliermondii*, *C.krusei* gibi albicans dışı Candida türlerinin insidansında %50' den fazla artış görülmüştür (Pfaller ve ark. 2014). Ayrıca son yıllarda, patojenik Candida türlerinin (*C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *C.glabrata*) taksonomisi, yakın ilişkili yeni türlerin tanımlanmasından dolayı büyük değişikliklere uğramıştır. Bu sebeple laboratuvarlarda tanımlanması zor tür kompleksleri ortaya çıkmıştır (Criseo 2015).

Candida enfeksiyonları ile mücadelede başarının anahtarı, uygun ilaç kombinasyonu ile erken antifungal tedavidir. Bunu yapmak için, Candida' ların tür seviyesinde tanımlanması gereklidir (Bader ve ark. 2011). Direkt mikroskopi ve kültür yöntemleri, hastalarda fungal patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların teşhisi için halen kullanılan standart yöntemlerdir. Ancak Candida türlerini tanımlanması için kullanılan bu yöntemler zaman alıcıdır. Bu nedenle Candida türlerinin tanımlanması için yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahip, pratik ve güvenilir testlere ihtiyaç vardır (Susever ve Yeğenoğlu 2011).

Araştırmamızda kullandığımız ve pek çok rutin mikoloji laboratuvarlarında Candida türlerinin tanımlanması için kullanılan VITEK-2 YST kartlarının performansını değerlendirmek amacıyla pek çok araştırma ve bilgi mevcuttur.

Graf ve ark. 2000 yılında mayaların tanımlanmasında VITEK ID- YST' nin güvenilirliğini değerlendirmek için 241 suşu incelenmişler ve tanımlanamayan suşlar için ek testler ilave etmişler. Bu türlere ait suşları, ek testler (alt kültür, morfolojik, aglütinasyon) olmadan % 93.8, ek testler yapılmıca da % 97.5 oranında tanımlama yaptığını bildirmişlerdir. O yıllar için, 51 farklı takson içeren geniş veri tabanı ve tam otomasyonu nedeniyle, VITEK-2 sisteminin 15 saat içinde hızlı ve doğru tanımlama ile klinik mikoloji laboratuvarında maya ve maya benzeri organizmaların tanımlanmasında uygun bir sistem olduğu ifade edilmiş.

İlerleyen yıllarda rutin mikolojik tanımlamanın bir parçası haline gelen VITEK-2 sistemi verimliliğine dair raporlamalar devam etmiştir. Ochiuzzi ve ark. 2014 yılında yaptıkları bir çalışmalarında; morfolojik ve biyokimyasal yöntemlerle tanımlanan 168 izolattan 165 (%98.3)' inin VITEK-2 YST kart tarafından doğru tanımlandığını bildirmişlerdir. Sonuç elde etme süresinin ortalama 18.25 saat olduğu, VITEK-2 sisteminin Candida türlerinin tanımlanması için basit, güvenli ve kullanışlı bir sistem olduğu araştırma sonucunda ortaya konulmuştur.

Çalışmamızda kullandığımız yöntemlerden biri olan VITEK-2, identifikasyon ve antifungal duyarlılık testinin birlikte yapılmasına imkan sağlayan bir sistemdir. VITEK-2 sisteminde çalışmanın kolay olması, maya mantarı identifikasyonunda ayrı bir deneyim gerektirmemesi ve daha az teknik hatalar vermesi gibi avantajları çalışmamızı kolaylaştırdı. Birçok yayında belirtilen süreye yakın olarak bizde yaklaşık 18 saatlik bir inkübasyondan sonra tanımlamaları elde ettik.

Araştırmamızda kullandığımız diğer bir yöntem olan bazı mikoloji laboratuvarlarında Candida türlerinin tanımlanmasında kullanılan MALDI-TOF MS sisteminin de etkinliği hakkında pek çok yayın bulunmaktadır.

Bader ve ark. 2011' de yaptıkları bir çalışmada, rutin teşhis laboratuvarlarında MALDI-TOF MS kullanımının mikroorganizma tanımlama sürecini önemli ölçüde kısalttığını ve bu tekniğin mikrobiyolojide tür tanımlamasında güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, MALDI-TOF MS' in kullanımının tıp alanında mikrobiyoloji ile sınırlı kalmayıp onkolojik hastalıklar, alzheimer, romatoid artrit ve bazı alerjik hastalıkların tanısında da kullanıldığı, bütün bunların MALDI-TOF MS' in dünya çapında klinik laboratuvarlarda giderek daha fazla kullanılmasını sağladığı bildirilmiştir (Doğan 2018).

Lotz ve ark. 2010 yılında, mikobakteriyel tanımlamada da alternatif bir yöntem olarak MALDI-TOF MS sistemi kullanılabildiğini yaptıkları çalışmada bildirmişlerdir.

MALDI-TOF MS, bakterilerin ve mayaların tanımlanması için hızlı ve doğru bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır, ancak bu yöntemin filamentöz mantarları tanımlanmasında ki etkinliğine dair veri azlığı mevcuttur. Yakın zamana kadar, bu teknikle sadece mayalar tanımlanmışken, yeni gelişmeler özellikle Aspergillus türleri

olmak üzere filamentöz mantarların tanımlanması için MALDI-TOF MS' in kullanımına olanak sağlamıştır.

