

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN CANDIDA SUŞLARININ
PCR-RFLP YÖNTEMİYLE İDENTİFİKASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
H. Suphi BAYRAKTAR

Danışman
Doç. Dr. Nizami DURAN

HATAY-2013

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN CANDIDA SUŞLARININ
PCR-RFLP YÖNTEMİYLE İDENTİFİKASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
H. Suphi BAYRAKTAR

Danışman
Doç. Dr. Nizami DURAN

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
1101Y0119 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2013

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN CANDIDA SUŞLARININ PCR-RFLP YÖNTEMİYLE İDENTİFİKASYONU

Yüksek Lisans Tezi
H. Suphi BAYRAKTAR

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 09/05/2013 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir

Tez Jürisi: Jüri Başkanı: Doç. Dr. Nizami DURAN.....

Üye: Doç. Dr. Burçin ÖZER.....

Üye: Doç. Dr. Oktay Hasan ÖZTÜRK.....

Bu tez Enstitümüz Tıp Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

.../.../....

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tezin oluşmasında son ana kadar desteğini esirgemeyen, bilgi, birikim ve tecrübelerinden faydalanmama imkan sunan, gerek laboratuvar çalışmalarında gerekse tezimin yazımında tüm yaşadığım zorlukları yenmemde yardımcı olan, alçak gönüllülüğü ve özverisi sayesinde bana her türlü desteği sağlayan danışman hocam Doç. Dr. Nizami DURAN'a ve ayrıca her ortamda sıcak ve samimi davranışlarıyla moral kaynağım olan ve eğitimimde emeği geçen değerli hocalarım Doç. Dr. Burçin ÖZER, Yard. Doç. Dr. Melek İNCİ'ye

Bu yola beraber çıktığımız çok değerli çalışma arkadaşlarım Biyolog Hayat MULLAOĞLU ve Biyolog Merve OCAK'a

Zor günlerimde yanımda olan, güler yüzleri ve içten tavırlarıyla desteklerini asla unutamayacağım sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Gülcan ERKASLAN, Arş. Gör. Dr. Şeyda ÖZARSLAN KURTGÖZ, Arş. Gör. Biyolog Cansu ÖNLEN ve Biyolog Esra KARAYİĞİT'e

Tüm sıkıntılarımı paylaşan ve desteklerini her daim hissettiğim tüm laboratuvar personeline,

Gösterdiği sabır ve büyüklükle bu tezde büyük emeği geçen, ışığıyla yolumu aydınlatan canım dostum Biyolog Naciye ERYILMAZ'a

Beni bugünlere getirebilmek için varını yoğunu ortaya koyan Sevgili Babam (merhum) M. Kemal BAYRAKTAR, Annem Nimet BAYRAKTAR, Ağabeyim Dr. Dt. Serhat A. BAYRAKTAR'a ve Dr. Dt. A. Sonay ALTUNAY BAYRAKTAR ve biricik yeğenlerim Kemal Barkın BAYRAKTAR ve Nimet Biriz BAYRAKTAR'a

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ÖZET.....	X
ABSTRACT	XI
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Tarihçe.....	4
2.1.1. <i>Candida albicans</i>	5
2.1.2. <i>Candida glabrata</i>	5
2.1.3. <i>Candida tropicalis</i>	5
2.1.4. <i>Candida parapsilosis</i>	6
2.1.5. <i>Candida krusei</i>	6
2.1.6. <i>Candida lusitaniae</i>	6
2.2.Patogenez.....	7
2.3.Tanı.....	8
2.3.1.Direkt Tanı.....	8
2.3.1.1.Kültür.....	9
2.3.1.1.1.Türlerin İdentifikasyonu.....	10
2.3.1.1.1.1.Biyokimyasal İdentifikasyon.....	10
2.3.2.Seroloji.....	11
2.3.3.Moleküler Tanı.....	12
2.4.Non-Albicans <i>Candida</i> (NCAC) Türleri.....	12
2.5. <i>Candida</i> 'ların İdentifikasyonunda PCR Bazlı Olmayan Metodlar.....	17
2.6. <i>Candida</i> 'ların İdentifikasyonunda PCR Bazlı Metodlar.....	19
2.7.NCAC Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	20
2.8. <i>C. albicans</i> 'larda Virulans Faktörler.....	23
2.9. <i>Candida</i> 'larda Virulans Faktörler.....	27

2.9.1.Adezinler.....	27
2.9.2. <i>ALS1p</i> ve <i>ALS5p</i>	29
2.9.3. <i>HWPIp</i>	29
2.9.4. <i>INT1p</i>	31
2.9.5. <i>MNT1p</i>	32
2.9.6.Morfogenez	34
2.9.7.İnvazyona Yol Açan Enzimler	36
2.9.8.Fenotipik Değişim	37
2.10.NCAC Türlerinde Patojenite ve Virulans Faktörleri.	38
2.10.1.Adezyon ve Biyofilm Formasyonu	38
2.11.Epidemiyoloji.....	41
2.12.Filamentöz Büyüme	42
2.13.Antifungal Tedaviler ve NCAC Türlerine Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları ..	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
3.1.Araç ve Gereçler.....	44
3.1.1.Araçlar.....	44
3.1.2.Kimyasal Maddeler.....	44
3.2.Örneklerin Toplanması ve Kültivasyon.....	45
3.3.Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar	49
3.3.1.Kanlı Agar	49
3.3.2.Sabouraud Dekstroz Agar (SDA).....	49
3.3.3.50X Tris-Asetat EDTA (TAE) Elektroforez Tamponu: 1 Litre.....	49
3.3.4.Yükleme Tamponu (6X)	49
3.3.5.Fosfat Buffer Tamponu (PBS)	50
3.4.Genomik DNA Ekstrasyonu	50
3.5.PCR Amplifikasyonu	51
3.5.1.PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Tekniği ile Görüntülenmesi	53
3.6. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	55
3.6.1. <i>Msp1</i> ve <i>Bln1</i> ile Restriksiyon Enzim Analizi	55
3.6.2.Kesim Ürünlerinin Analizi.....	56
3.6.3.İstatistiksel Analiz.....	56
4. BULGULAR.....	57
5. TARTIŞMA.....	73
6. SONUÇ.....	81
7. KAYNAKLAR.....	83
ÖZGEÇMİŞ.....	102

Şekiller Dizini

Sayfa No

Şekil 2.1. <i>Candida albicans</i> suşlarının çeşitli morfolojik üremelerinin epifloresan fotokompozisyonu.....	14
Şekil 2.2. <i>Candida</i> türlerinin Cornmeal Tween-80 agarda makroskobik kolonileri ve SDA'daki mikroskobik yapıları.....	16
Şekil 2.3. Bir maya hücresinin germinasyon, tomurcuklanma ve mukozadan penetrasyon aşamaları.....	26
Şekil 2.4. <i>C.albicans</i> 'a ait adezin polipeptitleri.....	28
Şekil 2.5. <i>C.tropicalis</i> biyofilmlerinin elektron mikroskopi görüntüsü.....	40
Şekil 3.1. SDA besiyerinde <i>Candida</i> kolonileri.....	46
Şekil 3.2. Kanlı agarda <i>Candida</i> kolonileri.....	46
Şekil 3.3. PCR cihazı (Thermal cycler, Techne Flexigene™, İngiltere).....	52
Şekil 3.4. Elektroferez ünitesi (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD).....	54
Şekil 3.5. Görüntüleme cihazı (Wealtec, Dolphin-View, ABD, UV Transillumunator)..	54
Şekil 3.6. <i>Msp I</i> ve <i>Bln I</i> enzimlerinin DNA üzerindeki hedef bölgeleri.....	55
Şekil 4.1. Çeşitli <i>Candida</i> türleri için ITS1-ITS4 primer ürünlerinin büyüklükleri.....	68
Şekil 4.2. <i>Bln I</i> restriksiyon enzimi kullanılarak çeşitli <i>Candida</i> türlerinin kesim görüntüsü.....	71
Şekil 4.3. <i>Msp I</i> restriksiyon enzimi kullanılarak çeşitli <i>Candida</i> türlerinin kesim görüntüsü.....	72

Çizelgeler Dizini

Sayfa No

Çizelge 2.1. <i>Candida albicans</i> ile ilişkilendirilen virulans faktörleri	7
Çizelge 2.2. Çeşitli <i>Candida</i> türlerinin morfolojik özellikleri	15
Çizelge 2.3. <i>Candida albicans</i> ve <i>Candida glabrata</i> 'nın adezinleri	30
Çizelge 2.4. <i>C.albicans</i> 'ın transkripsiyonel proteinleri ve morfogenez	33
Çizelge 2.5. Aspartil proteazların (SAPS) kandidiazis ile ilişkisi.....	35
Çizelge 3.1. Suşların izolasyonlarının yapıldığı örnek tipleri.....	47
Çizelge 3.2. Klinik örneklerin bölümlere göre toplandığı birimler	48
Çizelge 3.3. Thermal cycler amplifikasyon döngüsü	52
Çizelge 3.4. Kesim karışımı (<i>Msp I</i>).....	55
Çizelge 3.5. Kesim karışımı (<i>Bln I</i>)	55
Çizelge 4.1. Suşların kökenleri ve cinsiyete göre dağılımı.....	57
Çizelge 4.2. Suşların izole edildiği servisler.....	58
Çizelge 4.3. Klinik örneklerden fenotipik yöntemle göre izole edilen türlerin dağılımı	59
Çizelge 4.4. Klinik örneklerden genotipik yöntemle göre izole edilen türlerin dağılımı	60
Çizelge 4.5. Fenotipik yöntemle poliklinik ve servislere göre <i>Candida</i> suşlarının tür dağılımı	61
Çizelge 4.6. Genotipik yöntemle poliklinik ve servislere göre <i>Candida</i> suşlarının tür dağılımı	63
Çizelge 4.7. Genotipik ve fenotipik yöntemlere göre tür dağılımı	64
Çizelge 4.8. <i>Msp I</i> ve <i>Bln I</i> enzimleri kullanılarak yapılan genotipik identifikasyona göre türler ve yüzde oranları	65
Çizelge 4.9. Genotipik yöntemle klinik örneklere göre tür dağılımı	66
Çizelge 4.10. İzole edilen türlerin antifungal direnç paternleri	67
Çizelge 4.11. <i>MSP I</i> restriksiyon enzimi ile yapılan identifikasyon.....	69
Çizelge 4.12. <i>Bln I</i> restriksiyon enzimi ile yapılan diskriminasyon	70

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

μ l:	mikrolitre
μ m:	mikrometre
AIDS:	Acquired Immundeficiency Syndrome (Kazanılmış immun yetmezlik sendromu)
ALS:	Aglütinin benzeri sekans proteini
Avir:	Avirulan
bp:	base pare (baz çifti)
CD4:	Cluster of differantiation 4 glikoproteini
CHK1p:	Histidin kinaz proteini
cm:	santimetre
CMA+TW80:	Cornmeal Agar Tween 80 besiyeri
COS1/NIK1:	Histidin kinaz proteinleri
dk:	dakika
DNA:	Deoksiribonükleik asit
ECM:	Ekstraselüler matriks
EDTA:	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA:	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPA:	Epitelyal Adezin Proteini
FN:	Fibronektin
GPI:	Glikozilfosfatidilinositol
gr:	gram
HBEC:	İnsan bukkal epitelyal hücresi
HIV:	Human immundeficiency virus
HOG:	Yüksek ozmolariteli gliserol
ITS:	Internal Transcribed Spacer
kDA:	Kilo Dalton
KOH:	Potasyum hidroksit
mg:	miligram
ml:	mililitre
NCAC:	Non-albicans Candida türleri
ND:	Belirlenmemiş
PAS:	Periyodik Asit Schiff boyama tekniği
PBS:	Fosfat tampon solüsyonu
PCR:	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PFGE:	Pulse Field Gel Electrophoresis
PKC:	Protein kinaz C
PL:	Fosfolipaz
PNA-Fish:	Peptid nükleik asitli <i>in situ</i> floresan hibridizasyon yöntemi
RAPD:	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RGP:	Ribozomal protein gen

RIA:	Radioimmuno Assay
RNA:	Ribonükleik asit
rpm:	Rotation per minute (dakikadaki tur sayısı)
RT-PCR:	Reverse transcription – PCR
SAP:	Aspartil proteinaz
SDA:	Sabouraud Dextrose Agar besiyeri
sn:	saniye
TAE:	Trisasetat EDTA
Tgase:	Transglutaminaz
UV:	Ultraviole
Vir:	Virulan
Wt:	Wild type

ÖZET

Klinik Örneklerden İzole Edilen Candida Suşlarının PCR-RFLP Yöntemiyle İdentifikasyonu

Bu çalışmadaki amaç Candida türlerinin fenotipik dağılımlarını otomatize sistem kullanarak yapmak ve aynı zamanda Candida türlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve *Msp I* ve *Bln I* enzimleri kullanılarak restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi (RFLP) yöntemleriyle tanımlamaktır.

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 150 Candida türü çalışmaya dahil edildi. Klinik izolatların fenotipik değerlendirmesi VITEK-2 otomatize identifikasyon sistemiyle yapıldı. Candida türlerinin genomik DNA ekstraksiyonları cam boncuklu kit kullanılarak yapıldı. Daha sonra amplifikasyon ürünleri *Msp I* ve *Bln I* restriksiyon enzimleriyle kesildi ve kesilen ürünler %3'lük agaroz jelde yürütüldü. Sonuçlar standart Candida suşları ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Candida türlerinin büyük bir çoğunluğu idrar örneklerinden izole edildi (%78.6). Diğer klinik örneklerin oranları; vajinal sürüntü örnekleri %11.3 (17/150), yara örnekleri %3.3, kan örnekleri %2 ve diğer klinik örnekler %4.7 şeklindeydi. Fenotipik yöntemle yapılan identifikasyonda Candida türleri ve oranları; *C. albicans* %48.6, *C. tropicalis* %17.3, *C. glabrata* %17.3, *C. parapsilosis* %4.0, *C. krusei* %4.0, *C. lusitaniae* %0.6, *C. kefyr* %0.6, *C. famata* %0.6, *C. lyopolitica* %0.6 ve diğer türler %6 olarak bulundu. *Msp I* ve *Bln I* restriksiyon enzimleri kullanılarak yapılan RFLP yöntemine göre ise oranlar; *C. albicans* %45.3, *C. glabrata* %19.3, *C. tropicalis* %14.6, *C. parapsilosis* %5.3, *C. krusei* %5.3, *C. lusitaniae* %0.6 ve diğer türler %9.3 olarak belirlendi.

Msp I ve *Bln I* restriksiyon enzimleri kullanılarak yapılan PCR-RFLP yöntemi *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* türlerinin identifikasyonunda başarıyla kullanıldı. Candida türlerinin identifikasyonunda restriksiyon fragment ürünleri ilgili daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. PCR-RFLP yöntemi, DNA sekans analizi gibi diğer sık kullanılan DNA bazlı yöntemlere göre ucuz ve daha az zaman alıcı bir yöntemdir. Bu avantajı sayesinde yöntemin kullanılabilirliği ve tanılabilirliği artmaktadır.

Anahtar kelimeler: Candida, PCR, RFLP, *Msp I* ve *Bln I*

ABSTRACT

Identification of Candida Strains Isolated From Clinical Samples by PCR-RFLP method

It was aimed to determine the phenotypic type distribution of Candida species by the automated system phenotypically. Also it was aimed to determine the identification of Candida species with a method of Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism by using *Msp* I and *Bln* I restriction enzymes.

A total of 150 Candida species isolated from various clinical samples were included to the study. For phenotypic evaluation of clinical isolates was made using the VITEK-2 automated identification systems. Genomic DNA extraction of Candida species was performed by using glass bead extraction kits. Later, the amplification products were digested by *Msp* I and *Bln* I restriction enzymes and the digested products were separated on a 3% agarose gel. The results were evaluated in comparison with the standard Candida strains.

