



**CANDIDA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER TEKNİKLERLE
TİPLENDİRİLMESİ**

Emrullah AKSAKAL

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Doç. Dr. Özlem BARIŞ**

**2016
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**CANDIDA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER TEKNİKLERLE
TIPLENDİRİLMESİ**

Emrullah AKSAKAL

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

ERZURUM

2016

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

CANDIDA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER TEKNİKLERLE TİPLENDİRİLMESİ

Doç. Dr. Özlem BARIŞ danışmanlığında, **Emrullah AKSAKAL** tarafından hazırlanan bu çalışma, 21/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **Biyoloji** Anabilim Dalı **Genel Biyoloji** Bilim Dalı'nda **Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Mehmet Nuri AYDOĞAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özlem BARIŞ

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun **23.06/2016** tarih ve **26/.../25**... nolu kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Ertan YILDIRIM
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu (BAP) kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: 2012 / 478

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

***Candida* TÜRLERİNİN MOLEKÜLER TEKNİKLERLE TIPLENDİRİLMESİ**

Emrullah AKSAKAL

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem BARIŞ

Bu çalışmada Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına ait kültür koleksiyonundan alınan *Candida* türleri kullanılmıştır. Alınan 60 adet *Candida* izolatlarının tanı ve karakterizasyonu; konvensiyonel (morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler) ve moleküler yöntemlerle yapılmış olup tür düzeyinde tanımlanmıştır. Spesifik primerler yardımıyla RAPD - PCR moleküler tiplendirme metodları kullanılarak 60 *Candida* türünün akrabalık dereceleri belirlenmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmada dört farklı DNA izolasyon tekniği denenerek *Candida* türleri için en uygun DNA izolasyon metodu belirlenmiştir. İzolasyonu yapılan ve RAPD – PCR yöntemi ile tiplendirilmeye çalışılan *Candida*'ların istatistiki olarak değerlendirilmesi yapılmış ve *C. albicans*'ın merkezde %35, ve tüm dendogramda %57 oranında dağılım gösterdiği ve tüm *Candida*'lar içinde merkezi konumda yer aldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte tüm *Candida*'lara oranla %3,3 oranında *C. guilliermondii*, %5 oranında ise *C. pseudotropicalis*, *C. albicans*'lara yakın özellikler göstererek *C. albicans* grupları içinde yer almışlardır. Ayrıca %3,3 oranında *C. geotrichum*, hem *C. glabrata*ya hemde *C. tropicalis*'e 1. Derece, *C. albicans*'lara ise 2. derece yakın akrabalık göstermiştir. *C. glabrata*'ya ait iki farklı grup, zıt kutuplarda yer alarak *C. albicans*'lara akrabalık derecelikleri bakımından uzak yerleşim göstermişlerdir. *C. krusei* türleri'de %3,3 ve %5 oranlarında iki farklı grup olarak zıt kutuplarda ve *C. albicans*'lara akrabalık yönünden yakın derecede yer almışlardır. *C. parapsilosis* türlerinin çalışmada kullanılan tüm *Candida*'lara oranı %8 olup, en uzak akraba olduğu saptanmıştır. Aynı türlerin farklı gruplarda yer alan bireyleri için farklı suşlar olabileceği değerlendirilmesi yapılmıştır.

2016; 76 sh

Anahtar Kelimeler: *Candida*, RAPD - PCR, DNA İzolasyon, Dendogram

ABSTRACT

Master Thesis

TYPING *CANDIDA* SPECIES WITH MOLECULAR TECHNIQUES

Emrullah AKSAKAL

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Science of General Biology

Supervisor: Doç. Dr. Özlem BARIŞ

Candida species, which are taken from culture collection belonging to microbiological laboratory, Atatürk University faculty of medicine, have been used in this research. The diagnosis and characterisation of obtained isolates have been done with convectional (morphological, physiological and biochemical tests) and molecular methods, and 60 candida species have been taken as diagnosed at the species level. The degree of affinity of 60 candida species has been determined by the help of specific primary by using RAPD - PCR molecular typing procedures. For this purpose, most efficient method that can be used for DNA isolation of candida species, has been determined by proving four different DNA isolation techniques. The *Candida*, which were insulated and tried to typing with RAPD – PCR, have been statistically evaluated and they have shown that they fall into the centre among all *Candida* by ranging at the rate of %35 in centre of *C. albicans* and at the rate of %57 in all dendograms. In addition, compared to all *Candida*; they have taken part at the rate of %3,3 in *C.guilliermondii*, %5 in *C. pseudotropicalis* and *C. albicans* by showing similarity with *C. albicans*. Besides, they have shown primary affinity with both *C. glabrata* and *C. tropicalis*, and at the second rate with *C. albicans* and also at the rate of %3,3 with *C. geotrichum*. Two different groups *C. glabrata* which are at the rate of %1,6 and %3,3 compared to all *Candida* and belonging to *C. glabrata*, have shown away habitat in terms of the degree of affinity to *C. albicans* by being poles apart. Species of *C. krusei* in poles apart as two different groups at the rate of %3,3 and %5, have takes part near to *C. albicans* in terms of affinity. Species of *C. parapsilosis*'s rate is %8 compared to all *Candida* which are used in the research, and it has been determined that they are the most distant relatives. It has been evaluated that there can be different strains for the individuals of the same species in different in groups.

2016; 76 pages

Key Words: *Candida*, RAPD - PCR, DNA Isolation, Dendogram

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu (BAP) tarafından 2012 / 478' nolu proje olarak desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Üniversite yönetimimize teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Bu çalışmanın planlanması ve değerlendirilmesinde büyük emeği geçen ve çalışmalar dışında da her zaman yanımda olan, fikirlerini ve sabrını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Özlem BARIŞ'a ve desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye, Sayın Prof. Dr. Esin AKTAŞ'a, Sayın Doç. Dr. Mehmet Nuri AYDOĞAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. İsmail BEZİRGANOĞLU'na ve Biyoloji Bölüm Başkanım Sayın Prof. Dr. Ökkeş ATICI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezin hazırlanma sürecinde fikirlerinden istifade ettiğim, çalışmalarına yardımda bulunan ve her zaman yanımda olan değerli eşim Biyolog Saliha AKSAKAL'a tez yazım sürecinde desteklerini hiç esirgemeyen Sayın Uzm. Biyolog Selma SEZEN'e ve çalışmam sırasında benden daha fazla emek harcayan tüm Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarı çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca eğitim hayatım boyunca bütün desteklerini arkamda hissettiğim Babam Sayın Hüsnü AKSAKAL'a ve kıymet ifadeleri sayfalara sığmayacak olan kıymetli ağabeyim Sayın Doç. Dr. Enbiya AKSAKAL'a maddi ve manevi bütün desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Emrullah AKSAKAL

Haziran 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Tarihçe	5
2.2. Mantarların Genel Özellikleri	6
2.3. Mantarlarda Üreme	8
2.3.1. Eşeyli üreme.....	9
2.3.2. Eşeysiz üreme	9
2.4. Mantarların Sınıflandırılması.....	10
2.5. <i>Candida</i> 'ların Genel Özellikleri	11
2.5.1. Hücre ve hücre duvar yapısı	14
2.5.2. <i>Candida</i> 'ların sınıflandırılması.....	16
2.5.3. <i>Candida</i> ekolojisi	16
2.5.4. <i>Candida</i> epidemiyolojisi.....	17
2.6. <i>Candida</i> Türlerinin Laboratuvar Tanısı	18
2.6.1. Direkt bakı ve kültür.....	18
2.6.2. İdentifikasyon.....	19
2.6.3. Hif blastospor ve klamidospore oluşumu	19
2.6.4. Karbohidrat asimilasyon testi	20
2.6.5. Nitrat asimilasyon testi	20
2.6.6. Karbohidrat fermantasyon testi	20
2.6.7. Üreaz testi	21
2.6.8. Kromojenik besiyeri	21

2.6.9. Serolojik yöntemler	22
2.6.10. Moleküler tanı yöntemleri	22
2.6.10.a. Random Amplification Of Polymorphic DNA (RAPD).....	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM	25
3.1. Hasta Örnekleri ve Referans Suşlar	25
3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	25
3.3. Çalışmada Kullanılan Çözelti ve Besiyerlerinin Hazırlanışı	26
3.4. Yöntem.....	29
3.4.1. DNA izolasyonu 1	30
3.4.2. DNA izolasyonu 2.....	31
3.4.3. DNA izolasyonu 3.....	33
3.4.4. DNA izolasyonu 4.....	34
3.5. Kullanılan Primerler.....	37
3.5.1. Primerlerin hazırlanması	38
3.5.2. Reaksiyonun hazırlanması	38
3.5.3. PCR programı	38
3.5.4. Agaroz jel elektroforezi:	38
3.6. Sonuçların İstatistik Olarak Değerlendirilmesi.....	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	40
4.1. Çalışmada Kullanılan <i>Candida</i> Türleri	40
4.2. RAPD-PCR Sonuçları.....	41
4.3. Sonuçların İstatistik Olarak Değerlendirilmesi.....	52
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	61
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	77

SİMGELER DİZİNİ

µl	Mikrolitre
A	Adenin
bp	Base pair (Baz çifti)
C	Sitozin
CTAB	Setil Trimetil Amonyum Bromür
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid Tri Fosfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
DD	Disk Difüzyon
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
G	Guanin
g	gram
M	Molar
ml	Mililitre
°C	Santigrat Derece
PCR	Polimerase Chain Reaction
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribozomal RNA
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
STR	Ardışık Dizi Tekrarı
T	Timin
TAE	Tris Asetat EDTA tamponu
TBE	Tris-Borat-EDTA tamponu
TE	Tris-EDTA tamponu
Tris-HCl	Trihidroksimetil amino metan-hidroklorik asit
tRNA	Transfer RNA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>C. albicans</i> germ tüp.....	12
Şekil 2.2. <i>Candida</i> spp.....	12
Şekil 4.1. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin E1 primeri ile RAPD-PCR sonucu 1 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1-22 <i>C. albicans</i> türleri)	42
Şekil 4.2. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin E1 primeri ile RAPD-PCR sonucu 2 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 23-34 <i>C. albicans</i> türleri, 35-39 <i>C. krusei</i> türleri, 40-43 <i>C. guilliermondii</i> türleri).....	42
Şekil 4.3. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin E1 primeri ile RAPD-PCR sonucu 3 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 44-47 <i>C. glabrata</i> türleri, 48-50 <i>C. tropicalis</i> türleri, 51-53 <i>C. pseudotropicalis</i> türleri, 54-58 <i>C. parapsilosis</i> türleri, 59-60 <i>C. geotrichum</i> türleri).....	43
Şekil 4.4. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin E3 primeri ile RAPD-PCR sonucu 1 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1-22 <i>C. albicans</i> türleri)	43
Şekil 4.5. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin E3 primeri ile RAPD-PCR sonucu 2 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 23-34 <i>C. albicans</i> türleri, 35-39 <i>C. krusei</i> türleri, 40-43 <i>C. guilliermondii</i> türleri).....	44
Şekil 4.6. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin E3 primeri ile RAPD-PCR sonucu 3 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 44-47 <i>C. glabrata</i> türleri, 48-50 <i>C. tropicalis</i> türleri, 51-53 <i>C. pseudotropicalis</i> türleri, 54-58 <i>C. parapsilosis</i> türleri, 59-60 <i>C. geotrichum</i> türleri).....	44
Şekil 4.7. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin E5 primeri ile RAPD-PCR sonucu 1 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1-22 <i>C. albicans</i> türleri)	45

- Şekil 4.8.** Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **E5** primeri ile RAPD-PCR sonucu **2** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 23–34 *C. albicans* türleri, 35–39 *C. krusei* türleri, 40–43 *C. guilliermondii* türleri)..... 45
- Şekil 4.9.** Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **E5** primeri ile RAPD- PCR sonucu **3** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 44–47 *C. glabrata* türleri, 48–50 *C. tropicalis* türleri, 51–53 *C. pseudotropicalis* türleri, 54–58 *C. parapsilosis*, 59–60 *C. geotrichum* türleri)..... 46
- Şekil 4.10.** Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **F5** primeri ile RAPD-PCR sonucu **1** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1-22 *C. albicans* türleri) 46
- Şekil 4.11.** Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **F5** primeri ile RAPD-PCR sonucu **2** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 23–34 *C. albicans* türleri, 35–39 *C. krusei* türleri, 40–43 *C. guilliermondii* türleri)..... 47
- Şekil 4.12.** Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **F5** primeri ile RAPD- PCR sonucu **3** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 44–47 *C. glabrata* türleri, 48–50 *C. tropicalis* türleri, 51–53 *C. pseudotropicalis* türleri, 54–58 *C. parapsilosis* türleri, 59–60 *C. geotrichum* türleri)..... 47
- Şekil 4.13.** Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **F7** primeri ile RAPD-PCR sonucu **1** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1-22 *C. albicans* türleri) 48
- Şekil 4.14.** Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **F7** primeri ile RAPD-PCR sonucu **2** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 23–34 *C. albicans* türleri, 35–39 *C. krusei* türleri, 40–43 *C. guilliermondii* türleri)..... 48
- Şekil 4.15.** Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **F7** primeri ile RAPD- PCR sonucu **3** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 44–47 *C. glabrata* türleri, 48–50 *C. tropicalis* türleri, 51–53 *C. pseudotropicalis* türleri, 54–58 *C. parapsilosis* türleri, 59–60 *C. geotrichum* türleri)..... 49

Şekil 4.16. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin OPA3 primeri ile RAPD-PCR sonucu 1 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1-22 <i>C. albicans</i> türleri)	49
Şekil 4.17. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin OPA3 primeri ile RAPD-PCR sonucu 2 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 23-34 <i>C. albicans</i> türleri, 35-39 <i>C. krusei</i> türleri, 40-43 <i>C. guilliermondii</i> türleri).....	50
Şekil 4.18. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin OPA3 primeri ile RAPD- PCR sonucu 3 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 44-47 <i>C. glabrata</i> türleri, 48-50 <i>C. tropicalis</i> türleri, 51-53 <i>C. pseudotropicalis</i> türleri, 54-58 <i>C. parapsilosis</i> türleri, 59-60 <i>C. geotrichum</i> türleri).....	50
Şekil 4.19. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin OPE18 primeri ile RAPD-PCR sonucu 1 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1-22 <i>C. albicans</i> türleri)	51
Şekil 4.20. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin OPE18 primeri ile RAPD-PCR sonucu 2 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 23-34 <i>C. albicans</i> türleri, 35-39 <i>C. krusei</i> türleri, 40-43 <i>C. guilliermondii</i> türleri).....	51
Şekil 4.21. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin OPE18 primeri ile RAPD-PCR sonucu 3 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 44-47 <i>C. glabrata</i> türleri, 48-50 <i>C. tropicalis</i> türleri, 51-53 <i>C. pseudotropicalis</i> türleri, 54-58 <i>C. parapsilosis</i> türleri, 59-60 <i>C. geotrichum</i> türleri).....	52
Şekil 4.22. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin E1 primerine göre dendogramı	53
Şekil 4.23. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin E3 primerine göre dendogramı	54
Şekil 4.24. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin E5 primerine göre dendogramı	55
Şekil 4.25. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin F5 primerine göre dendogramı	56
Şekil 4.26. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin F7 primerine göre dendogramı	57
Şekil 4.27. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin OPA3 primerine göre dendogramı... 58	
Şekil 4.28. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin OPE18 primerine göre dendogramı. 59	
Şekil 4.29. Hasta kaynaklı <i>Candida</i> türlerinin tüm primerlere göre dendogramı.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. *Candida* türlerini diğer mayalardan ayıran mikroskobik özellikler 15

Çizelge 4.1. Hasta kaynaklı *Candida* türleri ve kodları..... 40



1. GİRİŞ

Candida türleri doğada yaygın olarak görülen maya mantarları olup cansız yüzeylerde, kuşların sindirim kanallarının normal florasında ve birçok bitkide bulunmakla birlikte insanlarda; deri, saç, oral veya vajinal kanalın yüzeysel enfeksiyonları ve hayatı tehdit eden sistemik enfeksiyonlarla ilişkili, en yaygın insan mantar patojenleridir (Sardi 2013; Yarar 2014). İnsan vücudunun normal florasında yer alabilen *Candida* türleri özellikle immün yetmezlikli hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır (Hazen 2009; Gültekin 2010). Bugüne kadar 250.000 türe sahip olduğu bilinen mantarlar içerisinde dermatofitler ve bazı *Candida* türleri de dahil olmak üzere 200 civarı mantar türünün insan ve hayvanlar üzerinde patojen etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bunların dışında sağlıklı bireylerde hastalığa neden olmadığı bilinen bazı mantar türleri, immün yetmezlikli hastalarda fırsatçı patojen özellik gösterebilmektedir (Ustaçelebi 1999; Gayıbov 2014).

Bu fırsatçı patojenlerinde içinde bulunduğu maya taksonomisine ait kurallar uluslararası botanik isimlendirme kodları (International Code of Botanical Nomenclature-ICBN) tarafından düzenlenmekte olup, bunların yapıları ve oluşum biçimleri mantarların sınıflandırılmalarında temel oluşturmaktadır. *Candida* ismi 1959'da Montreal'de "Uluslararası Botanik Kongresi'nde" *Basidiomycota*'ya ait olanlar ayrı tutularak *Ascomycota* içine alınmıştır. *Candida* türleriyle ilgili hem klasik hem de moleküler araştırmalar; *Candida* türlerinin teleomorflarının keşfedilmesini ve genus içindeki bazı türlerinde aşamalı olarak silinmesini sağlamıştır. *Candida* türleri sistematik olarak *Ascomycota* şubesinin, *Hemiascomycetes* sınıfının, *Saccharomycetales* takımı ve *Candidiaceae* familyası içinde bulunurlar (Gültekin 2009; Turan 2014).

Genel olarak bakıldığında *Candida* hücreleri oval, ince duvarlı, hareketsiz, kapsülsüz yapıdadır. 1-3 x 4-6 µm boyutlarında, Gram özellik bakımından pozitif olan *Candida*'lar lateral tomurcuklanma ile eşeysiz üreyen fakültatif anaerob mikroorganizmalardır. *Candida*'lar yaygın maya formlarından farklı olarak canlı

dokularda ve kültürlerde gerçek veya yalancı hif oluşturabilirler. *Candida* türlerinin çoğu yalancı hif oluştururken, *C. albicans*, *C. norvegensis* ve *C. dubliniensis* türlerinin gerçek hif oluşturma özellikleri mevcuttur (Calderone 2002).

En sık karşılaşılan tür *C. albicans* olmakla birlikte klinik açıdan önemli olan *Candida* türleri; *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis* sıklıkla saptanan türler arasındadır. Nadiren görülen *Candida* türleri ise *C. famata*, *C. utilis*, *C. inconspicua*, *C. lipolytica*, *C. rugosa*, *C. intermedia*, *C. haemulonii*, *C. norvegensis*, *C. catenulata*, *C. viswanathi*, *C. lambica* ve *C. zeylanoides*'tir (Hazen 2009).

Steril vücut sıvılarında (BOS, Kan, periton, plevral, ve prekardial sıvılar) veya doku örneklerinden izole edilmeleri ve üretilmeleri ya da kültürlerde fazla sayıda olmaları önem arz etmekte ve kaygıyla karşılanmaktadır. Hastalık belirtileri olmaksızın idrar, balgam, feçes ve vajenden az sayıda izole edilmeleri durumunda ise, immün yetmezlikli hastalar dışında tedaviye ihtiyaç duyulmamaktadır (Gültekin 2009).

Son yıllarda steril vücut sıvılarında *Candida* varlığının saptanması önem kazanmıştır. Özellikle immün yetmezliği olan hastalarda ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı nedeniyle sağlıklı bireylerde fungal enfeksiyonların görülme sıklığı artmıştır. Kanser nedeniyle ölen hastaların otopsi raporları incelendiğinde bu hastaların %50'den fazlasında *Candida* enfeksiyonu, %33 *Aspergillus* enfeksiyonu, bazılarında *Cryptococcus* ve son dönemlerde de *Fusarium* enfeksiyonları görülmektedir (Anaissie 1992; Walsh 1992).

Yapılan çalışmalarda son on yılda hastane kökenli dolaşım sistemi enfeksiyonları arasında kandidemi sıklığının beş kat arttığı ve *Candida*'ların en sık rastlanan dördüncü etken olduğu belirtilmektedir. Son yıllarda hastane kökenli kandidemi sebebiyle ölüm oranları %33-75 arasında değişmektedir (Uzun 2000; Marchetti 2004).

Mantar hastalıklarının etkenlerinin tanınmasında, doğrudan mikroskopik inceleme ve kültür ekim - değerlendirme yöntemleri günümüzde halen önemlerini korumasına

rağmen bu yöntemlerde sürenin uzun olması ve her zaman doğru sonuç vermemesi ve bazı mantar türleri için uygulama ve yorumlamanın zor olması ciddi bir dezavantajdır. Bu yöntemlerin aksine daha hızlı, duyarlılık ve özgüllükleri yüksek yeni tanılama yöntemlerinin kullanılması mikroorganizmaların doğru tanılanması ve hastaya uygulanacak etkin tedavinin belirlenmesinde büyük önem arz etmektedir (Çerikçioğlu 2003; Saraçlı 2005).

Son yıllarda DNA çoğaltma yöntemlerinin gelişmesi bu güçlüklerin çözümlenmesinde önemli bir adım olarak dikkatleri çekmektedir. Mantar enfeksiyonlarının moleküler olarak tanılanması ya doğrudan hastadan alınan örneklerle ya da kültür ortamında yetiştirilen mikroorganizmalarla gerçekleştirilebilmektedir (Çerikçioğlu 2003; Saraçlı 2005).

Moleküler tanılamamanın ilk aşamasında öncelikle, hastada kuşku duyulan mantar enfeksiyonunun varlığının kanıtlanabilmesi, ikinci aşamada ise enfeksiyon etkeni olan mantar ve/veya mantarların izole edilerek tür düzeyinde tanılanması gerekmektedir. Mantarların genotip çalışmalarında, proteinleri kodlayan intron bölgeleri ve ribozomal DNA (rDNA) gibi protein kodlamayan gen bölgeleri hedef olarak kullanılmaktadır (Çerikçioğlu 2003; Saraçlı 2005).

Mantar türlerinin genetik özelliği ve türler arasındaki genetik ilişkinin düzeyini belirlemek için rRNA dizini, mitokondrial DNA ve diğer nükleer DNA zincirlerinin analizleri kullanılmaktadır. Filogenetik araştırmalar sayesinde birçok anamorfik (eşeysiz üreyen) ve Ascomycota veya Basidiomycota gibi telemorfik (eşeyli üreyen) özelliklere sahip organizmalar arasında yakın genetik ilişki bulunduğunun ortaya koyulması, çok sayıda hastalık yapabilme özelliğine sahip ve çürükçül mantar gruplarına ait DNA yapılarının uluslararası veri tabanlarına girilmesi ve soy gelişim (akrabalık) ilişkilerinin daha iyi anlaşılması gibi bilimsel gelişmeler, mantar hastalıklarının hızlı DNA-tabanlı testlerle tanılanmasına büyük katkı sağlamıştır (Gene 1996).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan önemli bir yöntemdir. Kullanımı giderek artan bu yöntem sayesinde; klinik örneklerden etkenin saptanması, izole edilen suşun ve alt tiplerinin tanınması mümkün olmaktadır. PCR yönteminde birden fazla türe özgü primer çiftinin kullanılması sonucunda multipleks PCR testi geliştirilmiştir. Bu teknikte, ilk basamakta geniş özgüllüğü olan DNA ürünü çoğaltılır ve daha sonra bu ürün türe-özü primerler ile reaksiyona sokulur, DNA ürünleri jel üzerinde elektroforez yöntemi ile yürütülmesi sonucunda farklı bantlar oluşturur. Sonuçta ele geçen ürün, sadece söz konusu tür açısından amaçlanan bölgeye özel olmaktadır (Ausubel 1995; Zhao 2001; Arı 2004).

Genel olarak hastanelerin mikrobiyoloji laboratuvarlarına gelen klinik örneklerde üreyen *Candida* türlerinin moleküler açıdan incelenmesi ve tür düzeyinde tanınması tedavi süreci ve *Candida* popülasyonlarının belirlenmesi klinik açıdan oldukça kıymetlidir. Bizim tez çalışmamızda; Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve klasik metodlarla tanınan *Candida*'ların, farklı primerler kullanılarak moleküler düzeyde tiplendirme, genotipleme ve akrabalık derecelerinin kıyaslanması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Tarihçe

İlk çağlardan itibaren mantarların deri, saç ve tırnakta hastalığa neden olmaları hekimlerin dikkatini çekmiş olsa da bunlar hakkındaki esaslı bilgiler, diğer birçok bilim dalında olduğu gibi 19. yüzyılda netleşmeye başlamıştır (Ainsworth 1986).

Mantar hastalıklarına ait bilinen en eski bilgiler Hindu kutsal yazıtında (Samhita, M.Ö 2000–1000) bulunmakla birlikte tarihçesi Hipokrat'a (Hippocrates MÖ 460- 337) kadar uzanmaktadır. Etkenin keşfi ise bundan asırlar sonra, 1839'da Almanya'da Bernhard Rudolph Conrad von Langenbeck tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacı Tifo etkeni bulunan bir hastanın ağızdaki pamukçuk lezyonundaki kazıntıda mantar gözlemlemiş, fakat gördüğü mantarı tifüsün etkeni şeklinde yorumlamıştır. Pamukçuğun etkeni olarak mantarın tarifi 1842 yıllarında Gruby tarafından yapılmış olup, *Sporothricum* türü olarak sınıflandırılmıştır. Bu nedenle tıp mikolojisi Gruby ile başlamıştır. 1842'de Berg tarafından deneysel olarak oral aft modeli oluşturularak bu konudaki ilk ve en önemli adım atılmış, bu organizma 1843 yılında Rubin tarafından *Oidium albicans* olarak isimlendirilmiştir (Yeğenoğlu 2002).

1849'da Frank ve Wilkinson, ağızdaki lezyonun genital organlarda da bulunabileceğini ortaya koymuştur. 1888'de Hansen bu mantara *Monilia*, 1890'da Zopf; *Monilia albicans* ve en son 1923'de Berkhout; *Candida albicans* adlarını vermişlerdir. Gruby'nin pamukçuk tarifinden 2 yıl sonra 1844 yılında Bennett tüberküloz enfeksiyonu olan bir hastanın balgamında *Candida albicans* gibi görünen bir mantarın mikroskop altında tespit ettiği özelliklerini resimlemiştir (Yücel 1999).

Candida türlerinin başka organlara da yerleşebildikleri ve hastalığa sebep oldukları 20. yüzyılın başında tarif edilmiştir. 1907'de Jacobi; dermatiti, 1910'da Rafin; sistiti, 1912'de Castellani; bronkoalveolar kandidiyazi, 1923'de Forbes; kronik mukokutanöz

kandidiyaz hastalıklarını tanımlamış ve 1923'te Roth Berkhout, pamukçuk etkeni olan mikroorganizmanın bir *Monilia* türü olmadığını bildirmiş ve jenerik isim olarak *Candida*'yı önermiştir (Bilgehan 1986).

1940'lı yıllarda geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımıyla birlikte mantar hastalıklarının ve özellikle *Candida* enfeksiyonunun önemi artmıştır. Mantar hastalıkları ve *Candida* enfeksiyonlarının önlenmesine karşı organizasyonlar ve ilk komiteler ancak 1970'li yıllarda ABD ve İngiltere'de kurulmuştur. Ocak 1970'de CDC (Center for Diseases Control and Prevention) ABD'deki ulusal hastane enfeksiyon verilerini toplamak ve analiz etmek amacıyla NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance) sistemini kurmuştur (Yücel 2002).