Iriart ve ark. 2010 yılında mayalar ve *Aspergillus* türlerinin belirlenmesinde MALDI-TOF MS' i kullandıkları çalışmalarında yüksek doğrulukta (% 93.2) tanımlama elde etmişlerdir. Iriart ve ark. 2012 yılındaki çalışmalarında, zamanla tanımlanabilir mantar türlerinin yelpazesinin giderek genişlediğini de bildirmişlerdir.

Sanguinetti ve Posteraro 2017' de bir çalışmalarında, MALDI-TOF MS sisteminin mikoloji iş akışında devrim yaratarak, özellikle filamentöz mantar türlerinin yol açtığı, invaziv hastalıkların hızlı teşhisi ve uygun tedavisi için önemli katkılar sunabileceğini bildirmişler. *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucorales*, dimorfik mantarlar ve dermatofitlerin türlerini MALDI-TOF MS ile tanımlamayı amaçlayan araştırmacılar sistemin özellikle yaygın türler veya tipik filamentöz mantar suşlarını hızlı ve doğru bir tanımlama yapabileceğini ifade etmişlerdir.

Son çalışmalar, MALDI - TOF MS' in, bu mikroorganizmalar için spesifik standartlaştırılmış prosedürlerin oluşturulması ile filamentöz mantarları ve dermatofitleri doğru bir şekilde tanımlama potansiyeline sahip olduğunu bildirmiştir. Ayrıca MALDI - TOF MS, alt tür düzeyinde mikrobiyal tiplendirme ve tanımlama için başarıyla kullanılmış ve bu teknolojinin epidemiyolojik çalışmalar ve taksonomik sınıflandırma için etkili bir araç olduğu gösterilmiştir (Croxatto ve ark. 2012).

267 *Candida* türünü geleneksel yöntemlerle ve MALDI-TOF MS sistemi ile tanımlayarak karşılaştırılan bir çalışmada, MALDI-TOF MS ile 247 (%92.5) izolat tür düzeyinde tanımlanırken, tanımlanamayan 20 (%7.5) izolat MALDI-TOF MS veritabanında kayıtlı olmayan *Candida* türleri olarak ifade edilmiştir (Marklein ve ark. 2009). Başlangıçta tanımlanamayan bu suşlarla ilgili kalıpların veritabanına eklenmesinden sonra tüm izolatlar tanımlanabilmiş. Araştırmacılar MALDI-TOF MS sisteminin %100 doğruluk oranıyla, maya ve maya benzeri mantarların tanımlanması için en hızlı ve güvenilir araç olduğunu raporlamışlardır.

Bizzini ve ark. 2010 yılında, bakteri ve maya izolatlarının tanımlamak için MALDI-TOF MS' i geleneksel yöntemle karşılaştırmışlardır. Konvansiyonel yöntemlerle belirlenen 1.371 izolatı, MALDI-TOF MS ile 1.278 (% 93.2) tür düzeyinde, 73 (% 5.3) cins seviyesinde tanımlamışlar, 20 (% 1.5) izolat için güvenilir

bir tanımlama elde edemediklerini bildirmişler. Çalışmada, MALDI-TOF MS ile tür düzeyinde belirlenen 1.278 izolatin 63 (% 4.9)' ünün konvansiyel yöntemlerle elde edilen sonuçlarla uyumsuz olarak belirlendiğini raporlamışlardır. Bu sonuçlara gerekçe olarak 42' sinin veri tabanı ile ilgili taksonomik farklılıklardan, 14' ünün elde edilen spektrumların uygun ayrılmamasıyla, 7' sinin ise başlangıçtaki geleneksel tanımlamadaki hatalardan kaynaklandığını bildirmişlerdir. Bu veriler ışığında, MALDI-TOF MS tekniğinin konvansiyonel yöntemlerin yerine geçme potansiyeline sahip güvenilir bir teknik olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Cherkaoui ve ark. tarafından 2010 yılında yapılan bir araştırmada, 720 bakterinin iki farklı MALDI-TOF MS sistemi ile tür tanımlaması yapmışlar ve sırasıyla Bruker ve Shimadzu sistemleri için doğru tanımlama oranlarını 680 izolatta 674 (%99.1) ve 639 izolatta 635 (% 99.4) olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar her iki sistemin ve dolayısıyla MALDI-TOF MS' in tür tanımlaması için ilk test olarak uygulanması ile laboratuvarlarda zamandan tasarruf edileceğini, izolat tanımlama maliyetinin azalacağını, özellikle bu şekilde kullanım ile maliyetlerde izolat başına yaklaşık 5 ABD doları tasarruf edileceğini bildirmişlerdir.

Martinez-Lamas ve ark. 2011 yılında, VITEK-2 ve API CAUX ile 73 Candida suşunun, 67 tanesinin tür düzeyinde ve 6 tanesinin cins seviyesinde tanımlandığını belirtmişlerdir. Aynı suşların MALDI - TOF MS tanımlamaları ise Shimadzu Launchpad ve SARAMIS veritabanı kullanılarak yapılmış ve her iki veritabanında da 73 izolatu tür düzeyinde tanımlayabilmiştir.