The majority of Candida spp. was isolated from urinary samples (78.6%). The isolation rates in other clinical samples was as follow: For vaginal samples: 11.3% (17/150); for wound samples: 3.3%; for blood samples: 2% and for the other clinical sample: 4.7%. The distribution of Candida species was determined as follows by phenotypic methods; *C.albicans*: 48.6%, *C. tropicalis*: 17.3%, *C. glabrata*: 17.3%, *C. parapsilosis*: 4.0%, *C. krusei*: 4.0%, *C. lusitaniae*: 0.6%, *C. kefyr*: 0.6%, *C. famata*: 0.6%, *C. lypolitica*: 0.6 and the other Candida species: 6.0%. The species distribution of Candida was determined as follows by the RFLP technique that used *Msp*I and *Bln*I restriction enzymes; *C.albicans*: 45.3%, *C. glabrata*: 19.3%, *C. tropicalis*: 14.6%, *C. parapsilosis*: 5.3%, *C. krusei*: 5.3%, *C. lusitaniae*: 0.6%, and other Candida species: 9.3%.

PCR-RFLP method used *Msp* I and *Bln* I restriction enzymes could be used successfully the identification of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* and *C.krusei*. There is also a need for further well-designed studies on the restriction fragment products for using for identification of Candida species. PCR-RFLP method is cheaper and less time consuming compared to the other common DNA testing method such as DNA sequencing. This feature increases its usability and diagnostic value.

Key words: Candida, PCR, RFLP, *Msp* I and *Bln* I.

1.GİRİŞ

Candida'lar ökaryotik diploid mayalardır (Kurtzman ve Fell 1998). Yüz elliden fazla türü olup çok azı insanlar için patojendir. Oldukça heterojen bir grup olan Candida sınıfının üyeleri maya formunda üreyen (blastospor) ve birçok üyesi filamentöz üreme de gösteren türlerden oluşur. Sadece *Candida albicans* ve *Candida dubliniensis* türleri gerçek hif oluşturma yeteneğine sahiptir ve bu iki tür polimorfik olarak değerlendirilmektedir (Calderone 2002).

Sağlıklı insanların mukokutanöz dokuları gastrointestinal sistemleri ve genitoüriner sistemlerinde normal flora elemanı olarak bulunan Candida'lar fırsatçı patojen mikroorganizmalardır (Calderone 2002). Candida'lar insanlarda, deri ve müköz membran infeksiyonları ile sistemik infeksiyonların en önemli etiyolojik ajanları arasında yer almaktadırlar. (Anane 2007, Filoti 2007, Furuta 2000, Marr 2004, Pfaller ve Diekema 2004, Souza 2009). Sistemik Candida infeksiyonları AIDS'li hastalar, antikanser tedavi gören nütropenik bireyler, geniş spektrumlu antibiyotik kullananlar, metabolik hastalıkları (diabetes mellitus gibi) olan kişilerde oldukça yüksek oranda seyretmektedir (Back-Brito 2009, Furuta 2000, Imamura 2008, Kakabadze 2008).

Son yıllarda Candida'ların neden olduğu invazif infeksiyonların sayısında önemli artışların olduğu bildirilmektedir. Son verilere göre Candida türleri kan dolaşımı infeksiyonlarının en önemli dördüncü sebebidirler (Schaberg ve ark 1991, Edmond ve ark 1999, Pfaller ve ark 1998). Candida türleri deri ve mukozalarda basit yüzeysel infeksiyonlardan, derin dokularda ölümcül olabilen daha ciddi infeksiyonlara kadar geniş bir hastalık oluşturabilme spektrumuna sahiptir. Ciddi Candida infeksiyonları arasında derin, invazif, sistemik, dissemine, hematojen dissemine ve hematojen infeksiyonlar sayılabilir (Anonymous 1994, Voss 1999, Ostrosky-Zeichner ve ark 2002, Hull ve ark 2000, Edwards 1991, Miller ve Johnson 2002, Rex ve ark 2000, Edwards ve ark 1978, Safdar ve Perlin 2002).

Geçmişte Candida infeksiyonlarından izole edilen etkenlerin %70-%90'ına varan oranda etkenin *C. albicans*, yaklaşık %5 kadarının ise *C. glabrata* ile *C. tropicalis* olduğu tespit edilirken çok nadir olarak da bu türler dışındaki Candida türlerinin izole edildiği

bildirilmekteydi. Günümüzde ise Candida infeksiyonlarında eskiden görülen yaygın türler dışındaki Candida türlerinin bu tür infeksiyonlarda çok daha sık etken olarak izole edildiği bildirilmektedir (Anane 2007, Fidel 1999, Filoti 2007, Furuta 2000, Marr 2004, Pfaller ve Diekema 2004). Epidemiyolojik çalışmalar infeksiyon paternini *C. albicans*'dan *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* gibi diğer non-albicans türler lehine değiştiğini göstermektedir (Ahmad ve Khan 2009, Ferrer 2000, Gutierrez ve ark 2002, Silva ve ark 2009). Sözgelimi *C. glabrata*'nın özellikle vajinal infeksiyonlarda ikinci en sık izole edilen kandidiazis etkeni olduğu bildirilmiştir (Ahmad ve Khan 2009, Ferrer 2000, Fidel ve ark 1999).

Son yıllarda epidemiyolojik patern değişiminin yanı sıra Candida türlerinin konvansiyonel tedaviye direncinde de önemli artışlar olduğu bildirilmektedir (Cappelletty ve Eiselstein-McKitrick 2007, Fidel ve ark 1999, Filoti ve ark 2007, Kakabadze ve ark 2008, Marr 2004, Silva ve ark 2009, Tanabe ve ark 2008). Çoğu hastane Candida'ların alt tiplerini belirlemede yeterli imkana sahip olamadığından *C. albicans* ve non-albicans ayrımı yapmak konusunda sınırlı kalmaktadır. Rutin diagnostik yöntemler Candida türlerini ayırmada çoğu kez yetersiz kalmaktadır. Bu yetersizlik ya kullanılan yöntemlerin ayırıcı tanıda yetersiz kalmasından ya da kullanılan yöntemlerin sınırlı olmasından kaynaklanmaktadır. Klinik örneklerden ilk kez 1995 yılında izole edilerek tanımlanan *C. dubliniensis* germ tüp ve klamidospore oluşturması bakımından *C. albicans* ile fenotipik benzerliği olan bir tür olup ve standart diagnostik metodlarla tiplendirilmesi oldukça zordur (Anane ve ark 2007). İlk izole edildiği yıllarda *C. dubliniensis* suşlarının antifungal ajanlara karşı duyarlı oldukları görülürken, yıllar içinde flukonazol dirençli suşların ortaya çıktığı daha sonraları ise çoklu ilaç dirençli kökenlere rastlanıldığı da bildirilmiştir (Gutierrez ve ark 2002).

Günümüzde çoğu laboratuvar Candida türlerinin laboratuvar tanısında standart diagnostik prosedürler kullanarak *C. albicans* ve non-albicans şeklinde yapmakta ve antifungal ilaç seçimi ise baştan aşağı ampirik bilgilere dayanmaktadır. Candida türlerinin dağılımı, antifungal direnç paternlerine göre farklı antifungal ilaç seçimleri sağlık kuruluşları arasında farklı şehirlerde ve ülkelerde infeksiyon kontrol prosedürleri ile mümkündür (St-Germain ve ark 2001). Candida türlerinin dağılımı ve antifungal direnç profilleri ülkeden

ülkeye, şehirden şehire hatta aynı şehrin farklı sağlık kuruluşları arasında dahi farklılıklar gösterebilmektedir. Candida tür dağılımı ve ilaç direnç paternlerinin bilinmesi çoklu ilaç dirençli suşların yayılımının önüne geçilmesi ve efektif tedavi için son derece önemlidir (St-Germain ve ark 2001).

Son yıllarda fırsatçı patojen Candida infeksiyonlarının dikkate değer ölçüde arttığı gözlenmektedir. Candida infeksiyonları sıklığı özellikle HIV, kanser hastaları gibi immünosupressif kişilerde veya kemoterapinin yaygın olarak kullanılmasıyla ciddi şekilde artmıştır. Candida'ların hastalık oluşturma potansiyelleri ve antifungal duyarlılıkları türlere göre değişkenlik gösterdiğinden hastalık etkeni Candida tiplerinin tanımlanması oldukça önemlidir.

Biz bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen Candida kökenlerinde fenotipik olarak otomatize sistemle ve genotipik olarak ise rDNA'nın ITS1 ve ITS2 bölgelerinin amplifikasyonunu takiben PCR ürünlerinin *Msp* I ve *Bln* I restriksiyon enzimleri kesimine dayalı RFLP yöntemiyle tür dağılımını belirlemeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Mayalar ve maya benzeri mikroorganizmalar klinik laboratuvarlarda en çok izole edilen mantarlardır (Larone D 2002). Bu mikroorganizmalar fırsatçı patojen olarak değerlendirilmektedir. ‘Maya’ ismi köpük ve ‘yükselmek, doğmak’ anlamına gelen kelimelerden oluşmaktadır. Bu yüzden mayalar çoğunlukla fermentatif Asomiçetesler olarak düşünülmektedir. Bazı mayalar vejetatif formda Bazidiomiçeteslerdir ve genellikle tomurcuklanma veya bölünmeyle ürerler. Psödohif, gerçek hif ve/veya terminal klamidospore oluşturma yeteneği, blastokonidya yapısı ve diğer morfolojik özellikler biyokimyasal testlerde olduğu gibi mayaların familya ve tür düzeyinde identifikasyonunda kullanılmaktadır (Guarro J ve ark 1999).

Candida familyası heterojen anamorfik mayaları içerir ve fizyolojik olarak asomiçetes veya basidiomiçeteslerle ilişkilendirilen yaklaşık 196-200 türden oluşur (Kwon-hung KJ ve Bennet JE 1992, Murray PR ve ark 1995). *Candidatus* adı antik Roma’da bir devlet dairesi için adaylık gereği giyinen beyaz elbiseden ileri gelmektedir. *Albico* terimi ise ‘beyaz olmak’ anlamı taşımaktadır ve neticede *Candida albicans* adı doğmuştur. Daha önemli patojen türler *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* ve *C. glabrata* filogenetik olarak Asomiçeteslerle ilişkilendirilir. *Candida* familyası aşağıdaki şekilde sınıflandırılır:

Filum: Deuteromycota

Sınıf: Blastomycetes

Cins: Cryptococcales

Familya: Cryptococcaceae

Tür: Candida

2.1.1.Candida albicans

Candida albicans için bugüne kadar 100 farklı isim kullanılmıştır. Bu tür ilk olarak Charles-Philippe Robin (1821-1885) tarafından 1853'de *Oidium albicans* olarak adlandırılmıştır. Daha ileri çalışmalar sonrasında Zopf, 1880'de bu ismi değiştirerek *Monilia albicans* ismini vermiştir. Son olarak *Candida albicans* olarak Berkhout tarafından 1923'de adlandırılmıştır (Kwon-hung KJ ve Bennet JE 1992). Çeşitli *Candida* türlerinin isimleri değiştirilmişken *C. clausenii* ve *C. langeronii* türleri de *C. albicans* ile birleştirilmiştir. *C. dubliniensis* türü farklı blastokonidia ve klamidospore yapıları nedeniyle *C. albicans*'tan ayrılmıştır (Guarro J ve ark 1999). Germ tüp formasyonu ve klamidospore formasyonu *C. albicans* identifikasyonunda en önemli morfolojik kriterlerdir (Murray PR ve ark 1995). *C. albicans*'ın tüm klinik izolatları diploid yapıdadır (Kwon-hung KJ ve Bennet JE 1992). Tüm kandidiazis olgularında en çok izole edilen tür *C. albicans*'tır.

2.1.2.Candida glabrata

Candida glabrata ilk olarak ilk olarak Anderson tarafından 1971'de *Cryptococcus glabrata* olarak adlandırılmıştır. Lodder ve de Vries 1938'de *Torulopsis glabrata* adını vermişlerdir. Türlerin kökenlerine göre sınıflandırılması diğer *Candida* türlerinde olduğu gibi *Torulopsis* türlerinin psöдохif oluşturamaması temeline dayanır. Ancak bu kriter *C. glabrata* türünün hatalı isimlendirilmesine yol açtığı için uygun değildir (Kurtzman CP ve Fell JW 1998). Meyer ve Yarrow 1978'de bu türü ovoid yapısı ve psöдохif oluşturamaması nedeniyle *C. glabrata* olarak isimlendirmişlerdir.

2.1.3.Candida tropicalis

Aldo Castellani (1877-1971) Sri Lanka'da çalıştığı dönemlerde aralarında *C. tropicalis* türünün de bulunduğu çeşitli *Candida* türlerinin ayrımı üzerine yoğunlaşmıştır (1910) ve bu türe *Oidium tropicale* adını vermiştir. Bu türle ilgili verilen diğer isimlerden bazıları; *Monilia tropicalis*, *Candida vulgaris*, *Mycotorula dimorpha*, *Candida paratropicalis* olarak sayılabilir. *C. tropicalis*'e bugüne kadar 58 farklı isim verilmiştir. Son olarak Berkhout 1923'te bugünkü ismi olan *C. tropicalis* olarak adlandırmıştır (Kwon-hung KJ ve Bennet JE 1992). *C. tropicalis* germ tüp negatiftir ve klamidospore oluşturmaz. Diploid Asomiyetes benzeri mayadır (Kurtzman CP ve Fell JW 1998).

2.1.4.Candida parapsilosis

Bu tür için *Monilia onychopila* (Poll ve Nann, 1926), *Monilia parapsilosis* (Ashford, 1928), *Mycocandida parapsilosis* (Dodge, 1935) gibi isimler kullanılmıştır. Diploid bir maya türü olan *Candida parapsilosis* adı Langeron ve Talice tarafından 1932’de verilmiştir. Koloni morfolojisi *C. albicans* türüne benzer ancak mikroskopik olarak çarpık veya kıvrık kısa psödohif görüntüsü vardır ve bazen büyük hifal unsurları ile dev hücreler olarak adlandırılır (Guarro J ve ark 1999).

2.1.5.Candida krusei

Castellani 1910’da *C. krusei*’ i *Sacharomyces krusei* olarak ve 1912’de *Endomyces krusei* olarak adlandırmıştır (Castellani A 1912). Chalmers 1913’te *Monilia krusei* ismini vermiştir. Berkhout 1923’te *C. krusei* olarak tekrar isimlendirmeden önce bu tür için 18 farklı isim kullanılmıştır. *C. krusei* kolonileri Sabouraud dekstroz agarda *C. albicans* ve diğer *Candida* türlerinin oluşturduğu kolonilerine benzer ancak Cornmeal-Tween 80 agarda uzamış blastokonidyalara psödohif oluşturması, çapraz (birbirine girmiş) kibrit çöpü veya ağaç dalı görüntüsü ile ayrılır (Kwon-hung KJ ve Bennet JE 1992, Guarro J ve ark 1999). *C. krusei* türü flukonazole doğal dirençlidir.

2.1.6.Candida lusitaniae

Dietrichson bu türü 1954’te *Candida parapsilosis* var. *Obtusa* olarak isimlendirmiştir. van Uden ve do Carmo-Sousa 1959’da *C. lusitaniae* adını vermişlerdir. Bu tür ilk olarak Portekiz’de sıcak kanlı hayvanların sindirim kanalından izole edilmiştir. *C. lusitaniae* 1979’dan beri insanlarda kan, idrar ve solunum sisteminde fırsatçı patojen olarak değerlendirilmiştir (Kwon-hung KJ ve Bennet JE 1992). *C. lusitaniae* türü *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* türlerine benzer ancak sellobiyozu fermente edebilmesi ve ramnozu sindirebilmesi ile bu türlerden ayrılır (Guarro J ve ark. 1999). *C. lusitaniae* genellikle düşük virulanslı bir mayadır ve amfoterisin B’ye direnç gösterebilmektedir (Murray PR ve ark 1995).