2.2. Mantarların Genel Özellikleri

Mantarlar doğada yaygın olarak bulunmakta ve yaklaşık 250.000 kadar farklı tür içermektedir. Doğada bulunan bu mantar türlerinden yaklaşık 200 tanesi insanlarda hastalığa neden olmaktadır. Özellikle son 20 yıl içerisinde immün yetmezlikli, kemoterapötik ilaç kullanan, transplantasyon yapılan ve uzun süre hastanede yatan hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olması ile mantarlar oldukça önem kazanmıştır (Saniç 2006; Susever 2006; Gayıbov 2014).

Mantarlar ökaryotik canlılardır ve fotosentetik pigment ihtiva etmemeleri ile bitkilerden ayrılırken hücre duvarlarına sahip olmaları ile de hayvanlardan ayrılmaktadırlar. Prokaryotlardan daha yüksek organizasyon gösteren bu canlılar vejetatif yapıları silindirik, tüpsü iplikçiklerden meydana gelmiş spor meydana getiren ökaryotik mikroorganizmalardır. Boyut olarak bakterilerden daha büyüktürler (mayalar 3-10µm, küfler morfolojilerinden dolayı kesin olarak bilinmemekle beraber mayalardan büyüktür). Nükleusları bir zarla çevrili olup birden fazla kromozoma ve nukleolusa sahiptir. Sitoplazma zarlarında sterol bulunan mantar hücreleri mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve ribozom (80S) gibi hücre organellerine sahiptirler (Çolakoğlu 1999; Warnock 2009; Turan 2014).

Büyük çoğunluğu toprakta yaşayan mantarların en önemli işlevleri organik atıkların (bitki, hayvan, besin vb.) parçalanması ve yapı taşlarının doğaya tekrar kazandırılmasıdır. Çoğu zorunlu aerob veya fakültatif anaerob olan mantarlar kendi besinlerini üretememeleri nedeniyle karbon kaynağına muhtaçtırlar ve bu ihtiyaçlarını ekstraselüler enzimleri sayesinde organik atıklar ya da patojen olarak yer aldıkları canlı dokulardan karşılamaktadırlar (Levinson 2004; İzci 2008; Gayibov 2014).

Mantarlar belirli özellikleri ile bitki, hayvan ve bakterilerden kolaylıkla ayırt edilebilirler mantarlara ilişkin sekiz temel özellik şu şekilde sıralanmaktadır.

- Gerçek bir çekirdeğe sahiptirler (ökaryot).
- Sporlar/ konidiyumlar oluştururlar.
- Klorofil içermezler (kemoheterotrof).
- Eşeyli ve / veya eşeyli ürerler.
- Flamantöz yapılar oluştururlar (Küf Mantarları).
- Hücre duvarları vardır.
- Sitoplazmalarında zarla çevrili nükleus ve organeller bulunur.
- Gram pozitiflerdir (İnci 1999; İzci 2008)

Mantar hücresinin duvarları %90 karbohidratlardan, %10 - 20 protein ve glikoproteinden oluşmaktadır. Karbohidratlar ise mannan, glukun, galaktan, kitin polimerleri ve/veya selülozdan oluşmaktadır. Hücre zarı iki tabakalı olup, fosfolipid, sifingolipid, glikoprotein ve sterol içerirken hücre zarındaki ergosterol, antifungal ilaçların güvenle kullanımını sağlamaktadır. Bazı mantar türlerinde polisakkarid yapısında kapsül bulunabilmektedir (Çerikoğlu 2002; Saniç 2006; İzci 2008).

Morfolojik yapılarına göre mantarlar küf ve maya olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Küf mantarları genellikle oda ısısında ürerler, 2 - 10 mm çapında hif adı verilen ipliksi yapılardan oluşmaktadır. Hifler bir araya gelerek miselyum adı verilen kadifemsi, tüysü yapıları meydana getirirler (Willke 2002).

Maya mantarları genellikle tek hücreli ve tek çekirdeklidir. Yuvarlak, oval veya uzamış hif benzeri görünümde olabilmektedir. Mayalar katı besiyerlerinde 37°C’de iki-üç günde opak, beyaz veya çoğu kez krem renkte, yuvarlak, keskin sınırlı, tereyağı kıvamında koloniler oluşturur, kapsüllü mantarlarda ise mukoid koloniler gözlenmektedir (Yüksekkaya 2009).

Mayalar, makroskopik olarak bakteri kolonilerine benzemekle birlikte krema kıvamındadırlar. Gram boyanma özellikleri pozitifdir. Mayalar tomurcuklanarak bölünmektedir. Bazı durumlarda tomurcuklanmış olan maya hücreleri kopmayarak uzamaya devam ederler bu yapı küflerin oluşturduğu hif yapılarına benzediği için yalancı hif (pseudohif) olarak adlandırılır. Küflerin oluşturduğu hiflerde boğumlar bulunmazken yalancı hiflerde boğumlar oluşmaktadır (Karaltı 2011).

Küf ve maya formu dışında; bazı türler, besin içeriği, CO₂ basıncı, ısı, oksidasyon-redüksiyon potansiyeli gibi çevre şartlarının durumuna bağlı olarak her iki şekilde de üreyebilirler böyle türler dimorfik mantarlar olarak adlandırılmaktadır. Dimorfik türlerin 26 °C’de küf şeklinde 35 – 37 °C’de ise maya şeklinde üredikleri bilinmektedir. Dimorfik mantarların tamamı patojendir (Willke 2002; Saniç 2006).

2.3. Mantarlarda Üreme

Mantarlar sporlanma (sporulasyon), eşeysiz (aseksüel) ve eşeyli (seksüel) olarak üreme yeteneğine sahiptirler. Mantarlarda eşeysiz üreme suda yaşayanlarda zoosporlarla, karada yaşayanlarda ise spor veya konidilerle olur. Yaşam döngüsünü sularda devam ettiren mantarların sporlarında var olan flagellumlar, bu mantarları uygun ortamlara taşır ve hareketlerini sağlarlar. Sporlar renksiz, sarı, kırmızı, yeşil, siyah renklerde ve küresel, oval, silindirik, iplik, böbrek, iğ şekillerinde olabilmektedir. Sporlar hifin ucunda veya sporangium adı verilen keselerde oluşmaktadır. Miselyumlar yeterince gıda depo etmeleri ve olgunlaşmaları halinde çevresel koşullar da sporulasyona uygun ise hiflerde çeşitli şekillerde sporlar gelişir (Çolakoğlu 1999; Karaltı 2006).

Mantar sporları, çevre şartlarına karşı oldukça dayanıklıdırlar. Bu sebeple, doğada uzun yıllar canlılıklarını sürdürebilirler. Olgunlaşan sporlar hiflerden ayrılarak serbest hale gelir. Uygun koşullarda çimlenerek kendi türlerine özgü mantarları oluşturmaktadırlar. Mantar sporları çok farklı renkte ve biçimdedirler. Bu özellik, mantarların teşhisinde oldukça önemlidir (Karaltı 2011).

2.3.1. Eşeyli üreme

Eşeyli üreme mayoz bölünme temeline dayanmaktadır. Eşeyli spor çeşitleri ise zigospor, askospor, bazidyospor ve oospor dur.

Zigospor; Uygun iki hifin ucundaki özgün hücrelerin yanyana gelmesi, aradaki bölmelerin kaybolması ve hücrelerin birleşmesi (füzyon) sonucu oluşan kalın çeperli yeni hücrelerdir (Yeğenoğlu 2002).

Askospor; Askus içinde yer alan; anteridyum ve askogonyumun birleşmesi sonucunda oluşan sporlardır (Yeğenoğlu 2002).

Bazidyospor; Uygun iki hücrenin birleşmesi sonucunda; hiflerin ucundaki bazidiyum üzerinden çıkan dört sapın her biri üzerine yerleşmiş sporlardır (Yeğenoğlu 2002).

Oospor; Anteridyum ve oogonyumun köprüler aracılığı ile birleşerek oluşturdukları kalın duvarlı yeni sporlardır (Yeğenoğlu 2002).

2.3.2. Eşeysiz üreme

Eşeysiz üreme mitoz bölünme temeline dayanmaktadır. Eşeysiz spor çeşitleri Artrokonidya, blastokonidya, klamidokonidya, konidyospor ve sporanjiospordur (Susever 2006).

Artrokonidya; Dikdörtgen ya da fiçı görünümünde olan sporlar özellikle bölmeli hif oluşturulan mantarlar tarafından sıklıkla hifin parçalanması sonucunda meydana getirilir.

Blastokonidya; Ana hücreden bir tomurcuk şeklinde oluşan çıkıntıdır (Yeğenoğlu 2002).

Klamidokonidya; Sitoplazmanın yoğunlaşması ile oluşmuş, ısı ve kuraklığa dirençli kalın duvarlı sporlardır. Hiflerin uçlarında yer aldığında “terminal”, ortasında bulunduğunda “interkalar”, yan kısımlarında bulunduğunda ise “sesil” klamidokonidya olarak isimlendirilirler (Yeğenoğlu 2002).

Konidyospor; Hiflerin ucunda bulunan serbest sporlardır. Oluştukları hiflere farklı şekillerde bağlanırlar. Bu sporlar çok hücreli ve büyük ise makrokonidyum; tek hücreli ise mikrokonidyum adını alırlar. Bazen de boncuk görünümünde dizilim gösterirler (Yeğenoğlu 2002).

Sporangiyospor; Sporangiyofor olarak tanımlanan bölmesiz hiflerin ucundaki ince duvarlı sporanjium denen keseler içinde yer alan hücrelerdir (Yeğenoğlu 2002).

2.4. Mantarların Sınıflandırılması

Mantarlar öncelikle bitkiler içerisinde sınıflandırılmışlar ancak hücre yapılarına göre canlıların beşinci alemi olarak kabul edilmiş ve üreme biçimleri, yapıları, yaşam döngüleri ve fizyolojik özelliklerine göre sınıflandırılmışlardır. Mantarların isimlendirilmesi “International Code of Botanical Nomenclature” tarafından yürütülmektedir (Tümer 2011).

Yeryüzündeki mantarlar spor yapılarına, hif yapılarına, eşey özelliklerine göre 5 taksonomik sınıfa ayrılırlar. Bunlar Oomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes,

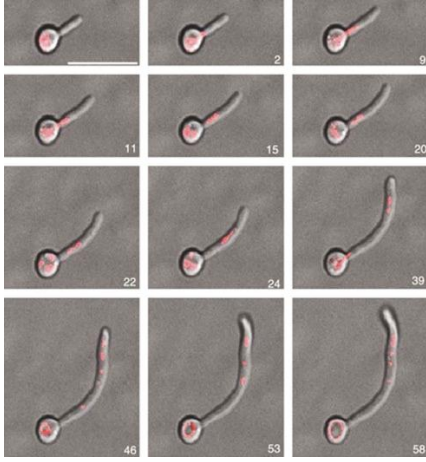
Basidiomycetes ve Deuteromycetes (Fungi Imperfecti) sınıflarıdır. Oomycetes sınıfı dışındakiler insanda hastalık oluşturan mantar cinslerini içermektedir. Eşeyli üremesi saptanamayan mantarların tümü Deuteromycetes (Fungi imperfecti) sınıfında incelenmektedir (Murray 2005).

2.5. *Candida*'ların Genel Özellikleri

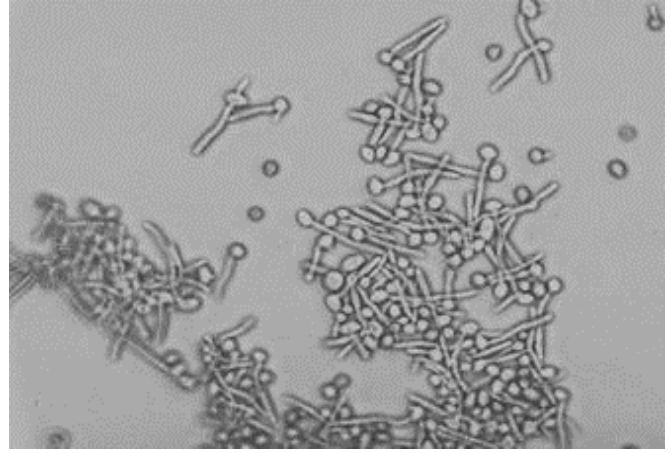
Candida türleri insanları etkileyen en yaygın fungal patojenlerdir. *Candida* türleri; deri, saç, oral veya vajinal kanalın yüzeysel enfeksiyonları ve hayatı tehdit eden sistemik enfeksiyonlarla ilişkili fungal bir patojen olmasına karşın insan vücudunun normal florasında yer alabilmektedir. Doğum sırasında veya doğumdan hemen sonra yenidoğana bulaşarak vücut florası içerisindeki yerlerini alırlar. Normal bireylerin %30 - 50'sinin ağızda ve gastrointestinal kanalında var oldukları bilinen bu mikroorganizmalar, bazı hazırlayıcı faktörlerin varlığında invaziv olmayan yüzeysel ve/veya derin dokuları tutan enfeksiyonlara neden olurlar (Tümer 2011; Sardi 2013).

Candida türleri, klinik örneklerde ve kültürlerinde, 3 - 6 µm büyüklüğünde oval veya yuvarlağımsı, tomurcuklanan hücreler (blastokonidyum veya blastosporlar) olarak görülen, maya şeklinde funguslardır. Ayrıca türlerin çoğu, yalancı hif (psödohif) de oluştururlar. Yalancı hif, arka arkaya tomurcuklanan blastokonidyumların birbirinden ayrılmayıp uzayarak ve aralarında boğumlar oluşturarak yaptıkları bir hücreler zinciridir. Yalancı hif maya hücrelerinin çoğalma sırasında oluşturduğu bir ara formdur. *C. glabrata* hariç, tümü uygun koşullarda yalancı hif üretebilmektedirler. Gerçek hif boğumlanma göstermez, duvarları birbirine paralel olup septa oluştururlar. *C. albicans* 37 °C'de *in vitro* olarak birkaç saat içinde çimlenme borusu üretimi ile maya formundan derin dokulara geçebilen agresif bir form olan hif fazına dönüşebilmektedir (Hazen 2009; Gayıbov 2014).

Çimlenme borusu (germ tüp) bir blastokonidyumun kenarından başlayarak büyüyen, blastokonidyuma bağlanan bölgelerinde boğumlanma görülmeyen, silindirik filamentöz yapılardır (Tümer 2011).



Şekil 2.1. *C. albicans* germ tüp



Şekil 2.2. *Candida* spp.

Candida türleri arasında *C. albicans* ve çok daha seyrek izole edilen *C. dubliniensis* ve *C. norvegensis* gerçek hişler de oluşturabilirler (Tümer 2011).

Candida türleri, SDA gibi basit ve rutin besiyerlerinde oda ısısında ve 37 °C'de 24–48 saatte üreyerek genellikle krem rengi veya kirli beyaz renginde, tipik şekilde maya kokan, düzgün yüzeyli, göbekli ve uzayan, inkübasyonla birlikte kıvrımlı hal alan, genellikle parlak koloniler oluştururlar. Birkaç istisna türleri dışında, *Candida* cinsi içindeki mayaların makroskobik ve mikroskobik özellikleri farklılık göstermez. Bakteri üretiminde kullanılan genel üretim besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilirler. Bu yüzden, genç kültürlerde, kolonileri bakteri kolonileri ile karışabilmektedir (Poyraz 2006).

Türler arası morfolojik farklılıklar ancak, mısır unlu (corn meal) agar gibi özel besiyerlerinde saptanabilir. Kültür için alınan örnekler etüvde hem 26 °C'de hem de 37 °C'de ayrı ayrı inkübe edildiklerinde, 37 °C'de üreyememe saprofit özelliği ortaya koyarlar. Patogen *Candida*'ların çoğu hem 26 °C hem de 37 °C'de üreyebilirler. Mayaların üreyebilmesi için besiyeri ortamında glukoz, amonyum tuzu, fosfat, biotin ve serbest metallere (Fe, Zn, Ca gibi) bulunması, ortam pH'ının 2-8 arasında olması yeterlidir ve üretildikleri ortamda (%95 - %100) neme ihtiyaç duyarlar (Tümer 2011).

Kültürlerde maya kolonilerinin ayırt edilmesinde potasyum hidroksit, kalkoflor beyazı floresan boyama kullanılmaktadır. Bu yöntemle maya hücre duvarındaki kitin ve selüloza nonspesifik bağlanan kalkoflor beyazı floresan boya yeşilden maviye değişen renklerde floresan vermektedir (Poyraz 2006; Tümer 2011).

Candida türlerinin çoğu yaygın kullanılan mikolojik ve bakteriyolojik kültürlerde iyi ürerler. Tween 80'li mısır unlu agarda 25 °C'da 72 saatte pseudohif septalarında yuvarlak blastokonidyumlar ve geniş kalın duvarlı terminal klamidosporlar oluştururlar. Klamidospor oluşumu 37 °C'da inhibe olması sebebiyle teşhiste önemli bir farklılıktır. *C. albicans*'in Tween 80'li agarda klamidospor geliştirmesini teşvik etmek amacıyla bir ekim yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemin esası besiyerinin yüzey geriliminin de ayarlanmış olmasından yararlanılarak ekim iğnesi ile oluşturulan vakum sayesinde inokulumun, bir merkez noktası etrafına muntazam olarak dağılmasını sağlamaktır. Bu şekilde yapılan ekimlerde besiyerine muntazam dağılan kolonilerin periferlerinde iyi gelişmiş klamidosporlar üretilmektedir (Tümer 2011).

Candida türleri, SDA gibi rutin ve basit besiyerlerinde meydana getirdikleri kolonileri ve mısır unu-Tween 80 gibi besinden fakir besiyerlerinde saptanan blastokonidyumlarının özellikleri ve blastokonidyumların yalancı hif boyunca dizilimlerine göre farklar gösterirler. Ancak türlerin kesin tanısı morfolojik özelliklerinin yanısıra yapılan şeker fermentasyon ve asimilasyon deneyleri ile konulur (Forbes 2007).

Mantar kültürlerinde bakterilerin ve hızlı üreyen küflerin üremesini baskılayarak seçicilik sağlamak üzere ilk izolasyon besiyerlerinin bileşimine sikloheksimid, gentamisin, ampisilin, kloramfenikol gibi antibiyotikler eklenebilir. Sikloheksimid bazı mantar türlerinin üremesini baskıladığı için sikloheksimid içermeyen besiyerlerine de ekim yapılması gerekmektedir (Tümer 2011).

2.5.1. Hücre ve hücre duvar yapısı

Candida hücreleri ökaryotik olduklarından membranla çevrili gerçek bir çekirdek içerirler. Çekirdek içerisinde çekirdekçik ve lineer kromozomlar bulunur. Mantarların sitoplazmalarında vakuoller, mikrotübüller, retiküler endotel mitokondriyumlar bulunur. Mantar hücresindeki mitokondri bitki ve hayvan hücrelerinde bulunanlara benzerdir ve sayısı hücrenin aktivitesine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Hücre sitoplazmasında, mantarın yaşamında önemli yer tutan ve turgor basıncına karşı koyan hücre iskeleti bulunmaktadır. Hücre iskeleti; mikrotübül, aktin ve miyozin komponentlerini içerir, hücre duvarı ve hücre membranı ile ilişki halindedir (Tünger 1998).

Candida'ların hücre duvarı, konak ile etkileşimde olan yegane kısımdır. Çeşitli moleküllerin iç ve dış ortamlar arasında geçişlerinde rol oynarlar ve maya hücresinin değişik yüzeylere tutunmasında (adezyon) doğrudan görev almaktadırlar. Ayrıca mantarın maya veya hif formunun karakteristik şeklinin korunmasından sorumludur ve hücreyi osmotik, kimyasal ve fiziksel hasarlara karşı korur (Çerikcioğlu 2002).

Mikrofibriler polimerler olan β -glukanlar ve kitin, duvarın yapısal komponentleridir. Hücreye güçlü fiziksel özellikler sağlayan sert iskeleti oluştururlar. Miktar olarak β -glukanlar, hücre duvarı ağırlığının %47 - 60'ı oluşturan ana bileşenlerdendir. Kitin, küçük (%0,6 - 9) ama önemli bir komponenttir. Düşük kitin düzeyli mutantların, osmotik olarak hassas olduğu ve anormal morfoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Öte yandan mannan, yapısal polimerler olan β -glukanlar ve kitinin içine gömüldükleri amorf matriksi ve hücre duvarı karbonhidratlarının %40'ını oluşturur. Mannan, hücre duvarının majör antijenik komponentidir ve mannoprotein yapısında olan fimbriyaların epitelyal hücrelere bağlanmada rolleri vardır (Kantarcıoğlu 2004; Masuoka 2004).

Elektron mikroskopuyla yapılan çalışmalara göre *Candida*'ların hücre duvarı en az 5 katmanlıdır. Bu tabakaların sayısı ve kalınlığı ise üreme formuna (maya veya hif), üreme ortamına ve suşa bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Tümer 2011).

Genel olarak gluklan ve kitin hücre duvarının iç tabakasında yoğun görünmektedir. Tersine protein ve mannoproteinler tüm duvar yapısında bulunmakla birlikte, hücre duvarının dış tabakasında daha baskın görünürler (Masuoka 2004).

Maya hücresi ve germ tüp (hif) hücre duvarı, kompozisyon olarak benzerdir, Bununla birlikte relatif miktarları morfolojiye bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Örneğin, *C. albicans* hif hücre duvarında mayadakinin üç katı kitin bulunur (Poyraz 2006).

Hücre zarı taşıdığı ozmoenzimler aracılığı ile moleküllerin dış ve iç ortama geçişinde rol almaktadır. Kitin sentetaz gibi, duvar bileşenlerinin sentezlenmesinde rolü olan enzimler de hücre zarında bulunurlar. Ayrıca *C. albicans*'ın morfogenezini (maya-hif dönüşümü ve hifal uçtan uzama) için gerekli olan sinyal iletiminde rol alan fosfolipaz C, adenilat siklaz, proteaz gibi enzimler de membranda yer alırlar. *Candida* 'ların hücre zarında; fosfatidil inozitol, fosfatidil etanolamin, fosfatidil serin ve fosfatidil kolin, gibi fosfolipidler bulunur (Tümer 2011).

Çizelge 2.1. *Candida* türlerini diğer mayalardan ayıran mikroskopik özellikler (İzci 2008).

M.organizma	Yalancı Hif	Gerçek Hif	Blasto- konidyum	Artro-konidyum	Anello-konidyum	Klamidyo-spor	Asko-Spor
<i>B. capitatus</i>	+	+	+	-	+	-	-
<i>C. albicans</i>	+	+	+	-	-	+	-
<i>Candida</i> spp.	+	+	+	-	-	-	+
<i>Cryptococcus</i> spp	-	-	+	-	-	-	-
<i>Geotrichum</i> spp.	-	+	-	+	-	-	-
<i>Hansenula</i> spp.	+	-	+	-	-	-	+
<i>Rhodotorula</i> spp.		+		-	-	-	-
<i>Saccharomyces</i> spp.	+	-	+	-	-	-	+
<i>Trichosporon</i> spp.	+	+	+	+	-	-	-

Mantarların tamamında olduğu gibi, *Candida*'ların da hücre zarlarında bulunan sterol, hücre zarı lipidlerinin %20'sini oluşturur. Mantar hücre zarı, kolesterol içeren insan hücre zarlarının aksine ergosterol ve zimosterol içerir (Levinson 2004).

2.5.2. *Candida*'ların sınıflandırılması

Candida ismi 1959'da Montreal'de "Uluslararası Botanik Kongresi'nde" Basidiomycota'ya ait olanlar ayrı tutularak Ascomycota içine alınmıştır. *Candida* türleriyle ilgili hem klasik hem moleküler araştırmalar *Candida* türlerinin teleomorflarının keşfedilmesini ve genus içindeki bazı türlerinde aşamalı olarak silinmesini sağlamıştır (Masuoka 2004; Gültekin 2009).

Candida'lar blastosporlarla çoğalan, yalancı ve gerçek hif yapan, bir grup mayadır. *Candida* türleri heterojen bir grup olup bu cins içerisinde türler arasındaki taksonomik ilişkiler tam belirlenememiştir (Yücel 1999; Yüksekaya 2009; Gültekin 2009).

Bu aile yaklaşık 200 tür içermektedir. Bu aileye giren *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondi*, *C. catenulata*, *C. ciferrii*, *C. haemulonii*, *C. intermedia*, *C. kefyr*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis*, *C. pelliculosa*, *C. pulcherrima*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. viswanathii* ve *C. zeylanoides* gibi *Candida* türleri, tıbbi önemi olan ve en çok karşılaşılan türlerdir (Hazen 2009).

2.5.3. *Candida* ekolojisi

Candida türleri doğada yaygın olarak bulunan maya mantarlarıdır. Birçok bitkide bulunabilmelerinin yanı sıra özellikle memelilerde, gastrointestinal sistem başta olmak üzere mukokutanöz membranlarda bulunurlar. Sağlıklı bireylerde gastrointestinal sistemdeki yayılım, ağızdan kolona doğru gittikçe artmaktadır. *Candida* florasının yoğun olduğu bir diğer yer vajendir. Sağlıklı kadınların %30 unda bulunabilir. Sağlıklı deride ise *Candida* türlerine fazla rastlanmaz (Yüksekkaya 2009).

2.5.4. *Candida* epidemiyolojisi

Candida türleri doğada ve insan vücudu florasında yaygın olarak bulunurlar. *Candida* türlerinin insan florasındaki yerleşim ve dağılımı değişik özellikler gösterir. Deri florasında daha çok nemli kat yerlerinde olmak üzere *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* ve daha az sıklıkta *C. tropicalis* ve *C. krusei*' ye ve ender olarak *C. albicans*'a rastlanır. Sıkı giyim ve lokal antibiyotik kullanımı kolonizasyonu artırmaktadır (Warren 1995).

Candida türleri sindirim sistemi florasında da bulunur. Sindirim sistemindeki *Candida* kolonizasyonu üzerinde diyetin, sindirim sisteminin, bakteri florasının ve laktik asitin denetleyici etkisi vardır. Sağlıklı bireylerde ağızda %30, jejunum ve ileumda %55 ve gaitada %65 oranında *Candida* türlerine rastlanmaktadır. Ağız florasında en çok bulunan tür *C. albicans* (%75) olup bunu *C. tropicalis* (%8), *C. krusei* (%6), *C. glabrata* (%2-6) izler. Ağız hijyeninin bozulması, diş protezi uygulanması, sigara içilmesi durumlarında ve diyabetik hastalarda sayıları artar. Anorektal ve dışkı florasındaki *Candida* türlerinin %50'sini *C. albicans*, %20'sini de *C. tropicalis* ve *C. glabrata* oluşturur. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süre kullanılması, *Candida* türlerinin gastrointestinal kolonizasyonunu arttırmaktadır (Ener 2004).

Sağlıklı kadınların vajeninde %5 - 30 oranında *Candida* türüne rastlanır ve bu oran gebelik, oral kontraseptif kullanımı gibi faktörlere bağlı değişmektedir. Vajinal *Candida* enfeksiyonları sık rastlanan klinik tablolardan biridir. Tüm vajinitli kadınların üçte birinde etkenin *Candida* türleri olduğu ve erişkin kadınların %75'inin yaşamları boyunca en az bir kez vajinal *Candida* enfeksiyonu geçirdiği bilinmektedir. Ayrıca vajendeki *Candida* türlerinin gebelerde fetusa ulaşarak düşüğe yol açtığı da bildirilmektedir. Çeşitli çalışmalarda vajinal *Candida* enfeksiyonlarında en sık rastlanan etkenin *C. albicans* olduğu; *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*'nın da sıklıkla izole edildiği bildirilmektedir (Richardson 2002; Tümer 2011).