VITEK-2 ile iki MALDI - TOF MS (VITEK-MS ve Bruker Biotyper MS) tanımlama performanslarının araştırıldığı ve 188 Candida türünün kullanıldığı 2014 yılında yapılmış bir araştırmada VITEK-2, VITEK-MS ve Bruker Biotyper MS tanımlama sistemlerinin sırasıyla % 94.1 (177/188), % 93.0 (175/188) ve % 92.6 (174/188) oranında doğru tanımlama yaptığı ifade edilmiştir (Jamal ve ark. 2014). Araştırmacılar, 3 izolatin tanımlanamadığını, VITEK-MS ile 9 izolatin ise (*C.ortopsiloszisi*) veri tabanında bulunmamasından dolayı *C.parapsilosis* olarak belirlediklerini ifade etmişlerdir.

Bazı yayınlarda MALDI-TOF MS sisteminin farklı ticari sistemlerinin karşılaştırıldığını görmekteyiz. Biz araştırmamızda VITEK-MS (BioMerieux, Franca) ticari sistemini kullandık. Çalışmamızda diğer ticari sürümlerle çalışma

olanağımız olmadığı için MALDI-TOF MS' in diğer ticari sistemlerini karşılaştırma yapmadık.

Lima-Neto ve ark. 2014 yılında, Brezilya kültür koleksiyonunda 1 ile 52 yıl arasında korunan 40 *Candida* spp. izolatını MALDI-TOF MS tekniğini ile tanımlamışlardır. Sonuçlar morfolojik ve biyokimyasal analizlerle karşılaştırıldığında %15 uyumsuzluk göstermiştir. Bu sonuç ile MALDI-TOF MS' in gerek kültür koleksiyonlarında korunan *Candida* türlerinin tanımlanması için hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu, gerekse laboratuvarlarda uygulanan mevcut rutin yöntemlerin performansı ile karşılaştırıldığında belirgin faydalar sağlayabileceği net biçimde ortaya konmuştur.

Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarını tanımlamak için VITEK-2 YST ve VITEK-MS yöntemlerinin birlikte değerlendirildiği ve Sarigüzel ve ark. tarafından 2015 yılında yapılan bir araştırmada VITEK-2 YST kartı ve VITEK-MS için doğru tanımlama oranlarının sırasıyla % 90.7 ve % 100 olarak belirtilmiştir.

Ruiz de Alegria Puig ve ark. 2018 yılında kandidemili hastalardan izole edilmiş, 9 farklı *Candida* türünden oluşan 298 izolatı VITEK-MS ile tanımlamıştır. Araştırma sonucunda, 279 (% 93.62) izolatın doğru tanımlandığını bildirmişler. Araştırmacılar, ayrıca MALDI-TOF MS' in kandidemili hastalarda *Candida* türlerinin tanımlanmasında güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Alizadeh ve ark. 2017 yılında, vulvovajinal kandidiyaz tanılı hastalardan alınan ve konvansiyonel yöntemlerle *Candida* olarak tanımlanan 65 izolattan 61' ini (% 94) MALDI-TOF MS ile tanımlamışlardır. Araştırmalarında, *C.albicans* (% 58.5) en çok izole edilen tür olurken, diğer türler *C.tropicalis* (% 16.9), *C.glabrata* (% 7.7), *C.parapsilosis* (% 7.7) ve *C.guilliermondii* (% 3.1) olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda tanımlanan suşları, gönderildikleri klinikler dikkate alınmaksızın sıraladığımızda, *C.albicans* > *C.glabrata* > *C.parapsilosis* > *C.kefyr* = *C.krusei* > *C.tropicalis* > *C.dublinsiensis* > *C.membanifaciens* şeklinde olduğunu tespit ettik. *C. albicans* türünün diğer türler arasında oranına bakıldığında VITEK-MS ile 77 (%48.7), VITEK-2 ile 83 (%52.6) oranlarında olduğu dikkat çekmektedir. *C. Albicans*, VITEK-MS ve VITEK-2 ile sırasıyla yoğun bakım hastalarında %50 (10/20) ve %60 (12/20), cerrahi kliniklerden elde edilen örneklerde %53.8 (28/52)

ve %53.8 (28/52), dahili kliniklerden elde edilen örneklerde ise %45.3 (39/86) ve %50.0 (43/86) oranlarında belirlendi. Çocuk cerrahi, dermatoloji, kalp damar cerrahisi kliniklerinde *C.albicans* egemenliği hakim iken, onkoloji kliniğinde *C. parapsilosis* > *C. glabrata* = *C. keyfr* = *C.krusei* sıralamasıyla non-albicans Candida egemenliğinin yüksek olması ön plandaydı.

Çalışmaya aldığımız örnekleri sayısal olarak sıraladığımızda kan (73) > solunum (40) > idrar (24) > yara (15) > periton (6) şeklinde olduğunu tespit ettik. Burada örneklerin dağılımında eşitlik yoktu. Bu bize çalışmamız sonucunda, örnekler arasında eşitlik sağlansaydı hepsinde büyük oranda Candida tür dağılımında eşitlik olabileceğini düşündürmüştür.