2.2.Patogenez

Candida'ların zararsız kommensal bir formdan patojenik forma geçişleri oldukça komplike olup, mikroorganizmanın çeşitli virulans faktörleri ve çevresel faktörlerle ilişki olduğu bildirilmektedir (Çizelge 2.1). Candida infeksiyonlarının ortaya çıkışı hem konak hem de mikroorganizmaya ait faktörlerle ilişkilidir (Marsh ve Martin 2009).

Çizelge 2.1. *Candida albicans* ile ilişkilendirilen virulans faktörleri

Virulans Faktörler	Etkisi
Tutunma	Ağızda tutunmaya neden olur
Nispi hücre yüzeyi hidrofobisitesi	Nonspesifik tutunma sürecini başlatır
Hücre yüzeyi adezyon moleküllerinin sentezi	Spesifik tutunma mekanizmalarını aktive eder
Konak savunmasını aşma	Ağızda tutunmaya neden olur
Yüksek düzeyde fenotipik dönüşüm	Sık sık hücre yüzey değişikliğiyle antijenik modifikasyon
Hif oluşumu	Olası fagositozu engeller; fagosite edilmiş olan mayaların kurtulmasına olanak sağlar
Salgısal aspartil proteinaz üretimi	Salgısal IgA yıkımı
Komplement moleküllerine bağlanma	Antijenik maske
Konak dokulara invazyon ve doku yıkımlanması	Patojeniteyi arttırır
Hif oluşumu	Oral epitelyuma invazyonu sağlar
Salgısal aspartil proteinaz üretimi	Konak hücre ve ekstraselüler matriks yıkımı
Fosfolipaz üretimi	Konak hücre yıkımı

Candida türlerinin sağlıklı bireylerin mukozal yüzeylere tutunmaları virulanslarına katkı sağlayan önemli bir faktördür. Candida infeksiyonlarında infeksiyon süreci tek faktörden ziyade çoklu virulans faktörlerinin olaya katılmasıyla başlamaktadır. Bu virulans faktörleri arasında Candida'ların mukozal yüzeye adezyonu, konak immun defans mekanizmasına direnç göstermeleri ve bazı hidrolitik enzimlerin (proteinazlar ve fosfolipazlar gibi) salınımı gibi faktörler sayılabilir.

2.3.Tanı

Kandidiazisde mikrobiyolojik tanı; örneklerin alınmasını takiben direkt tanı, kültür izolasyon, seroloji ve moleküler yöntemleri kapsamaktadır (Marsh ve Martin 2009).

2.3.1.Direkt Tanı

Candida türlerinin morfolojik özelliklerinin bilinmesi identifikasyon için önemlidir. Tanıda maya ve hif formların ayrımı önemli olabilmekle birlikte kültür yöntemlerine göre daha düşük sensitiviteye sahiptir (Williams ve Lewis 2000). Direkt tanıda lezyondan alınan örneğin potasyum hidroksit (KOH) ile hazırlanan preparatında çatal şeklinde (yaklaşık 45 derece açılı) pigmentsiz septalı hiflerin görülmesi karakteristiktir (Baveja 2010).

KOH-Kalkaflor floresan-boyama metodunda ise hif, maya hücreleri ve diğer fungal yapılar floresan renkte görülebilmektedir (Harrington ve Hageage 1991).

Lezyonlu bölgeden alınan örnek lamda tespit edildikten sonra Gram boyama veya Periyodik Asit Schiff (PAS) tekniği ile boyanarak incelenebilir. Gram boyamada kandidal hif ve mayalar koyu mavi, PAS boyamada kırmızı/mor olarak görüntülenmektedir (Davenport ve Wilton 1971).

Kronik hiperplastik kandidiazisde, lezyondan alınan biyopsi örneği PAS veya Gomori metenamin gümüş boyama yöntemiyle histolojik olarak değerlendirilebilmektedir. Bu yöntemlerle dokulardaki fungal yapıların incelenmesi mümkün olabilmektedir. Blastosporlar ve hif veya psödohiflerin varlığı histopatolojik olarak gösterilebilir. Ayrıca kronik hiperplastik kandidiazis tanısında kullanılmaktadır (Nassar ve ark 2006).

2.3.1.1.Kültür

Lezyonlu bölgeden alınan örnekten *Candida* suşlarının izolasyonuna dayanır. Yöntem steril eküvyonun lezyonlu doku üzerine sürülerek örneğin alınması ve kültür besiyerlerine (Sabouraud Dekstroz Agar gibi) inokülasyonunu içerir (Axell ve ark 1985).

Imprint kültür: Bu yöntemde yaklaşık 2.5 cm² ebatında steril köpük pedler kullanılmaktadır. Bu pedler Sabouraud buyyon gibi bir sıvı besiyerine daldırıldıktan sonra lezyonlu bölgeye 30 sn kadar tatbik edilir ve sonra kültür için uygun besiyerine inoküle edilir (Williams ve Lewis 2000).

Candida'lar için en çok tercih edilen izolasyon besiyeri, düşük pH' sını nedeniyle birçok bakterinin üremesini baskılayan ve sadece *Candida* üremesini sağlayan Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyeridir. SDA içerisinde, çeşitli antibiyotiklerin varlığı da, selektiviteyi arttırmaktadır (Marsh and Martin 2009).

Tipik olarak SDA, aerobik ortamda 37°C' de 24-48 saat inkübe edilir. *Candida*'lar SDA'da krema, macun kıvamında ürer ve 'S' koloni oluşturur. Bu yöntemde tür düzeyinde ayırım yapılamaz (Baveja 2010). Tür ayırımı için spesifik besiyerlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Williams ve Lewis 2000).

Son yıllarda *Candida* türlerinin, koloni yapısı ve renk oluşturması gibi spesifik ayırımında kullanılmak üzere farklı besiyerleri geliştirilmiştir. Bu gibi besiyerlerinin avantajı, bir enfeksiyona neden olan birden fazla *Candida* türünün ayırt edilebilmesi ve buna göre uygun antifungal tedavinin seçilmesine olanak sağlamasıdır (Marsh and Martin 2009). Bu besiyerleri arasında Pagano-Levin agar, kromojenik agar (CHROMA agar *Candida*, Albicans ID, Fluroplate, Candichrom albicans gibi) örnek olarak gösterilebilir (Williams ve Lewis 2000).

Pagano-Levin agar, trifeniltetrazolyum klorid redüksiyonuna bağlı olarak, *Candida*'lar arasında ayırım yapabilme olanağı sağlar. Besiyerinde diğer *Candida* türleri pembe renkli koloni oluştururken, *C. albicans*'ın solgun renkli koloni oluşturduğu görülür. Pagano-Levin agar, SDA'ya benzer sensitivite gösterir ancak örnek içerisinde birden fazla *Candida* türünü tespit edebilmesi ile SDA'dan üstündür (Samaranayake ve ark 1987). Albicans ID ve Fluroplate, *C. albicans*'ın identifikasyonunda kullanılabilirken (Rousselle ve ark 1994)

CHROMagar Candida ile koloni yapısı ve rengi belirlenebilmekte ve *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* türlerinin identifikasyonu sağlanabilmektedir (Beighton ve ark 1995).

CHROMagar Candida besiyeri *C. dubliniensis* türünün (Sullivan ve ark 1995), *C. albicans*'tan ayrımını mümkün kılmaktadır. CHROMagar Candida besiyerinde *C. dubliniensis* kolonileri, *C. albicans* kolonilerine göre daha koyu yeşil renkte görülür . Ancak bu iki türün ayrımı için CHROMagar kullanıldığında, izolatların pasajı ve stoklanması mümkün olmamaktadır. *C. dubliniensis*'in üremesi 45°C'de mümkün olmadığı için bu yöntem, bu iki türün ayrımında son zamanlarda alternatif bir yol olarak ortaya konmuştur (Pinjon ve ark 1998).

2.3.1.1.1.Türlerin İdentifikasyonu

Mayaların, primer kültür ile identifikasyonu, izolatların morfolojik ve fizyolojik özellikleri göz önünde bulundurularak çeşitli testler ile doğrulanabilir.

Morfolojik kriterler: Germ-tüp testi standart bir laboratuvar yöntemi olup, *C. albicans*'ın identifikasyonunda kullanılır. At serumuna yapılan pasajlarda, 37°C' de 2-4 saat içerisinde germinasyon tüpünün görülmesi esasına dayanır. *C. albicans* izolatlarının yaklaşık %95'i germ tüp oluştururken, *C. stellatoidea* ve *C. dubliniensis* türlerinin de germ tüp pozitif olduğu bildirilmiştir (Williams ve Lewis 2000). *C. albicans* ve *C. dubliniensis*, diğer türlerden klamidospor olarak bilinen morfolojik üremeleri ile de ayrılır. Klamidosporlar, Corn Meal Agar gibi zengin olmayan besiyerlerinde kültür izolasyonunu takiben sferik yapıları ve hiflerin terminal bölgesinden üremesiyle karakterizedir. İzolatlar besiyerine inoküle edildikten sonra ekim yapılan bölgenin üzeri steril bir lam ile kapatılır. Plaklar 37°C'de, 24-48 saat inkübe edilir ve klamidospor varlığı yönünden mikroskopta incelenir (Marsh and Martin 2009).

2.3.1.1.1.1.Biyokimyasal identifikasyon

Candida türlerinin biyokimyasal identifikasyonu, büyük ölçüde karbonhidrat kullanımı esasına dayanır. Rutin testlerde, test izolatlarının kültürü, karbon içermeyen bir agar

besiyerinde yapılır. Karbonhidrat çözeltileri ekim yapılmış agar içerisinde açılan kuyucuklara konur ya da agar yüzeyine yerleştirilen filtre kağıtlarına emdirilir. Karbon kaynağının etrafındaki üreme, karbonhidrat kullanımının göstergesidir. Aynı prensiple çalışan ticari sistemler de mevcut olup, bir test stripinde hazır plastik kuyucuklara numunelerin yerleştirilmesi ile gerçekleştirilmektedir. Her kuyucuktaki üreme bulanıklık ve renk değişikliğinin okunmasıyla değerlendirilir. Test sonuçlarından elde edilen sayısal kodlar ile araştırılan organizmaların identifikasyonu için veri tabanı oluşturulur (Ellepola ve Morrison 2005).

2.3.2.Seroloji

Serolojik testler, *Candida* tür izolatlarının klinik önemini belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır. İmmünkomprime bireylerde invazif kandidiazise yol açan *C. albicans*'a karşı IgG düzeyinde artış görülür. Akut infeksiyon tanısında, IgA ve IgM antikor titrelerinin belirlenmesi önemlidir. İmmünespresif bireylerde, antikor üretimi her zaman değişkenlik gösterir. Bu bireylerde serolojik tanı düşünüldüğünde, bu durum göz önünde bulundurulmalıdır. ELISA veya RIA gibi testlerde hem hücre duvarı mannanı hem de sitoplazmik bileşenler kullanılarak antijen taraması yapılabilmektedir (Aubert ve ark 1996).

Serolojik tanı çoğu kez gecikmekte, sensitivite ve spesifite yönünden zayıf kalmaktadır. Ayrıca immünespresiflerde antikor üretimi değişkenlik gösterdiği için, tanıyı zorlaştırmaktadır (Wahyuningsih ve ark 2000).

Fungal antijenler ve metabolitler çoğu zaman dolaşımda bulunmakta ve özellikle altta yatan ciddi bir hastalığı olanlar veya immünespresif tedavi alanlarda, antikor varlığı her zaman bir *Candida* infeksiyonunun olduğunu göstermemektedir (Yeo ve Wong 2002).

Serolojik testler kandidiazisde rutin tanı yöntemleri arasında sayılmaz. Ancak bu gibi yöntemler antimikotik tedaviye zayıf yanıt veren vakalarda prognostik açıdan değerli olabilmektedir (Budtz-Jørgensen 1990).

2.3.3.Moleküler Tanı

Genetik çeşitlilik analizleri ile yapılan identifikasyon, fenotipik kriterler esas alınarak yapılan identifikasyona göre daha kesin yöntemlerdir. Candida identifikasyonunda en sık kullanılan yöntemler arasında multipleks PCR yöntemi, real-time multipleks PCR yöntemi, elektroforetik karyotip analizi ve Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) yöntemleri sayılabilir (Williams ve Lewis 2000). Türe özgü PCR yöntemi Candida identifikasyonu amacıyla kullanılan yöntemler arasında sayılabilir. Candida türlerinin ayırımında birçok hedef gen bölgesi tanımlansa da bu amaçla en sık ribozomal RNA operonun çoğaltılmasına dayalı yöntemler kullanılmaktadır. İdentifikasyon, jel elektroforezi takiben elde edilen PCR ürününe dayalı olarak ya da PCR ürünü ya direkt dizi analizi veya restriksiyon endonükleaz enzimi ile genomun kesilmesi sonucu RFLP yöntemiyle yapılır (Marsh and Martin 2009).

Peptid nükleik asitli *in situ* floresan hibridizasyon (PNA-FISH) yöntemi rRNA bazlı yeni bir identifikasyon yöntemidir. Bu yöntemde hücreler amplifikasyona gerek kalmadan direkt olarak tespit edilebilmektedir (Shepard ve ark 2008).

Bu yöntemin *C. albicans*'ı fenotipik olarak benzer *C. dubliniensis*'den %98.7-%100 arası sensitivite ve %100 spesifitede ayırım sağlayabildiği bildirilmiştir (Trnovsky ve ark 2008).

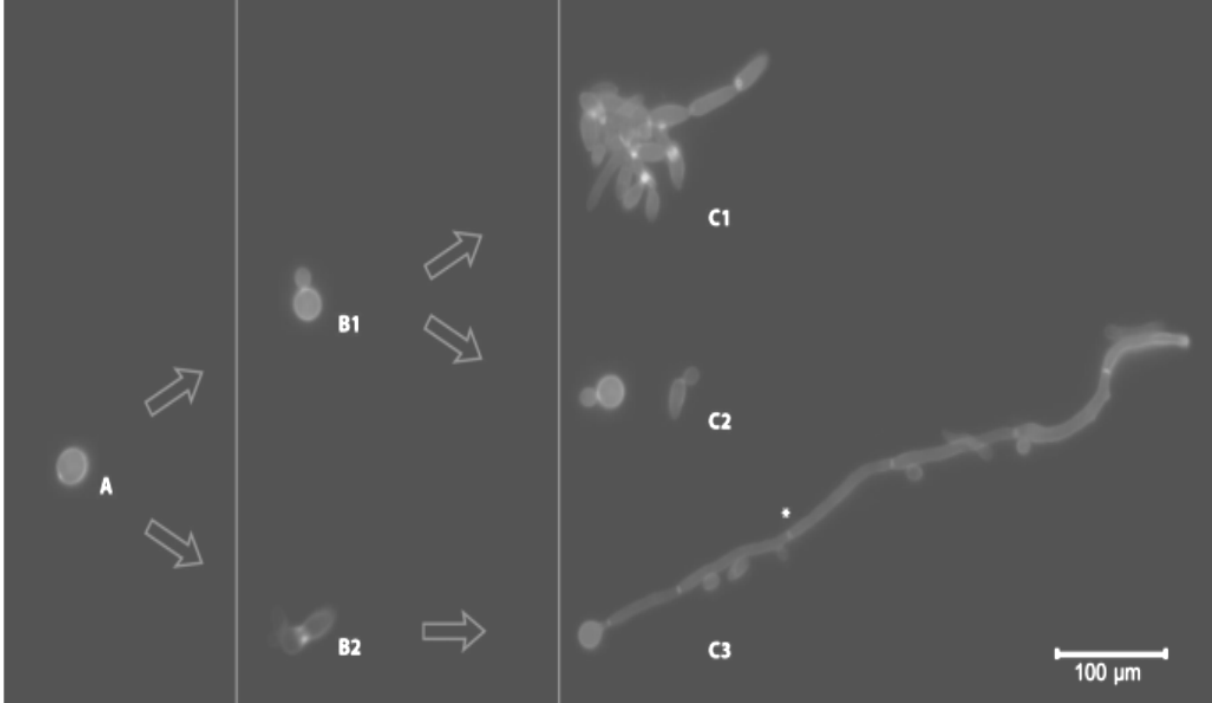
Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE), Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) gibi genotipik identifikasyon yöntemleri epidemiyolojik çalışmalarda sıkça kullanılsa da bu yöntemler Candida türlerinin ayırımında da kullanılabilir (Marsh and Martin 2009).