2.6. *Candida* Türlerinin Laboratuvar Tanısı

Candida türleri normal florada da bulduklarından, laboratuvarlarda karşılaşılan en büyük sorunlardan birisi klinik örneklerde üreyen *Candida* türlerinin klinik bir öneminin olup olmadığını tahmin etmek ve rapor edilip edilmemesine karar vermektir. Bu nedenle, laboratuvar verilerinin doğru yorumlanabilmesi için iyi bir klinik-laboratuvar işbirliğinin kurulması gerekir. *Candida* türlerinin tanılanmasında klinik örneğin uygun bir şekilde alınıp ekilmesi ve diğer laboratuvar işlemlerinin yapılması gerekir. Örnekler aseptik kurallarına uygun olarak alınıp hızla laboratuvara iletilmelidir. Klinik materyalden *Candida* türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu için bir dizi işlem yapılır (Yücel 2002; Tümer 2011).

Candida enfeksiyonlarının tanısı için alınacak örnekler olarak kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), biyopsi örnekleri, idrar, doku, solunum yolu örnekleri, ağız ve vajen sürüntü örnekleri, saç-tırnak-deri örnekleri sayılabilir (Yıldırım 1999)

Candida enfeksiyonlarının standart laboratuvar tanısı için;

- Klinik örneklerden direkt mikroskopik bakı
- Kültürden *Candida* türlerinin soyutlanması
- Organizmanın tür düzeyine indirgenerek tanılanması
- Moleküler yöntemler ile *Candida* türlerinin identifikasyonu
- Serolojik yöntemler ile *Candida* türlerinin varlığının gösterilmesi
- Dokuda bulunan *Candida* türlerinin histopatolojik olarak saptanmaları gerekmektedir (Richardson 2002; Merz 2003).

2.6.1. Direkt bakı ve kültür

Laboratuvarlar'da klinik örneklere uygulanacak ilk işlem direkt bakı yöntemidir. Direkt bakı yöntemi için yaş preparat hazırlanabileceği gibi, %10'luk potasyum hidroksit,

kalkoflor beyazı, metilen mavisi, Giemsa, Gram, Wright gibi boyalar ile hazırlanan preparatlarda kullanılabilir. Doku örneklerindeki *Candida* türlerinin araştırılmasında ise methanamin gümüş boyaları ve periyodik asit-schiff (PAS) kullanılmaktadır. *Candida* türleri için önerilen besiyerleri SDA (Sabouraud dextrose agar), inhibitör mold agar, modifiye edilmiş SDA (gentamisin - kloramfenikol ve sikloheksimit gibi antimikotik antibiyotikler eklenmiş), koyun kanlı beyin kalp infüzyon agar olup, en sık kullanılan besiyeri SDA'dır. SDA besiyerine ekilen örnekler 26 °C – 37 °C de inkübe edilir. *Candida* türleri genellikle 24 – 48 saat içerisinde beyaz yada krem renkli, düzgün yüzeyli, hafif şişkin 1 - 2 mm çapında, tereyağ kıvamında maya kokulu koloniler oluştururlar. *C. albicans* koyun kanlı agar da yıldız şeklinde saçaklı koloniler oluşturmaktadır. Kültür tüplerinin kapakları havalanmayı sağlamak üzere hafifçe gevşetilmelidir. İnkübatör nemi %30 - 40'a ayarlanmalıdır (Erbakan 1989; Yıldırım 1999; Gültekin 2009).

2.6.2. İdentifikasyon

Genel olarak *Candida* türleri identifikasyonu morfolojik karakterlerinin mikroskopik ve makroskopik olarak incelenmesi ve biyokimyasal özelliklerinin değerlendirilmesiyle yapılır. Morfolojik karakterleri olarak; şekli, hücre büyüklüğü koloni rengi ve görünümü, germ tüp veya klamidospore oluşturma, hif ve/veya pseudohif üretimi gibi özellikleri değerlendirilir. Biyokimyasal özellikleri bakımından ise; karbohidrat asimilasyonu, fermantasyonu, nitrat asimilasyonu ve üre hidrolizi değerlendirilir (Koneman 1997; Gültekin 2009).

2.6.3. Hif blastospor ve klamidospore oluşumu

C. albicans hem gerçek hem de yalancı hif, blastospor ve klamidospore oluşturur. Bunun yanında *C. tropicalis* hif başlangıcı benzeri yapılar üretebilmektedir. Ancak hifin ana hücreden çıkış yerinde darlık mevcut olup blastokonidyalı *C. albicans* suşlarından daha geniştir. Daha ileri tanımlama için pirinç özütü tween 80 agar, mısır unu-tween 80 agar gibi besin açısından fakir ortamlarda lam kültürü yöntemi

(Bir tüpte eritilmiş 45 – 50 °C'ye soğutulmuş SDA steril lam üzerine ince tabaka şeklinde dökülür. Lam petri kutusu içerisine yerleştirilmiş cam borular üzerine dikkatlice konulur ve ekim yapıp 37 °C'lik etüvde 24 – 48 saat bekletilir. Üreme olduktan sonra mikroskop altında incelenir) uygulanır. Bunun için Pirinç ekstresi-Tween 80 agar, Corn meal-Tween 80 agar, Wolin Bevis agar, Oxgall agar veya Czapek Dox-Tween 80 agar besiyerlerinden birine lam kültürü uygulanır. Blastospor, Hif ve klamidospore yapımı *Candida* türlerinin belirlenmesini sağlar (Koneman 1997; Gültekin 2009).

2.6.4. Karbohidrat asimilasyon testi

Mayalar oksijen varlığında karbon kaynağı olarak spesifik bir karbohidratı kullanabilme yeteneklerini gösterirler. Wickerham yöntemi, oksanografik yöntem ve ticari identifikasyon kitleri kullanılarak yapılabilir. Klinik laboratuvarların çoğunda bu testlerin yerini API 20 C, ID 32 C ve Uni-Yeast-Tek, VITEK gibi hazır ticari test sistemleri almaktadır. API sistemleri bunların içerisinde en yaygın kullanılan yöntem ve sistemdir. Bu testler belirli bir kimyasal profil üretmek için farklı substratları içeren kuyucuklardaki renk üretimini kullanırlar (Gültekin 2009).

2.6.5. Nitrat asimilasyon testi

Karbohidrat asimilasyon testine benzer ve mayaların nitrojen kaynağı olarak nitratı kullanma yeteneklerini ortaya koyar (Yücel 1999).

2.6.6. Karbohidrat fermantasyon testi

Karbohidratların etanol ve CO₂ üretimiyle sonuçlanan anaerobik kullanımınıdır. Modifiye Wickerham tekniği ile yapılabilir. Fermantasyon tüplerindeki pH değişiklikleri fermantasyon yoğunluğu ya da miktarını göstermez. Durham tüpünde gaz kabarcığının ortaya çıkması ile görülür. *Candida* türleri ile *Cryptococcus* ve *Rhodotorula* gibi nonfermantatifleri ayırmada oldukça yararlıdır. Karbohidrat asimilasyon testlerine

göre zor ve kaba materyallerle işlem gerektirmektedir ayrıca daha az güvenilir olduğundan rutin identifikasyonda genellikle önerilmez (Buckley HR 1989; Warren NG 1995).

2.6.7. Üreaz testi

Christensen's üre agara ekim yapılarak belirlenir. Bu ortamda üre hidrolizi yapanlar üreaz pozitif olarak değerlendirilir. *C. lipolytica*, ve *C. krusei* üreyi hidroliz edebilir. Klinik önemi olan *Candida* türlerini diğer mayalardan ayırmak için kullanılan önemli bir testtir. Klinik önemi olan *Candida* türlerinin büyük çoğunluğu üreaz negatiftir (Warren NG 1995; Gültekin 2009).

2.6.8. Kromojenik besiyeri

Kromojenik agar bir veya daha fazla maya türünü koloni karakterlerine dayanarak ayırmaya olanak sağlar. CHROMagar Candida (CHROMagar Fransa Paris ve ABD Becton Dickensen tarafından ticari olarak dağıtılır) 10'dan fazla tür için farklılıkları ortaya koymaktadır. Koloni tanımlamasının temeli; ekzoenzimlerin değişik substratlarda kullanılmasıyla ortaya çıkan farklı kromojenik ürünlere dayanmaktadır. Bu besiyeri ile türler farklı koloni görüntüleri ortaya koymaktadırlar (Gültekin 2009).

İnkübasyon sıcaklığı ve süresi koloni görüntüsünü önemli derecede etkilemektedir. Karışık maya kültürü infeksiyonlarında ve tanımlamanın zor olduğu örneklerde bu ortam elverişlidir. CHROMagar'la birlikte diğer CHROM ortamlar da bulunmaktadır. Ama hiçbir ortam kandaki karışık maya kültürlerinin tamamını ortaya koymaya yetmemektedir. *C. albicans* izolatlarının yaklaşık olarak %2-10'u renkli koloni yerine beyaz koloni oluşturur. Kromojenik besiyerleri ile yapılan çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olduğu bildirilmektedir (Yeğenoğlu 1998; Gültekin 2009).

2.6.9. Serolojik yöntemler

Tüm dünyada hızla artan invaziv mantar enfeksiyonları geniş dağılım ve yayılım göstermeleri nedeniyle *Candida* enfeksiyonlarına tanı konulması giderek daha çok önem arz etmektedir. Sistemik *Candida* enfeksiyonlarının tanılanmasında kullanılmak üzere çok çeşitli serolojik testler geliştirilmiştir. Bu amaçla *Candida* türlerine özgü antikolar, antijenler veya metabolitlerin saptandığı çok çeşitli testler bulunmaktadır. (Aydın 1996; Çerikçioğlu 1999; Gültekin 2009).

2.6.10. Moleküler tanı yöntemleri

Mikroorganizmaların ve enfeksiyon yapan patojenlerin neden olduğu enfeksiyon hastalıklarının başarılı bir şekilde tedavi edilebilmeleri için ilk şart, doğru hastalık ve doğru patojen tanısının sağlanmasıdır. Bu sebeple hızlı tanılama sağlama imkanı olan, özgüllüğü ve duyarlılığı yüksek laboratuvar yöntemlerine ihtiyaç vardır. Klasik tanı yöntemleri günümüzde halen birçok patojen mikroorganizmanın saptanmasında vazgeçilmez yöntemler olmalarına rağmen, bazı durumlarda yetersiz kalabilmektedirler. Özellikle geç veya zor şartlarda üreyen mantar türlerinin ve/veya enfeksiyonlarının saptanması çalışmalarında moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Moleküler tanı yöntemleri; mikroorganizmaların cins veya tür düzeyinde tanılanması, virulans, epidemiyolojik tiplendirme faktörlerinin belirlenmesi, antifungal direnç genlerinin taranması, mutasyon incelemeleri, sınıflandırma ve filogenetik analizlerde kullanılmaktadır. Moleküler tanı yöntemleri; hibridizasyon “probe”larının kullanıldığı sinyal amplifikasyon yöntemleri ve nükleik asit amplifikasyon yöntemleri olmak üzere gruplandırılabilir (Chemaly 2006; Gültekin 2009).

Kary Mullis’in 1983 yılında PCR yöntemini keşfetmesinden günümüze kadar olan süreçte, nükleik asit çoğaltma yöntemlerinin rutin tanılama amacıyla kullanılmaları konusunda önemli mesafeler kaydedilmiştir (Abacıoğlu 2001).

Nükleik asit çoğaltma yöntemleri; seçilmiş olan hedef bölgenin çoğaltılması ile gerçekleştirilebildiği gibi nükleik asit üzerinde özgül problemler kullanılarak gerçekleştirilmesi mümkündür (Abacıoğlu 2001).

Rutin mikrobiyolojik tanıda PCR yönteminin kullanım amacı, hastalardan alınan örnekler içinde hastalık etkeni olan patojen mikroorganizmaların nükleik asit düzeyinde saptanmasıdır. PCR yöntemi; nükleik asitlerin yapay koşullarda çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir. Başka bir ifadeyle, canlı bir hücre içinde gerçekleşen DNA replikasyonu, PCR yönteminde bir tüp içinde benzer şekilde tekrar yada taklit edilir. Bu amaçla, mantar hücresinde DNA replikasyonu için kullanılan enzimlerin işlevleri, farklı ısı döngüleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Mikroorganizmalarda replikasyonunun başlayabilmesi için ilk basamak, DNA çift zincirinin birbirinden ayrılmasıdır. PCR yönteminde 94°C gibi yüksek bir ısı uygulanarak, zincirlerin birbirlerinden ayrılması sağlanır. Bu yöntemde yüksek sıcaklıklarda çalışabilen Taq polimeraz enzimi ve uygun primerler kullanılır (Abacıoğlu 2001).

PCR yöntemi, farklı sıcaklıkların uygulandığı üç basamağın (denaturasyon, bağlanma (annealing), sentez) birbirini takip eden döngüler şeklinde tekrarlanması esasına dayanır. Böylece toplam 30-50 döngü yapılması sonucunda, genom üzerinde seçilmiş olan hedef bölge milyarlarca kopya halinde çoğaltılmış olur. Çoğaltılan ürün saptanmasında hız ve kolaylık açısından en uygun yöntem etidium bromid ile jel elektroforez analizidir. Ancak duyarlılık artırılmak istenirse, radyoaktif dot blot veya Southern blot analizleri kullanılır. Kemilüminesans ve enzim kullanan non-radyoaktif sistemler de geliştirilmiştir. (Durmaz 2001).

2.6.10.a. Random Amplification Of Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD yöntemi avantajları nedeniyle prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının genotipinin belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, çeşitli taksonomik çalışmalar, evrimsel sorunlar, populasyon biyolojisi, kültür ve ırk belirlenmesinde, ebeveyn belirleme, genetik varyasyonun belirlenmesi, DNA bağlantı haritalarının

oluşturulması, özgün bir gen lokusunun belirlenmesi, adli tıp, klinikal teşhis, prenatal tanı, salgınlar ve ekoloji alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (Aydın 2004).

1990'ların başından itibaren polimeraz zincirleme reaksiyonu (PCR) tekniği ile çok küçük miktarlardaki DNA'nın çoğaltılması ve kolaylıkla agaroz jel de görülebilmesi mümkün olmuştur. Böylece türe özgül DNA ürünlerinin çoğaltılması ve birbirine çok yakın türlerin ayrılabilmesi imkanı sağlanmıştır. Epidemiyolojik tiplendirme amacıyla en çok başvurulan yöntemlerden biri olan RAPD - PCR tekniğidir. RAPD - PCR tekniğinde mikroorganizma genomu rastgele çoğaltılarak ortaya çıkan patern farklılıklar değerlendirilir. Kullanılan primerler, tiplendirme yapılacak mikroorganizmaların genom bilgisine ihtiyaç olmaksızın rastgele seçilebilmelerinin yanı sıra, genom içindeki spesifik bölgelere yönelik bilinçli olarakta seçilebilir. Bu yöntem ilk kez 1990 yılında McClelland ve Welsh tarafından tanımlanmış ve kullanılmıştır (Yüksekkaya 2009).

Primerlerin bağlanabilme yerleri arasındaki mesafe farklılıkları agaroz jelde saptanabilen farklı sayılarda ve uzunluklarda (baz çiftleri) bantların oluşmasına sebep olur. Kullanılan primerler genelde kısa primerlerdir ve G - C açısından oldukça zengindirler (en az %40 G + C içermelidir). Bağlanma ısısı 30 - 50 °C'ye düşürülmektedir. Bağlanma sırasında primerler kromozom üzerinde hem kendilerine spesifik bölgelere hem de diğer evrensel bölgelere bağlanabilmektedir. Aynı tür içerisinde ve aynı türün farklı suşlarında primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirlerine uzaklıkları farklı farklı olacağı için, jel elektroforezlerinde amplifikasyona tabi tutulan parçaların sayı ve büyüklükleri de farklı olabilmektedir. Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezlerinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılır. Aynı bant profili gösteren izolatlar epidemiyolojik olarak ilişkili kabul edilir (Yüksekkaya 2009). Kolay uygulanabilme yöntemi ve kısa sürede sonuç verebilme imkânı açısından yaygın kullanım alanı bulunan bu yöntemin en önemli dezavantajı henüz herhangi bir standardizasyonun sağlanamamış olmasıdır. Standardizasyonu sağlayabilmek için, standart hale getirilmiş bir amplifikasyon karışımı, aynı thermocycler'da standart bir amplifikasyon protokolüyle uygulanarak, tüm izolatlar aynı anda çalışılmalıdır (Yüksekkaya 2009).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Hasta Örnekleri ve Referans Suşlar

Bu çalışmada kullanılan örnekler, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir. Kültürler aseptik kurallara mümkün olduğunca dikkat edilerek Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji Laboratuvarına getirilmiş ve %16'lık gliserol içeren YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) içerisinde – 76 °C'de muhafaza edilmiştir (Sherman 1986; Yüksekaya 2009).

Mikroorganizmalarımız; Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Esin AKTAŞ tarafından klasik kültür yöntemleri ile tanılanan 33 adet *C. albicans*, 4 adet *C. krusei*, 4 adet *C. guilliermondii*, 4 adet *C. glabrata*, 4 adet *C. parapsilosis*, 3 adet *C. tropicalis*, 3 adet *C. pseudotropicalis*, 2 adet *C. geotrichum* ve 1 er adet *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 standart referans suşlarından oluşmaktadır.

3.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

- İnkübatör (Binder BD53, GERMANY)
- Otoklav (HMC Hirayama Hiclava HV-50L, JAPAN)
- Mikroskop (Boeco BM 180, GERMANY)
- Steril Kabin (Esco AC2-4E1, SINGAPORE)
- Çalkalayıcı (Zhicheng ZHWY-200B, CHINA)
- Magnetik Karıştırıcı (Daihan Scientific MSH 20A, KOREA)
- pH Metre (InoLab pH730 wtw Series, GERMANY)
- Derin Dondurucu (Nuair-86 Ultralow Freezer, NU6613W37, U. S. A.)

- Hassas Terazı (Mettler Toledo AL204, CHINA)
- Buzdolabı (Beko BK9470, TÜRKİYE)
- Su Banyosu (Memmert WNB14, GERMANY)
- Mikrodalga Fırın (Beko MD1505, TÜRKİYE)
- Saf Su Cihazı (GFL 2004, GERMANY)
- Vorteks (Heidolph Reax Top, GERMANY)
- Dikey Tüp Karıştırıcı (GFL 3025, GERMANY)
- Santrifüj (Hettich Mikro 22R, GERMANY)
- PCR (Corbett Research CG1-96, AUSTRALIA)
- Elektroforez Tankı (Yatay) (OWL B2, U.S.A.)
- Elektroforez Akım Sağlayıcı (OWL OSP300-2Q, U.S.A.)
- Jel Görüntüleme Sistemi (DNR BioImaging Systems MiniBis Pro, ISRAEL)

3.3. Çalışmada Kullanılan Çözelti ve Besiyerlerinin Hazırlanışı

Çalışma süresince kullanılan besiyerleri ve çözeltilerin hazırlanma şekilleri aşağıda verilmiştir:

%0,85'lik NaCl çözeltisi: 8,5 mg NaCl 1 L saf suda çözüldü. Çözelti otoklavda steril edildi.

Stok Besiyeri 1: 0,65 g Sabouraud's dextrose broth karışımına 36 ml gliserol eklendikten sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Magnetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri, otoklavda steril edildi. Aseptik olarak steril 2 ml'lik eppendorf tüplerine 1,2 ml konularak hazırlandı (Temiz 2000).

Stok Besiyeri 2: 1,5 g Sabouraud's dextrose broth karışımına 15 ml gliserol eklendikten sonra son hacim saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. Magnetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri, otoklavda steril edildi. Aseptik olarak steril 2 ml'lik eppendorf tüplerine 1,2 ml konularak hazırlandı (Temiz 2000).

Stok Besiyeri 3: 0,5 g Yeast extract agar'a 1 g Pepton ve 80 ml saf su eklenerek çözeltinin PH'sı 5.8 e ayarlandıktan sonra 15 ml gliserol eklendikten sonra son hacim saf su ile 100ml'ye tamamlandı. Magnetik karıştırıcıda karıştırılan besiyeri, otoklavda steril edildi. Aseptik olarak steril 2 ml'lik eppendorf tüplerine 1,2 ml konularak hazırlandı (Temiz 2000).

SDA (Sabouraud %2 Dextrose Agar): 47 gr SDA agar (Sigma) 1 L saf su içerisinde çözüldü ve PH'sı $5,6 \pm 0,2$ ye ayarlandı, otoklavda 121°C de 15 dakika steril edildi. Hazırlanan besiyeri $45- 50^{\circ}\text{C}$ ye soğuyunca steril petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakıldı (Temiz 2000).

SDB (Sabouraud %2 Dextrose Broth): 30 gr SDB (Sigma) 1 L saf su içerisinde çözüldü ve PH'sı $5,6 \pm 0,2$ ye ayarlandı, otoklavda 121°C de 15 dakika steril edildi. Hazırlanan sıvı besi yeri ağzı kapaklı cam tüplere 5 ml olmak üzere dökülerek oda sıcaklığında bekletildi (Temiz 2000).

Yeast Lizis Buffer: 0,3 g Tris-HCl, 0,093 g EDTA 200 ml saf suda çözüldükten sonra pH'sı 8'e ayarlandı. pH ayarlaması yapıldıktan sonra üzerine 0,1461 g NaCl eklenir ve son hacim 220 ml'ye tamamlanarak otoklavda 121°C de 15 dakika steril edildi. Otoklavdan çıkartıldıktan sonra 25 ml %10'luk SDS eklenir ve 5 ml Triton X 100 eklenerek oda sıcaklığında muhafaza edildi (Barış 2009).

Potassium acetate: 24,538 gr potassium acetate 50 ml saf suda çözüldükten sonra 121°C de 15 dakika steril edildi. Oda sıcaklığında muhafaza edildi (Barış 2009).

Antibiyotikli SDA Hazırlama: SDA besiyeri hazırlandığında Otoklavlama öncesi 100 ml besiyerine 125 µl Ampisilin gelecek şekilde hesaplama yapıp eklendi daha sonra otoklavda 121°C de 15 dakika steril edildi. Hazırlanan besiyeri $45 - 50^{\circ}\text{C}$ 'ye soğuyunca steril petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakıldı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi (Temiz 2000).

TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH: 8) tamponu: 0,3 g Tris-HCl ve 0,093 g EDTA saf su içerisinde çözüldü ve pH 8'e ayarlandı. Son hacim 250 ml'ye tamamlanarak otoklavda steril edildi (Barış 2009).

%10'luk SDS çözeltisi: 10 g SDS'nin 100 ml steril saf su içerisinde çözünmesiyle hazırlandı. Şişenin ağzı kapatılarak, oda sıcaklığında muhafaza edildi (Barış 2009).

Proteinaz K: 1 ml steril saf su içerisinde 20 mg proteinaz K olacak şekilde hazırlandı. – 20 °C'de muhafaza edildi (Barış 2009).

5 M NaCl çözeltisi: 29,22 g NaCl'ün 100 ml saf su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı. Otoklavda steril edildi (Barış 2009).

%10 CTAB (Hexadecyl trimetil-ammonium bromide) - 0,7 M NaCl çözeltisi: 80 ml saf su içerisinde önce 4,09 g NaCl çözüldü. NaCl tamamen çözüldükten sonra karışıma 10 g CTAB ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda steril edilerek, oda sıcaklığında muhafaza edildi (Barış 2009).

%70'lik Etil alkol: 70 ml saf etil alkolün hacmi steril saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. – 20 °C'de muhafaza edildi.

20X Dimetil sülfoksit (DMSO): %100' lük DMSO (Sigma) 2 ml'lik eppendorf tüplere aktararak, kullanılıncaya kadar oda ısısında muhafaza edildi (Barış 2009).

Primer çalışma konsantrasyonu: Ticari olarak liyofilize halde alınan primerler kataloğu doğrultusunda çözülerek $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ formülü kullanılarak son konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde hazırlandı (Barış 2009).

1XTAE Tamponu: 100 ml 10XTAE'nin (Sigma) hacmi steril distile su ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlandı. (TAE: Tris Acetate EDTA buffer 10X konsantrasyona sahiptir. Bunu %10'a (1X) seyreltmek için 900 ml steril edilmiş saf su üzerine 100 ml 10X TAE eklendi. Oda sıcaklığında muhafaza edildi (Barış 2009).

Ethidium bromür çözeltisi: 100 ml steril saf su içerisinde 1 g ethidium bromür magnetik karıştırıcı kullanarak iyice çözüldü. Amber şişede, oda sıcaklığında muhafaza edildi (Barış 2009).

6X yükleme tamponu: 100 ml için %100'lük gliserolden 40 ml alıp, 0,1 g bromfenol blue ile karıştırıldı ve hacmi 1x TAE ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon amber şişe içerisinde, + 4 °C'de muhafaza edildi (Barış 2009).

Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi: 25 ml fenol, 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlandı. - 20 °C'de muhafaza edildi.

Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisi: 24 ml kloroform ve 1 ml izoamilalkol karıştırılarak hazırlandı. - 20 °C'de muhafaza edildi.

Kullanılan Hazır Kitler: DNA saflaştırma kiti (Promega-A1120).

0,5X TBE tamponu: Bu araştırmada kullanılan TBE tamponu 10X TBE olarak satın alınmış ve 0,5 birim 10X TBE tampon + 9,5 birim saf su ilavesi ile 0,5X TBE tamponu hazırlanmıştır (Barış 2009).

3.4. Yöntem

Çalışmaya alınan *Candida* ' lar – 76 °C' deki stok besi yerlerinden alınarak tek tek steril petri plaklarındaki SDA besiyerlerine (sabouraud dextrose agar) ekilerek canlanması

için etüvde 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında gelişen kültürlerden DNA izolasyonuna başlandı.

3.4.1. DNA izolasyonu 1

(Barış 2004, Susever 2006 ve Şahiner 2008' DNA izolasyon protokolleri birlikte uyarlanarak hazırlanmıştır).

- a. SDA plaklarında saf olarak üretilen *Candida* kolonilerinden 1 – 2 öze dolusu (20 – 30 mg) alınarak 2 ml'lik steril eppendorf tüplerine koyuldu.
- b. Eppendorf tüplerine 600 µl lizis buffer eklenerek homojenize olması için 1- 2 dk vorteklendi.
- c. Eppendorf tüpleri 65 °C' sıcaklıktaki su banyosuna koyuldu ve 10 dk arayla alt üst edilerek karıştırılmak kaydıyla 30 dk bekletildi.
- d. Eppendorf tüplerinin üzerine 150 µl Potasyum asetat eklendi
- e. Eppendorf tüpü 12000 rpm ve 4 °C' de 5'dk santrifüjlendi. Üst fazı yeni 2 ml eppendorf tüpüne alındı.
- f. Üzerlerine 200 µl Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi ve 200 µl Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisi eklenerek fenol yıkama yıkama yapıldı.
- g. Eppendorf tüpü 12000 rpm ve 4 °C' de 10'dk santrifüjlendi. Üst fazı yeni 2 ml eppendorf tüpüne alındı.
- h. 0,6 hacim (eppendorf tüpüne alınan yeni hacimin 0,6'sı kadar) soğuk izopropanol eklendi.