Araştırmamızda, *C.albicans* tüm örneklerde birinci sırada üreyen türdü. Literatürlerde her ne kadar ikinci sıklıkta üreyen *C.parapsilosis* olduğu bildirilse de bizim çalışmamızda ikinci sırada (periton örneği hariç) izole edilen tür *C.glabrata* oldu. Periton örneğinde ise ikinci sırada *C.krusei* türü ürediğini tespit ettik.

Yapılan çalışmalarda *C.albicans'* in tüm örneklerde izolasyonun sık görüldüğü bildirilmekle birlikte bizim çalışmamızda da yüksek oranda tespit edilmiştir. Örneklerinde *C.albicans* tespit edilen hastaların klinikleri birbirinden farklı olduğu için ve en sık izole edilen tür olduğu için klinikte herhangi bir yaygın enfeksiyon ihtimalini düşündürmemiştir.

Literatürlerde MALDI-TOF MS yönteminin hızlı ve güvenilir tanımlama yapabilen bir yöntem olduğu bildirilmektedir. Uygulamamızda, MALDI-TOF MS sisteminde, plak üzerindeki kuyucuklarda 48 izolatu toplu olarak çalıştık. Cihazın 10-15 dakika sonra tanımlamaları yapmaya başladığını tespit ettik. Bir izolatın sonuçlanması için geçen süreyi ortalama 2 dakika olarak hesapladık.

Wieser ve ark. 2012' de yaptıkları çalışmalarında, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılacak ticari sistemlerin seçiminde hızlı olmasının yanı sıra maliyetinin de göz ardı edilmemesi gerektiğini vurgulamışlar.

VITEK-2 YST sistem için çalışma yaptığımız laboratuvardaki maliyetinin 2019 fiyatları; alım test başı 41 TL, sut fiyatı 17 TL olduğunu tespit ettik.

Taşbent ve Doğan 2018 yılında, MALDI-TOF MS' in maliyet analizini yaptıkları sunumlarında; cihazın alımı, cihazın bakım ücretleri, kullanılan sarf malzemelerin maliyetlerinin hesaplanmasıyla MALDI-TOF MS sisteminin toplam

maliyet açısından çok pahalı bir yöntem olduğunu, MALDI-TOF MS' in hızlı teknoloji olduğunu ama sadece belirli üniversite hastanelerinde kullanmak için uygun olabileceğini bildirmişlerdir.

Dhiman ve ark. ise 2011 yılında maliyet analizi yaptıkları çalışmalarında MALDI-TOF MS' in geleneksel yöntemlere göre daha az maliyetli olduğunu savunmuşlar.

Hastanemizde yapılan ve 105 maya mantarı örneğinin tanımlanmasında VITEK-2 sistem ve MALDI-TOF MS yöntemlerinin kullanıldığı bir çalışmada; VITEK-2 YST ile 100 (%95,2); VITEK-MS ile 103 (%98,1) tür düzeyinde tanımlanabildiği görülmüştür. Çalışmanın sonucunda; izolasyon oranlarının VITEK-2 ve VITEK MS için tatmin edici oranda olduğu, VITEK-MS' in kısa zamanda ve sadece düşük maliyetli sarf malzemesi ile yüksek identifikasyon sunmasıyla ileriki dönemlerde daha sık kullanılacağına vurgu yapılmıştır.

Yeni sistemlerin maliyet hesaplanmasının yapıldığı çalışmalar sonucu elde edilen veriler bize, maliyet hesaplanmasının kolay olmadığını, fakat VITEK-MS' in çok da ucuz olmadığını düşündürmüştür.

Bazı yayınlarda, mayaların tanımlanmasında kullanılan ticari sistemlerin tanımlama oranlarının sık izole edilen türlerde daha yüksek, nadir türlerde daha düşük olduğu bildirilmektedir. Karabıçak ve ark. 2015' de yaptıkları çalışmada, VITEK-2 sistemlerinin, sık görülen türlerde doğru tanımlamanın (en az %95) oranla daha yüksek, nadir görülen türlerde ise daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmamızda bu kanaati destekleyecek nitelikte istatistiksel veri oluşmamıştır.

Sonuç olarak, VITEK-2 ile MALDI-TOF MS sistemlerinin identifikasyon performansını karşılaştırdığımızda iki yöntem arasında anlamlı bir farklılık saptanmadığını, benzer tanımlama performansı sergilediğini tespit ettik. Biz bu çalışmayla klinik mikoloji laboratuvarlarında gerek VITEK-2 gerekse MALDI-TOF MS sistemleriyle sık veya nadir görülen maya mantarı türleri tanımlanıp sistemler arasında farklı sonuçların elde edilmesi durumunda türlerin tanımlanmasının geleneksel yöntemlerle doğrulanması gerekliliği kanaatindeyiz. Yine de sonuçlarımız hem VITEK-2' nin hem de MALDI-TOF MS' in güvenilir tanımlama metodu olduğunu düşündürmektedir. VITEK-2 sistemle çalışmamızın maliyet açısından avantajı, süre açısından dezavantajı vardı. MALDI-TOF MS' in ise en önemli