2.4.Non-albicans Candida (NCAC) Türleri

Candida'lar oldukça fazla miktarda heterojen gruplara sahip, değişik morfolojik karakterlerde fungal mikroorganizmalardır. Makroskopik olarak Candida kolonileri SDA'da üremekte ve krem renginden sarıya kadar değişen renklerde koloniler oluşturmaktadırlar. Bu türler, kültür özelliklerine göre, S koloni, parlak veya kuru, buruşuk veya mat olabilmektedir.

Standart şartlarda ve optimal besi yerlerinde koloniler yuvarlaktan ovale kadar değişen şekillerde, tomurcuklanan ve yaklaşık olarak 2-5×3-7 µm büyüklüğündedir (Larone 2002) (Şekil 2.2). *C. albicans* ve *C. dubliniensis* gibi türler hif formunda veya psödohif gibi filamentöz tipte koloniler de oluşturabilmektedirler (Şekil 2.1). Hif ve psödohif arasındaki fark hangi yol ile oluştukları ile ilgilidir. Psödohifler maya hücrelerinden tomurcuklanma yoluyla oluşur, ancak yeni gelişenler ana hücreye yapışık olarak uzantılar gösterirler ve filamentler halinde daralarak, hücre-hücre bağlantılarını oluşturmaktadırlar (Şekil 2.1). Psödohifler arasında internal septalar bulunmaz (Şekil 2.1). Gerçek hifler ise maya hücrelerinden ya da mevcut hiflerin dallarından oluşmaktadırlar. Gerçek hiflerin gelişmesi “germ tüp” prensibiyle başlamakta daha sonra uzantılar ve yan dallar halinde septalarla bölünmüş fungal birimler şeklinde devam etmektedirler (Şekil 2.1).

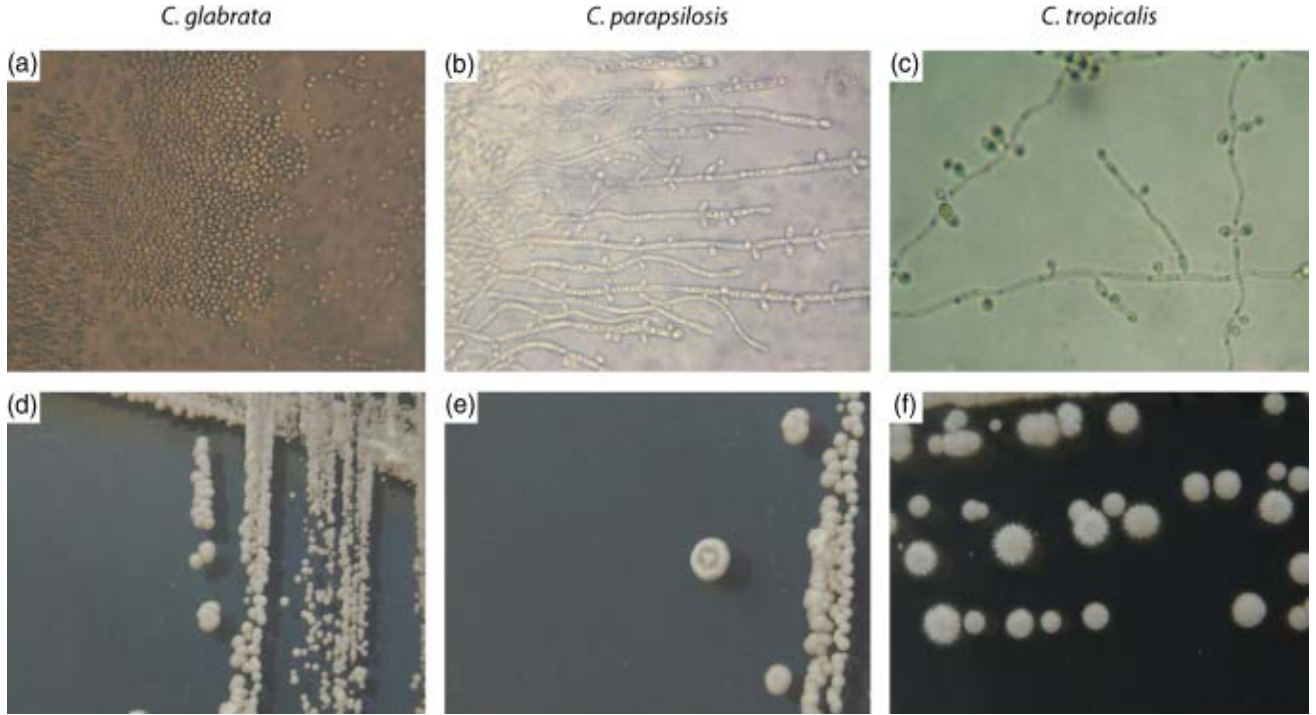
C. albicans ve *C. dubliniensis* gerçekte polimorfik yapıya sahip olup bu durum hif ve/veya psödohif oluşturma yetenekleriyle ilişkilidir. Bu türler germ tüp pozitif özelliği gösterirler (Calderone 2002) (Çizelge 2.2). Bunun yanında *C. glabrata* polimorfik olmayıp ve sadece maya formunda üremektedir (Çizelge 2.2, Şekil 2.1). Geçmişte bu tür psödohif formu olmadığından *Torulopsis* familyası içerisinde sınıflandırılmıştı. Ancak 1978’de psödohif oluşturma yeteneğinin *Candida*’lar için belirleyici bir ayırt edici faktör olmadığı anlaşıldığından, *Torulopsis glabrata*’nın insanlarda hastalık yapıcı bir etken olduğundan *Candida* familyasında yer alması önerilmiştir (Fidel ve ark 1999). *C. parapsilosis* ile ilgili olarak; bu türün gerçek hif oluşturmadığı fakat karakteristik geniş ve kıvrık psödohifler oluşturarak “dev hücre” formunda ürediği bilinmektedir (Larone 2002, Trofa ve ark 2008). Buna karşılık mısır özü agarda ve 25°C’ de 72 saatte, *C. tropicalis*’in oval blastosporlar bazı kaynaklara göre psödohif ve gerçek hifler oluşturduğu bildirilmiştir (Calderone 2002, Larone 2002, Yoshio ve Kouji 2006) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Candida albicans* suşlarının çeşitli morfolojik üremelerinin epifloresan fotokompozisyonu: (A)blastokonidya; (B1)tomurcuklanmayla üreme; (B2)germ tüp formasyonu; (C1)psödohif formasyonu; (C2)maya formu; (C3)hif formasyonu.

Çizelge 2.2. Çeşitli Candida türlerinin morfolojik özellikleri

Türler	Germ tüp	Hif/Psödohif	Mayaların büyüklüğü (µm)	CHROM-agar Candida besiyerindeki koloni rengi
<i>C. albicans</i>	+	+/+	4-6 x 6-10	Mavi-yeşil
<i>C. tropicalis</i>	-	±/+	4-8 x 5-11	Koyu mavi
<i>C.parapsilosis</i>	-	-/+	2.5-4 x 2.5-9	Beyaz
<i>C.glabrata</i>	-	-/-	1-4	Beyaz, pembe-mor



Şekil 2.2. *Candida* türlerinin Cornmeal Tween 80 agarda makroskopik kolonileri ve SDA'daki mikroskopik yapıları. Mikroskopik yapılar: (a)*Candida glabrata*, (b)*Candida parapsilosis*, (c)*Candida tropicalis*, makroskopik koloniler; (d)*Candida glabrata*, (e)*Candida parapsilosis*, (f)*Candida tropicalis*.

C. glabrata hücresi 1-4 μm boyutlarında olup, *C. albicans* 4-6 μm , *C. tropicalis* 4-8 μm ve *C. parapsilosis* 2.5-4 μm 'den daha küçük yapıdadır (Larone 2002) (Çizelge 2.2). SDA besiyerinde *C. glabrata* parlak, pürüzsüz ve krem rengi koloniler oluşturur (Şekil 2.2). Bu koloniler büyüklükleri dışında (diğer türlerden biraz daha küçük), çoğunlukla diğer *Candida* türlerinden ayırt edilemezler (Şekil 2.2). Ayrıca *C. parapsilosis*, SDA besiyerinde ürediğinde, beyaz, kremi, parlak/berrak ve pürüzsüz/buruşuk koloniler yapar (Şekil 2.2). Aynı ortamda *C. tropicalis* kolonileri az da olsa miselyum (hif kitlesi) ile sınırlı olup, krem renginde görülürler (Calderone 2002) (Şekil 2.2).

Candida türlerinin biyokimyasal özellikleriyle ilişkili olarak *C. glabrata* sadece glukoz ve trehalozu fermente etmektedir. *C. albicans* ise sükröz dışında birçok şekeri fermente ederken (Odds 1988). *C. tropicalis* sükröz ve maltozu fermente etmektedirler (Martin 1979). Geçmişte *C. parapsilosis* maltozu fermente edemediği için bir *Monilia* türü olarak sınıflandırılmaktaydı (Odds 1988, Trofa ve ark 2008).

Genetik faktörler açısından *C. glabrata*'nın ana ayırt edici özelliği, *C. albicans*'ın ve benzer diğer NCAC türlerinin diploid genoma sahip olmalarına karşılık, haploid genoma sahip olmasıdır (Fidel ve ark 1999). Genetik olarak *C. tropicalis* en çok *C. albicans*'a ve en az oranda ise *C. glabrata*'ya benzemektedir (Butler ve ark 2009). Moleküler genetik biliminin gelişmesiyle birlikte Candida'ların identifikasyonunda yeni metodlar ortaya çıkmıştır ki insanlarda infeksiyon etkeni olanların tanımlanması ve izole edilmesi buna en güzel örnektir.

Kandidiazisin laboratuvar tanısı tartışmalı bir şekilde devam etmektedir. NCAC türlerinin mikrobiyolojik doğrulamalarının yapılması zordur çünkü kan kültürü sonuçlarının %50'den fazlası negatif çıkabilmektedir (Ellepola ve Morrison 2005). İdrardan veya müköz membranlardan alınan pozitif örnekler, invaziv hastalığı mutlaka ortaya koymazken, sistemik infeksiyon esnasında teşhis edilebilmektedir (Ellepola ve Morrison 2005). Ayrıca, Candida türlerinin virulansları arasındaki farklılıklar, antifungal ilaç dirençlerine göre klinik teşhiste büyük öneme sahiptir.

Laboratuvar tanısı Candida'ların izolasyonu ve identifikasyonu için yeni metodların gelişmesiyle oldukça önemli hale gelmiştir. Türe özgü FISH (Alexander ve ark 2006) antikor-antijen teknikleri (Ellepola ve Morrison 2005) ve moleküler yaklaşımlar, tanı ve tiplendirmede başarıyla kullanılan bazı yöntemlerdir. Buna rağmen, bu tekniklerin çoğu henüz standardize edilmemiş veya onay almamış yöntemler olup klinik tanıda laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmamaktadır (Ellepola ve Morrison 2005).

Birçok laboratuvar standart yaklaşımlar çerçevesinde tanıyı non-moleküler yöntemlerle yapsa da Candida'ların identifikasyonunda PCR bazlı yöntemlerin kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır.

2.5.Candida'ların İdentifikasyonunda PCR Bazlı Olmayan Yöntemler

Kromojenik agarlar gibi bazı özel besiyerleri (CHROMagar™ Candida, Paris, Fransa) Candida'ların tiplendirilmesinde diğer besiyerlerine nazaran daha yeni ayırt edici ortamlar olup özellikle *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* türlerinin identifikasyonunda sıkça kullanılmaktadır. CHROMagar™ Candida agarda, *C. glabrata* kolonileri, beyaz, pembe veya mor olarak görülür. *C. albicans* kolonileri ise mavi-yeşil olarak ayırt edilir. *C. parapsilosis* kolonileri beyaz, *C. tropicalis* ise koyu mavidir. Primer kültürdeki farklı Candida türlerinin

sebepler olduğu koinfeksiyonlar da, aynı yöntemle tanınabilmekte ve bu infeksiyon kontrol stratejilerinde büyük öneme sahiptir (Ellepola ve Morrison 2005, Furlaneto-Maia ve ark 2007).

Candida izolasyonundan sonra izolatlar karbonhidrat sindirimi ve fermentasyon testleri ile de tanımlanabilmektedirler. Bunun yanında daha hızlı ve daha az yorucu fenotipik tanımlama yöntemleri daha etkin olarak kullanılır hale gelmiştir. Belki de en yaygın olarak kullanılan tanımlama yöntemleri, ticari kitlerdeki plastik çukurcuklarda karbonhidrat sindirimi ve/veya enzim taramalarının yapılmasıdır. *Candida* türlerinin tanımlanmasının tam olarak yapılamadığı durumlarda tür tanımlamasında Vitek *Candida* (bioMérieux, Fransa) Auxacolor (Bio-Rad, İngiltere) ve Uni-Yeast Tek System™ (Corning Medical, Roslyn, N.Y.) gibi testler sıklıkla kullanılmaktadır. Örneğin, *C. dubliniensis*'i, *C. albicans*'tan ayırt etmede kesin biyokimyasal veya morfolojik testlerden faydalanılmaktadır (Verweij ve ark 1999, Ellepola ve Morrison 2005). *Candida* türlerinin tanımlaması için, RapID Yeast System (Innovative Diagnostic Systems, Norcross), Fongiscreen test (Sanofi Diagnostic Pasteur, Fransa) ve otomatize Rapid Yeast Identification Panel (Dade Microscan) gibi bir günde sonuç veren testler de vardır. Fakat bahsedilen testlerin çoğu en sık karşılaşılan patojen mayaların kesin tanımlamasında kullanılmaktadır (Ellepola ve Morrison 2005).

İnvaziv kandidiazisin optimum tanısı, yeterli miktarda kan ve agar bazlı kan kültürü yöntemleriyle mümkündür (Pfaller 1992). Pozitif kan kültürü elde etmek için hem kısa zamanda, hem de hassas olarak ölçüm yapabilen ileri kan kültürü teknikleri geliştirilmiştir. Son zamanlarda, kan kültürü şişelerini görüntüleyebilen, renk bazlı, monitörize (BacT/ALERT 3D, Organon Teknika Corp., Durham, NC) ve floresans prensibine dayalı (BACTEC 9240, Becton Dickinson, ABD), olarak isimlendirilen yöntemler geliştirilmiştir (Ellepola ve Morrison 2005).

Candida türlerine ait tipik maya ve hişlerin dokudan yapılan mikroskopik muayenesinde invaziv veya yaygın kandidiazis tanısı için standartlar geliştirilmiştir. Maalesef bu yöntemlerin çoğu, örnekleme problemleri (izolasyon kaynağı ve örnek miktarı gibi) nedeniyle kullanılamamaktadır (Pfaller 1992). Floresan antikor, akrinin turuncu veya kalkoflor beyaz boyama (Pfaller 1992, Ellepola ve Morrison 2005) yöntemleri mikroskopik

tanı için duyarlılığı arttırır. Ancak, *Candida* türleri için spesifik floresan antikorların oluşması oldukça zordur.

PNA FISH (Fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes-peptid nükleik asit problemleri kullanılarak floresan in situ hibridizasyon) bazlı yeni laboratuvar metodlarına nazaran, 26S rRNA genin hedeflenmesi *C. albicans*'ın, 2.5 saat içinde, yüksek duyarlılık ve %100 özgüllükte diğer *Candida* türlerinden ayırmada başarıyla kullanıldığı bildirilmiştir (Rigby ve ark 2002). Son zamanlarda kullanılmaya başlanan bu yöntemin ekonomik olduğu ve kandidiazisin laboratuvar tanısında etkin olarak kullanılmaya başlandığı bildirilmiştir (Rigby ve ark 2002, Ellepola ve Morrison 2005, Alexander ve ark 2006).