- i. Eppendorf tüpü 12000 rpm ve 4 °C' de 10'dk santrifüjlendi. Üst fazı yeni 2 ml eppendorf tüpüne alındı.
- j. Eppendorf tüpünün alt kısmında pellet kalacak şekilde üst faz döküldü ve 30 dk oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- k. Üzerlerine %70'lik ethanol'den 100 µl eklendi.
- l. 1 gece oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı
- m. Kurutulan *Candida*'lar 70 µl TE tamponunda çözüldü.
- n. Üzerlerine 2 µl RNase eklenerek alt üst edilerek karıştırıldı ve 20 dk bekletildi (Barış 2004; Susever 2006; Şahiner 2008).

3.4.2. DNA izolasyonu 2

(Oltu 2004, Barış 2004' DNA izolasyon protokolleri birbirileri ile uyarlanarak hazırlanmıştır).

- a. SDA plaklarında saf olarak üretilen *Candida* kolonilerinden 1 – 2 öze dolusu (20 – 30 mg) alınarak 2 ml'lik steril eppendorf tüplerine koyuldu.
- b. Eppendorf tüplerine 600 µl lizis buffer eklenerek homojenize olması için 1 - 2 dk vorteklendi.
- c. Eppendorf tüpleri 85 °C' sıcaklıktaki su banyosuna koyuldu ve 10 dk arayla alt üst edilerek karıştırılmak kaydıyla 30 dk bekletildi.

- d.** Eppendorf tüplerinin üzerine 150 µl Potasyum asetat eklendi. 5 dk alt üst edilerek karıştırıldı.
- e.** Eppendorf tüpü 12000 rpm ve 4 °C' de 10'dk santrifüjlendi. Üst fazı yeni 2 ml eppendorf tüpüne alındı.
- f.** Eppendorf tüpüne yeni alınan üst fazın 0,6 hacmi kadar soğuk izopropanol eklendi.
- g.** Eppendorf tüpü 12000 rpm ve 4 °C' de 10'dk santrifüjlendi. Üst fazı uzaklaştırıldı.
- h.** Eppendorf tüpünün altında kalan pellet kısmı üzerine %70'lik ethanol'den 100 µl eklendi.
- i.** 37 °C' lik etüvde 1 saat yada 1 gece oda ısısında kurumaya bırakıldı.
- j.** Kurutulan DNA'lar 200 µl TE tamponu ile çözüldü ve üzerlerine 2 µl RNase eklendi. 37 °C' lik etüvde 30 dk bekletildi.
- k.** Üzerlerine 200 µl Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı.
- l.** Eppendorf tüpü 12000 rpm ve 4 °C' de 10'dk santrifüjlendi. Üst fazı dikkatlice yeni 2 ml eppendorf tüpüne alındı.
- m.** Alınan üst fazın 0,6 hacmi kadar soğuk izopropanol eklendi.
- n.** Eppendorf tüpü 12000 rpm ve 4 °C' de 10'dk santrifüjlendi. Üst fazı uzaklaştırıldı.
- o.** Eppendorf tüpünün altında kalan pellet kısmı üzerine %70'lik ethanol'den 100 µl eklendi.

- p. 1 gece oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı
- q. Kurutulan *Candida*'lar 70 µl TE tamponunda çözüldü (Oltu 2004; Barış 2004).

3.4.3. DNA izolasyonu 3

(Barış 2004 ve Barış 2009' DNA izolasyon protokolleri birbirileri ile uyarlanarak hazırlanmıştır).

- a. SDA plaklarında saf olarak üretilen *Candida* kolonilerinden 1 – 2 öze dolusu (20 – 30 mg) alınarak 2 ml'lik steril eppendorf tüplerine koyuldu.
- b. 567 µl TE tamponu eklendi ve iyice homojenize olması için alt üst edildi.
- c. Üzerine 30 µl %10'luk SDS ve 15 µl β-Merkaptoetenol (çeker ocakta dikkatlice) eklendi.
- d. Eppendorf tüpleri 65 °C' sıcaklıktaki su banyosuna koyuldu ve 15 dk arayla alt üst edilerek karıştırılmak kaydıyla 60 dk bekletildi.
- e. 60 dk sonunda 100 µl Potasyum asetat eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı.
- f. Tüplere 80 µl 65 °C'de CTAB/NaCl çözeltisi eklenerek hemen karıştırıldı.
- g. Eppendorf tüpleri 65 °C' sıcaklıktaki su banyosuna koyuldu ve 10 dk bekletildi.
- h. Üzerlerine 780 µl Kloroform: izoamilalkol (24:1) çözeltisi eklenerek alt üst ederek karıştırıldı.

- i. Eppendorf tüpleri 12000 rpm ve 4 °C' de 5'dk santrifüjlendi. Üst fazı dikkatlice yeni 2 ml eppendorf tüpüne alındı.
- j. Eppendorf tüpüne alınan üst fazın hacmine eşit miktarda Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) çözeltisi eklendi.
- k. Eppendorf tüpleri 12000 rpm ve 4 °C' de 5'dk santrifüjlendi. Üst fazı dikkatlice yeni 2 ml eppendorf tüpüne alındı.
- l. Eppendorf tüplerine alınan üst fazın 0,6 hacmi kadar soğuk (- 20 °C) izopropanol eklendi ve verimi arttırmak için tüpler – 20 °C'de 15 dk bekletildi.
- m. Eppendorf tüpünün altında kalan pellet 100 µl %70'lik ethanol ile yıkandı.
- n. 37 °C' lik etüvde yada 1 gece oda ısısında kurumaya bırakıldı.
- o. Kurutulan DNA'lar 30 µl TE tamponunda çözüldü. (Barış 2004; Barış 2009)

3.4.4. DNA izolasyonu 4

(Promega A1120 Kit DNA izolasyon protokolü revize edilerek kullanılmıştır).

- a. SDA plaklarında saf olarak üretilen *Candida* kolonilerinden 1 – 2 öze dolusu (20 – 30 mg) alınarak 2 ml'lik steril eppendorf tüplerine koyuldu. Üzerlerine 0,3gr glassbeed eklendi.
- b. Eppendorf tüplerine 200 µl lizis buffer eklenerek homojenize olması için 1 - 2 dk vorteklendi.

- c.** Eppendorf tüpünün üzerine 200 µl Fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) zltisi eklendi. Alt st edilerek dikkatlice karıştırıldı.
- d.** Eppendorf tüpleri 12000 rpm ve 4 °C' de 5'dk santrifüjlendi. Üst faz uzaklaştırıldı.
- e.** Eppendorf tüpünün üzerine 200 µl TE tamponu eklendi. 1 - 2 dk vortekslerek homojenize olması sağlandı.
- f.** Eppendorf tüpü 16000 rpm ve 4 °C' de 10'dk santrifüjlendi. Üst fazı dikkatlice yeni 2 ml eppendorf tüpüne alındı.
- g.** Eppendorf tüpüne alınan üst faza %100' lk ethanolden 1 ml eklendi.
- h.** Eppendorf tüpleri 16000 rpm ve 4 °C' de 10'dk santrifüjlendi. Üst faz uzaklaştırıldı.
- i.** Tüpün alt kısmında kalan pelletin üzerine 300 µl Nklei Lizis solüsyonu (Promega A1120 Kit) ve 100 µl Protein klme Solüsyonu (Promega A1120 Kit) eklendi.
- j.** Tüpler - 20 °C' de 5 dk bekletildi
- k.** Eppendorf tüpü 16000 rpm ve 4 °C' de 6'dk santrifüjlendi. Üst fazı dikkatlice yeni 2 ml eppendorf tüpüne alındı.
- l.** Eppendorf tüplerinin üzerine 300 µl soğuk (- 20 °C) izopropanol eklendi. Alt st ederek dikkatlice karıştırıldı.
- m.** Eppendorf tüpü 16000 rpm ve 4 °C' de 5'dk santrifüjlendi. Üst fazı dikkatlice uzaklaştırıldı.

- n. Tüpün alt kısmında kalan pellet üzerine oda sıcaklığında 300 µl %70' lik ethanol eklendi.
- o. Eppendorf tüpü 16000 rpm ve 4 °C' de 5'dk santrifüjlendi.
- p. Eppendorf Tüpleri 37 °C'de 90 dk yada 40 °C'de 60 dk bekletilerek ethanol'ün kuru hava ile aspire edilmesi sağlandı.
- q. Aspire edilen tüplerin üzerine 50 µl DNA Rehidration solusyonu (Promega A1120 Kit) den eklendi, ve üzerlerine 1,5 µl RNase solüsyonu (Promega A1120 Kit) eklenip 37 °C' lik etüv'de 15 dk bekletildi.
- r. Etüvden çıkarılan tüpler 65 °C'de 1 saat yada 4 °C'de 1 gece bekletildi.

Tüm DNA izolasyonlarından sonra elde edilen DNA'lar %0,6'lık agaroz jelinde 90 volt elektirik akımında 30 dakika yürütülmüş ve jelde tek parça bant veren örnekler +4 °C'ye kaldırılarak sonraki çalışmalar için hazır hale getirilmiştir.

DNA konsantrasyonlarının ölçülmesi ve çalışma solüsyonlarının hazırlanması:

DNA miktarı, direkt olarak 260 nm'deki absorbans ölçümlerindeki değerlerle belirlenirken, genetik materyalin temizliği yani protein kirliliği taşınması ise 280 nm'de okunan absorbans değeriyle tespit edilir. Kuvarts küvet içerisine 998 µl TE çözeltisi konularak 260 nm'ye ayarlı spektrofotometrede absorbans değeri ölçülmüş ve elde edilen değer kör numune olarak kaydedilmiştir. Ardından küvete 2 µl DNA ilave edilerek karışımın homojen olması sağlandıktan sonra 260 nm'de absorbans değeri yeniden ölçülerek okunan bu değerden kör numuneye ait değer çıkarılarak DNA'nın absorbans değeri bulunmuştur. Yapılan işlemlerin aynısı 280 nm için de tekrarlanarak, A_{260} ve A_{280} değerlerine bakılarak $A_{260} / A_{280} = 1 - 1,7$ arasında olan örnekler çalışma solüsyonu hazırlamak için kullanılmıştır (Sezen 2015).

DNA örneğinin ve DNA çalışma solüsyonunun konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$): DNA konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) = $A_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü (500)} \times 50$ (DNA için sabit değer) formülü kullanılarak stok solüsyonların DNA konsantrasyonları belirlenmiştir. DNA çalışma solüsyonlarının konsantrasyonları ise; İstlenen Konsantrasyon ($100 \text{ ng}/\mu\text{l}$) \times İstlenen 50 Hacim ($200 \mu\text{l}$) /Stok DNA Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) formülü ile DNA çalışma solüsyonu hazırlanmış ve bu hesaplamadan elde edilen değer stok DNA çözeltisinden alınacak miktarı vermiştir. Bu miktar TE çözeltisi ile $200 \mu\text{l}$ 'ye tamamlanarak $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ konsantrasyondaki DNA çalışma solüsyonu hazırlanmış ve DNA tüpleri $-76 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de sonraki çalışmalarda kullanılmaya kadar saklanmıştır (Sezen 2015).

İzolatların PCR ile amplifikasyonu: Test izolatlarından saflaştırılmış olan genomik DNA'lar 13 adet RAPD primerleri kullanılarak *in vitro* koşullar altında PCR yardımı ile çoğaltılmıştır.

3.5. Kullanılan Primerler

No	Primer İsmi	Baz Dağılımı	Referans
1	E1	5' CTG GAC GTC A 3'	(Nardemir 2012)
2	E3	5' TGT GGC AGC A 3'	(Nardemir 2012)
3	E5	5' GAC TGC CTC T 3'	(Nardemir 2012)
4	F5	5' GAA TTC TTG GCT CTC ATA GAC 3'	(El-Kirat <i>et al.</i> 2011)
5	F7	5' AGA AAC TTA CAC TCA GAG GGC 3'	(El-Kirat <i>et al.</i> 2011)
6	OPA3	5' AGT CAG CCA C 3'	(Csutak 2012)
7	OPE18	5' GGA CTG CAG A 3'	(Gültekin 2010)
8	CA8	5' TGT ACT CTT CTG GTA GAA CTA CCG G 3'	(Daniel 2003)
9	AGC6	5' AGC AGC AGC AGC AGC AGC 3'	Genbank (AJ277643.1b)
10	T3B	5' AGG TCG CGG CTT CGA ATC C 3'	(Thanos 1996)
11	AP3	5' TCA CGA TGC A 3'	(Thanos 1996)
12	SOY	5' AGG TCA CTG A 3'	(Csutak 2012)
13	GTG5	5' GTG GTG GTG GTG GTG 3'	(Thanos 1996)

3.5.1. Primerlerin hazırlanması

Kullanılan primerler firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu hazırlanmış, daha sonra da uygun hesaplamalar ile 1 μ M olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

3.5.2. Reaksiyonun hazırlanması

PCR işlemi için 0,5 ml'lik tüpe 2,5 μ l 10X PCR tamponu, 1 μ l DMSO, 0,5 μ l 10 mM dNTP, 1,5 μ l 25 mM MgCl₂, 1 μ l 50 ng/ μ l Template DNA, 0,25 μ l 1 μ M primer, 0,25 μ l 5 Unit/ μ l *Taq* DNA polimeraz (Promega Crop., Madison, Wis.) ve 18 μ l saf su ilave edilerek hacim 25 μ l'ye tamamlanmıştır. Birden fazla primer kullanıldığı durumlarda her primer için saf su miktarı 0,25 μ l azaltılmış olup yerine ayrı ayrı 0,25 μ l primer konulmuştur.

3.5.3. PCR programı

Hazırlanan örnekler, 94 °C'de 3 dakika denatürasyon, bunu takiben 40 döngü olacak şekilde 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 34 °C'de 1 dakika bağlanma ve 72 °C'de 1,5 dakika uzama basamakları ve son olarak 72 °C'de 7 dakika uzama basamağından oluşacak şekilde programlanan PCR termal döngü cihazına yerleştirildi. Seçilen programda hedef bölgelerin çoğaltılması yapıldı.

3.5.4. Agaroz jel elektroforezi

PCR işleminden sonra örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bantların varlığı primerlerin hibridize olduğu ve bu primerlerin ait olduğu operon bölgelerinin incelenen örneklerde bulunduğu anlamında değerlendirilmiştir. Jel içerisinde agarın konsantrasyonu %1,2 olacak şekilde agaroz tartılıp 0,5X Tris–Borat EDTA (TBE)

tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır. Mikrodalga fırından çıkarılan 0,5X TBE + agaroz çözeltisi içerisine 0,6 µg/ml olacak miktarda Etidium bromid eklenmiştir. Hazırlanan jel 50 °C'de katılaşmadan elektroforez tankına dökülmüş ve donmadan önce jel üzerine tarak konularak örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur. Jel donduktan sonra her bir kuyucuğa ayrı bir örnek (2 µl bromfenol mavisi + 8µl PCR ürünü) yüklenmiştir. Elektroforez jel düzeneği 90 volta ayarlanarak örnekler 75 dakika yürütüldü. Yürütme işleminden sonra jel, jel dökümantasyon sistemi ile görüntülendi ve bilgisayar ortamında (DNR BioImaging Systems Software) analiz edildi (Sezen 2015).

3.6. Sonuçların İstatistikî Olarak Değerlendirilmesi

Elde edilen RAPD – PCR analiz sonuçları SPSS 20.0 istatistik programı kullanılarak Jaccard'ın yakın komşuluk metodu kullanılarak analiz edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Çalışmada Kullanılan *Candida* Türleri

Çalışmada kullanılan hasta kaynaklı 60 adet *Candida* türü Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji ABD. Laboratuvarından temin edilmiştir. İzolatlar laboratuvarımızda kendimize özgü bir biçimde kodlanarak muhafaza edilmiştir. Çizelge 4.1’de stok kodları ve daha sonraki işlemlerde kullanılan kodları gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. Hasta kaynaklı *Candida* türleri ve kodları

Jel ve Dend. kodu	Stok kodu	Tür adı	Jel ve Dend. kodu	Stok kodu	Tür adı
1	EA1	<i>Candida albicans</i>	24	EA50	<i>Candida albicans</i>
2	EA2	<i>Candida albicans</i>	25	EA51	<i>Candida albicans</i>
3	EA3	<i>Candida albicans</i>	26	EA52	<i>Candida albicans</i>
4	EA4	<i>Candida albicans</i>	24	EA53	<i>Candida albicans</i>
5	EA5	<i>Candida albicans</i>	28	EA54	<i>Candida albicans</i>
6	EA6	<i>Candida albicans</i> (A.T.C.C 10231)	29	EA55	<i>Candida albicans</i>
7	EA7	<i>Candida albicans</i>	30	EA56	<i>Candida albicans</i>
8	EA10	<i>Candida albicans</i>	31	EA57	<i>Candida albicans</i>
9	EA15	<i>Candida albicans</i>	32	EA58	<i>Candida albicans</i>
10	EA16	<i>Candida albicans</i>	33	EA59	<i>Candida albicans</i>
11	EA17	<i>Candida albicans</i>	34	EA60	<i>Candida albicans</i>
12	EA18	<i>Candida albicans</i>	35	EA8	<i>Candida krusei</i>
13	EA33	<i>Candida albicans</i>	36	EA12	<i>Candida krusei</i>
14	EA34	<i>Candida albicans</i>	37	EA13	<i>Candida krusei</i>
15	EA36	<i>Candida albicans</i>	38	EA28	<i>Candida krusei</i>
16	EA37	<i>Candida albicans</i>	39	EA46	<i>Candida krusei</i> (A.T.C.C 6258)
17	EA38	<i>Candida albicans</i>	40	EA25	<i>Candida guilliermondii</i>
18	EA39	<i>Candida albicans</i>	41	EA26	<i>Candida guilliermondii</i>
19	EA41	<i>Candida albicans</i>	42	EA30	<i>Candida guilliermondii</i>
20	EA42	<i>Candida albicans</i>	43	EA31	<i>Candida guilliermondii</i>
21	EA44	<i>Candida albicans</i>	44	EA9	<i>Candida glabrata</i>
22	EA48	<i>Candida albicans</i>	45	EA35	<i>Candida glabrata</i>
23	EA49	<i>Candida albicans</i>	46	EA45	<i>Candida glabrata</i>

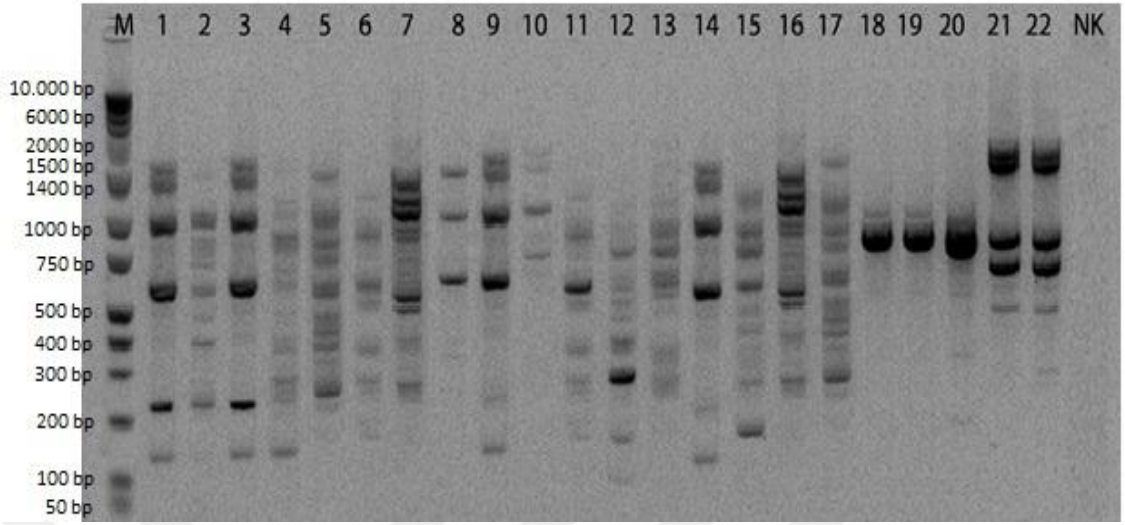
Çizelge 4.1. (devam)

Jel ve Dend. kodu	Stok kodu	Tür adı	Jel ve Dend. kodu	Stok kodu	Tür adı
47	EA47	<i>Candida glabrata</i>	54	EA11	<i>Candida parapsilosis</i>
48	EA32	<i>Candida tropicalis</i>	55	EA19	<i>Candida parapsilosis</i>
49	EA40	<i>Candida tropicalis</i>	56	EA20	<i>Candida parapsilosis</i>
50	EA43	<i>Candida tropicalis</i>	57	EA24	<i>Candida parapsilosis</i> (A.T.C.C 22019)
51	EA14	<i>Candida pseudotropicalis</i>	58	EA27	<i>Candida parapsilosis</i>
52	EA22	<i>Candida pseudotropicalis</i>	59	EA21	<i>Candida geotrichum</i>
53	EA23	<i>Candida pseudotropicalis</i>	60	EA29	<i>Candida geotrichum</i>

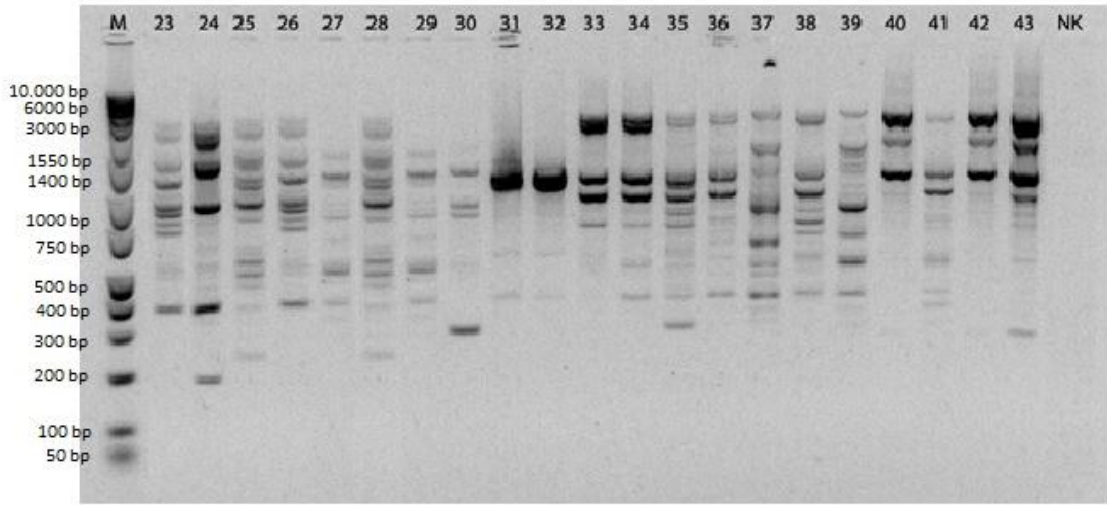
Tez çalışmamızda 4 ayrı DNA İzolasyon yöntemi denenmiş olup %100 verim sadece 4 nolu DNA İzolasyon yönteminden alınmıştır. Diğer üç yöntemin *Candida*'larda DNA İzolasyonu sonrasında DNA verimi yüksek ancak daha ileri aşama olan PCR sonrası ürünler için düşük oranda verim sağladığı görülmüştür. Ayrıca çalışmamızda 13 farklı primer ve birden fazla PCR yöntemi denenmiş olup bunlardan sadece 7 adet primer ve RAPD –PCR yönteminde %90 ve üzeri oranında verim alınabilmektedir.

4.2. RAPD-PCR Sonuçları

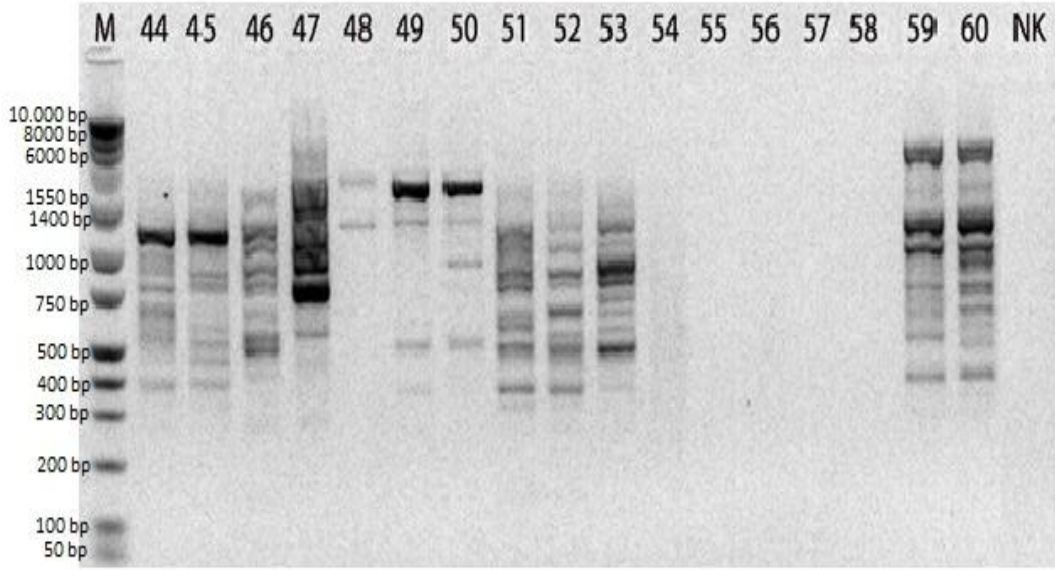
Çalışma için çok sayıda primer denenmiş fakat değerlendirilebilecek sonuçlar veren 7 primer ile çalışmalara devam edilmiştir. Aşağıdaki şekillerde (Şekil 4.1 – Şekil 4.21) bütün izolatların, çalışılan bütün primerlerle elde edilen agaroz jel görüntüsü verilmiştir.