avantajı ise kısa çalışma süresi ve düşük sarf maliyeti ile tanımlamayı dakikalar içinde yapabilmesiydi. MALDI-TOF MS, bu sayede tedaviye erken başlanmasına yardımcı olabilir. Fakat maliyet yönünden düşünüldüğünde MALDI-TOF MS cihazının alımı pahalı olduğu için günlük mikroorganizma tanımlama sayısı düşük olan klinik laboratuvarlar için uygun olmadığı; cihaz, program ve bakım/değişim maliyetlerinin makul seviyelere inmesi durumunda, klinik mikoloji laboratuvarlarının tanı algoritmasında MALDI-TOF MS kullanımının yaygınlaşacağı kanaatindeyiz.



11. KAYNAKLAR

- Alizadeh M, Kolecka A, Boekhout T, Zarrinfar H, Ghanbari Nahzang MA, Badiie P, Rezaei-Matehkolaei A, Fata A, Dolatabadi S, Najafzadeh MJ. Identification of *Candida* species isolated from vulvovaginitis using matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Curr Med Mycol*. 2017;3(4):21-25.
- Arikan S, Sancak B, Hasçelik G, Günalp A. *Candida albicans* izolatlarında fosfolipaz aktivitesinin saptanması. *Flora* 1998;3:240-243.
- Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(9):1359-65.
- Bader O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*.2013;13(5):788-99.
- Beyda ND, Chuang SH, Alam MJ, Shah DN, Ng TM, McCaskey L, Garey KW. Treatment of *Candida famata* bloodstream infections: case series and review of the literature. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(2):438-43.
- Biberoglu G. Kütle spektrometresi ve tıp alanında kullanımı. *T Klin Tıp Bilimleri* 2003;23:491-498.
- Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. 2010;48(5):1549-54.
- Brandt ME, Warnock DW. Taxonomy and Classification of Fungi. In: Versalovic J. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol 2, 10th edn. Washington D.C: ASM Press. 2011;1747-1755.
- Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, Schrenzel J. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1169–75.
- Criseo G, Scordino F, Romeo O. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. *J Mikrobiyoloji Yöntemleri*. 2015;111:50-6.
- Critchley IA, Douglas LJ. Isolation and partial characterization of an adhesin from *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1987;133:629-36.
- Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012;36(2):380-407.
- Crozier WJ. Two cases of onychomycosis due to *Candida zeylanoides*. *Australas J Dermatol*. 1993;34(1):23-5.
- Culter JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*.1991;45:187-218.

- Çerikçiođlu N. Candida türleri. İçinde: Willke Topçu A, Söyletir G, Dođanay M (editor). Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Etkenlere Göre Enfeksiyonlar. Cilt 2, 3. Basım, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2008;2411-26.
- Çerikçiođlu N. Candida' ların İnce Yapısı. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. Candida Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu, Tutanaklar. Eskişehir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını. 2002;47-55.
- Çerikçiođlu N. Mantarlarda virülans faktörleri. ANKEM Dergisi 2012;26(Ek 2):261-269.
- De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. 2th edn. Centralbureau vooon Schimmelcultures/ Universtat Rovirai Virgili, Netherlands. 2000;178-300.
- Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. J Clin Microbiol. 2011; 49(4):1614-6.
- Doğan M. Matriks aracılı dezorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) sistemlerinin virolojide kullanımı. 2018, Altındış M(Ed). Temel, Klinik ve Tanısal Tıbbi Viroloji. Nobel Yayınevi, s: 419-25.
- Douglas LJ. Medical importance of biofilms in Candida infections. Rew Iberoam Micol. 2002;19(3):139-143.
- Edwards JE. Candida Species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas and Bennett' s Principles and Practice of Infectious Diseases. Vol 2, 7th edn. Churchill Livingstone: Philadelphia. 2010:3225-3241.
- Ellepola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol 2005; 43:65-84.
- Taşbent FE, Doğan M. Principle and cost analysis of MALDI-TOF MS microbial identification: an emerging and rapid technology Department of Basic Medical Sciences, Department of Microbiology, Meram Faculty of Medicine, Necmettin Erbakan University 2nd International Congress on Advances in Bioscience and Biotechnology (ICABB). Podgorica, Montenegro,2018 June 26-30.
- Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact micoorganisms by MALDI mass spectrometry. Mass Spectrom Rev.2001;20(4),157-71.
- Feyzioğlu B, Uğraklı S, Doğan M, Baykan M.. Kandida' ların Tanımlanmasında MALDI TOF MS Deneyimimiz. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16-20 Kasım 2016, Antalya; Konuşma özetleri ve bildiri kitabı: TPS-56. S.238.
- Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. Candida glabrata: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to C. albicans. Clin Microbiol Rev. 1999;12(1):80-96.
- Graf B, Adam T, Zill E, Göbel UB. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. J Clin Microbiol. 2000;38(5):1782-5.