2.6.Candida'ların İdentifikasyonunda PCR Bazlı Metotlar

Candida infeksiyonlarının tanısında kullanılan moleküler bazlı tekniklerden en etkilişi hiç kuşku yok ki PCR yöntemidir. Bu teknik kan ve doku örneklerinden oldukça fazla miktarda mikrobiyal nükleik asidi tanımlayabilmektedir. Son 10 yıl içerisinde *Candida* kökenli sistemik infeksiyonların tanısında PCR tekniğinin etkinliğini araştırmaya yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Chen ve ark 2000, Carvalho ve ark 2007, Orazio ve ark 2009).

PCR reaksiyonu, DNA'nın çift zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), daha sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyon) ve sonra zincirin uzamasını (polimerizasyon) (çift iplikçikli DNA'ların sentezi) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. PCR'in en önemli getirisi, spesifik primerlerin örnekler üzerinde direkt olarak kullanılabilir olması, diğer mikroorganizmalar veya konak DNA'sını amplifiye etmemesidir.

PCR duyarlılığını arttırmak için birçok araştırmacı fungal genom için amplifiye edilecek DNA bölgelerine özgü primerler oluşturmuşlardır. Mayalarda hedef tanı için en sık kullanılan PCR primerleri, 18S, 5.8S ve 28S rRNA alt ünitelerini kodlayan rRNA gen bölgesi için, internal transcribed spacer 1 (ITS1), ITS2 ve ITS4' tür (Haynes ve Westerneng 1996, Chen ve ark 2000). Daha yeni olarak, multipleks hedefler, real-time PCR için eşlenerek *Candida* türlerinin identifikasyonunda başarıyla uygulanmaktadır (Carvalho ve ark 2007, Orazio ve ark 2009).

Yeni moleküler yaklaşımların giderek atmasına rağmen hastanelerde PCR ekipmanı ve genetik laboratuvar yokluğu, örnek hazırlamadaki zorluklar ve kontaminasyon ve PCR için standart protokollerin olmamasından dolayı, kandidiazisin klinik tanısı için çoğunlukla non-moleküler teknikler kullanılmaktadır.

2.7.NCAC Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

Sistemik fungal infeksiyonlar giderek artan önemli mortalite ve morbidite sebebidirler. *Candida* türleri, hastanede yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen en önemli fungal infeksiyon etkenleridir (Pfaller ve ark 1998). Aslında, *Candida* türlerinden ileri gelen fungal infeksiyon insidensindeki artış, kanser hastaları, yoğun bakım hastaları ve postoperatif bakım hastaları gibi immunsupresif kişilerde daha çok dikkat çekmektedir (Kiehn ve ark 1980, Samaranayake ve ark 2002, Hagerty ve ark 2003). Sağlıklı bireylerin yaklaşık %31-55'inde *Candida* türlerinin en sık olarak ağız florasından, vulvovaginal bölgelerden ve üriner kanallardan izole edildiği bildirilmektedir. Geçmişte *C. albicans* türü klinik izolatların %70-80'ini oluşturmaktayken, NCAC türlerine ise çok nadir olarak rastlanmaktaydı. Fakat son yıllarda NCAC türleri insanlarda önemli fırsatçı patojenler olarak izole edilmeye başlanmıştır. *C. albicans*'ın en çok rastlanan hastalık yapıcı ajan olmasına rağmen infeksiyondaki azalan insidensi *Candida albicans* dışındaki diğer türlerin (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*) artan prevalansları buna örnek olarak gösterilebilir (Colombo ve ark 2003, Bassetti ve ark 2006)

İnvazif kandidiazis ile ilgili bir çalışmada *Candida* infeksiyonlarının %95'inin, *C. albicans*, *C.glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* türlerinin sebep olduğu bildirilmiştir (Pfaller ve Diekema 2007). Kanserli hastalar arasında yapılan 1980'lerde yapılan bir çalışmada izole edilen türlerin % 68'i *C. albicans*, %12'si *C. tropicalis*, %10'u *C.parapsilosis* ve %3' ünün de *C. glabrata* olduğu bildirilmiştir (Kiehn ve ark 1980). Çizelge 2'de 2000-2010 yılları arasında yapılan oral kandidiazis, kandidüri ve kandidemi vakalarına ait epidemiyolojik veriler görülmektedir. Bir çok yeni çalışmada fungemi vakalarının NCAC türlerinin frekansında önemli artışlar olduğu bildirilmektedir (Chakrabarti ve ark 2009, Pfaller ve ark 2010). *Candida* türlerinin coğrafi yerleşimlere ve hasta gruplarına göre önemli değişiklikler gösterdiği ve hatta bazı ülkelerde NCAC türlerinin *C. albicans*'a oranla daha yüksek prevalansa sahip oldukları bildirilmiştir (Colombo ve ark 2007). *C. glabrata* insidensi

yetişkinlerde çocuklara oranla daha yüksek olmakla birlikte yeni doğanlara göre daha düşük olarak bildirilmiştir (Krcmery ve Barnes 2002). Fakat *C. parapsilosis* yeni doğanlarda, transplantasyon hastalarında ve parenteral beslenen hastalarda önemli bir patojen olarak bilinmektedir (Trofa ve ark 2008). Ayrıca *C. tropicalis* nötropenili ve maligniteli hastalarda en sık izole edilen tür olarak bildirilmiştir (Colombo ve ark 2007). Uzun yıllardır *C. glabrata* sağlıklı bireylerde normal florada saprofit olarak bulunan, insanlarda ciddi infeksiyonlara sebep olmayan bir tür olarak kabul edilmiştir. Ancak immunsupresif tedavilerin artması ve beraberinde geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılmasıyla *C. glabrata* kaynaklı mukozal ve sistemik infeksiyonların sayısında önemli artışları olduğu gösterilmiştir (Hajjeh ve ark 2004). Her ne kadar Candida infeksiyonlarıyla ilişkili ölüm oranları, hastanın durumu ve etkene bağlı çeşitlilik gösteriyor olsa da, Avrupa Medikal Mikoloji Konfederasyonu'nun verilerine göre, kandidiazis infeksiyonu dağılımı NCAC türlerinden %14 oranında *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* ve %7 oranında *C. tropicalis* olarak bildirilmiştir (Tortorano ve ark 2006). Son zamanlarda Avustralya'da kandidüri etkeni olarak *C. glabrata*'nın öne çıktığı bildirilmiştir (Chen ve ark 2008). Diğer NCAC türleriyle karşılaştırıldığında *C. glabrata*'nın neden olduğu mortalite oranlarının daha yüksek oranda olduğu bildirilmiştir (Abi-Said ve ark 1997).

C. glabrata hasta florasındaki bir etken olarak ve daha az sıklıkta hastane infeksiyonu etkeni olarak bilinmektedir. *C. glabrata* hem çevre hem de insan rezervuarları arasındaki kompleks etkileşimi içeren infeksiyon etkeni olarak kabul edilmektedir. Yapılan iki çalışmada *C. glabrata*'nın direkt veya indirekt olarak kontaminasyon (muhtemelen hastane personelinin elleriyle etkeni bulaştırması) ile bulaşabileceği bildirilmiştir (Isenberg ve ark 1989, Vazquez ve ark 1993). Diğer benzer nozokomiyal patojenlerde olduğu gibi *C. glabrata* direkt veya indirekt olarak kontamine yüzeylerden bulaşabilmektedir. Bununla birlikte, *C. glabrata*'nın sağlık çalışanı yoluyla bulaşmasının açıklığa kavuşturulması önemli bir konudur. Son zamanlarda Candida türleriyle oluşmuş miks infeksiyonlarda en sık oral kandidiazisli hastaların %70'inde *C. glabrata* ve *C. albicans* kombinasyonunun görüldüğü bildirilmiştir (Redding ve ark 2002).

İlk başlarda *C. parapsilosis* non-patojenik bir tür olduğu kabul edilse de, endokarditli ölen bir hastadan etken olarak izole edilmesi etken olarak değerlendirilmesine yol açmıştır (Joachim ve Polayes 1940). Son 10 yıl içerisinde infeksiyon etkeni olarak *C. parapsilosis*

insidansında hızlı bir artış görülmüştür. Günümüzde *C. parapsilosis* kan kültürlerinden en sık izole edilen ikinci en önemli Candida türü olarak bildirilmektedir (Almirante ve ark 2006, Colombo ve ark 2007, Costa-de-Oliveira ve ark 2008). Ayrıca *C. parapsilosis*, insan elinden en sık izole edilen mantar türlerinden biri olduğu ve hastanede yatan hastaların doğal steril vücut bölgelerinden en sık izole edilen ikinci Candida türü olduğu bildirilmiştir (Bonassoli ve ark 2005). Bir çalışmada bu türün Kuzey Amerika'da %15.5, Avrupa'da %16.3 ve Latin Amerika'da %23.4 sıklıkla izole edildiği ve sadece *C. albicans*'tan daha az rastlanılan patojen olduğu belirlenmiştir. *C. albicans*'ın Kuzey Amerika'da %51.5, Avrupa'da %47.8, Latin Amerika'da %36.5 oranında izole edildiği bildirilirken, *C. glabrata*'nın ise Kuzey Amerika'da %21.3 oranında etken olarak izole edildiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte *C. parapsilosis* fungemisi, *C. albicans* ve *C. glabrata* fungemisiyle karşılaştırıldığında, %4 gibi düşük bir ölüm oranıyla seyretmektedir (Kossoff ve ark 1998).

Diğer Candida türlerine benzer olarak *C. parapsilosis* enfeksiyonu insidansındaki artış bir dizi risk faktörlerinden ileri gelmektedir. Bu faktörler arasında hiperalimentasyon sınırları içerisinde yüksek üreme kabiliyeti ve intravasküler kateterler ve prostetik materyallere yüksek affinite ve bu alanlara yüksek kolonize olma yetenekleri sayılabilir. Bunun yanında kanser hastalarının uzun süre santral venöz kateter veya kalıcı kateter ya da sondaya ihtiyaç duymaları *C. parapsilosis* enfeksiyonu riskini arttıran bir diğer risk faktörüdür. İspanya'da *C. parapsilosis*'li 72 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada enfeksiyonların %97'sinin vasküler kateter ilişkili olduğu, %91'inin önceden antibiyotik tedavisi aldığı, %54'ünün parenteral beslendiği, %46'sının operasyon hikayesi olduğu, %38'inin immunsupresif tedavi aldığı, %27'sinde malignite bulunduğu, %16'sının organ nakli hikayesi olduğu, %12'sinin nötropenik ve %11' ininde de kolonizasyon hikayesi olduğu bildirilmiştir (Almirante ve ark 2006) Brezilya'da 2002-2003 yılları arasında 64 vaka üzerinde yapılan bir çalışmada, primer risk faktörlerinin, nötropeni, santral venöz kateterler ve kanser kemoterapisi olduğu bildirilmiştir (Brito ve ark 2006).

Cildi veya gastrointestinal sistem kolonizasyonu, invazif kandidiazisin patogeneğinde çoğu kez ilk adım olmuştur ve özellikle yenidoğanlar bu tip enfeksiyonlara predispozitedir. Deri bütünlüğünün bozulduğu haller, gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına duyarlılık, uzun süre santral venöz kateter veya göbek kateteri takılı olanlar ve uzun süre entübe edilmiş hastalar da bu tip enfeksiyonlara karşı oldukça duyarlıdır (Benjamin ve ark 2000). Ayrıca gastrointestinal

Candida kolonizasyonlu yenidoğanların üçte birinden sağlıklı yenidoğanların ise %23'ünde orofarenksinden *C. parapsilosis* izole edildiği bildirilmiştir (Saiman ve ark 2001, Contreras ve ark 1994). Ayrıca diğer NCAC türleriyle karşılaştırıldığında *C. parapsilosis* kökenli infeksiyonlarda düşük ağırlıklı doğan bebeklerdeki ölüm oranlarının çok daha fazla olduğu ve bazen *C. albicans* ilişkili infeksiyonlardakine eşit oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir (Trofa ve ark 2008).

Candida tropicalis Candida'lar arasında en çok izole edilen üçüncü türdür (Alvarez-Lerma ve ark 2003, Bineli ve ark 2006, Colombo ve ark 2007, Hasan ve ark 2009). Özellikle *C. tropicalis* kan ve idrar kültürlerinden sık izole edilen maya türüdür (Kauffman ve ark 2000; Alvarez-Lerma ve ark 2003) (Çizelge 2). Brezilya'da 12 sağlık merkezinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *C. tropicalis* tüm kandidemilerin %33-48'ini oluşturan en sık izole edilen ikinci tür olmuştur (Colombo ve ark 2007, Miranda ve ark 2009). Ayrıca, *C. tropicalis* yoğun bakım hastalarından uzun süre kateterize edilmiş hastalar, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alanlar veya kanser hastalarından sürekli izole edilen bir türler arasında yer almaktadır. (Kauffman ve ark 2000, Rho ve ark 2004, Colombo ve ark 2007, Nucci ve Colombo 2007) *C. tropicalis*'in *C. albicans* ve diğer NCAC türleriyle karşılaştırıldığında, nütropenik hastalarda daha hızlı bir yayılma gösterdiği bildirilmiştir (Colombo ve ark 2007)

Bir çalışmada *C. tropicalis* ve *C. albicans* fungemileri arasında risk faktörleri açısından belirgin farklılıklar olduğu bildirilmiştir (Kontoyiannis ve ark 2001).

Bazı epidemiyolojik çalışmalar *C. tropicalis*' in, *C. albicans* ve diğer NCAC türlerine oranla daha yüksek mortaliteyle seyrettiğini göstermiştir (Krcmery 1999a, Kontoyiannis ve ark 2001, Eggimann ve ark 2003, Colombo ve ark 2007). *C. tropicalis* kökenli mortalitenin bu denli yüksek seyretmesinin biyofilm formasyonu, proteinaz sentezi ve dimorfizm gibi virulans faktörleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Krcmery 1999b, Negri ve ark 2010a).

2.8.C. albicans'lerde Virulans Faktörler

Kandidiazis insanlarda deri, oral kavite ve özafagus, gastrointestinal sistem, vajina ve vasküler sistemin yaygın bir infeksiyonudur. Bununla birlikte immunsupresyon veya çeşitli nedenlerle bağışıklık sisteminin zayıflaması Candida infeksiyonları için en önemli sebep olup

mikroorganizmaya ait çeşitli virulans faktörleri ise hastalığın oluşumu ve şiddetiyle ilişkilidir. Candida'larda virulans faktörler arasında konak tanıyıcı biyomoleküller (adezinler), morfogenez (tek hücreli mayalar ve filamentöz, büyüme formları arasında geri dönüşümlü değişim), gizli aspartil proteinaz ve fosfolipazlar sayılabilir.

Candida'lar insanlarda hastalık oluşturan önemli patojenler arasında yer alır. Çevre koşullarına spesifik savunma yöntemleriyle, çeşitli anatomik bölgelerde kommensal olarak hayatta kalabilmeleri çok yönlü patojen olmalarıyla ilişkilidir. Bu sebeple *C. albicans* ve diğer Candida türlerinin oluşturduğu hastalıkların spektrumunu diğer birçok kommensal mikroorganizmaların sebep olduğu infeksiyonlardan daha fazla ve daha ciddidir. Örneğin *Escherichia coli*, normalde insanların barsaklarında kolonize olmakta ve bazen geçici bir süre oral kavitede ve nadiren vajinal mukozada da görülebilirken, Candida'lar ise bahsedilen bu alanlarda kommensal olarak bulunmakta ve fırsatçı infeksiyonlara sebep olabilmektedir. Mukozal yüzeylerde, beslenme bozuklukları bakteriler ve mantarlar arasında kompetitif davranış şekli, daha güçsüz olan mikroorganizmanın selektif eliminasyonuna neden olmaktadır. Floradaki birçok bakteri beslenme bozuklukları veya fazlalıkları sırasında, kendi katabolik ve anabolik metabolik yollarını regüle eder; insanlardaki patojen mantarların da, hayatta kalabilmek için muhtemelen aynı yolu izledikleri düşünülmektedir. Örneğin Candida'larda birçok spesifik genin katabolik proteinleri kodladığı ve bu genlerin bazılarının, mikroorganizmanın kommensal ve patojen olarak hayatını devam ettirmede rol oynadığı düşünülmektedir (De Backer ve ark 2000).