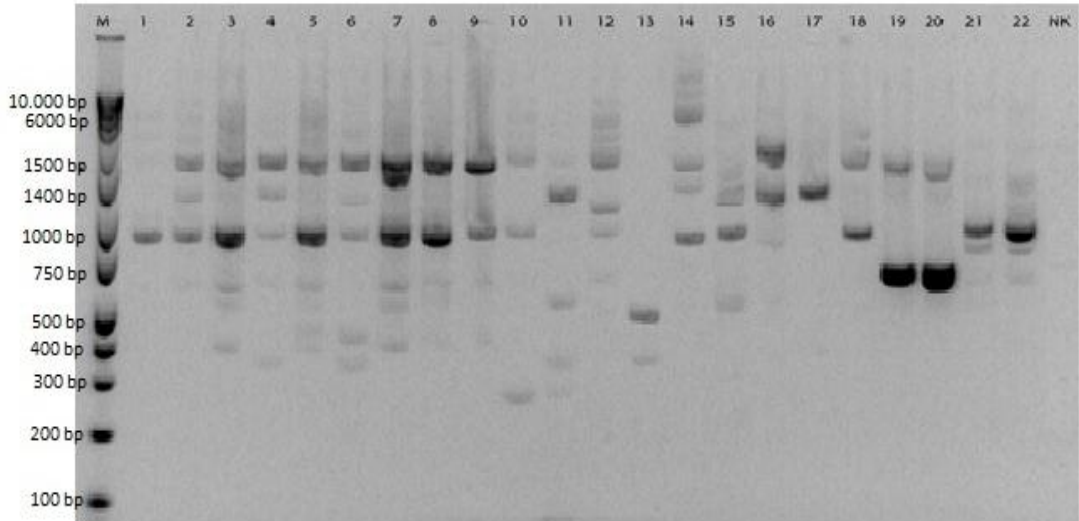
Şekil 4.1. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **E1** primeri ile RAPD-PCR sonucu **1** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1-22 *C. albicans* türleri)



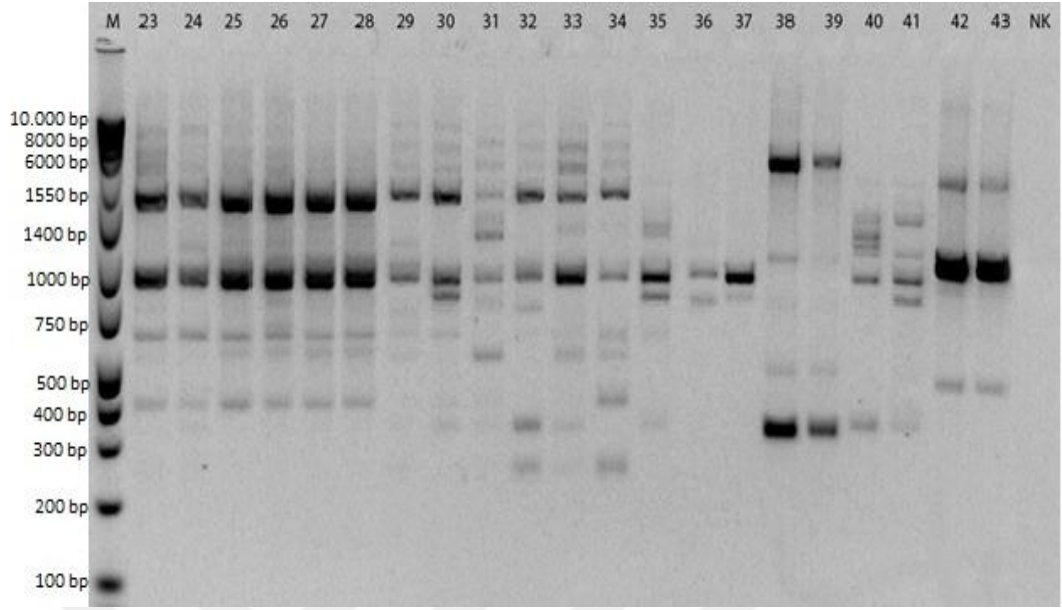
Şekil 4.2. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **E1** primeri ile RAPD-PCR sonucu **2** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 23-34 *C. albicans* türleri, 35-39 *C. krusei* türleri, 40-43 *C. guilliermondii* türleri)



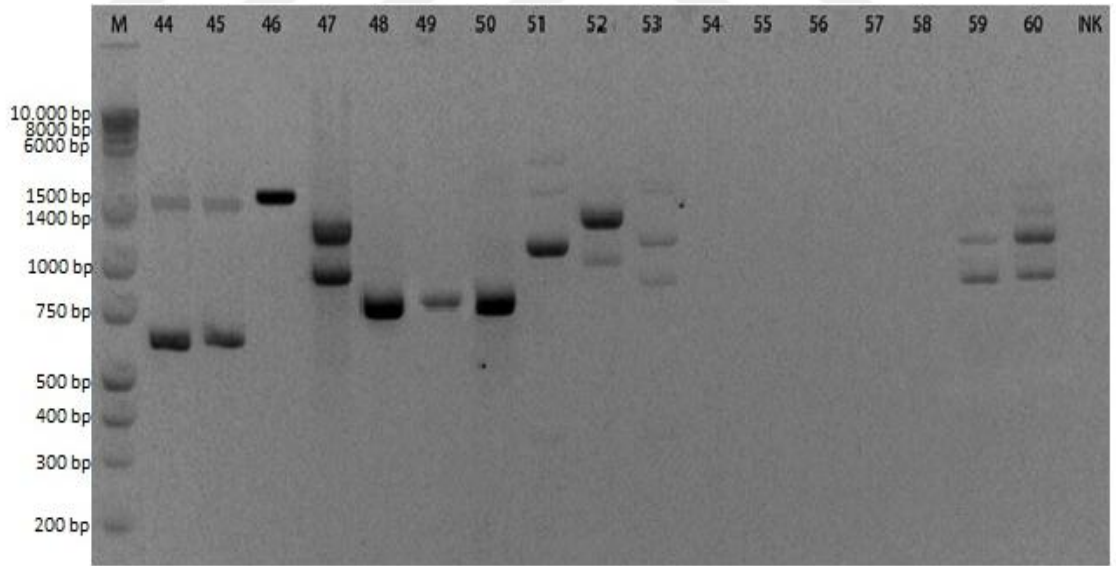
Şekil 4.3. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **E1** primeri ile RAPD-PCR sonucu **3** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 44–47 *C. glabrata* türleri, 48–50 *C. tropicalis* türleri, 51–53 *C. pseudotropicalis* türleri, 54–58 *C. parapsilosis* türleri, 59–60 *C. geotrichum* türleri)



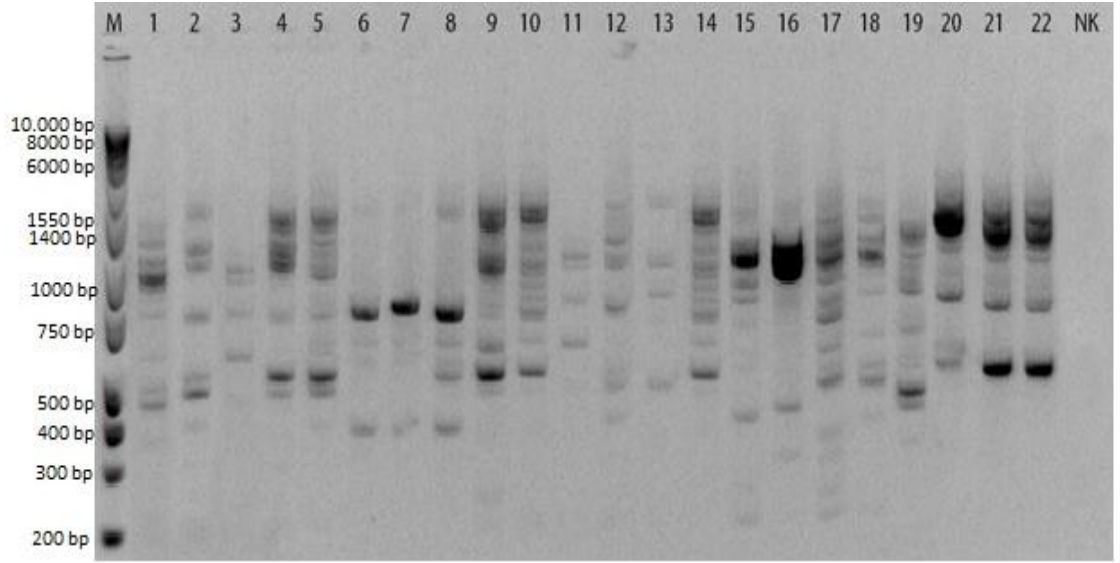
Şekil 4.4. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **E3** primeri ile RAPD-PCR sonucu **1** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1-22 *C. albicans* türleri)



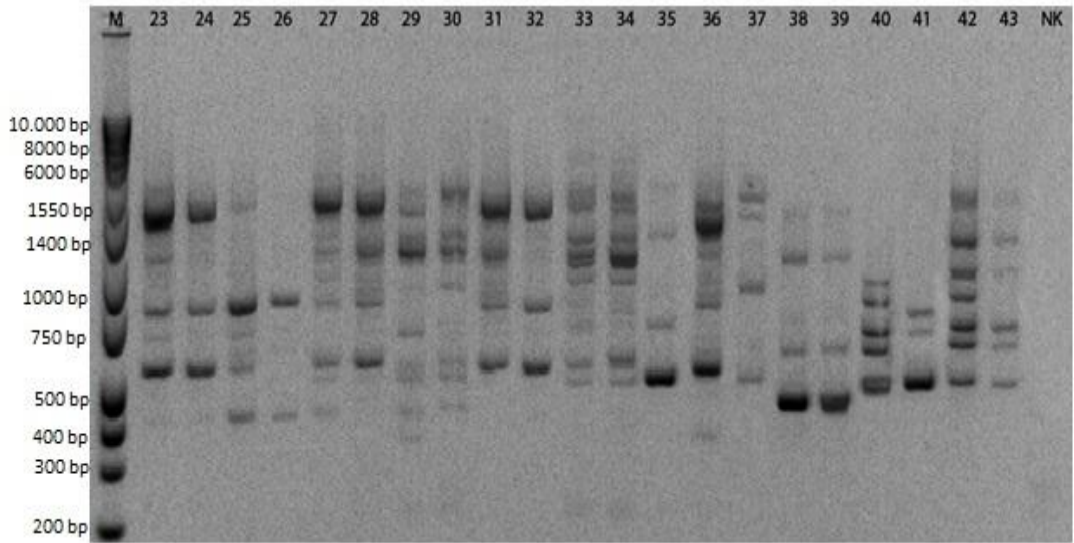
Şekil 4.5. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **E3** primeri ile RAPD-PCR sonucu **2** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 23–34 *C. albicans* türleri, 35–39 *C. krusei* türleri, 40–43 *C. guilliermondii* türleri)



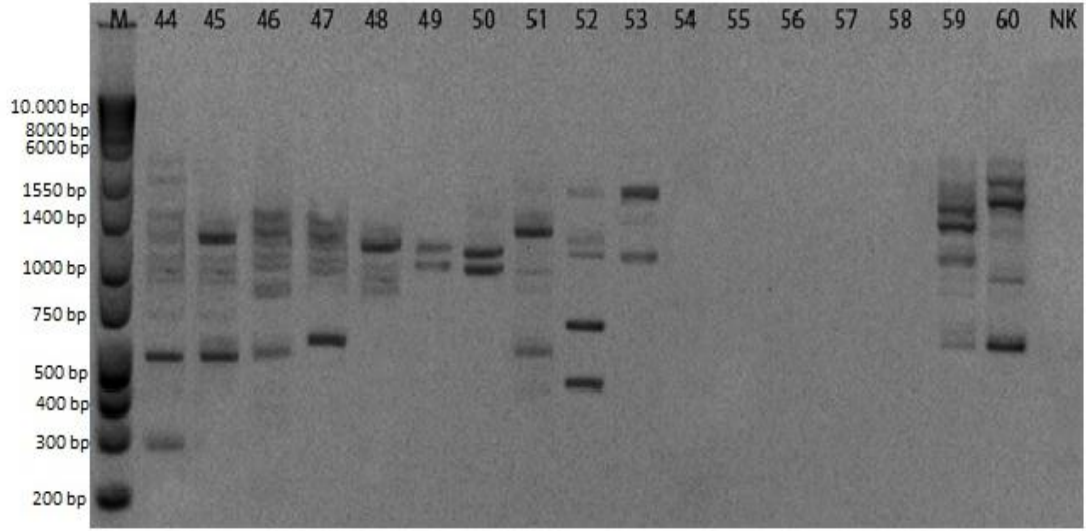
Şekil 4.6. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **E3** primeri ile RAPD-PCR sonucu **3** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 44–47 *C. glabrata* türleri, 48–50 *C. tropicalis* türleri, 51–53 *C. pseudotropicalis* türleri, 54–58 *C. parapsilosis* türleri, 59–60 *C. geotrichum* türleri)



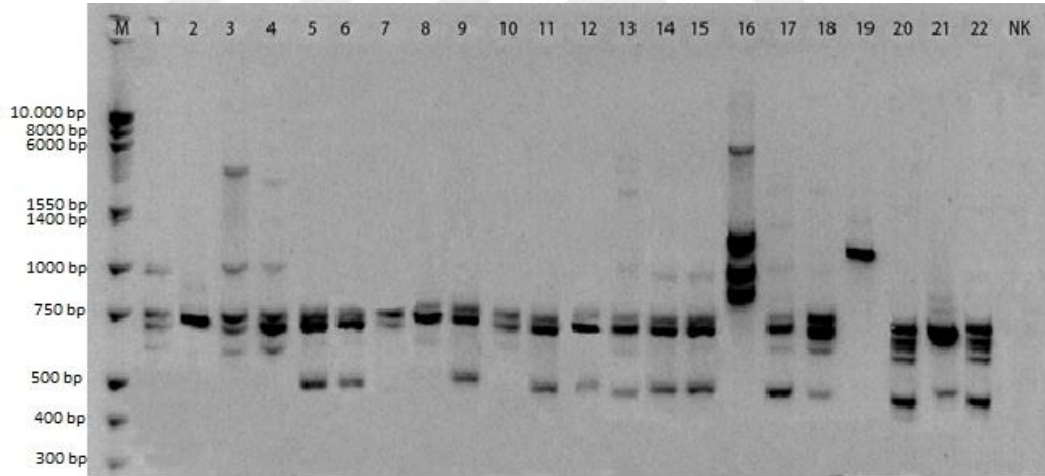
Şekil 4.7. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **E5** primeri ile RAPD-PCR sonucu **1** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1-22 *C. albicans* türleri)



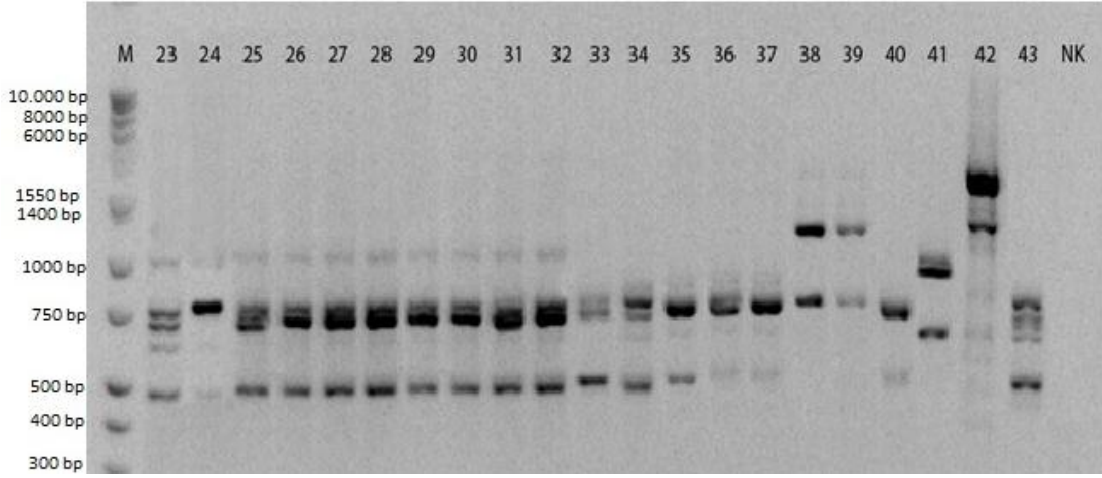
Şekil 4.8. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **E5** primeri ile RAPD-PCR sonucu **2** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 23-34 *C. albicans* türleri, 35-39 *C. krusei* türleri, 40-43 *C. guilliermondii* türleri)



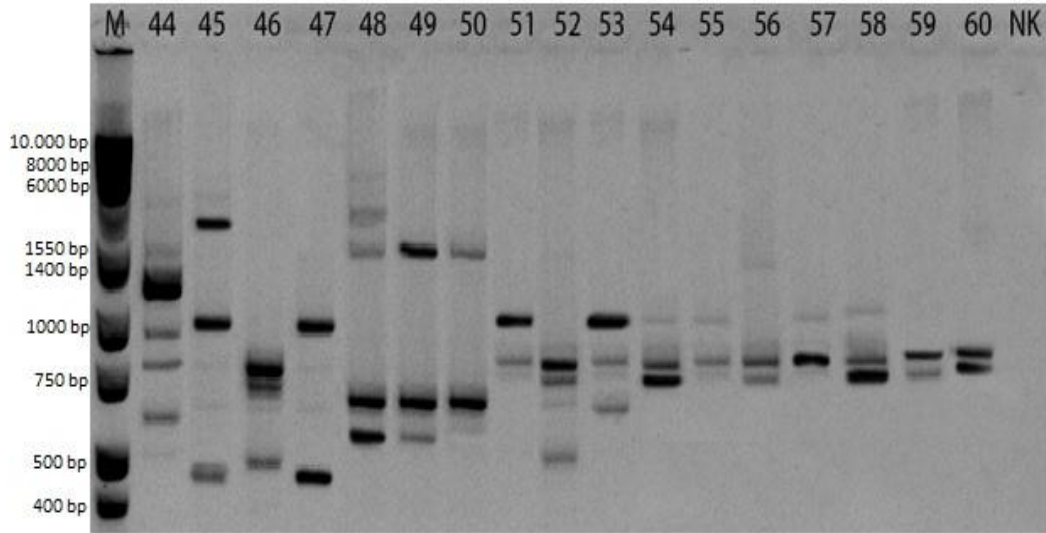
Şekil 4.9. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **E5** primeri ile RAPD- PCR sonucu **3** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 44–47 *C. glabrata* türleri, 48–50 *C. tropicalis* türleri, 51–53 *C. pseudotropicalis* türleri, 54–58 *C. parapsilosis*, 59–60 *C. geotrichum* türleri)



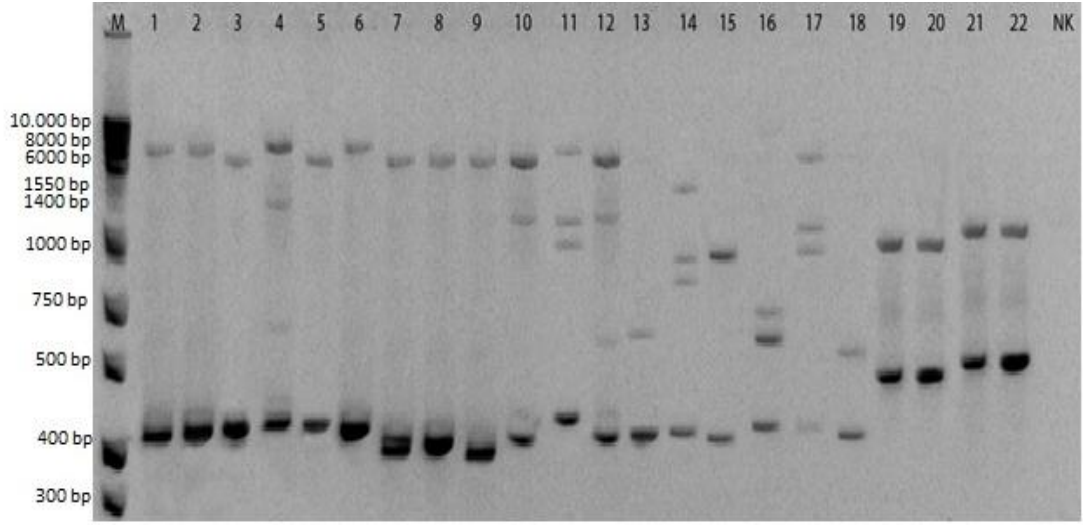
Şekil 4.10. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **F5** primeri ile RAPD-PCR sonucu **1** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1-22 *C. albicans* türleri)



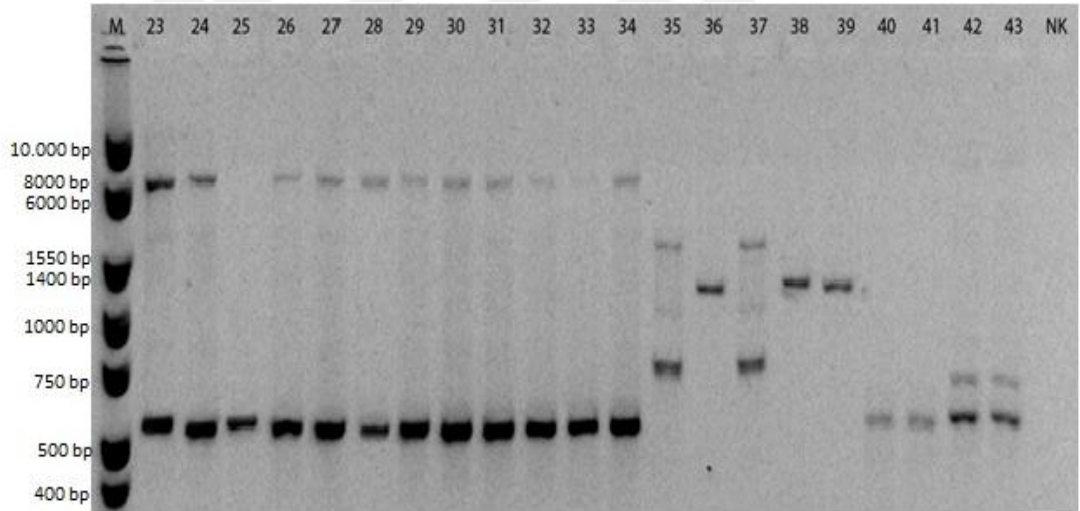
Şekil 4.11. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin F5 primeri ile RAPD-PCR sonucu 2 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 23–34 *C. albicans* türleri, 35–39 *C. krusei* türleri, 40–43 *C. guilliermondii* türleri)



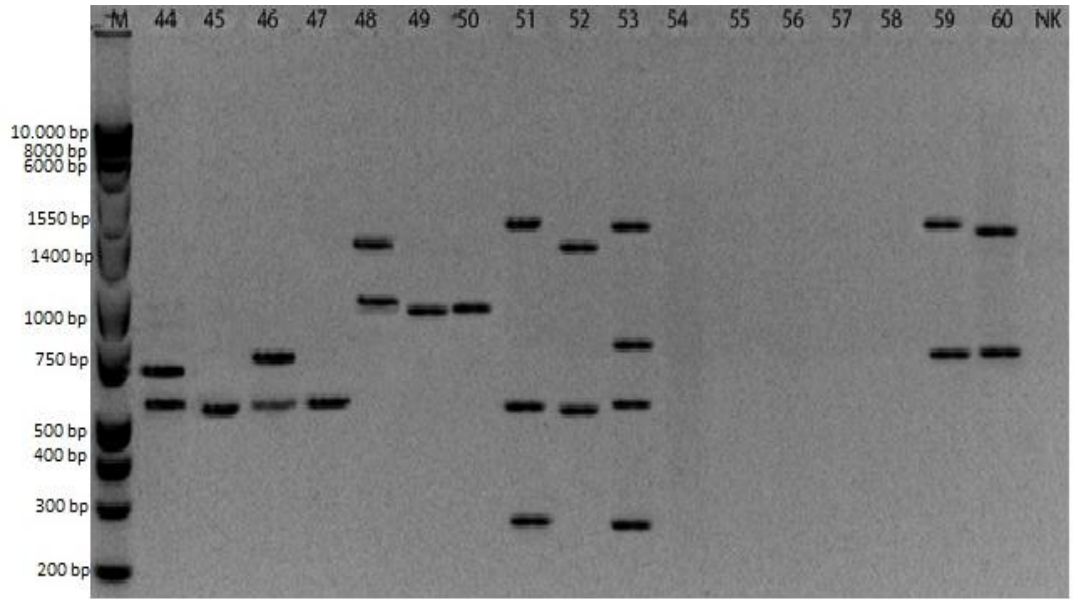
Şekil 4.12. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin F5 primeri ile RAPD-PCR sonucu 3 numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 44–47 *C. glabrata* türleri, 48–50 *C. tropicalis* türleri, 51–53 *C. pseudotropicalis* türleri, 54–58 *C. parapsilosis* türleri, 59–60 *C. geotrichum* türleri)



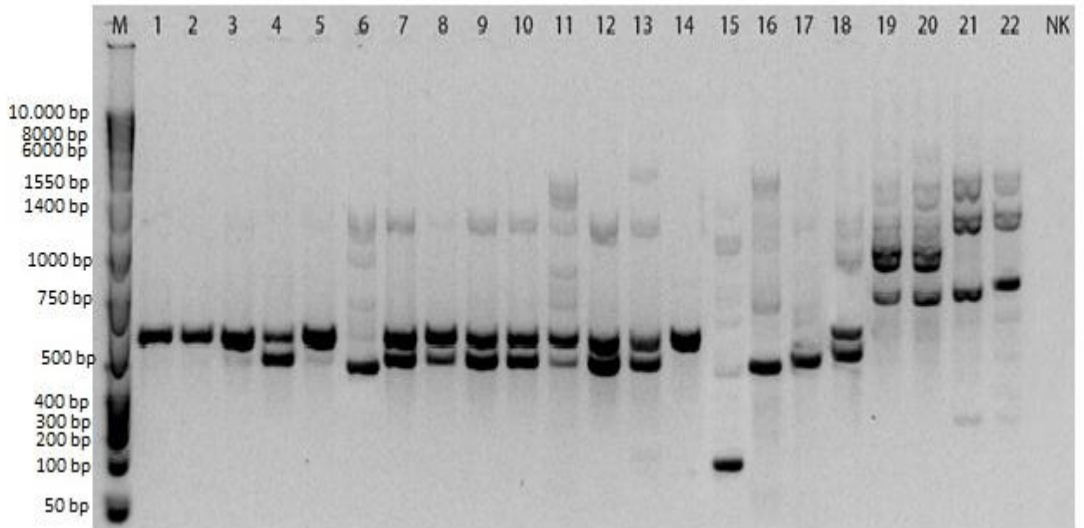
Şekil 4.13. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **F7** primeri ile RAPD-PCR sonucu **1** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1-22 *C. albicans* türleri)



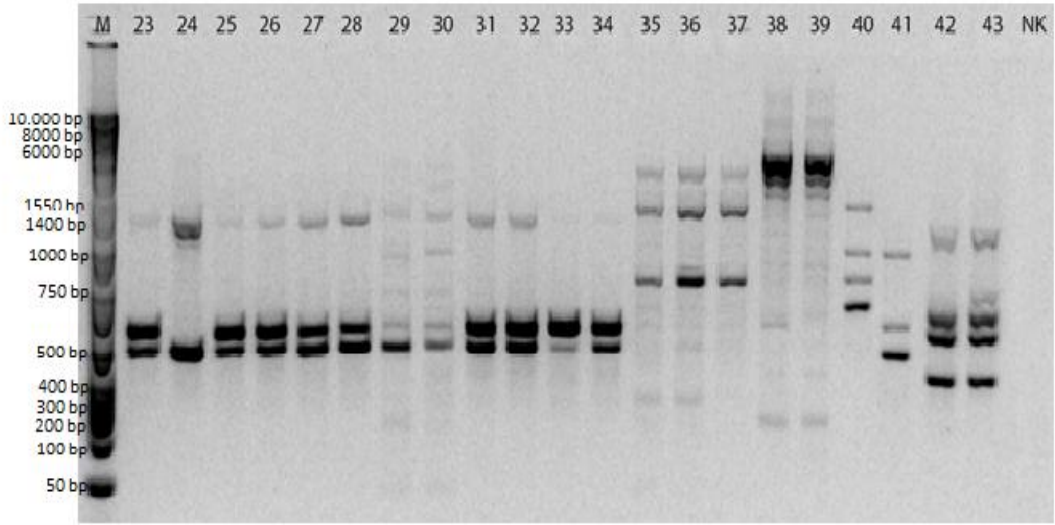
Şekil 4.14. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **F7** primeri ile RAPD-PCR sonucu **2** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 23-34 *C. albicans* türleri, 35-39 *C. krusei* türleri, 40-43 *C. guilliermondii* türleri)