- Gudlaugsson O, Gillerpie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable mortality of nosocomiyal candidemia, revisited. *Clin Infect Dis*. 2003;1;37(9):1172-7.
- Hazen KC, Howell SA. Candida, Cryptococcus and other yeasts of medical importance. In: *Manual of clinical microbiology*. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC, eds 8th edition. ASM Pres: Washington DC 2003: 1693-711.
- Howard DH. Acquisition, transport and storage of iron by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(3):394-404.
- Huffnagle GB, Herring AC, Traynor TR. Role of fungal virulence factors in evasion of host defences, *ARBS Ann Rev Sci* 2000;2:77-90.
- Iriart X, Lavergne R-A, Fillaux J, Valentin A, Magnaval J-F, Berry A, Cassaing S. Routine Identification of Medical Fungi by the New Vitek MS MatrixAssisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight System with a New Time-Effective Strategy. *J Clin Microbiol*. 2012;50(6):2107-2110.
- İnci R. Mantarların yapıları, üreme özellikleri ve sınıflanması, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Baskı: 1, Ustaçelebi Ş.(Editör) Güneş Kitabevi, Ankara. 1999:P.1015-1244.
- Jamal WY, Ahmad S, Khan ZU, Rotimi VO. Comparatvie evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spetctrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. *Int J Infect Dis*. 2014;26:167-70.
- Kalkancı A. Mikozların serolojik tanısında yenilikler. Tuncer, İ, Fındık D, Arslan U.(editor) 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Tutanaklar. Konya: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını. 2005;49:61-74.
- Karabıçak N, Uludağ Altun H, Karatuna O, Hazırolan G, Aksu N, Adiloğlu A, Akyar I. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında maya türlerinin tanımlanmasında sık kullanılan ticari sistemlerin değerlendirilmesi: çok merkezli bir çalışma. *Mikrobiyol Bül*.2015;49(2):210-20.
- Kartal ED. Fungal Üriner sistem enfeksiyonları. İçinde: *Fungal İnfeksiyonlar ve Tedavisi*. Arman D, Odabaşı Z.(editor). Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi. 2009; 73-84.
- Kauffman CA. Fungal infections. *Proc Am Thorac Soc*.2006;3(1):35-40.
- Kılıç SŞ. Kronik Mukokütanöz Kandidiyazis. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, İmmünoloji BD, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, BURSA. Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci* 2005;1(5): 83-7.
- Kiraz N. Candida türlerinde fenotipik ve genotipik tiplendirme. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, İzmir. Kongre Kitabı 1999:125-135.
- Kiraz N. Klinik örneklerden izole edilen Candida albicans suşlarının fenotiplendirilmesi ve farklı fenotiplerin bazı antifungal maddelere duyarlılıklarının araştırılması. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yan Dal Uzmanlık tezi 1996.

- Kocabay G, Aydın S, Tiryaki B, Vatanserver S, Erk O, Akkaya V, Güler K. C. keyfr pneumonia. İst Tıp Fak Derg.2005;68:26-28.
- Kocagöz T. Genomik ve proteomik infeksiyon hastalıklarındaki yeri ve önemi. Ankem Derg 2009;23(Ek 2):48-52.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Mycology. In: Diagnostic Microbiology, 5th ed. Philadelphia, Lippincott 1997: 983-1069.
- Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. Candida tropicalis: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. J Med Microbiol. 2010; 59(Pt 8): 873-80.
- Kubar A. Enfeksiyon hastalıklarının tanısında laboratuvarında tasarlanan nükleik asit testleri ve gereksinimler. Moleküler Tanı Dergisi 2007;3(1):13-17.
- Kurtzman CP, Fell JV, Boekhout T. The Yeasts A Taksonomic Study. Vol 1, 5th edn. USA: Elsevier. 2011;3-100.
- Kuştimur S. Candida Türlerinin İdentifikasyonu. İçinde: Tıbbi Önemi Olan Fungal Etkenlerin Tanımlanması Uygulamalı Eğitimi, Kurs Kitapçığı. Ankara; Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2013: 69-83.
- Kuştimur S. Kandida patogeneğinde rol oynayan faktörler. Mik Bul. 1994;28:175-181.
- Kutlugül Y. Tekrarlayan Vajinal Mantar Enfeksiyonu. Nisan 2009.
- Lima-Neto R, Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C, Neves RP. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a Candida clinical isolates culture collection. Braz J Microbiol.2014, 29;45(2):515-22.
- Liu WC, Chan MC, Lin TY, Hsu CH, Chiu SK. Candida lipolytica candidemia as a rare infectious complication of acute pancreatitis: a case report and literature review. J Microbiol Immunol Infect. 2013; 46(5): 393-6.
- Lotz A, Ferroni A, Beretti JL, Dauphin B, Carbonelle E, Guet-Revillet H, Veziris N, Hyem B, Jarlier V, Gaillard JL, Pierre-Audigier C, Frapy E, Berche P, Nassif X, Bille E. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2010;48(12):4481-6.
- Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horre R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl HG. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. J Clin Microbiol. 2009;47(9):2912-7.
- Martinez-Lamas L, Perez del Molino ML, Pardo F, Varela E, Regueiro BJ. [Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry vs conventional methods in the identification of Candida non-albicans]. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(8):568-72.