Mukozal flora üyeleri arasındaki kompetitif çekişmenin yanısıra konakçı dokuları spesifik yanıtlarına karşı *Candida albicans* gibi etkin patojenler bir takım fizyolojik adaptasyon mekanizmalarıyla ortamın pH'sı gibi parametrelere ayak uydurmak zorunda kalmaktadır. Kan dolaşımı veya dokulardaki nötral pH'da mikroorganizmanın hücre duvarı sentezine yardımcı olan vajinal kanalda nötral ortamda optimum adaptasyon sağlamaya yardımcı olan pH-regülatörü gen 1 (*PHR1*) rol oynamaktadır. *PHR1*' in etkisi sona erdiğinde ikinci pH-regülatörü gen (*PHR2*) devreye girmekte ve benzer etkiyi asit pH'da göstermektedir (Saparito-Irwin ve ark 1995, Ghannoum ve ark 1995, Muhlschlegel ve Fonzi

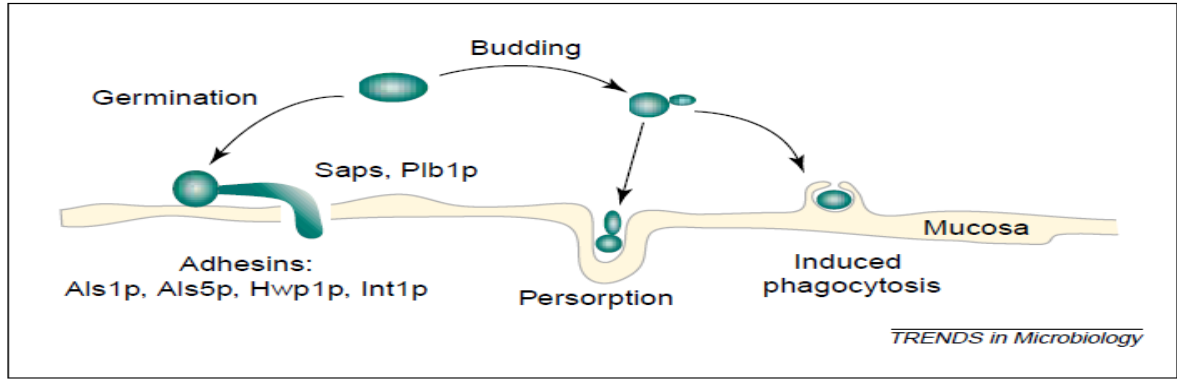
1997). Bu örnek, Candida'ların konak dokularına adaptasyonunda rol oynayan fizyolojik adaptasyon

mekanizmalarından sadece biridir. Buna ek olarak, Candida türleri, predispoze faktörler varlığında konakçıyı istila ederek geniş ölçüde spesifik immun defektler oluşturmaktadır. Buna rağmen Candida türleri fırsatçı patojendirler. Candida türlerinin konakta belli bazı anatomik lokalizasyonları olup buralarda infeksiyon oluşturabilmektedirler. Kandidiazis sıklığı, bu hastalığın ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (Wenzel 1995, Pfaller ve ark 2000, Fidel ve ark 1999). Bu nedenle Candida türleri, ABD'de ve birçok ülkede en önemli dördüncü nozokomiyal infeksiyon sebebi olup bu hastalarda mortalite oranının %35'lere varan kandidemiye neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca AIDS hastalarının %70'inde orofarengeal kandidiazis geliştiği bildirilmektedir. Bunun yanında her 100 kadından yaklaşık 70'inin bir kez de olsa Candida türlerinden ileri gelen vajinit öyküsü olduğu ve kadınların yaklaşık 20'sinde nükslerin görüldüğü bildirilmektedir (Fidel ve ark 1999).

Candida infeksiyonlarına karşı son dönemlerde bölgesel özel immun koruyuculuktan bahsedilmektedir. Örneğin hayvan modellerinde sistemik invazyona karşı koruyuculuk, vajinite karşı koruyuculuk şeklinde bahsedilmektedir (Fidel ve ark 1999). T-hücre immun yanıtı, orofarengeal kandidiazis, kutanöz ve vajinal infeksiyonlara karşı önemli koruyuculuk sağlasa da, sistemik hastalığa karşı oluşan direnç, nötrofil veya mononükleer fagositler gibi immun hücrelerce oluşturulan fonksiyonel fagositik yanıt ile daha sık ilişkilendirilmektedir. Orofarengeal kandidiazisli AIDS hastalarında, CD4⁺ hücre sayısındaki azalma, hastalık seyri ve nüksü ile ilişkilendirilse de, AIDS hastalarında hastalıklarının terminal evresine kadar, kan yoluyla geçen sistemik infeksiyonlar gelişmemektedirler. Bulgular AIDS hastalarında vajinit insidansının diğer hasta popülasyonlarına göre daha fazla olmadığını göstermektedir. Bu nedenle CD4⁺ hücreleri oral mukoza ile karşılaştırıldığında vajinal mukozadaki koruyuculukla ilişkilendirilmemektedir. Candida türlerine karşı oluşan antikorlar, anahtar epitoplara birleştiğinde birkaç kandidiazis hayvan modelinde koruyucu olduğu gösterilmiş ve humoral immun yanıtın kompleman sistem ve diğer kalıtsal komponentler gibi koruyucu dengenin bir parçası olabileceğini düşündürmektedir (Han ve ark 1998). Bu organizmalardaki immun mekanizmanın biraz komplike olduğu görülmektedir. Kandidiazise karşı korunmada konak savunma mekanizmalarının tümü olaya dahil olmaktadır. Bu mekanizmalardan birinde

herhangibir aksamanın meydana gelmesi hastalığın oluşması ya da nüksü ile sonuçlanmaktadır. Candida'larda fenotipik değişimin mikroorganizmanın patojenitesinde

farklılıklar doğurduğu gösterilmiştir. Kandidiazis patogenezinde mukozal yüzeyde meydana gelen ilk reaksiyonlar Şekil 2.3'de şematize edilmiştir.



Şekil 2.3. Bir maya hücrenin germinasyon, tomurcuklanma ve mukozadan penetrasyon aşamaları

Bir *C. albicans* maya hücresi hem tomurcuklanma aşamasında (sağda) hem germinasyon safhasında (solda) hem de mukozadan penetrasyonu gösterilmiştir. Ancak, maya hücrenin persorpsiyonu (ortada), tomurcuklanan hücrelerin submukozaya alınması ile sonuçlanmaktadır. Sağda, bir maya hücrenin mukoza hücresi tarafından fagositozu görülmektedir. Bu olaylar, adezinler [*ALS1p*, *ALS5p* (*ALA1p*), *HWP1p* ve *INT1p*] ve enzimlerin (*SAPS* ve *PLB1p*) kontrolü altında gerçekleşmektedir. Germ tüp, farklı antiijenlerin maya hücresiyle karşılaştırması biçiminde şematize edilmiştir. Fenotipik dönüşümün patogeneze olan etkisi, antiijenik değişimlerin yanı sıra organizmanın dokuya özel affinitesi ile ilişkilendirilebilir.

Candida'ların insanlarda hem bir patojen hem de mukozal yüzeylerde kommensal mikroorganizmalar olduğunu unutmamak gerekir. Ne yazık ki, Candida'ların kommensallığı ile patojenliği arasındaki farkların ne olduğu hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu nedenle

virulans faktörlerinin belirlenmesi mikroorganizmanın patojenitesi hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir.

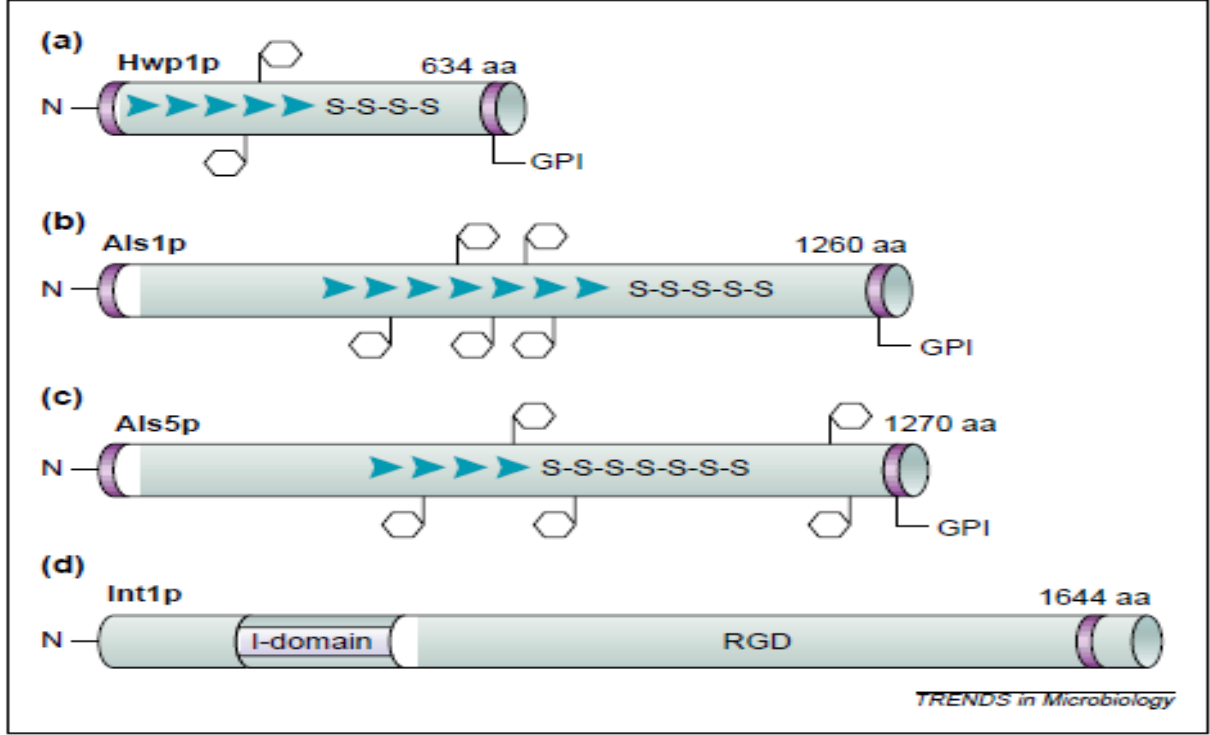
2.9.Candida'larda Virulans Faktörleri

Candida'larda virulans diğer patojen mikroorganizmalarda olduğu gibi konak yanıtıyla yakın ilişkilidir. Mikroorganizmanın konak hücre proteinlerine veya mikrobiyal reseptörlere bağlanması konağı patojen mikroorganizma adezyonlarına karşı korumakta ise de Candida'larda bazı virulans faktörler konağın infekte olmasına yol açabilmektedir.

Virulanlıkta çeşitli ayrıştırıcı enzimlerin önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Bir görüşe göre izotropik üremeye (tek-hücre, maya) nazaran, maya hücreleri ve filamentöz üreme arasındaki dönüşümün (morfogenez) invazyonu kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Cole ve ark 1993, Enache ve ark 1996). Bu konuda yapılan çalışmalar beyaz-opak değişim üzerinde yoğunlaşmıştır. Buna göre bir suşta (WO-1) ve klinik izolatlarda da gözlenen her bir fenotipik değişim esnasındaki koloni morfolojisi ve rengi kastedilmektedir. Yapışma özelliklerindeki değişimler, antijenik ifade ve doku affinitesi, koloni fenotipindeki farklılıklara eşlik etmektedir. Hayvan modellerinde oksotrofik mutantların virulan olmadığı da gösterilmiştir. Ancak, virulans faktörleri hakkında incelemeler hala çok sınırlı ve metabolik yollarla bu faktörlerin ilişkilendirilmesi konusu biraz belirsiz ve bahsedildiği gibi, bu hedefler, yeni antifungal ajanların geliştirilmesi için son derece önemlidir.

2.9.1.Adezinler

Candida'ların konak hücrelerine yada konak hücre ligantlarına yapışmasını sağlayan biyomoleküllerdir. İnfeksiyonun gelişmesi Candida'lar ve konakçı arasındaki interaksiyona bağlıdır. Bu konuda çoğu tartışma bir konak tanıma proteinini kodlayan bir gen çifti üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu gen tarafından kodlanan proteinler Çizelge 2.3 ve Şekil 2.4' de verilmiştir. Yapışmayı ölçen testler sınırlıdır ve görünebilen hücre bağlanması, radyometrik bağlanma, tüm hücre-ligant bağlanmaları ve kandidal adezyon-ligant bağlanmalarını içerir (Sundstrom 1999, Staab ve ark 1999, Tsuchimori ve ark 2000).



Şekil 2.4. *C. albicans*'a ait adezin polipeptitleri.

Yukarıda, *C. albicans*'a ait adezin polipeptidlerinin (a-d), mannozil transferazları olan ve muhtemelen mannan sentezinde adrens rolü oynayan *MNT1p* ve *PMT1p* dışındakilerin şeması verilmiştir. *ASP1p* ve *ALS5p* (*ALA1p*), amino ucu, nispeten serbest glikozilasyon, uzunluk yönünden değerlendirilen ancak büyük ölçüde korunan tandem tekrarlarının merkezi domeni (ok uçları) ve *ALS* protein ailesi içerisinde en az korunan serin yönünden zengin karboksil ucu olmak üzere üç domeni kapsar. Şekilde hegzagonlar olarak belirlenen N-glikozilasyon bölgeleri de görülmektedir. *Als* proteinlerinin altında *INT1p* gösterilmiştir. Bir I-domeninin (ligand bağlanması) *Staphylococcus aureus* fibrinojen bağlayan proteini *CLFA* homologu olan domene yakın bir yerde lokalize olduğu görülmektedir. Bu proteinlerden her birinin geniş (büyük) O-glikozilasyona sahip olduğu tahmin edilmektedir. Salgı noktaları,

glikozilfosfatidilinositol (GPI) bağlantı noktaları veya mor bantlar şeklinde görülen transmembran domenleri olarak bildirilen hidrofobik bölgeler gösterilmiştir. S = Ser/Thr domenleri.

2.9.2. *ALS1p* ve *ALS5p*

C. albicans' ın *ALS1p*' i, *S. cerevisiae* α -aglütinin proteini ile homolog olan 7 glikozile protein ailesinin bir üyesi olup, birleşmede hücre-hücre tanışmasını gerektiren bir proteindir. Her *ALS* geninin sahip olduğu ortak özellikler; her birinin 3 domeni olması, 1299-1308 nükleotidden (433-436 amino asit) oluşması, çeşitli büyüklükte bir santral domene sahip olmaları, 108 bp ardışık dizilim göstermeleri, serin-treonin bakımından zengin proteinleri kodlayan çeşitli uzunluktaki 3' domen içermeleri sayılabilir (Şekil 2.4). *ALS* ailesi bir GPI olarak kabul edilen tipik gizli protein ve hidrofobik karboksil grubu özelliği taşımaktadır. Ligand bağlanmasının proteinlerin amino grubu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. *ALS1'in* ailedeki diğer proteinlerin karakterizasyonundan geniş ölçüde sorumlu olduğu bildirilmiştir (Hoyer 2001).

C. albicans için hem *ALS1p* hem de *ALS5p* (*ALA1p*)'nin adezyon fonksiyonu sağlamada rol oynadığı düşünülmektedir (Gaur ve ark 1999). Ayrıca, *ALS1p*'nin bir fare modelinde hematogen yayılım açısından önemli virulans faktörü olduğu gösterilmiştir (Fu ve ark 1999).