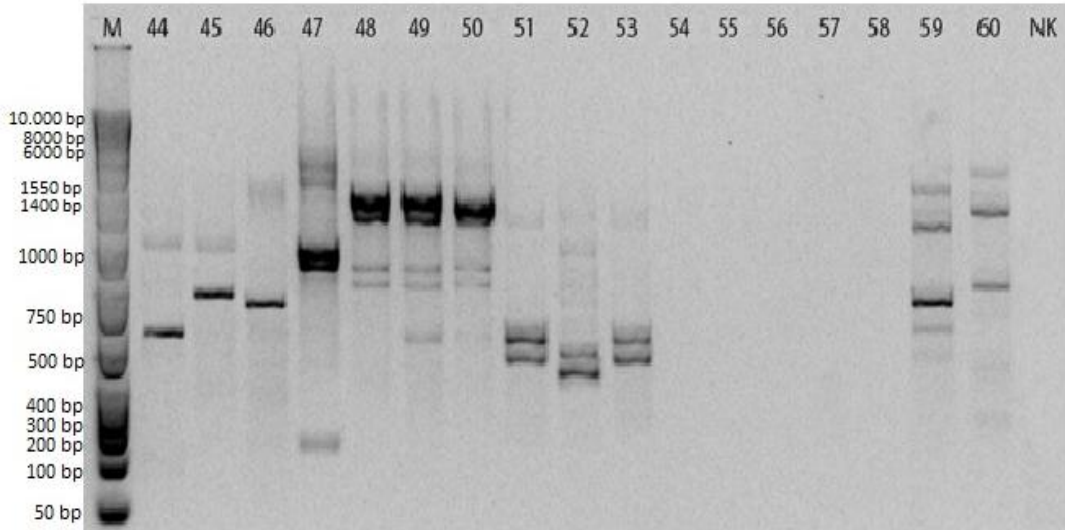
Şekil 4.15. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **F7** primeri ile RAPD- PCR sonucu **3** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 44–47 *C. glabrata* türleri, 48–50 *C. tropicalis* türleri, 51–53 *C. pseudotropicalis* türleri, 54–58 *C. parapsilosis* türleri, 59–60 *C. geotrichum* türleri)



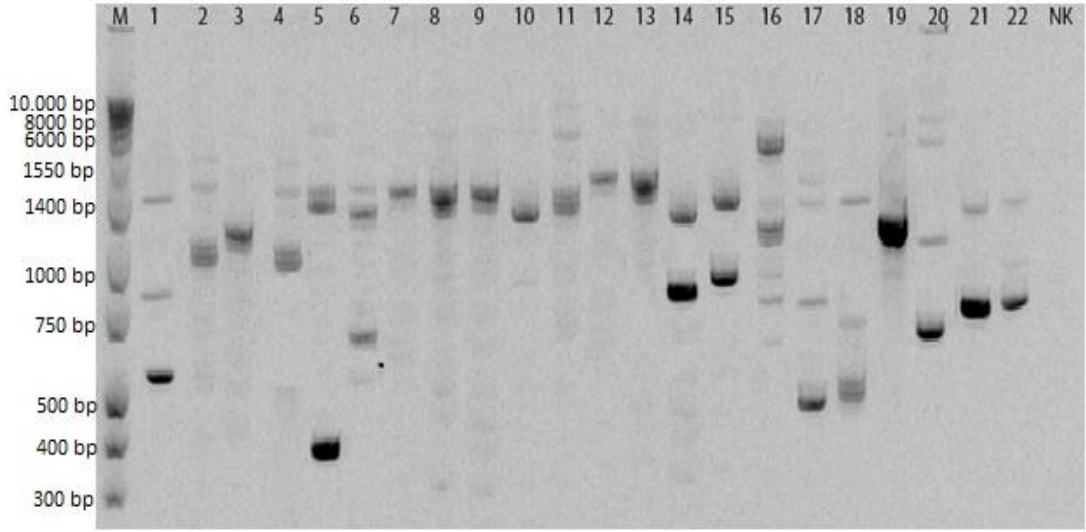
Şekil 4.16. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **OPA3** primeri ile RAPD-PCR sonucu **1** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1-22 *C. albicans* türleri)



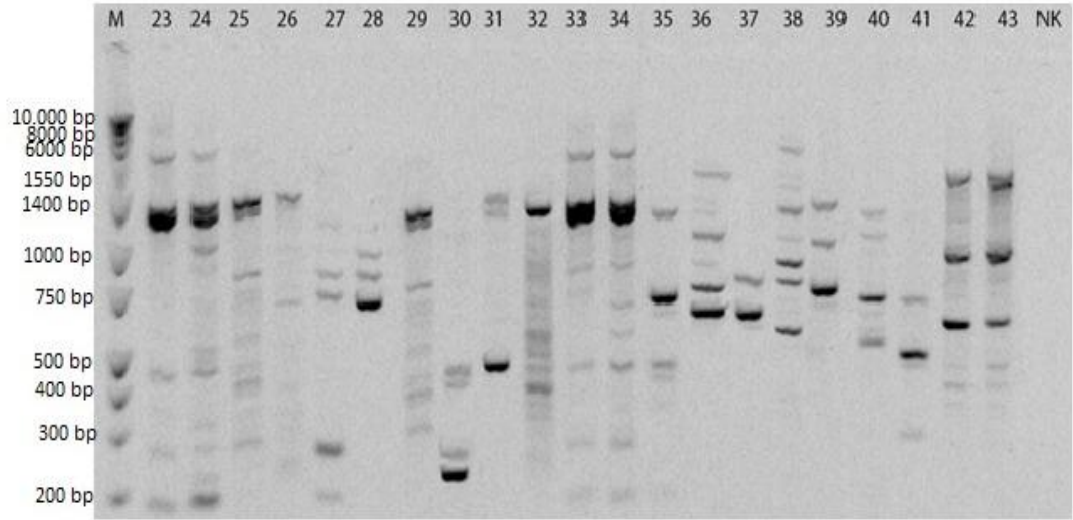
Şekil 4.17. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **OPA3** primeri ile RAPD-PCR sonucu **2** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 23–34 *C. albicans* türleri, 35–39 *C. krusei* türleri, 40–43 *C. guilliermondii* türleri)



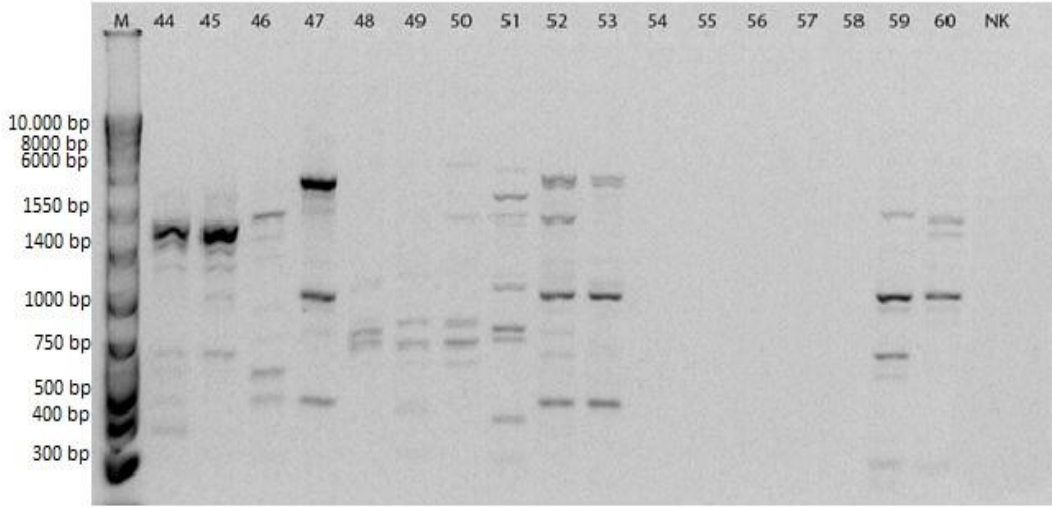
Şekil 4.18. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **OPA3** primeri ile RAPD-PCR sonucu **3** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 44–47 *C. glabrata* türleri, 48–50 *C. tropicalis* türleri, 51–53 *C. pseudotropicalis* türleri, 54–58 *C. parapsilosis* türleri, 59–60 *C. geotrichum* türleri)



Şekil 4.19. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **OPE18** primeri ile RAPD-PCR sonucu **1** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 1-22 *C. albicans* türleri)



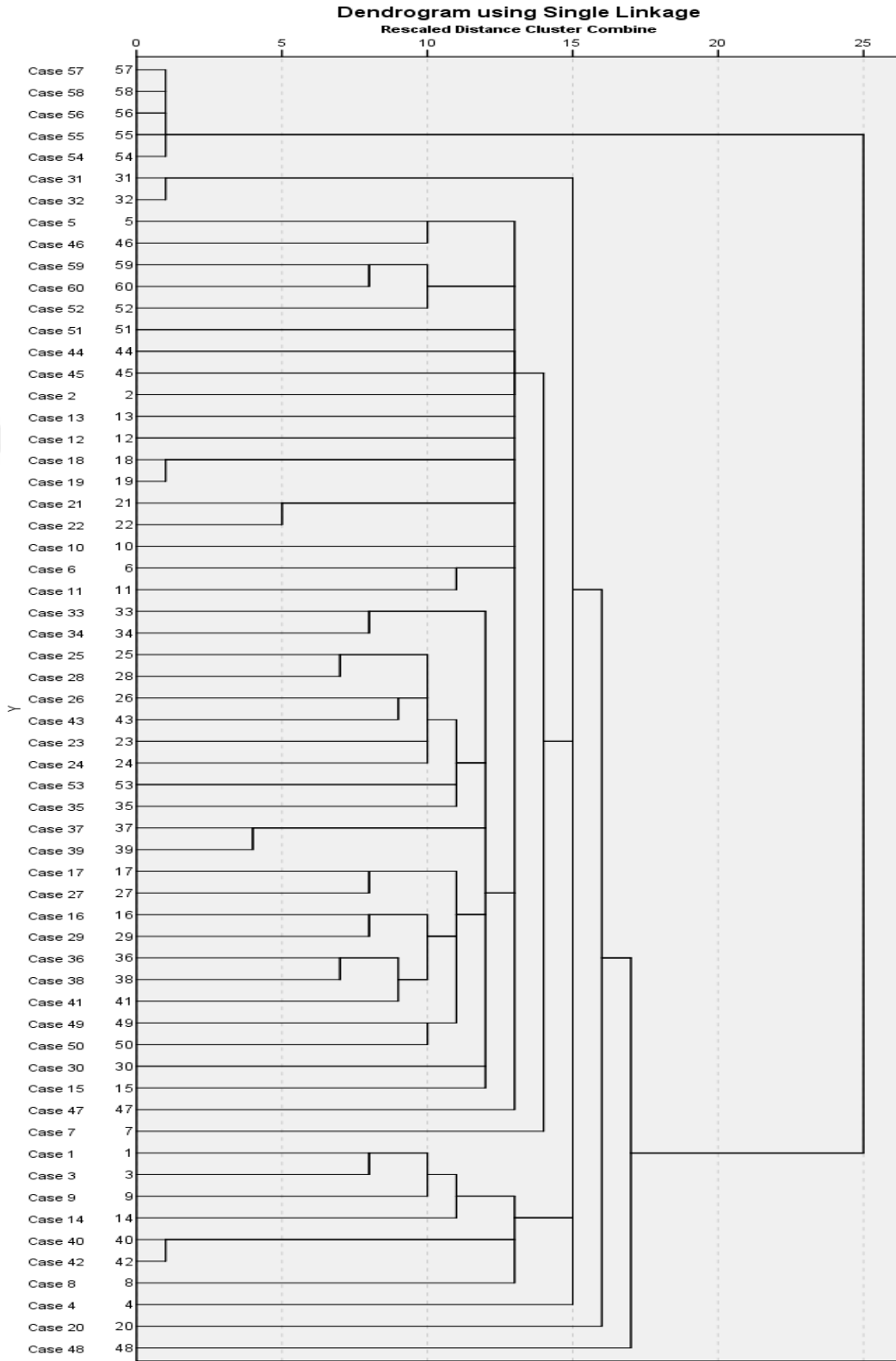
Şekil 4.20. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **OPE18** primeri ile RAPD-PCR sonucu **2** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 23-34 *C. albicans* türleri, 35-39 *C. krusei* türleri, 40-43 *C. guilliermondii* türleri)



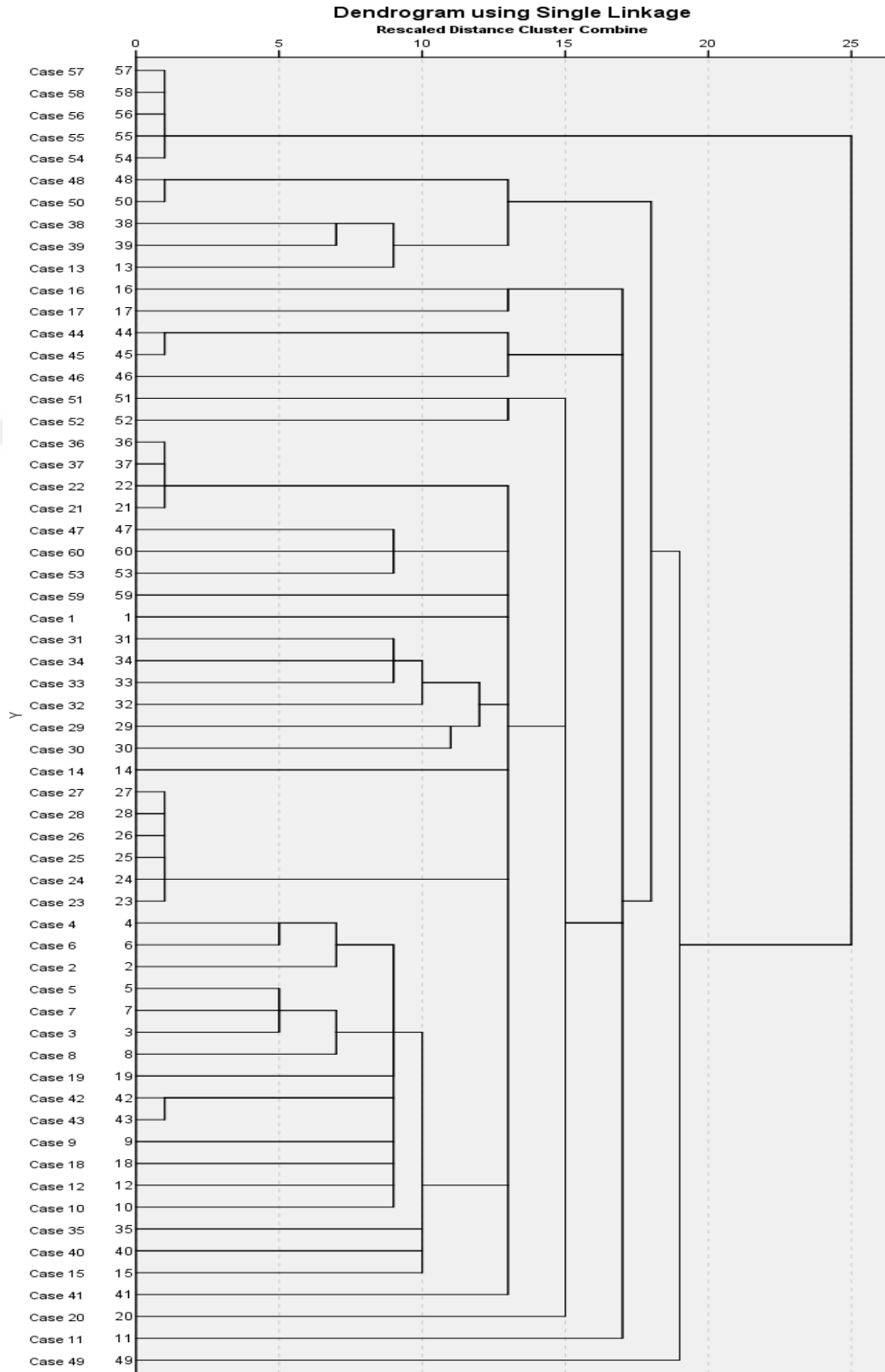
Şekil 4.21. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **OPE18** primeri ile RAPD- PCR sonucu **3** numaralı jel görüntüsü (M: Marker, NK: Negatif Kontrol, 44–47 *C. glabrata* türleri, 48–50 *C. tropicalis* türleri, 51–53 *C. pseudotropicalis* türleri, 54–58 *C. parapsilosis* türleri, 59–60 *C. geotrichum* türleri)

4.3. Sonuçların İstatistiki Olarak Değerlendirilmesi

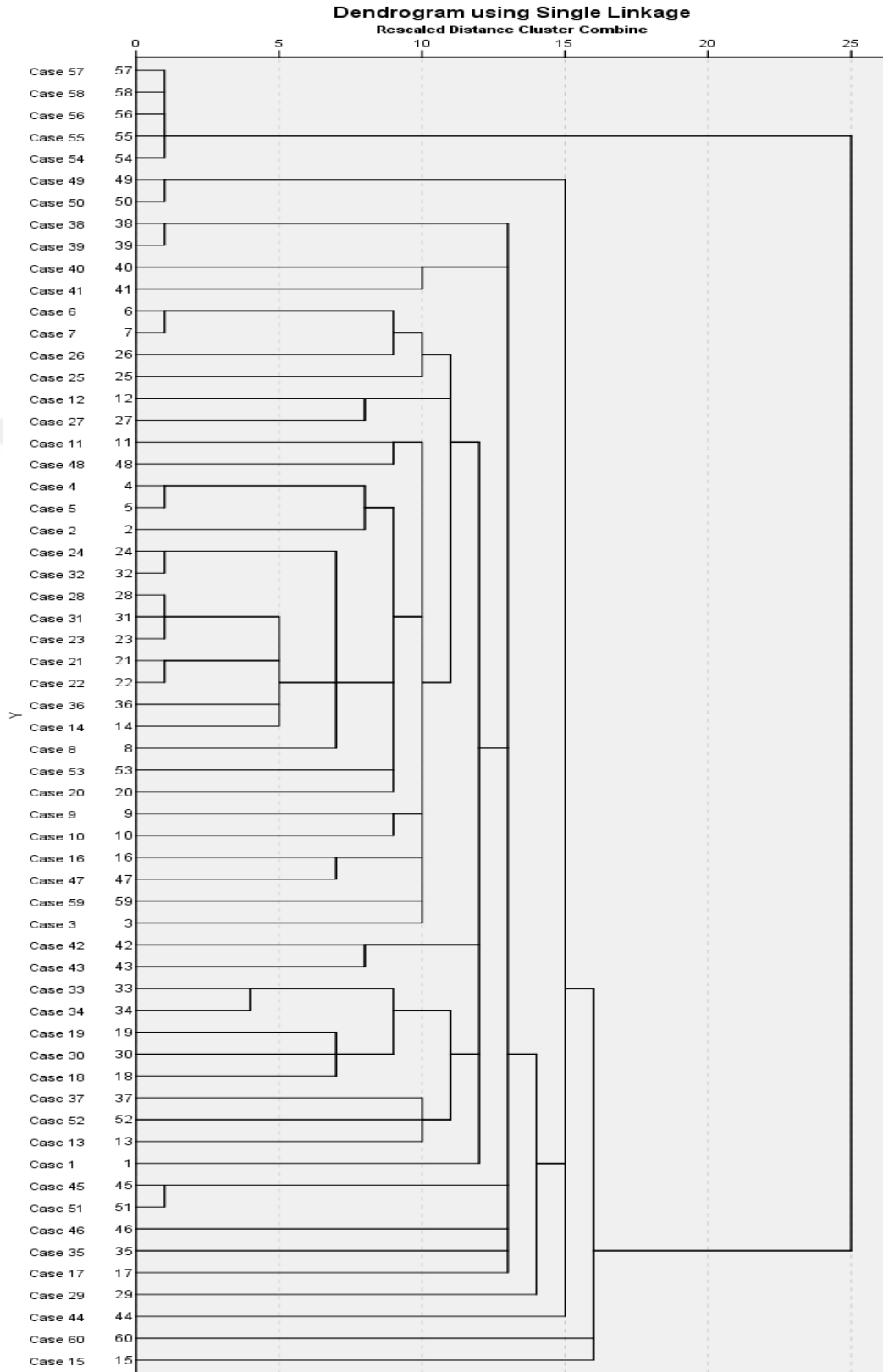
Elde edilen jel görüntüleri her bir primer için ayrı ayrı ve hepsi birlikte değerlendirilerek dendogramları hazırlanmıştır.



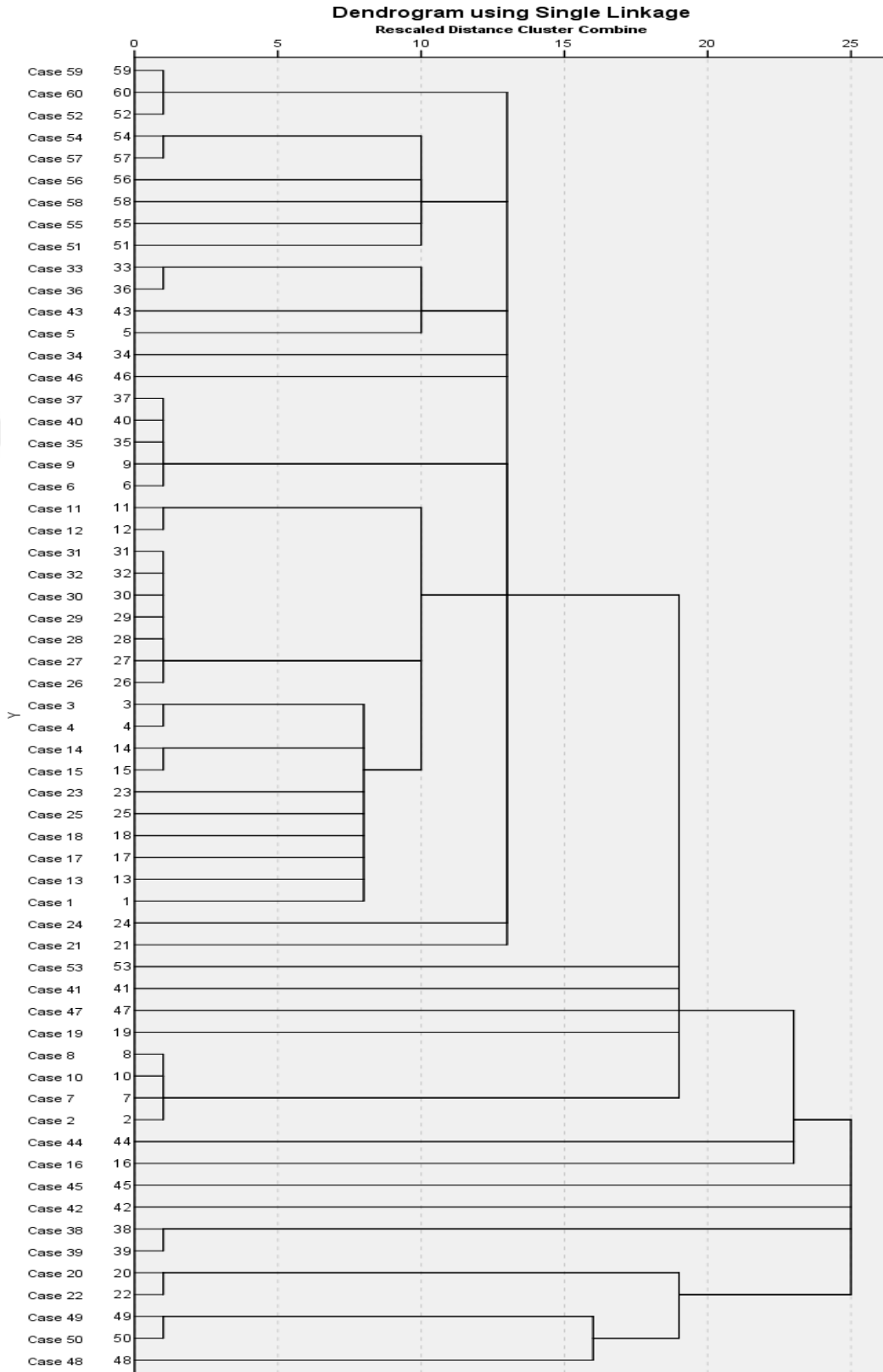
Şekil 4.22. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin E1 primerine göre dendrogramı



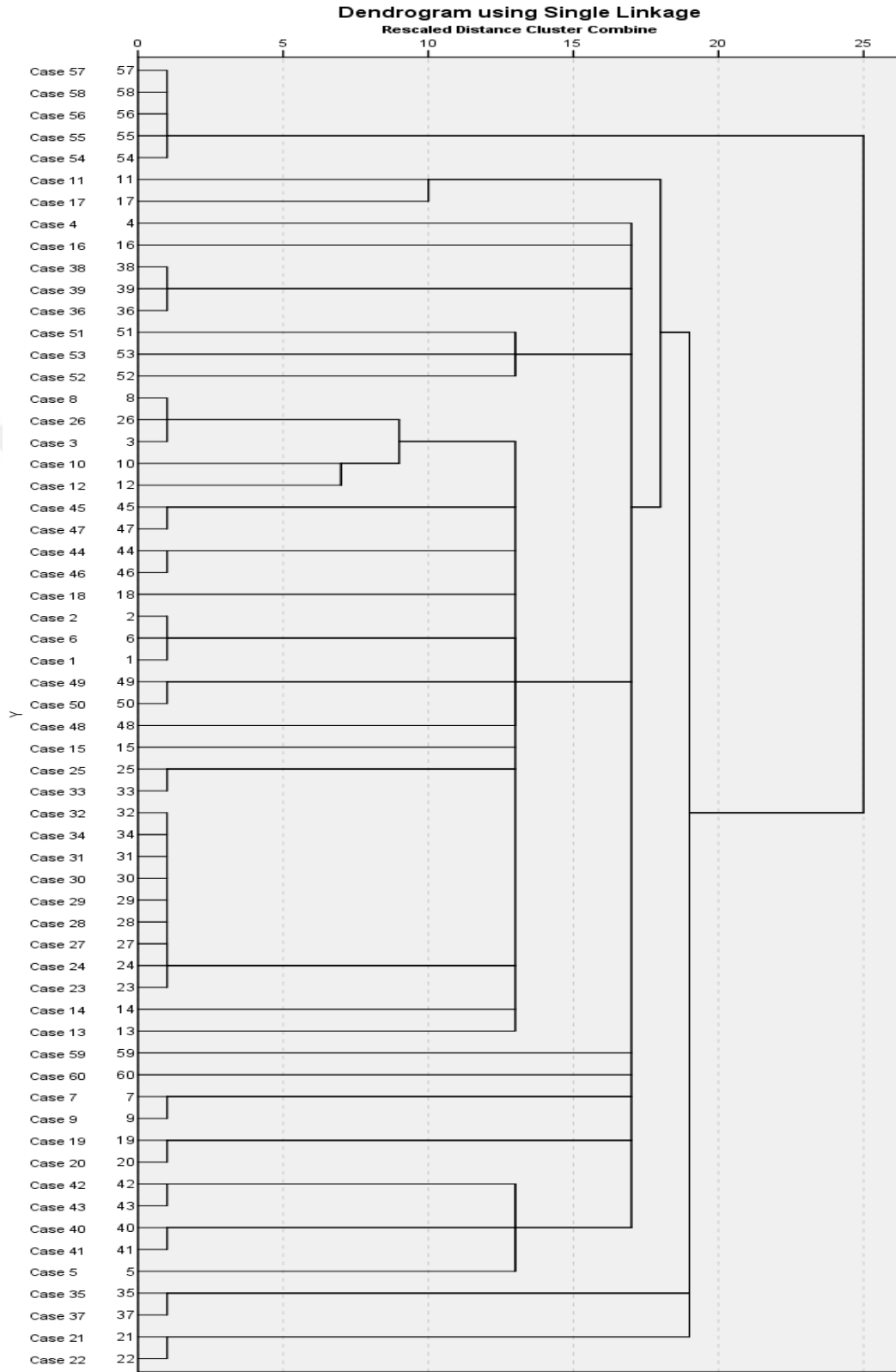
Şekil 4.23. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin E3 primerine göre dendrogramı