- Masood A, Sallah S. Chronic disseminated candidiasis in patients with acute leukemia: emphasis on diagnostic definition and treatment. *Leuk Res.* 2005;29(5):493-501.
- McMullen AR, Wallace MA, Pincus DH, Wilkey K, Burnham CA. Evaluation of the Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of Clinically Relevant Filamentous Fungi. *J Clin Microbiol.* 2016;54(8):2068-73.
- Neppelenbroek K, Seo RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, Campanha NH. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis.* 2014;20(4):329-44.
- Ochiuzzi ME, Çataldi S, Guelfand L, Maldonado I, Arechavala A, Red de Micologia CABA, Argentina. Evaluation of Vitek 2 for the identification of *Candida* yeasts. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46(2):107-10.
- Otağ F, Aslan G, Şen S, Emekdaş G. Fungemi etkeni *Candida* türlerinin hızlı tanısında CHROM agar *Candida* besiyerininin kullanımı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2006;36 (4): 200-204.
- Oz Y, Kiraz N. Diagnostic methods for fungal infections in pediatric patients: microbiological, serological and molecular methods. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011; 9(3): 289-98.
- Özdemir Ş, Bilen H. Oral Kandidiyazis ve Diğer Fungal Hastalıklar. *Deri ve Zührevi Hastalıkları AD, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Erzurum. Türkiye Klinikleri J Dermatol-Special Topics* 2015; 8(4):35-8.
- Pfäller MA, Diekema DJ, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang SC, Gibbs DL, Newell VA. *Candida guilliermondii*, an Opportunistic Fungal Pathogen with Decreased Susceptibility to Fluconazole: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(10): 3551–6.
- Pfäller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, Franks B, Azie NE. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. *PLoS One.* 2014,3;9(7):e101510.
- Pfäller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a Persistent public health problem. *Clini Microbiol Rev* 2007;20(1):133-63.
- Pfäller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROM agar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J Clin Microbiol.* 1996; 34(1): 58-61.
- Pfäller MA, Diekema DJ, Colombo AL, Kibbler C, Ng KP, Gibbs DL, Newell VA. *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(10): 3578-82.
- Pietrucha-Dilanchian P, Lewis RE, Ahmad H, Lechin AE. *Candida lusitanae* kateter ilişkili sepsis. *Ann Farmakoloji.* 2001; 35 (12): 1570-4.

- Posteraro B, De Carolis E, Vella A, Sanguinetti M. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Rev Proteomics* 2013;10(2):151-164.
- Rinaldi GM. Biology and pathogenicity of *Candida* species .In: Bodey PG (ed). *Candidiasis, pathogenesis, diagnosis and treatment*.New York :Raven Press; 2000: 1
- Rippon JW. *Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic Actinomyces*,Third edition, W.B Saunders Company. 1999: 532.
- Ruiz de Alegria Puig C, Agüero-Balbin J, Fernandez-Mazarrasa C, Martinez-Martinez L. Evaluation of the Vitek-MS™ system in the identification of *Candida* isolates from bloodstream infections. *Rev Iberoam Micol.* 2018;35(3):130-133.
- Sanguinetti M, Posteraro B. Identification of Molds by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2017;55(2):369-379.
- Sariguzel FM, Berk E, Koc AN, Sav H, Aydemir G. Evaluation of chromogenic agar, [corrected] VITEK 2 YST and VITEK MS for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. *Infez Med.* 2015;23(4):318-22.
- Segal E, Elad D. *Candidiasis*. In: Merz W, Hay R. *Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections. Medical Mycology*. 10th edn. London: Hodder Arnold. 2005; 579-623.
- Sobel JD, Kauffman CA, McKinsey D, Zervos M, Vazquez JA, Karchmer AW, Lee J, Thomas C, Panzer H, Dismukes WE. *Candiduria: a randomized double blind study of treatment with fluconazole and placebo*.The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. *Clin Infect Dis.* 2000; 30(1): 19-24.
- Sullivan DJ, Henman MC, Moran GP, O'Neill LC, Bennet DE, Shanley DB, Coleman DC. Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-albicans *Candida* species. *J Med Microbiol* 1996; 44(6): 399-408.
- Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis: Characteristics and Identification*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(2): 329–334.
- Susever S, Yeğenoğlu Y. Evaluation of the significance of molecular methods in the diagnosis of invasive fungal infections: comparison with conventional methods. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45(2):325-35.
- Sutton D. A. (2007). *Specimen Collection, Transpor, and Proceessing: Mycology*. In *Manual of Clinical Microbiology*. Murray P. R, Baron E. J, Jorgensen J. H, Landry M. L, Pfaller M. A. (Eds.), 9. Baskı ed. ASM Press, Washington. pp. 1728-1736.
- Sütçü M, Salman N. *Mantar enfeksiyonlar*. All content following this page was uploaded by Murat Sutcu on 2016 Apr.
- Test Rehberi Mikoloji Ünitesi Kod No: NAEK/ MRLDB Yayın Tarihi/No: 01.05.2013/01 Revizyon Tarihi/ No: 00.00.0000/00.

- Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(4): 606–625.
- Tümbay E, Karakartal G. Sistemik kandida infeksiyonları. Tümbay E (ed). *Candida infeksiyonları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları. Bilgehan Yayınevi* 1994: 35.
- Tümbay E. *Candida* türleri. İçinde: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi S, Tümbay E, Mete Ö. Ustaçelebi Ş. editor. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.* Ankara: Güneş Kitabevi. 1999; 1081-1086.
- Unat EK. *Tıp Mikolojisi.* Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M. *Unat'ın tıp parazitolojisi. İnsanın ökaryonlu parazitleri ve bunlarla oluşan hastalıkları. 5. baskı. İstanbul, Cerrahpaşa Tıp Fak. Vakfı Yayınları : 15, 1995; 682-860.*
- Ural, O. *Fungal İnfeksiyonların Epidemiyolojisi ve Korunma.* *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 2004; 8, 159-167.
- Vazquez JA, Sobel JD. *Candidiasis.* In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD. *Clinical Mycology.* New York: Oxford University Press. 2003; 141-188.
- Vella A, Carolis ED, Vaccaro L, Posteraro P, Perlin DS, Kostrzewa M, Posteraro B, Sanguinetta M. *Rapid Antifungal Susceptibility Testing by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Analysis.* *J Clin Microbiol.* 2013; 51(9):2964-2969.
- Whiteway M, Bachewich C. *Morphogenesis in Candida albicans.* *Annu Rev Microbiol.* 2007;61:529-53.
- Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. *MALDI-TOF-MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review).* *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93(3): 965-74.
- Wilke A. *Kandidemi nasıl değerlendirilmeli? Ne yapılmalı? İnfeksiyon Derg* 2007; 2(ek): 117-122.
- Willinger B, Kienzl D, Kurzai R. *Diagnostic of fungal infections.* In: Esser K, Kurzai O. *The Mycota. Human fungal Pathogens. 2nd edn. Vol 12. New York: Springer* 2014; 229-253.
- Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. *Koneman' s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th edn. Philadelphia: PA Lippincott Co.* 2006; 1151-1242.
- Yalınay Çırak M. *Genomik, Transkriptomik, Proteomik.* Durmaz R. IV. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu 3-7 Eylül 2007, Malatya. Kurs Kitabı: 125-136.*
- Yeğenoğlu Y. *Candida İnfeksiyonlarının epidemiyolojisi.* İçinde: Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. (ed) *Candida Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Sempozyumu, Tutanaklar. Eskişehir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını. 2002; 43: 55-64.*
- Yıldıran, Ş. T. *Mantar İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı.* In *Temel ve klinik mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş, Günal M, İmir T, Cengiz T, Tümbay E, Mete Ö (Eds.), Güneş kitabevi, 1999. Ankara. pp. 1127-1144.*

Yücel A, Kantarcıoğlu S. Some important changes in taxonomy of *Candida albicans*. *Cerrahpaşa J Med*. 2000; 30: 236-246.

Yücel A, Sezgiç N. Lam-lamel arasında hazırlanan örneklerin mantar yönünden incelenmesi sırasında ortama dimethyl sulphoxide ilavesinin önemi. *T.Parazitol.Derg*. 1998; 22(3): 299-302.

Yücel A. *Candida*' ların dünü. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. (Editörler). *Candida Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu*, Tutanaklar. Eskişehir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 2002; 43: 3-28.

Yücel A. Medical Mycology: Yesterday and Today. *Cerrahpaşa J Med* 1999; 30 (2):191-198.

Yücesoy M, Karaman M. *Candida* türlerinin biyofilm üretimi ve antifungal duyarlılık paternleri. *Mikrobiol Bült*. 2004; 38 (1-2): 91-98.



12. ÖZGEÇMİŞ ve EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Dudu Çuhadar

Doğum Tarihi ve Yeri:15.01.1984 KONYA

Medeni Durumu: Bekar

**Adres: Musalla Bağları Mahallesi Mahşer Sokak Gürcan Sitesi No:16
Selçuklu/KONYA**

Telefon:05417954183

E-Mail:dudubiyolog@gmail.com

**Mezun Olduğu Okul:Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji
Bölümü**

Görev Yeri: Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Yabancı Diller: İngilizce

**Ek-A. Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz
Dışı Araştırmalar Etik Kurul Kararı**

T.C.

**NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI**

Toplantı Sayısı:91

Toplantı Tarihi: 05 Temmuz 2019

Karar Sayısı:2019/1985:Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU' nun "Tıbbi önemi olan Maya Mantarlarının MALDI TOFF-MS ile tanımlanması" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 25.06.2018 tarihli çalışma başlığı değişikliği dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Dudu ÇUHADAR' ın yüksek lisans tez çalışma başlığının "Matriks Aracılı Lazer Dezorbisyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (Maldı Tof-Ms) İle Tıbbi Önemi Olan Maya Mantarlarının Tanımlanması" olarak değiştirilmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU

Yardımcı Araştırmacı: Dudu ÇUHADAR

ASLI GİBİDİR

05.07.2019

Prof. Dr. Ayşe S. ŞAHİN

İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkan Yardımcısı