2.9.3. *HWPIp*

HWPI ayırıcı tarama sisteminden orijinal hif ve germ tüp spesifik gen olarak izole edilmiştir (Staab ve ark 1996, Sundstrom 1999). *HWPI* amino grubuyla uyumlu bir dış yüzey mannoproteinini kodlamakta ve karboksil grubuyla hücre duvarı β -glukan ile kovalent bağla birbirine bağlanmaktadır (Staab ve ark 1996) (Şekil 2.4). *HWPI'* in amino grubu sekansı (prolin ve glutamin rich domeni), transglutaminaz (*Tgase*) substratlarını andırmaktadır.

Çizelge 2.3. *Candida albicans* ve *Candida glabrata*'nın adezinleri

Adezinler	Ligant	Mutant fenotip ^b		Diğer
		<i>In vitro</i> Tutunma	Virulans ^c	
<i>ALS1p</i>	HBEC, Endo ^a	Azalmış	Azalmış	Aglutin benzeri sekans proteinleri
<i>ALA1p</i> (<i>ALS5p</i>)	FN	ND	ND	Aglutin benzeri sekans proteinleri
<i>HWP1p</i>	HBEC	Azalmış	Azalmış	Stabilize tutunma, <i>Tgase</i> substratı
<i>INT1p</i>	Epitelyal	Azalmış	Azalmış	İntegrin benzeri protein
<i>MNT1p</i>	HBEC	Azalmış	Azalmış	Tip I mannozil transferaz

^aEndo, insan umbilikal veni endotelyal hücreleri

FN: Fibronektin;

HBEC: İnsan bukkal epitelyal hücresi

ND: Belirlenemedi

Tgase: transglutaminaz.

^bParental hücrelerle karşılaştırıldığında, heterozigot veya yeniden yapılandırılan suşlar; *ALS1* ve *ALS5* (*ALA1*), *Saccharomyces cerevisiae*'da heterolog görünüm.

^cHematojen dissemine fare modeli.

Aslında *Tgase* enzimi varlığında rekombinant *HWPIp*, N^Σ-(γ-glutamil) proteinin C-putresin'e kovalent bağla bağlanması (Calderone ve Braun 1991) bir enzimin epitel hücre proteinlerine N^Σ-(γ-glutamil) lizin izopeptid bağları aracılığıyla çapraz olarak bağlanması anlamına gelmektedir (Staab ve ark 1999). Eğer *HWPIp*, *Tgase* için bir substrat gibi görev yapsaydı, *C. albicans* hiflerinin insan bukkal epitelyum hücrelerine (HBEC) sabit ve kovalent

olarak non-kovalent bağlanmaları önleyebilen reaktiflerle bile geri dönüşümsüz olarak bağlanması gerekecekti. *C. albicans*'ın bir *HWPI* suşunun *Tgase* için bir substrat gibi indirgeyici aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Hematojen yayılımı olan bir fare modelinde, ana veya tek gen delesyonu olan suşlardan daha az virulan olduğu gösterilmiştir (Staab ve ark 1999).

Bir çalışmada *HWPI* baskılanmış bir *C. albicans* mutantta farelerde mortalitede azalma görüldüğü, infekte farede böbreklerde yerleşmenin daha zor olduğu ve daha az endotelial hücre hasarının olduğu bildirilmiştir (Staab ve ark 1999). Bu çalışma *HWPI*'in mikroorganizmanın hücre adezyonu ve virulansında oynadığı rolü doğrulamaktadır.

2.9.4.INT1p

C. albicans, fibronektin, laminin ve kollajen I ve IV gibi çeşitli ekstraselüler matriks (ECM) ligandlarına bağlanmaları gibi aktiviteleriyle memeli hücre reseptörlerinden integrin ailesini andırmaktadırlar. Hatta Western Blot analizlerinde integrin proteinlerinin α-zincirlerine karşı oluşan monoklonal antikorların *C. albicans* proteinlerine bağlandığı gösterilmiştir. Bu nedenle *C.albicans* protein benzeri bir integrin gibi değerlendirilmiştir. *C. albicans*'ın kabul görmüş bir integrin geni (*INT1*) tanımlanmıştır. *INT1* divalan katyon düzeninde yaklaşık %18 oranında insan α-M integrin domenine benzerliği ile tanımlanabilen I-domen içermektedir. Doğaldır ki, *C. albicans* sekansının memeli integrinine oranla daha düşük tanımlanma oranı, bu proteinin bir integrin proteini olmayabileceğini de düşündürmektedir.

INT1 bazı ilginç özellik ve fonksiyonlara sahiptir (Gale ve ark 1998). Birincisi divalan katyon bağlayan domene karşı yükselen antikor oranları, organizmaların maya hücreleriyle

reaksiyona girip hücre yüzeyi protein tabiatını doğrulamaktadır. İkincisi, *S. cerevisiae*'nin heterolog karakteri, insan epitelyum hücrelerine yapışan germ tüptekine benzer biçimde uzayan hücreler şeklinde olmasıdır. Üçüncüsü, genetik transformasyona uğramış *S. cerevisiae* hücreleri, *C. albicans*'da olduğu gibi kümeleşmektedir. *INT1* geni olmayan *C. albicans* suşları, daha az virulandır, epitelyal hücrelere daha güçsüz bağlanırlar (%40 daha az) ve milk-

tween ve Spider agarda filamentasyonda da daha yetersizdir. Bu durumda *INT1*'in *C. albicans* için yapışma ve filamentasyonda önemli rol oynadığı söylenebilir. Bu yöndeki son bilgilere göre, bir hücre filament proteini olan talin, aktin hücre filamentini modüle ederek, *INT1* proteini ile birlikte morfogenezde katılmaktadır (Alleson ve ark 2001).

2.9.5.MNT1p

MNT1 (α -1,2 mannoziltransferaz) geni adezyonda rol alıp mikroorganizmanın konak yüzeyine güçlü şekilde bağlanmasında rol oynamaktadır, bu genden yoksun mantarların avirulan olduğu bildirilmiştir (Buurman ve ark 1998). *MNT1p* mantarlarda, hem O- hem de N-mannoz formasyonu bir tip II membran proteindir. Mannan (mannoz polimeri olan bir hücre polisakkaridi-hücre duvarının başlıca bileşeni), konak dokuyu tanımak için gerekli bir proteindir. Enzim aktivitesi için karboksil ucu katalitik domene sahip olması gerekmekte olup, enzim ko-faktör olarak hem manganez hem de çinkoya ihtiyaç duyar. Aynı zamanda O-glikoz formasyonu mannoziltransferazı kodlayan gen olan *PMT1*'in de epitelyum dokuya adezyon için gerekli olduğu bildirilmiştir (Timpel ve ark 1998).

Çizelge 2.4. *C. albicans*'ın transkripsiyonal proteinleri ve morfogenez^a

Proteinler	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> homologları	Mutant fenotipi ^b		Referanslar
		Morfogenez	Virulans	
<i>CPH1p</i>	<i>STE12p</i>	Spider ağarda azalma	10 ⁶ = to wt 10 ⁴ = avir.	40
<i>EFG1p</i>	<i>PHD1p</i>	Anormal filamentler	10 ⁷ ~to wt 10 ⁵ = az vir.	40,46
<i>TUP1p</i>	<i>TUP1p</i>	Esas filamentler	ND	60
<i>RBF1p</i>	?	Esas filamentler	ND	61
<i>CZF1p</i>	-	Hifal üremede azalma	ND	59

<i>RIM101p</i>	<i>RIM101p</i>	Hifal üremede azalma	Azalmış	41-43,48
----------------	----------------	----------------------	---------	----------

^a**Avir:** Avirulan **ND:** Belirlenemedi. **Vir:** Virulan **Wt:** Wild type ^bEşlenmiş suşlarla karşılaştırılma

2.9.6.Morfogenez

Morfogenez, tek hücreli maya hücrelerinin filamentöz büyüme yapan forma geçişi olarak tanımlanabilir. *C. albicans* hem psödohifal hem de hifal büyüme formuna geçiş yapabilmektedir. Candida'lar içinde sadece *C. albicans* ve *C. dubliniensis* her iki tip filamentöz büyüme yeteneğine sahiptir. Bu yüzden bu türler izotropikal (maya) veya apikal (psödohif ve hif) gelişme yeteneğine sahiptir ve çoğalma aşamalarında tam anlamıyla polimorfik olarak tanımlanmaktadır. Morfogenezle ilişkili olarak *C. albicans*'ın filamentöz formu ile virulansı arasındaki ilişkiyi kanıtlamak için uzun yıllardan beri çalışılmasına rağmen bu konuda somut sonuçlar elde edilememiştir (Odds 1988). Günümüzde kullanılmakta olan modern moleküler yöntemler sayesinde yeni yeni morfolojik yapı ile mikroorganizma virulansı arasındaki ilişkiyi ortaya koyulabilmiştir. Bazı araştırmacılar tarafından altı çizilerek belirtilmiş olduğu gibi çoğu lezyon hem maya formundaki hem de filamentöz formdaki Candida'lar tarafından oluşturulmakta ve her ikisinin de hem infeksiyon gelişiminde hem de infeksiyonun seyri üzerinde rolü bulunmaktadır (Lo ve ark 1997, El Barkani ve ark 2000, Chen ve ark 2000, Calera ve Calderone 2001, Lengeler ve ark 2000, Riggle ve ark 1999) (Çizelge 2.3).

Morfogenezi düzenleyen sinyal transdüksiyonu metabolik yolları hakkında edinilen bilgilerin çoğu *S. cerevisiae* için yapılan çalışmalar sonucu elde edilmiştir. Candida'larla ilgili birçok bilgi *C. albicans* homologu olan *S. cerevisiae* mutantlarındaki ilgili defektlerin tamamlanması veya baskılanması yoluyla identifiye edilmiştir. Yakın bir geçmişte araştırmacılar *S. cerevisiae*'nın besin bakımından zayıf ortamlarda psödohifal gelişim gösterdiğini bildirmişler ve psödohiflerin besin arama fonksiyonu olduğunu öne sürmüşlerdir. Birbirine bağlı iki metabolik yol bu fenotiple ilişkilendirilmiş ve sadece *S. cerevisiae* için değil aynı zamanda *C. albicans* için de tanımlanmıştır (Lo ve ark 1997, Brown ve Gow 1999,

Lengeler ve ark 2000). *C. albicans* için bu yollardan ilki *STE12* homologlarının birleşmesini ve *S. cerevisiae* psödohif metabolik yolunu ihtiva etmektedir. Bir *C. albicans* homologu olan *STE12p* fosforilasyon mekanizması *CST20 (STE20)*, *HST7 (STE7)* ve *CEK1 (KSS1)*' i de kapsayan mitojen aktive protein (MAP) kinaz metabolik yolu ile düzenlenen *CPH1p*'dir (Brown ve Gow 1999, Lengeler ve ark 2000).

Bahsedilen proteinlerin çok az kısmı morfogenezi stimüle eden proteinlerdir olup morfogenezi baskılayan *TUP1p* ve *RBF1p* gibi diğer önemli proteinlerin olduğu da bildirilmiştir. *C. albicans TUP1p* proteini, %67 oranla *S. cerevisiae* proteiniyle benzerlik göstermektedir. *S. cerevisiae* mutantlarının psödohifal üremesi azalırken (Braun ve Johnson 1997) *TUP1*'de delesyona uğramış *C. albicans* suşları, temel olarak hif formundadır ve bu nedenle, bu iki proteinin birbirine zıt fonksiyonları vardır; çelişkili bir biçimde *C. albicans TUP1*, *S. cerevisiae*' da *TUP1* mutasyonu tamamlamaktadır.

Çizelge 2.5. Aspartil proteazların (*SAPS*) kandidiazis ile ilişkisi.

Analiz (Assay)	Kan/derin doku	Oral	Deri	Vajinal
Virulans	<i>SAP1-4, 6</i>	?	?	<i>SAP2</i>
Ekspresyon	-	<i>SAP1-3, 6, 8</i>	<i>SAP1-3, 6, 8</i>	-
Yöntemler	Delesyon mutantlar	RT-PCR immun mikroskopi	RT-PCR immun mikroskopi	Mutantlar

RBF1p DNA bağlayan bir protein olup *TUP1p* gibi *RBF1* delesyonu olan *C. albicans* mutantlarının filamentöz büyümeye yatkın olduğu bildirilmiştir. Bir çalışmada *RBF1* proteininin telomer uzunluğu ve ribozomal protein gen (*RPG*) kümesini tanımak açısından

önemli olabileceğini bildirilmiştir (Ishii ve ark 1997). Morfogenez için gerekli olan diğer metabolik yollar arasında hücre duvarı entegrasyonu [protein kinaz C (*PKC*)] ve ozmoregülasyon [iki bileşik yüksek ozmolariteli gliserol (*HOG1*)] metabolik yolları sayılabilir (Calera ve Calderone 1999, Calera ve ark 1999). İlginç olan *C. albicans* *HOG1p* metabolik yolunun, ozmoregülasyon ile tam olarak bağlantılı olmadığıdır. Diğer histidin kinaz

proteinlerinin (*CHK1p* ve *COS1/NIK1*) morfogenez için gerekli olduğu bildirilirken, *PHR1*, *CHK1*'de olduğu gibi mikroorganizmanın invaziv hastalık oluşturmasında rol oynadığı fakat vajinal infeksiyonda rolünün olmadığı bildirilmiştir (Calera ve Calderone 1999).

2.9.7. İnvazyona Yol Açan Enzimler

Aspartil proteinaz (*SAP*) ve fosfolipaz (*PL*) *Candida*'larda virulansla ilişkilendirilen iki büyük enzim ailesini oluşturmaktadır. Bilinen 4 fosfolipazdan (*PLA*, *PLB*, *PLC* ve *PLD*) sadece *PLB1*'in kandidiazis hayvan modelinde yapılan çalışmalarda mikroorganizmanın virulansında rol oynadığı gösterilmiştir. *In vitro* şartlarda gen delesyonunun olduğu suşlarda fosfolipaz enzim üretiminin azaldığı ve virulansta azalmanın olduğu gösterilmiştir (Ghannoum 2000). *PLB1p* aktivitesinin hif formlarının doku invazyonu sırasında rol ynadığı bildirilmektedir (Ghannoum 2000). *PLB1p* 84-kDa ağırlığında bir glikoprotein olan *PLB1p*'nin hem hidrolaz hem de lizofosfolipaz-transakilaz aktivitesine sahip olduğu düşünülmektedir.

Aspartil proteinazlar sadece *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. paraposilosis* ve *C. guilliermondii*'de de gösterilmiştir (Monod ve ark 1994, Zaugg ve ark 2001). *SAP1-9* enzimleri sentezinden sorumlu gen büyüklükleri yaklaşık 1170' den 1780 bp' e kadar değişmektedir. *SAP* gen ailesi, hastalık oluşturma potansiyellerine göre, RT-PCR yöntemiyle mutant kökenler üzerinde çeşitli yöntemlerle çalışılmıştır (Çizelge 2.4). Gine domuzları ve fare modellerinde yapılan çalışmalarda *SAP1-6*'da görülen tek gen delesyonlarının invazif hastalık oluşturma potansiyelini azalttığı gösterilmiştir (Hube ve ark 1997, Sanglard ve ark 1997). *SAP1-6*'nın invazif hastalık oluşturmada önemli rol aldığı düşünülmektedir. Başka bir çalışmada *in vitro* oral kandidiazis modeli oluşturulmuş bu modelde *SAP1-8*'in transkripsiyonel takibi yapılmıştır. Çalışmada *SAP1-3*'ün doku infeksiyonundan 48 saat *SAP6*'nın 48 saat, *SAP8*'in ise 60 saat sentezlendiği tespit edilirken, *SAP4* ve *SAP5*'e

rastlanmamıştır. *Candida* infeksiyonlarında doku hasarı en yoğun olduğu zaman dilimi ilk 48 saat olarak bulunmuştur.