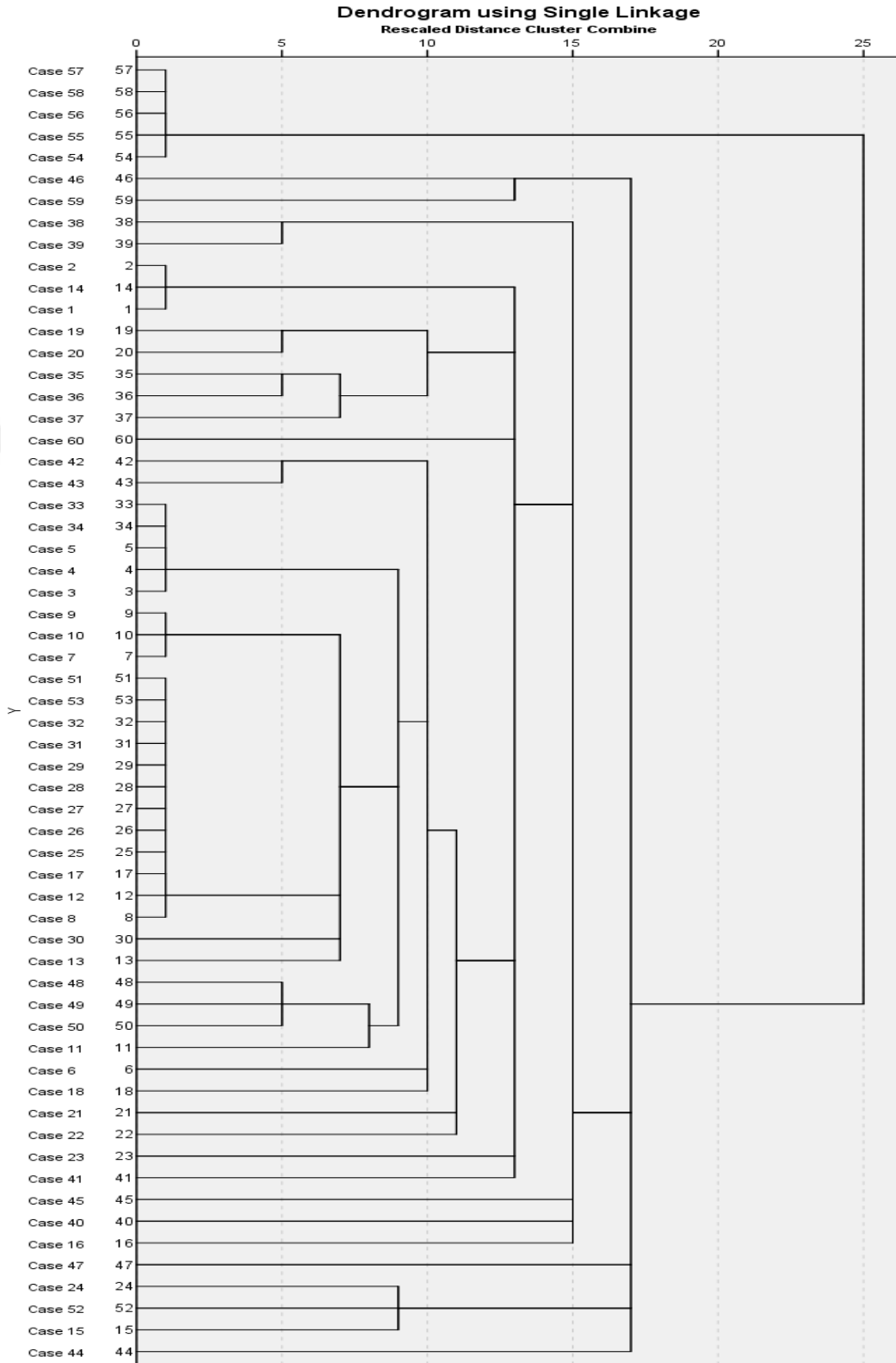
Şekil 4.24. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin E5 primerine göre dendrogramı



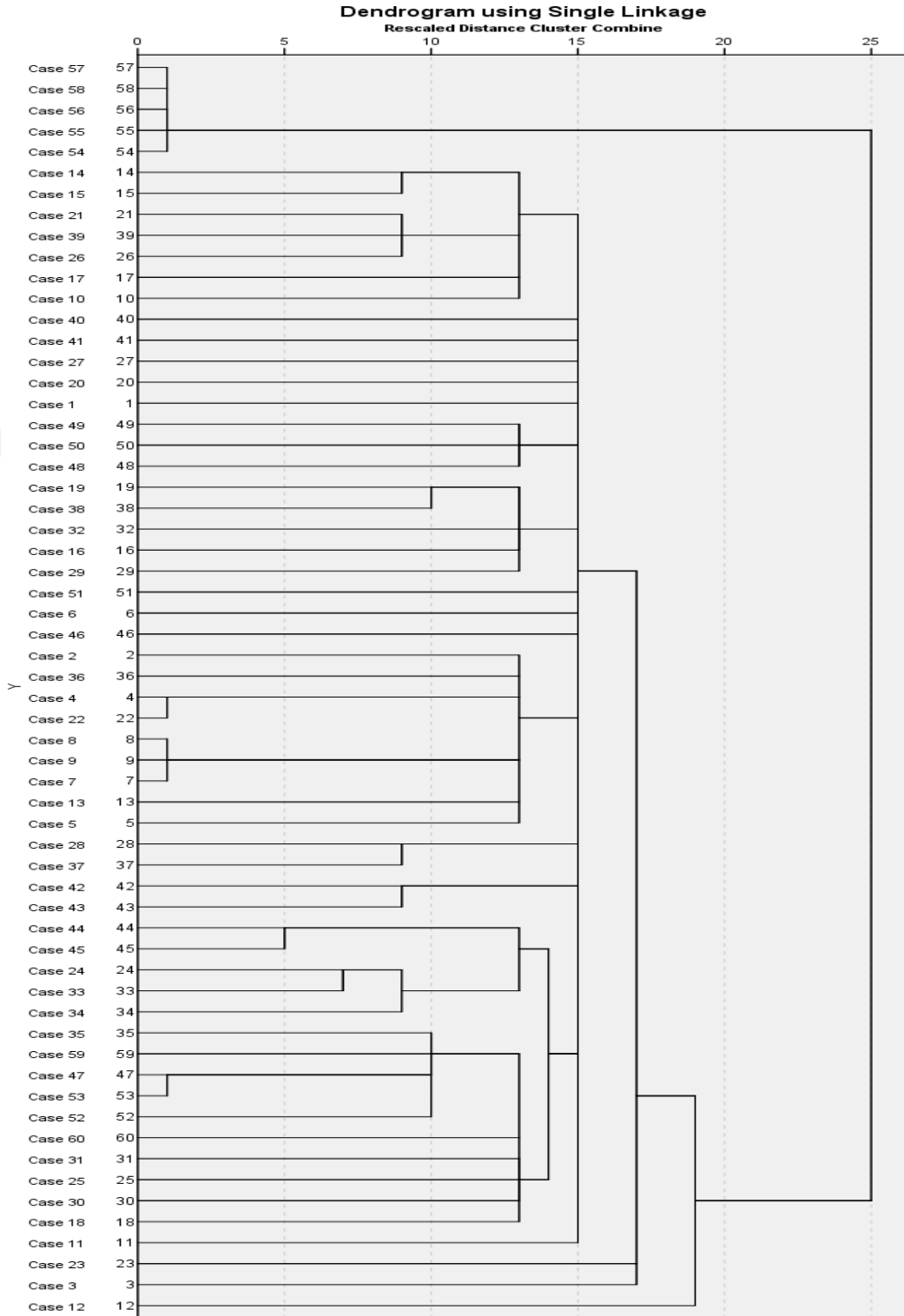
Şekil 4.25. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin F5 primerine göre dendrogramı



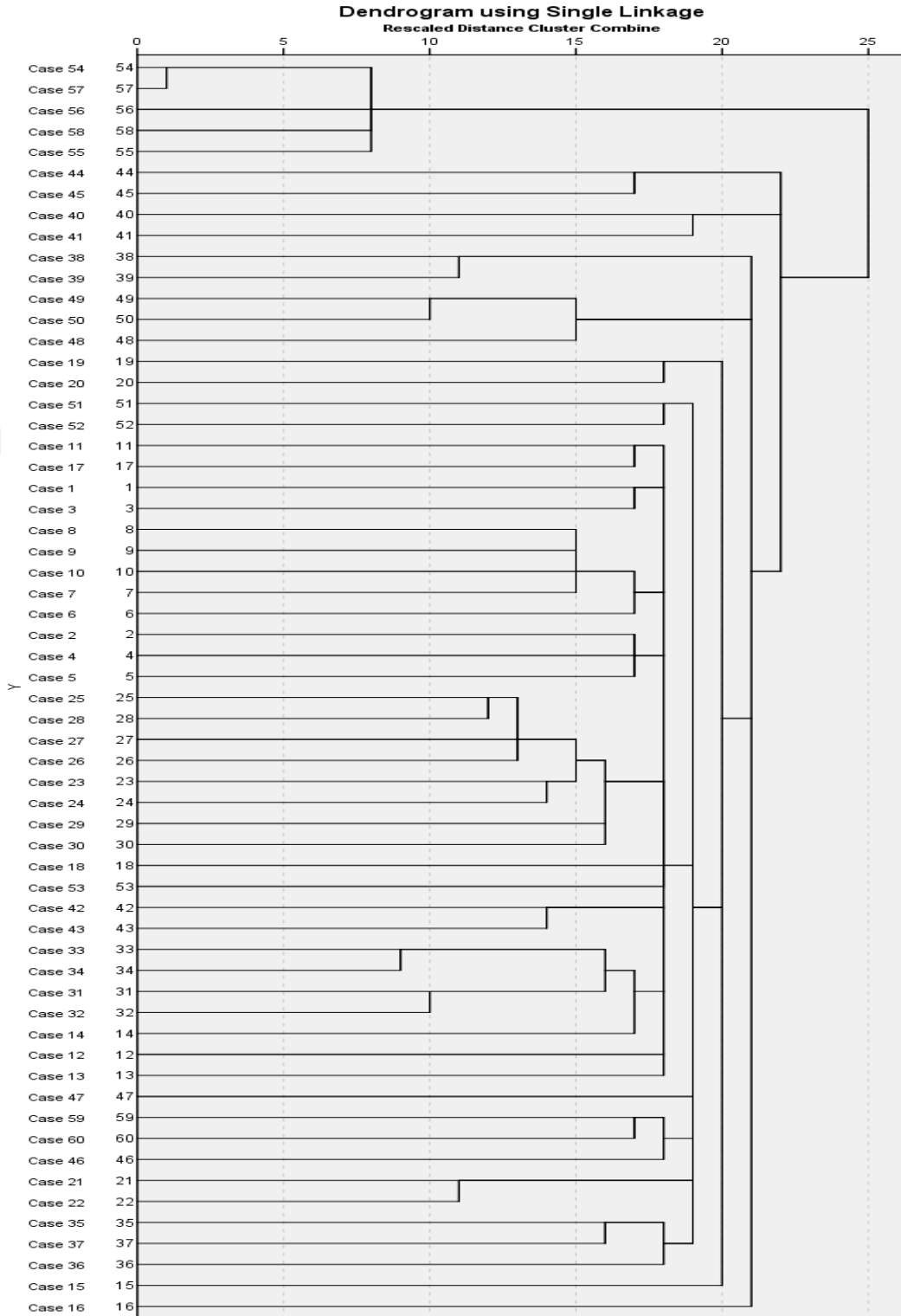
Şekil 4.26. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin F7 primerine göre dendrogramı



Şekil 4.27. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin OPA3 primerine göre dendrogramı



Şekil 4.28. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin OPE18 primerine göre dendrogramı



Şekil 4.29. Hasta kaynaklı *Candida* türlerinin **tüm** primerlere göre dendrogramı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son zamanlarda patojen maya enfeksiyonlarının sıklığındaki artış ve bu nedenle ortaya çıkan mortalite ve tedavi masraflarındaki yüksek oranlar, mayaların hızlı tanısı için kullanılabilir testlere olan gereksinimi her geçen gün artırmaktadır (Ağca 2015).

Enfeksiyon etkeni olabilen gerçek ve fırsatçı patojen mantarların tanılanmasında, doğrudan Gram boyama metodu ile mikroskopik inceleme ve kültür yöntemleri klasik mikrobiyolojinin temelini oluşturan en kolay ve en yaygın yöntemler olma özelliğini korumaktadır. Ancak hem testlerin uzun sürede yapılması, hem de her zaman kesin sonuç alınamaması, bazı mantar türleri açısından uygulanamaması ya da alınan sonuçların güvenilir olmaması bunların yanı sıra sonuçların yorumlanmasında oluşan sorunlar nedeniyle bu yöntemlere ek olarak; klasik yöntemlere kıyasla daha hızlı, duyarlılık ve özgüllükleri yüksek yeni tanılama yöntemlerine gereksinim duyulmuştur. Bugün fenotipik tanılama tekniklerinde karşılaşılan sorunlar ve zorluklar, moleküler yöntemlerin; mikrobiyolojinin diğer alanlarıyla ilgili çalışmalarında olduğu gibi mikoloji alanında da kullanımının yaygınlaşması, tanı, tedavi ve epidemiyoloji konusunda alınan sonuçların başarı oranını arttırmıştır (Susever 2006).

Candida türleri doğada çok yaygın halde bulunan mayalardır. Çoğu bitki türünde, memelilerde sindirim kanalı normal florasında, insan mukozaları ve derisinde bulunmaktadır. Doğumdan kısa süre sonra genital ve üriner bölgede ağız, boğaz ve bağırsaklarda kolonize olurlar. Endojen florada meydana gelen değişiklikler sonucu, deri ve mukozal yüzeylerde hızlıca çoğalabilmektedirler. *Candida* türleri hafif dereceli yüzeysel enfeksiyondan ağır sistemik enfeksiyonlara kadar birçok farklı klinik tablonun oluşmasına yol açabilmektedirler. Normal mikrobiyal floraya sahip vücut bölgelerinde fizyolojik koşulların (pH, sıcaklık vb.) değişmesi, hormonal değişiklikler, bağışıklık sistemini baskılayan ilaçların kullanılması, kanserler veya AIDS gibi immün yetmezlikli hastalarda *Candida* enfeksiyonlarının görülmesi daha sıktır. Hastane kaynaklı *Candida*

enfeksiyonları, bulaşma sonrası kişinin ağız ya da sindirim sistemindeki maya florasının aşırı üremesi sonucu oluşmaktadır. Bu durum *Candida* kaynaklı enfeksiyonların temel mekanizmasını oluşturmaktadır. Normal vücut florasında bulunan *Candida* türleri bağışıklık sistemi hasar görmüş hastalarda yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara yol açabilmektedirler. Yaygın kandidemiler’de çoğunlukla giriş kapısı gastrointestinal sistem (GİS) ’dir. *Candida* enfeksiyonları genelde endojen kaynaklı olmasına rağmen, sağlık çalışanlarıyla (deri, forma, kalem vb.) taşınarak insandan insana bulaşmak suretiyle hastane ortamlarından da kazanılabilir. Kolonizasyon, kandidoz gelişimini kolaylaştırır. Kana karışmış maya hücresine karşı savunmada önemli rol oynayan nötrofil sayı ve fonksiyonlarındaki bozukluk ise yaygın kandidoz gelişme riskini artırır. Yayılma; böbrek, karaciğer, dalak, deri, merkezi sinir sistemi ve akciğerlere olabilir ve mikroabselerle karakterize enfeksiyonlar oluşur. Sistemik kandidal enfeksiyon tanısı koymak zordur, çünkü *Candida* insan normal florasının bir parçasıdır ve bu organizmanın muköz membranlar ve deriden izolasyonu invazyonun kanıtı değildir. Ne yazık ki rutin kültür yöntemlerinin de kandidemiye saptamada duyarlılığı nispeten azdır. *Candida* suşlarının genotiplendirilmesi esas alınarak yapılan çalışmalarda, pek çok ciddi *Candida* olgusunda endojen kolonizasyonun etkili olduğu gösterilmiştir. *Candida* türlerinin vücuda girme ve yayılma istekleri bakımından (invazyon), sağlam deri en etkili bariyerdir (Atalay 2006; Tümer 2011).

Son zamanlarda *Candida* türlerinin neden oldukları enfeksiyonlarda sayısal anlamda belirli bir yükseliş olmakla birlikte, bu enfeksiyonlara sebep olan türlerin çeşitliliğinde de değişiklikler görülmeye başlamıştır. Endojen kaynaklı olması nedeniyle, hala hastane kaynaklı mantar enfeksiyonlarında ilk sırada *C. albicans* vardır. Antifungal tedavilere daha geç yanıt verdiği bilinen *C. lusitanae*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, gibi, non-albicans türlerinin görülme oranı da hızla artmaktadır (Tümer 2011; Yarar 2014).

Yurtiçi ve yurtdışında bildirilen çalışmalara bakıldığında; çoğunlukla idrar, solunum ve kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türleri içinde *C. albicans*’ın en çok görülen tür olduğu dikkat çekmiştir. Non-albicans türlerin sıklık sıralaması ise çalışmanın yapıldığı

yıla ve coğrafik lokalizasyonuna göre değişiklik göstermekle beraber ikinci sıklıkta saptanan türler *C. parapsilosis*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* arasında değişiklik göstermektedir (Hicran 2008).

Candida türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde önemli hastane kaynaklı enfeksiyonlar arasında olup %80 gibi bir ağırlığa sahiptir. Günümüzde *Candida*'lar özellikle YBÜ'nde (Yoğun bakım ünitesi) tedavi gören hastalarda mortalitesi yüksek enfeksiyonlara neden olmaktadır (Şahiner 2008; Tümer 2011).

Laboratuvarlarda karşılaşılan en büyük sorunlardan biri *Candida* türlerinin normal florada bulunabilmeleri ve buna karşın klinik örneklerden alınarak besi ortamlarında üretilen *Candida* türlerinin klinik olarak ne derece önemli olduğunun belirlenip, rapor edilip edilmemesi konusunda bir karara varılamamasıdır. Bu sebeple verilerin doğru tanılanması ve yorumlanabilmesi için iyi bir klinik laboratuvar protokolüne ihtiyaç vardır (Yarar 2014).

Çok merkezli olarak yapılan kapsamlı bir çalışmada, 1990'larda kandidemiye neden olan *Candida* türlerindeki değişimin yavaşladığı rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada 140.000 *Candida* örneği incelenmiş olup, tüm *Candida* türleri içinde *C. albicans* görülme oranı 1997-2000 yıllarında %68 iken 2003 yılında %59.5'e gerilemiş, *C. tropicalis* oranı %4.3'den %7.2'ye, *C. parapsilosis* %4.03'den %6.9'a yükselmiştir. *C. glabrata* ise bu iki dönem içinde %10 ve %11 olarak saptanmıştır. *C. krusei* türünde de bariz artışlar kaydedilmemiştir. Nadir görülen *Candida* tür sayısında ciddi artışlar kaydedilmiştir (Tümer 2011)

Mantar enfeksiyonlarının tanısı için ilk PCR yöntemlerinden biri 1990 yılında Buchman ve ark. tarafından yayınlanmıştır. *Candida*'larda çoğaltım için ergosterol biyosentezinde yer alan sitokrom P450 L1A1 (lanosterol-14L-demetilaz) gen kodu seçilmiştir. *C. albicans* üremiş olan on üç örneğin her birinin PCR çalışması pozitif olarak sonuç vermiş, buna ilaveten kültürde üreme olmayan on yedi örnekte PCR

çalışmasına tabi tutulmuş ve iki örnekte PCR ile pozitiflik saptanmıştır. Duyarlılık 100 µl örnekte 10 maya hücresi olarak bulunmuştur. (Atalay 2006).

Jordan 1994 yılında, klinik olarak önemi olan dört *Candida* türünün (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, ve *C. glabrata*) DNA'larını çoğaltmak ve tanılamak amacıyla PCR'da tek primer çiftleri kullanmıştır. %90'ın üzerinde neonatal kandidemiden sorumlu olan bu dört *Candida* türünden kitin-sentaz spesifik parçanın ilk başarılı amplifikasyonunu tanımlamışlardır. Primer çifti *C. albicans* kitin sentaz geninden elde edilmiştir (CHS1). CHS1'in memeli genomunda bulunmaması nedeniyle yalancı pozitif sonuçların önlenebileceği düşünülmüştür. Dört PCR ürününün her biri farklı boyutlarda tek bant oluşturmuştur. "Southern Blot" analizi ile türlere spesifik probalar kullanılarak 100 µl plazmada 10 organizma saptanabilmiştir. Retrospektif olarak kültür ile kandidemi saptanan 27 pozitif örneğin 26'sı PCR ile tür düzeyinde doğru olarak saptanmıştır. PCR yönteminin hızlı ve doğru tür tayini gibi avantajlar sağladığı belirtilmiştir. Bu yöntemin hasta örneklerinde uygulanması ile neonatal kandidemi tedavisinin zamanında yapılacağı, böylece morbidite ve mortalitenin azalacağı öngörülmüştür (Atalay 2006).

Enfeksiyona neden olan patojen mantarların genotiplendirmesinde; MLEE (multilocus enzyme electrophoresis), SB (Southernblot) hibridizasyon, SSCP (single strand conformational polymorphism), elektroforetik karyotipleme, bDNA (branched DNA), HC (hybrid capture) sistemi, TMA (transcription mediated amplification PFGE (pulsed field gel electrophoresis)), LCR (ligase chain reaction), SDA (strain displacement analysis), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temeline dayalı yöntemler [REA (restriction endonuclease analysis), AP-PCR (arbitrarily primed PCR), RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), mikrosatellit analizi, RT (real-time)- PCR vb.] ve genom dizi analizi kullanılmaktadır. PCR temelli yöntemler arasında en popüler olanı RAPD, dir. RAPD yönteminde yaklaşık 10 bazlık rastgele dizili primerler kullanılır. RAPD; yapılan PCR amplifikasyonu sonucunda oluşan farklı baz uzunluğundaki ürünlerin elektroforez uygulanarak agaroz jelde yürütülerek bant ayırımına dayanan bir yöntemdir. RAPD

analizleri, nispeten kolay, hızlı ve daha az teknik donanım gerektiren bir yöntemdir. *C. albicans* örnekleri için RAPD yönteminin ayırım gücünün, REA, MLEE ve tekrarlayan dizilere yönelik problemlerin kullanıldığı diğer yöntemlerle benzer olmakla birlikte PFGE yönteminden daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışma verilerinden elde edilen sonuçlar, *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda, salgın incelemesi ve insandan insana bulaşma insidansının belirlenmesi bakımından kıymetli bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak, bu metodun amplifikasyon temeline dayanması ve özgül olmayan primerlerin kullanılması nedeniyle, reaksiyon koşullarına bağlı olarak duyarlılıklarının değişkenlik göstermesi gibi önemli bir dezavantajı vardır. PCR çalışmalarında şartlarda gerçekleşecek çok küçük değişiklikler (kalıp DNA kalite ve konsantrasyonu, yapışma sıcaklığı, kullanılan polimeraz kaynağı, reaksiyon süreleri, MgCl₂ konsantrasyonu, primer konsantrasyonu vb.) bile fragmanların çoğaltılabilirliğini ve dolayısıyla yöntemin tekrarlanabilirliğini etkilemektedir. Bu nedenle, bu metodun veri tabanı oluşturmak için uygunluğu kanıtlanamamıştır. PCR için hazırlanan mixlerin aynı olması halinde dahi, cihaz değişikliğinin elde edilen bant paternlerini değiştirdiği gözlenmiştir. Bunun sebebinin, farklı cihazların döngüler arasında sıcaklık değişimlerindeki hız farkına bağlı olabileceği düşünülmektedir (Saran 2008).

Çalışmamızda 60 *Candida* örneğinin 4 farklı izolasyon tekniği kullanılarak DNA ları izole edildi. Görüntüleme sistemleri yardımıyla DNA varlığı kontrol edildi ve kullanılan tüm tekniklerde DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Ancak RAPD- PCR amplifikasyonları sırasında kullanılan farklı primerlerde farklı sonuçlar alındı. Bu sonuçlar her bir primer için incelendiğinde; E1 primeri ile yapılan RAPD-PCR amplifikasyon görüntüleri referans alınarak hazırlanan dendogramda *Candida* 'lar arası akrabalık dereceleri incelendiğinde, %57 oranı ile tüm dendograma yayılış gösteren *C. albicans* türleri %25 ile de merkezde yerini almıştır. Ayrıca dağılım gösteren bazı *C. albicans* grupları zıt kutuplarda yer alarak bu primere göre farklı suşlar olabileceklerini düşündürmüşlerdir. %7 oranlarına sahip olan *C. guilliermondii* ve *C. glabrata* türleri *C. albicans*'lar ile aynı gruplarda yer alıp benzer özellikler göstererek yakın akrabalık bağları olduğunu göstermektedirler. *C. glabrata* türleri *C. albicans*'lara benzer şekilde zıt gruplarda

yerleşim göstermiştir. %8 oranına sahip *C. krusei* türleri, *C. albicans* türlerine, *C. guilliermondii* türlerine, *C. pseudotropicalis* türlerine ve *C. geotrichum* türlerine yakın yerleşim göstererek yakın akrabalık bağlarının olduğunu göstermiştir. %5 oranında *C. tropicalis* türleri hem *C. albicans*'lara hem de *C. guilliermondii*'lere yakın akrabalık göstermiştir. %5 oranına sahip *C. pseudotropicalis*'ler, *C. albicans*'lara, *C. krusei*'lere ve *C. geotrichum*'lara yakın yerleşim göstererek yakın akrabalık bağlarını göstermiştir. %3,3 oranına sahip olan *C. geotrichum*'lar, *C. pseudotropicalis* ve *C. glabrata*'lara 1. dereceden yakınlık gösterirken, *C. albicans*'lara 2. dereceden yakınlık göstererek akrabalık derecelerini bu şekilde oluşturmuştur. Tüm *Candida*'lar içinde %8 oranına sahip olana *C. parapsilosis*'ler bu primere bant vermedikleri için değerlendirilememiştir. Nardemir 2012 yılında *Triticum aestivum* üzerine yaptığı çalışmada E1 primerinin yüksek oranda ayırıcı etki niteliğinin olduğunu göstermiştir. *Candida*'larda ilk kez kullanılan bu primer ayırım gücü bakımından dikkate almaya değerdir (Nardemir 2012).

E3 primeri ile yapılan RAPD-PCR amplifikasyon görüntüleri referans alınarak hazırlanan dendogramda *Candida*'lar arası akrabalık dereceleri incelendiğinde, %57 oranı ile tüm dendograma yayılım gösteren *C. albicans* türleri %37'lik oranlara merkezde yer almalarıyla *Candida*'lar içinde merkezi yer aldıklarını göstermişlerdir. %7 oranına sahip *C. guilliermondii* türleri, *C. albicans*'larla aynı gruplar içinde hareket edip yerleşim göstererek yakın akrabalık derecelerinin olduğunu göstermişlerdir. Oranları %3,3 olan *C. geotrichum*'lar ile %1,6 oranına sahip *C. pseudotropicalis* türlerine ait bir grup çok yakın özellikler göstererek çok yakın akraba olabileceklerini göstermişlerdir. Ayrıca *C. geotrichum*'lar, *C. albicans*'lar ile de yakın yerleşim göstererek yakın akrabalıkları olabileceğini göstermiştir. %7 oranına sahip olan *C. glabrata*'lar, *C. albicans*'lara ve *C. pseudotropicalis*'lere yakın akraba olabileceklerini göstermişlerdir. %7 oranına sahip *C. krusei*'ler, *C. albicans*'lar, *C. tropicalis*'ler, *C. guilliermondii*'ler ve *C. pseudotropicalis*'ler ile yakın akrabalık dereceleri olabileceğini göstermiştir. %5 oranına sahip *C. tropicalis* türleri, *C. krusei* ve *C. albicans*'lar ile yakın akrabalık bağlarını olabileceğini göstermiş ve *C. pseudotropicalis*'ler ile de en uzak akrabalık bağları olduğunu yerleşim düzeninde göstermiştir. Tüm *Candida*'lar içinde %8 oranına

sahip olan *C. parapsilosis*'ler bu primere bant vermedikleri için değerlendirilememiştir. Daha önce *Candida*'lar da hiç kullanılmayan bu primer Nardemir tarafından 2012 yılında *Triticum aestivum* üzerine yaptığı çalışmada kullanılmış ve ayırıcı etki niteliği bakımından zayıf olduğu görülmüştür. *Candida*'lar içinde ayırıcı nitelik bakımından kullanılması dikkate alınmaya değerdir (Nardemir 2012).

E5 primeri ile yapılan RAPD – PCR amplifikasyon görüntüleri referans alınarak hazırlanan dendogramda *Candida*'lar arası akrabalık dereceleri incelendiğinde, %57 oranı ile tüm dendograma yayılış gösteren *C. albicans* türleri %17'lik oranla *Candida*'lar içinde merkezi bir yerleri olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca *C. albicans*'lar %28 oranında bir dağılımla dendogram içinde diğer türlere yakın dağılım göstererek *C. geotrichum*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis* ve *C. guilliermondii* ile çok yakın akrabalık derecelerinin olabileceğini göstermiştir. *C. albicans*'lar, *C. tropicalis* türlerinin %1,6 oranında olan grubuna yakın %3,3 oranında olan grubuna ise uzak yerleşim göstererek akrabalık derecelerinin uzak olabileceğini göstermiştir. *C. krusei* türleri hem *C. albicans*'lara, hemde *C. tropicalis*'lere yakın akrabalık dereceleri göstermiştir. *C. guilliermondii* türleri hem *C. albicans*'lara, hemde *C. krusei*'lere yakın akrabalık dereceleri göstermiştir. *C. glabrata* türleri, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. geotrichum* ve *C. albicans*'lara yakın akrabalık dereceleri olabileceğini göstermiştir. Tüm *Candida*'lar içinde %8 oranına sahip olana *C. parapsilosis*'ler bu primere bant vermedikleri için değerlendirilememiştir. *Candida* türleri için hiç kullanılmayan bu primer Nardemir tarafından 2012 yılında *Triticum aestivum* üzerine yaptığı çalışmada kullanılmış yüksek oranda polimorfizm göstermiştir. RAPD yönteminde ayırıcı etki niteliği ve verdiği bant sayısı bakımından zayıf olduğu görülmüştür. *Candida*'lar içinde ayırıcı nitelik bakımından kullanılması dikkate alınmaya değerdir (Nardemir 2012).

F5 primeri ile yapılan RAPD–PCR amplifikasyon görüntüleri referans alınarak hazırlanan dendogramda *Candida*'lar arası akrabalık dereceleri incelendiğinde, %57 oranı ile tüm dendograma yayılış gösteren *C. albicans* türleri %38'lik oranlara merkezde yer almalarıyla *Candida*'lar içinde merkezi yer aldıklarını göstermişlerdir. Oranları %8 olan *C. krusei* türleri farklı gruplar halinde zıt kutuplarda yerleşim

göstererek *C. albicans*'lara ve *C. guilliermondii*'lere yakın yerleşimli durarak yakın akrabalık dereceleri olabileceğini göstermiştir. *C. glabrata*, *C. albicans*'lara ve *C. guilliermondii*'lere ve *C. krusei*'lere yakın akrabalık derecelerinin olabileceğini göstermişlerdir. *C. guilliermondii* hem *C. albicans*'lara hemde *C. krusei*'lere yakın akrabalık dereceleri olabileceklerini göstermiştir. *C. pseudotropicalis*'ler, *C. albicans* ve *C. parapsilosis*'lere yakın akrabalık dereceleri olabileceklerini göstermişlerdir. *C. parapsilosis* türleri sadece *C. pseudotropicalis* ile yakın yerleşim göstermiş ve yakın akrabalık dereceleri olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca *C. parapsilosis* türlerinin RAPD - PCR'da bant verdiği tek primer F5 primeridir. *C. geotrichum* %3,3 oranı ile *C. pseudotropicalis*'e yakın fakat *C. albicans*'lara uzak mesafede yerleşim göstermiş olup akrabalık derecelerini buna göre oluşturmuştur. El – Kirat 2011 yılında yaptığı çalışmada F5 primerini kullanmış ve ayırım gücü niteliği bakımından olumlu sonuçlar almıştır. Çalışmamız El – Kirat' in çalışmasını destekler niteliktedir (El – Kirat 2011).

F7 primeri ile yapılan RAPD–PCR amplifikasyonunda *C. albicans* türleri %38'lik oranlara merkezde yer almışlardır. Oranları %5 olan *C. tropicalis* türleri ve %3,3 olan *C. geotrichum* türleri merkeze çok yakın yerleşimli olduklarını ve *C. albicans*'lara çok yakın akrabalık derecelerine sahip olduklarını göstermişlerdir. Ayrıca *C. albicans*'lar %34 oranında bir dağılımla dendogram içinde diğer türlere yakın dağılım göstermiş ve bu dağılımda diğer türler ile arasındaki akrabalık dereceleri açısından önemlidir. *C. guilliermondii* türleri %7 oranına sahip ve *C. albicans*'lara çok yakın yerleşimli ve akrabalık dereceleri bakımından yakın özellik göstermiştir. *C. krusei* türleri %3,3 ve %5 oranında olmak üzere iki farklı grup ve iki zit kutupta yerleşim göstererek farklı suşlar olabileceklerini düşündürmüşlerdir. *C. glabrata* türleri %7 oranları ile *C. albicans*'lara 1. derece yakın *C. tropicalis* ve *C. pseudotropicalis* türlerine 2. dereceden yakın akrabalık bağları olabileceğini düşündürmüştür. *C. pseudotropicalis* türleri *C. krusei* ve *C. albicans* ile yakın yerleşim göstererek yakın akrabalık derecelerinin olabileceğini göstermiştir. Tüm *Candida*'lar içinde %8 oranına sahip olana *C. parapsilosis*'ler bu primere bant vermedikleri için değerlendirilememiştir. El – Kirat 2011 yılında yaptığı çalışmada F7 primerini kullanmış ve ayırım gücü niteliği bakımından olumlu sonuçlar almıştır. Çalışmamız El – Kirat' in çalışmasını destekler niteliktedir (El – Kirat 2011).

OPA3 primeri ile yapılan RAPD–PCR amplifikasyonuna göre *C. albicans* türleri %44'lük oranla merkezde yer almışlardır. *C. albicans* lar, %3,3 oranı olan *C. guilliermondii*'lere, %5 oranı olan *C. glabrata*'lara, %5 oranı olan *C. tropicalis*'lere yakın yerleşim göstererek yakın akrabalık bağları olabileceğini düşündürmüştür. %5 oranına sahip olan *C. pseudotropicalis*'ler, *C. albicans*'lar ile aynı gruptaymış gibi hareket ederek ve *C. albicans* grupları arasına yerleşim göstererek en yakın akraba derecelerini oluşturdukları düşünülmüştür. *C. glabrata* türleri *C. geotrichum* türleri ile yakın akrabalık derecesi göstermiş ve oranları %1,6 olan 5 adet grup oluşturarak %5 oranlı bir *C. albicans* grubuna yakın akrabalık göstermiştir. Ayrıca *C. glabrata* türleri farklı gruplar halinde zıt kutuplarda yerleşim göstererek farklı suşlar olabileceğini düşündürmüşlerdir. *C. krusei* türleri, *C. albicans* türlerine ve *C. geotrichum* türlerine eşit mesafede yerleşim göstererek bu seviyede akrabalık dereceleri olabileceğini düşündürmüştür. Tüm *Candida*'lar içinde %8 oranına sahip olana *C. parapsilosis*'ler bu primere bant vermedikleri için değerlendirilememiştir. Csutak 2012 yılında farklı sekiz primeri kullanarak yaptığı çalışmada OPA3 primerini kullanmış ve yüksek ayırım gücünün olduğunu göstermiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ayırım gücü bakımından Csutak'ın çalışmasını desteklemektedir (Csutak 2012).

C. albicans türleri, OPE18 primeri ile yapılan çalışmamızda istatistiksel dendograma homojene yakın olarak dağılım göstermiş *C. parapsilosis* türleri hariç diğer çalışılan tüm *Candida* türlerine yakın yerleşimler göstererek yakın akrabalık derecelerinin olduğunu düşündürmüştür. *C. krusei* türleri, *C. albicans*, *C. guilliermondii* ve *C. geotrichum* ile yakın yerleşim göstererek yakın akrabalık dereceleri olduğunu düşündürmüştür. *C. guilliermondi* türleri *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. glabrata* ile yakın yerleşim göstererek yakın akrabalık derecesi olduğunu düşündürmüştür. *C. geotricum*' türleri dağılımda farklı *Candida* türleri grupları arasında yer alarak diğer gruplarla akrabalık bağlarını göstermiştir. Tüm *Candida*'lar içinde %8 oranına sahip olana *C. parapsilosis*'ler bu primere bant vermedikleri için değerlendirilememiştir. Saran 2008 yılında yaptığı farklı primerleri karşılaştırma çalışmasında OPE18 primerini kullanmış ve yüksek ayırım gücü olduğunu göstermiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ayırım gücü bakımından Saran'ın çalışmasını desteklemektedir (Saran 2008).

Çalışmamızda kullandığımız tüm primerlerimizin RAPD- PCR amplifikasyon görüntüleri ile birlikte referans alınarak hazırlanan istatistiksel dendogramda ise *Candida*'lar arası akrabalık dereceleri incelendiğinde *C. albicans*'ların %35 ile merkezde ve %57 lik oranla da tüm dendograma dağılım göstererek çalışmadaki *Candida*'lar içinde merkezi konumda yer aldığı görülmüştür. %5 oranında *C. pseudotropicalis*, %3,3 oranında *C. guilliermondii*, *C. albicans* grupları arasında yer alarak yakın akrabalık gösterirken, *C. tropicalis* türü %1,6 oranında 1 kutupta ve %5 oranındada diğer kutupta yer alarak *C. albicans*'lara 2. Dereceden akrabalık göstermişlerdir. Tüm *Candida*'lar içinde oranı %3,3 olan *C. geotrichum* hem *C. glabrata*'ya hemde *C. tropicalis*'e 1.derece yakın akraba iken *C. albicans*'a ise 2. derece akrabalık göstermiştir. Oranları %1,6 ve %3,3 olan *C. glabrata* grupları zıt iki kutupta yer almıştır. Akrabalık dereceleri *C. albicans* ile uzak olup *C. guilliermondii*, *C. geotrichum* ve *C. krusei* ile yakındır. Oranları %1,6 ve %3,3 olan *C. krusei* türleri 2 farklı grup olarak 2 zıt kutupta yer almışlardır. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, ve *C. tropicalis* ile yakın akrabalık dereceleri görülmüştür. %3,3 oranında *C. guilliermondii*, *C. albicans* ile yakın akraba iken %3,3 oranında *C. guilliermondii* daha uzak akrabalık mesafesinde yer edinmiştir. Tüm *Candida*'lar içinde %8 oranında bulunan *C. parapsilosis*, *C. albicans*'a en uzak akrabalık derecesine sahip olmuştur. Aynı türlerin farklı kutuplarda yer alan bireyleri için farklı suşlar olabileceği değerlendirilmiştir.

Çalışmalarımızda kullandığımız tüm primerler, yüksek ayırım gücüne sahip olmasına rağmen kendi aralarında da bazı farklılıklar sergilemişlerdir. F5 primeri hariç olmak üzere diğer primerler *C. parapsilosis* türüne bant vermemişlerdir. F5 primerinde ise bant verimi %100 olmuştur. Fakat E1, E3, E5, F7, OPA3, OPE18 primerleri %91,6 oranında verim göstermişlerdir.

Çalışmamız bir bütün olarak değerlendirildiğinde hem enfeksiyonların belirlenmesi hemde sistematik açıdan problemleri kabul edilebilecek *Candida* türleri için moleküler tiplendirme yöntemlerinde karşılaşılabilecek DNA izolasyonu ve konsantrasyonu ile ilgili problemlerde dikkate alınarak tasarlanmıştır. *Candida* gibi mayalar'da yüksek

metabolik aktiviteleri ve özellikle RNA miktarı nedeniyle verimli gözükken DNA izolasyon protokollerinin PCR gibi ileri işlemlerde sorun oluşturabileceği görülmektedir. DNA verimini düşürmeden ideal bir RNase uygulamasının devam eden moleküler çalışmalar için önemli olduğu belirlenmiştir.

Literatür incelendiğinde çeşitli PCR yöntemleri ve farklı RAPD primerleri ile yapılan çalışmalara rastlansada, gerek etkin sonuçlar oluşturması ve gerekse'de sayısal anlamda literatürün yeterli olduğu düşünülmemektedir. Çalışmamızda bir çok Laboratuvarıda kolaylıkla uygulanabilecek ucuz, pratik ve sonuçları değerlendirilmesi kolay olan RAPD yöntemi için yeni 13 primer ile denemeler yapılmış bunlardan 7' sinin etkin olarak kullanılabilceği belirlenmiştir.

RAPD gibi bir yöntemde tek bir primer ile çalışılmadığı dikkate alınarak, en az 3 etkin primer sonucu değerlendirilerek dendogramların oluşturulması hedeflenmiştir. Primerler bağımsız olarak tek başlarına tutarlı sonuçlar oluşturmasa da etkin sonuç veren primerler birlikte değerlendirildiğinde anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır.

Sonuç olarak bütün veriler göz önüne alındığında; doğru DNA izolasyon protokolü, RAPD primerleri ve istatistiki değerlendirmelerin Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarlarında rutin tanılama sistemlerinin oluşturulmasında kullanılabilceği düşünölmektedir. Oldukça yaygın kullanılan RAPD yönteminin her laboratuvar tarafından kendi standartlarını oluşturarak kullanılabilceği önerilir.

KAYNAKLAR

- Abacıoğlu H. 2001 Moleküler yöntemlerde yeni gelişmeler ve yeni teknolojiler Kitabı, Adana, Çukurova Üniversitesi Yayınları, s. 191-192.
- Ağca, H., Dalyan C, B., Özmerdiven, G.E., Sağlam. S., Ener. B., 2015. *Candida* Türlerini Tanımlayan Bir Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yönteminin Geliştirilmesi. Mikrobiyoloj Bult. 49 (1), 56–65
- Anaissie, E.J., 1992. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host Experience at a cancer and review. Clin infect Dis., 14, 43-53.
- Ainsworth, G. C., 1986. Introduction to the History of Medical and Veterinary Mycology. Cambridge University, 54, 86-9619
- Arı, S., Temizkan, G., Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BiOGEM), 2, 101-20.
- Atalay, A., 2006 *Candida albicans* Suşunun Fare Modelinde Kan ve Çeşitli Organlarda PCR (Polimeraz Zincir reaksiyonu) ile Gösterilmesi. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Kayseri 72s
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore. D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 1995. Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons pres, 9911-917.
- Aydın, F., Tosun, İ., Ekmen, Ü., Bilekli, C., Köroğlu, H., Soylu, H., Alpay, Ş., 1996 Vulvovajinal Kandidazis olgulardan izole edilen mayaların türlere göre dağılımı. Mikrobiyoloji Bülteni 30:51-55.
- Aydın, Öz, S., 2004 RAPD Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, Sayı 6, Kütahya, 113 – 130
- Barış. Ö., 2004 Doğanadolu Bölgesinde Yetişen Bazı Salva Türlerinin Biyolojik Aktivite ve Genetik Profillerinin belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Erzurum. 44s
- Barış, Ö., 2009. Erzurum İlindeki Mağaralarda Damlataşı Oluşumunda Etkili Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Erzurum. 135s
- Bilgehan, H., 1986. *Candida* 'ların tarihçesi, ekolojisi ve dağılımı. *Candida* ve enfeksiyonları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 6, 1-8.
- Buckley HR., 1989 Identifications of yeasts. in: Evans EGV and Richardson MD (eds). Medical Mycology: A Practical Approach. Oxford, Oxford University Press, 97-109.
- Calderone, R. A., 2002. Taxonomy and biology of *Candida*. In: American Society for Microbiology, 15-27.
- Chemaly R. F., Prdocop G. W., Sarıbaş Z., Arıkan S., 2006 Patojen mantarların moleküler yöntemlerle sahtanması ve tanımlanması, In:Persing DH Tenover FC, Versolovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, Ustaçelebi Ş. Editörler. Moleküler Mikrobiyoloji tanı Prensipleri ve Uygulamalar Ankara, Palme Yayıncılık, p 551-559

- Csutak, O., Ghindea, R., Stoica, I., 2012 Identification of two yeast strains from oil polluted environment by RFLP on ITS-5.8S rDNA and RAPD analyses. University of Bucharest, Romanian Biotechnological Letters Vol. 17, No. 1
- Çolakoğlu, G., 1999. Tohumuz Bitkiler Sistematiği (Bacteriophyta, Cyanophyta, Phycophyta, Mycophyta, Lichenes), Marmara Üniversitesi, 7, 136-380.
- Çerikcioğlu, N., 2003. Yeni identifikasyon yöntemleri, 3. Ulusal mantar hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Tutanaklar, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları, 46, 182-90.
- Daniel, H-R., Meyer, W., 2012 Evaluation of Ribosomal RNA and Actin Gene Sequences for Theidentification of Ascomycetous Yeasts. International Journal of Food Microbiology 86, 61– 78
- Durmaz, R., İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji 2. Baskı Nobel tıp Kitap evi 2001 p 1-242
- El-Kirat, S., Dementhon, K., Noel, T., 2001 A two-step cloning-free PCR-based method for the deletion of genes in the opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitaniae*. Bordeaux, France Wiley Online Library 28; 321- 330
- Ellepola NB and Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol 2005; 43:65-84.
- Ener, B., 2004. Fırsatçı mantarlardan *Candida* türleri. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Aydın, 18-9.
- Erbakan N., 1989 Derinin Mantar Hastalıkları. Ankara, Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1-99
- Forbes, A. B., Sahm. D. F., Weissfeld, A. S., 2007. The yeasts. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology Missouri, In: Wilson L, editor. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 12 th ed. St Louis: The Mosby Company 696-702.
- Gayıbov, Ü., 2014. *Candida* Türlerinin Tanımlanmasında İki Farklı Yöntemin Karşılaştırılması. Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Bursa, 50s.
- Gene, J., Guillamon, J. M., Guarro, J., Pujol, I., Ulfig, K., 1996. Molecular characterization, relatedness and antifungal susceptibility of the basidiomycetous *Hormographiella* species and *Coprinus cinereus* from clinical and environmental sources. Antonie Van Leeuwenhoek, 70, 49-57.
- Gültekin, A., 2009. Sistemik kandidoz şüpheli hasta örneklerinden *Candida* Türlerinin izolasyonu Tanımlanması ve Genotiplendirilmesi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 82s.
- Gültekin, B., Eyigör, M., Telli, M., Aksoy, M., Aydın, N., 2010. Yedi Yıllık Dönemde Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinin Retrospektif Olarak İncelenmesi. Ankem Derg, 24, 202-208.
- Hazen, K.C., Howell, S.A., 2009. *Candida*, *Cryptococcus* ve tıbbi önemi olan diğer mantarlar. Klinik Mikrobiyoloji. Atlas Kitabevi, Ankara. 1-280
- İnci R., 1999. Mantarların yapıları, üreme özellikleri ve sınıflanması, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Öncü Basımevi, Ankara, 1015- 21
- İzci Y. H., 2008. Yoğun Bakım ünitesi'nden gelen hasta örneklerinden izole edilen *Candida* türleri ve Antifungal duyarlılıkları, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı. Uzmanlık Tezi Van, 71s.

- Jaccard, P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bullutin de la Société vaudoise de Sciences Naturelles 44, 223–270.
- Kantarcıoğlu, A.S., Yücel, A., 2004. *Candida albicans*'ta mannan: çeşitli özellikleri ve önemi. Cerrahpaşa J Med., 35, 42-45.
- Karalti, İ., 2006. İstanbul ilinde hastanelerin içinde ve dışında hava ile taşınan funguslar üzerine araştırmalar, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 129s.
- Karalti, İ., 2011. *Candida* ve *Aspergillus* enfeksiyonlarının Real Time PCR Yöntemi ile Hızlı Tanısn Kültür Yöntemi ile Karşılaştırılması ve Antifungal Direncin Kolorimetrik Yöntemle Tayini, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, 100s.
- Koneman, E.W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., Winn, W. C., 1997. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 983-1069.
- Levinson, W., 2004. Jawetz Ernest: Temel mikoloji, Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmunoloji, Güneş Kitabevi, Ankara
- Marchetti, O., Bille, J., Fluckiger, U., Eggimann, P., 2004. Fungal infection network of Switzerland. Epidemiology of candidaemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends 1991–2000. Clin Infect Dis, 38, 311- 320.
- Masuoka, J., 2004. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. Clin Microbiol Rev., 17, 281-310.
- Merz, W.G., Roberts, G.D., 2003. Algorithms for detection and Identification of Fungi. Manual of Clinical Micribology. Washington DC, American Society for Micribology Pres, 2, 1668-1685
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S. and Pfaller, M.A., 2005. Fungal classification, structure and replication. Medical Microbiology. Philadelphia, Pennsylvania, Elsevier, 5, 67.
- Nardemir, G., 2012. Malathion ve Glifosatin *Triticum aestivum* (Buğday) Üzerindeki Genetik ve Epigenetik Etkilerinin Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Erzurum. 62s
- Oltu, B., 2004 Enfeksiyon Etkeni Olarak İzole Edilen *Candida* Suşları ile Kolonize Suşlar Arasındaki genotipik Farklılıkların Pulsed Field Gel Elektrophoresis ve Arbitrarly Primed PCR Yöntemi İle Araştırılması. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi, Ankara, 105s
- Poyraz, Ö., 2006. Fırsatçı enfeksiyon oluşturan mantarlar. Genel ve Özel Tıbbi Mikoloji. Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, 101, 129-152.
- Richardson, M.D., Carlson, P., 2002. Culture and Non-culture Based Diagnostics for *Candida* species. In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology, 387-394.
- Saniç, A.. 2006. Mantarlar: Genel mikrobiyolojik özellikler ve sınıflandırma. Ulusoy S. (ed), Önemli ve Sorunlu Fungal İnfeksiyonlar, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 200
- Saraçlı, M.A., 2005. Mikozların moleküler tanısı: Neredeyiz? 4.Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayınları, 49, 33-45.

- Saran, B., Karahan, ZC., Ağırbaşı, H., Tekeli, A., Aksoy, A.M., 2008. *Candida albicans* Klinik İzolatlarının “Randomly Amplified Polymorphic DNA” Yöntemiyle Genotiplendirmesinde Kullanılan Farklı Primerlerin Karşılaştırılması. Mikrobiyoloji Bult. 42, 645- 654
- Sardi, J.C.O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A.M., Mendes, Giannini, M.J.S., 2013. *Candida* Species: Current Epidemiology, Pathogenicity, Biofilm Formation, Natural Antifungal Products And New Therapeutic Options. Journal of Medical Microbiology, 62, 10–24.
- Sezen, S., 2015 Afşin- Elbistan Linyit Madeninden Linyit İyileştirme Teknolojisinde Kullanılma Potansiyeline Sahip Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Erzurum. 112s
- Sherman, F., Fink, G. R., and J. B. Hicks., 1986 The Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY/USA. p. 179.
- Susever, S., 2006. İnvazif Mantar infeksiyonlarının tanımlanmasında moleküler yöntemlerin önemi; uygulanması ve geleneksel yöntemler ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul. 102s
- Şahiner, F., 2008. Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olarak İzole Edilen *Candida* Suşlarının Genotipik ve Fenotipik Olarak Tiplendirilmesi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Tıpta Uzmanlık Tezi İstanbul. 105s
- Tahanos, M., Shonian, G., Meyer, W., 1996 Rapid Identification of *Candida* Species by DNA Fingerprinting with PCR. Journal Of Clinical Microbiology, Mar. 1996, p. 615–621
- Temiz, A., 2000 Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. 3. Baskı. Hatipoğlu Yayınları, Ankara. 291s
- Turan, D., 2014. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida albicans* Türlerinde Virulans Faktörlerinin Fenotipik Ve Genotipik Olarak Araştırılması, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Mikoloji, Yandal Uzanlık Tezi, İstanbul, 112s.
- Tünger, A., Çavuşoğlu, C., Korkmaz, M., 1998. Mikolojiye giriş, Asya Tıp Yayıncılık, İzmir. 1-235s
- Tümer, S., 2011. Çeşitli Klinik örneklerden izole edilen *Candida* Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıkları” Tezi Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Şanlıurfa, 44s.
- Ustaçelebi Ş., 1999. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitap Evi, Ankara. 1–426s.
- Uzun, O., Anaissie, E.J., 2000. Predictors of outcome in cancer patients with candidemia, Ann Oncol, 11, 1517- 1521.
- Walsh, T.J., 1992. İnvazive Fungal İnfeksiyonları Sorunları ve Çözümleri in Developing New Antifungal Compounds, Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemoterapy, 349-373.
- Warnock, D.W., 2009. Mantarların Taksonomisi ve Sınıflandırılması. Çev. Ed. Başustaoğlu A. Klinik Mikrobiyoloji, Atlas Kitabevi, Ankara. 700s
- Warren, N.G., Hazen, K.C., 1995. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology., 6, 723-37.

- Willke Topçu A, Çerikçioğlu N., 2002. *Candida* türleri, İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Cilt 2. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara.
- Yarar, M., 2014. Klinik Materyallerden İzole Edilen *Candida albicans* Sap Genlerinin Araştırılması, Pamukkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, Denizli, 80s.
- Yeğenoğlu, Y., 2002. Mantarlar. Nobel tıp kitabevi, Ankara. 1-328s.
- Yeğenoğlu Y, Uzun M, Çekmeceli P.. 1998 *Candida albicans*'ın hızlı tanısında selektif kromojenik yeni besiyerleri: Albicans İD, Candichrom albians- ön çalışma. İnfeks. Derg. 12: 223- 228.
- Yıldıran, Ş.T., 1999. Mantar infeksiyonlarında laboratuvar tanısı. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara. 1129-1144
- Yücel A, Kantarcıoğlu AS.. 1999 *Candida albicans*'ın taksonomisindeki önemli ve bazı değişiklikler, Cerrahpaşa J Med; 30 (3), 236- 246.
- Yücel A., 2002. *Candida* 'ların Dünyü, *Candida* Mikrobiyolojisi Ve İnfeksiyonları Sempozyumu Kitabı, Eskişehir.
- Yüksekkaya, Ş., 2009. Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatan hastaların idrarlarından izole edilen *Candida* türlerinin Moleküler Epidemiyolojisi ve Antifungal Duyarlılıkları, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı, Uzmanlık Tezi, Konya, 67s.
- Zhao, J., Kong, F., Li, R., Wang, X., Wan, Z., Wang, D., 2001. Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. J Clin Microbiol, 39, 2261-6.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Erzurum'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Erzurum'da tamamladı. 2003 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2008'de Biyolog olarak mezun oldu. 2010 yılında Sağlık bakanlığında görev yapmaya başladı. Halen Erzurum Palandöken Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Acil Laboratuvarında Biyolog olarak görev yapmaktadır.