2.9.8.Fenotipik Değişim

Bir çalışmada düşük doz UV ışığının, yüksek frekanslarda (3×10^{-3}), *C. albicans*'ın R koloni oluşumunda ve orijinal S kolonileri için 9×10^{-4} gibi yüksek bir frekansta ortaya çıktığı gösterilmiştir. Koloni fenotipindeki değişimin dönüşümlü olduğu ve yüksek frekanslarda şekillendiği bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise 3153A suşunu kullanılarak, bu çalışma genişletilmiş ve "yıldız, benekli, şapka, düzensiz buruşuk ve hatları belirsiz" gibi ek koloni tiplerini gözlemlemiştir (Slutsky ve ark 1985). Bu koloni tiplerinden bazılarının bir başka tipe dönüştüğünde farklı fenotipler arasında yüksek frekansta değişimin olduğu tespit edilmiştir. İlginç olan suşa özel fenotipik değişimin aynı besiyeri kullanıldığında dahi gözlenmesi olmuştur.

Tüm fenotipik değişimler içerisinde en çok çalışılanı beyaz S kolonilerin gri yassı kolonilere dönüştüğü WO-1 suşundaki beyaz-opak dönüşümdür. Bu iki koloni tipinde 37°C 'de pH 6.7'de hücre şekli (beyaz hücreler yuvarlak-yumurtamsı ve opak hücreler uzamış veya fasülye biçiminde) ve hücre yüzey yapıları (sadece opak hücrelerde görülen kabarık form) arasında çeşitli farklılıklar ortaya çıkmaktadır (Slutsky ve ark 1987, Anderson ve ark 1990)

Fenotipik değişimin *Candida*'ların virulansında nasıl rol oynadığı sorusu yoruma açıktır. Bir çalışmada vajinitli veya sistemik infeksiyonu olan hastalardan izole edilen suşların yüksek frekansda fenotipik değişim gösterdiği bildirilmiştir (Soll 1988, Jones ve ark 1994). Fenotipik değişimin hastalık oluşumu ile direkt ilgisi olup olmadığının veya sadece genom varyasyonlarını mı belirttiğinin tespiti için oldukça önemlidir. Kütanöz model çalışmasında opak hücrelerin deriyi beyaz-faz hücrelerinden daha fazla kolonize edebildiği ancak, hayvan modeli çalışmalarında daha az virulan oldukları bildirilmiştir (Soll 1988, Jones ve ark 1994). Kısaca belirtmek gerekirse, *Candida*'ların koloni morfolojisini de içeren bir dizi faktörün

mikroorganizmanın lokalize oldukları anatomik bölge de dahil olmak üzere oldukça önemli olduğu söylenebilir.

2.10.NCAC Türlerinde Patogenite ve Virulans Faktörleri

Candida türlerinin patojenitesi; adezyon, konak dokuda veya medikal araçlarda biyofilm oluşturma, konak savunmasından korunmak ve doku hasarına neden olacak hidrolitik enzimler (proteaz, fosfolipaz ve hemolizin) üretmek gibi bir dizi virulans faktörleriyle ilişkilidir.

Hayvan modeli çalışmalarında kandidiazisde en sık izole edilen patojen türün *C. albicans* olduğu ve *in vitro* araştırmalarda diğer türlerle karşılaştırıldığında *C. albicans*'ın daha yüksek virulans faktörlerine sahip olduğu bildirilmektedir (Samaranayake ve Samaranayake 2001, Jayatilake ve ark 2006). Fakat mayaların hayvanların olağan patojenleri olmadığından bu tip çalışmaların Candida türlerinin patojenitesi hakkında gerçeği yeterince yansıtmadığı savunulmaktadır. Ayrıca Candida türleri, cilt, oral kavite, gatsrointestinal sistem, vajina ve vasküler sistemde kolonize olup, hastalık yapabilmektedir. İnfeksiyon oluşturabilmek için, fırsatçı patojenler, immun sistemden kurtulup, sistemik infeksiyonlara yol açabilmekte ve diğer doku ve organlara ulaşabilmektedir.

2.10.1.Adezyon ve Biyofilm Formasyonu

Candida infeksiyonlarındaki primer adım ilk kolonizasyonu gerçekleştirebilmek için ortamdaki dokulara yapışma (adezyon)'dır. Adezyon veya tutunma organizmanın konakçı dokudaki dayanıklılığını artırır ve hastalığın oluşmasında esas rol oynar. Bunun yanında Candida'lar medikal aletlerin yüzeyine yapışma ve yüzeylerinde biyofilm oluşturma yeteneğine de sahiptir. Hücre duvarı proteinlerinin yapısı ve hücre yüzeyinin fizyokimyasal özellikleri yapışmayı etkileyen önemli faktörlerdir (Chaffin 2008, Anil ve ark 2001, Henriques ve ark 2002).

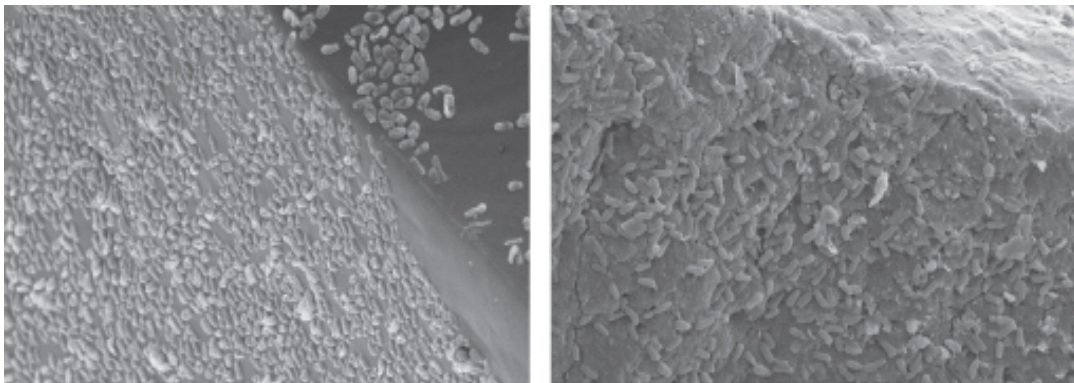
Adezinler konak hücre reseptörlerine spesifik olarak bağlanan Candida hücre yüzeyi proteinleridir. *C. glabrata*'da adezinlerin büyük bir kısmı, epitelyal adezin (EPA)'ler olarak adlandırılmaktadır (De Las Penas ve ark 2003). EPA proteinlerinin genel yapısı *C. albicans* türünün ALS (agglutinin-like sequence) proteinlerine benzemektedir. *C. glabrata* EPA proteinleriyle ilgili yapılan birkaç çalışmada EPA1p'nin glikol konjugatlarını ihtiva eden N-asetil laktozamine bağlanan kalsiyum bağlayıcı lektin olduğu bildirilmektedir (Cormack ve ark 1999). Ayrıca, EPA geninin bulunmasına rağmen EPA1p'nin ortamdan kaldırılması *in vitro* adezyonda azalmaya yol açmaktadır (De Las Penas ve ark 2003). Bunun yanında EPA6'nın *in vivo* üriner sistem infeksiyonlarında yükseldiği bildirilmiştir (Domergue ve ark 2005).

Fungal hücre yüzeyi konak dokularda veya medikal araçlarda fizyokimyasal reaksiyonların gerçekleştiği ve tutunmayı sağlayan ana bölgedir (Cannon ve Chaffin 1999). Çalışmalarda Candida hücre duvarı ile hücre adezyonu arasında bir ilişki olduğunu gösterilmiştir (Panagoda ve ark 2001). Sınırlı sayıda *C. glabrata* izolatıyla yapılan bir çalışmada hücre duvar yapısının *C. albicans* türüne oldukça yakın olduğu bildirilmiştir (Hazen ve ark 1986). *C. albicans* türünün permeabilitesinin spesifik üreme şartlarına karşı oldukça duyarlı olduğu, birçok *C. glabrata* izolatının aynı üreme koşullarına karşı daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (Kikutani ve Makino 1992). Ayrıca, Candida hücrelerinin silikon lateks kateterler adezyon yapamadıkları da bildirilmiştir. Bunun sebebinin ise hücre permeabilitesinin adezyon için tek başına yeterli bir faktör olmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Camacho ve ark 2007).

Candida'ların konak dokuya/medikal araçlara ilk bağlanmasını hücre bölünmesi, proliferasyon ve biyofilm oluşturması takip eder (Ramage ve ark 2006). Biyofilmler ekstraselüler matriks içine gömülü yüzey ilişkili mikroorganizma toplulukları olarak tanımlanmıştır. Biyofilm mikroorganizmaların en çok rastlanan üreme formu olarak nitelendirilmektedir (Al-Fattani ve Douglas 2006). Biyofilm formasyonu birçok Candida türü için, önemli bir virulans faktörü olup, mikroorganizmaların kimyasalların yüzeye penetrasyonunu kısıtlayıp konak immun sisteminden korunarak, antifungal tedaviye direnç gösterdikleri bildirilmektedir (Donlan ve Costerton 2002). Genellikle *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* izolatları tarafından üretilen biyofilmler biyofilm üretemeyen izolatlarla karşılaştırıldıklarında yüksek morbidite ve mortaliteyle

ilişkilendirilmiştir (Kumamoto 2002). Biyofilm formasyonu oluşumunun türe, suşa ve çevresel koşullara (pH, besiyeri bileşimi, oksijen yoğunluğu) büyük ölçüde bağlı olduğu düşünülmektedir (Ramage ve ark 2006, Jain ve ark 2007). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada *C. glabrata*'nın, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* ile karşılaştırıldığında, üriner sistemde infeksiyonlarında silikon yüzeylerde daha fazla biyofilm üretme yeteneğinin olduğunu gösterilmiştir (Silva ve ark 2010b). SDA'da yapılan araştırmalarda ise bu durumun

tersi gözlenmiştir (Silva ve ark 2009a). Zenginleştirilmiş besiyerinde, diğer NCAC türleriyle karşılaştırıldığında, *C. glabrata*'nın biyofilm formasyonu oluşturma yeteneğinin daha az olduğu bildirmiştir (Shin ve ark 2002). *Candida tropicalis* izolatları, silikon ve latex kateterlerde biyofilm formasyonu oluşturma yeteneklerine göre sınıflandırılmıştır (Şekil 2.5) (Redding ve ark 2002, Silva ve ark 2009a, Negri ve ark 2010b). *C. parapsilosis* türlerinin yüksek glikoz ve lipid konsantrasyonları ihtiva eden besiyerlerinde üretildiklerinde biyofilm oluşturdıkları gözlenmiştir. Bu durum parenteral beslenen hastaların kan dolaşımı infeksiyonlarındaki yüksek prevalansla ilişkilendirilmişlerdir (Nosek ve ark 2009). Bu türün, plastik medikal araçlara olan seçici affinitesi, üriner kateter ve damar yolu kateterlerinde kolonize olma yeteneğini arttıran biyofilm formasyonundan ileri gelmektedir (Weems 1992, Trofa ve ark 2008). Öte yandan, *C. albicans* ve *C. parapsilosis* biyofilmleri daha ince, daha yapısız ve sadece kümelenmiş blastosporlardan ibarettir (Kuhn ve ark 2002). Bir çalışmada *C. parapsilosis* gibi yeni tanımlanmış olan iki *Candida* türünün (*C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis*) de biyofilm oluşturma yeteneklerinin olduğu gösterilmiştir (Lattif ve ark 2009).



Şekil 2.5. *C. tropicalis* biyofilmlerinin elektron mikroskopi görüntüsü

24 saat uygulanan (a)silikon (b) lateks idrar kateterleri üzerinde oluşan *Candida tropicalis* biyofilmlerinin tarama elektron mikroskobu görüntüsü (Ölçek çubuğu = 20 µm)

RBF1p DNA bağlayan bir protein olup *TUP1p* gibi *RBF1* delesyonu olan *C. albicans* mutantlarının filamentöz büyümeye yatkın olduğu bildirilmiştir. Bir çalışmada *RBF1* proteininin telomer uzunluğu ve ribozomal protein gen (*RPG*) kümesini tanımak açısından

önemli olabileceğini bildirilmiştir (Ishii ve ark 1997). Morfogenez için gerekli olan diğer metabolik yollar arasında hücre duvarı entegrasyonu [protein kinaz C (*PKC*)] ve ozmoregülasyon [iki bileşik yüksek ozmolariteli gliserol (*HOG1*)] metabolik yolları sayılabilir (Calera ve Calderone 1999, Calera ve ark 1999). İlginç olan *C. albicans HOG1p* metabolik yolunun, ozmoregülasyon ile tam olarak bağlantılı olmadığıdır. Diğer histidin kinaz proteinlerinin (*CHK1p* ve *COS1/NIK1*) morfogenez için gerekli olduğu bildirilirken, *PHR1*, *CHK1*'de olduğu gibi mikroorganizmanın invaziv hastalık oluşturmasında rol oynadığı fakat vajinal infeksiyonda rolünün olmadığı bildirilmiştir (Calera ve Calderone 1999).

2.11.Epidemiyoloji

Candida türleri yaygın olarak bulunan türlerdir (Odds 1988). İmmünyüpresif hastalar, opere hastalar ile nötropenik hastalarda *Candida* infeksiyonlarında artışlar olduğu bildirilmiştir (Beck-Sague ve ark 1993, Bodey 1986, Bross ve ark 1989, Horn ve ark 1985, Komshian ve ark 1989, Wey ve ark 1989).

Candida türleri en sık olarak oral kaviteden izole edilmekte ve sağlıklı bireylerin yaklaşık %31-%55'inin normal florasında bulunmaktadır (Odds 1988).

Kolonizasyon oranları hastalığın ciddiyetine göre ve hospitalizasyon esnasında artmaktadır (Odds 1988, Vazquez ve ark 1988, Wey ve ark 1989).

Geçmişte *C. albicans* infekte hastaların %70-%80'ninden, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* türlerinden her biri hastaların yaklaşık %5-%8'inden, diğer non-*albicans* türler ise ender olarak izole edilmekteydi (Banerjee ve ark 1991, Beck-Sague ve Jarvis 1993).

Fakat günümüzde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *C. albicans*'dan diğer non-*albicans* türlerine (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei*) doğru mikolojik bir

kayma olduğunu bildirilmektedir (Banerjee ve ark 1991, Beck-Sague ve Jarvis 1993, Komshian ve ark 1989, Merz ve ark 1986, Meunier ve ark 1994, Wingard ve ark 1979, Wingard ve ark 1991, Wingard ve ark 1993).

Candida hastanede yatan hastalarda kan kültüründen izole edilen en önemli dördüncü etkendir (Beck-Sague ve Jarvis 1993).

C. glabrata son zamanlarda görülen önemli nozokomiyal patojenlerden biri olup epidemiyolojisi hakkında yeterli bilgi mevcut değildir. *C. glabrata*, antifungallere, özellikle

de azollere karşı, doğal olarak artan direnci nedeniyle özel öneme sahiptir (Fox ve ark 1991, Hickey, Sommerville ve F. J. Schoen. 1983, Warnock ve ark 1988, Wingard 1994, Wingard ve ark 1993).

Candida infeksiyonları ve kolonizasyonlarının epidemiyolojisi hakkında net bir bilgi edinmek zordur çünkü, tam anlamıyla tür ayrımını yapabilecek güvenilir bir yöntem bulunmamaktadır. Günümüze kadar yapılan çalışmaların çoğu gerçek tür farklılıklarını yansıtmayan fenotipik yöntemlere dayalı çalışmalardan oluşmaktadır (Dembry ve ark 1994, Howell ve W. C. Noble. 1990).

Bununla birlikte en son moleküler sistemlerin kullanıma girmesiyle beraber araştırmacılar daha hassas tiplendirme olanakları bulmuşlardır (Dembry ve ark 1994, Eisenstein ve Engleberg 1986, Howell, Anthony ve Power 1996, Howell ve Noble 1990, Merz 1986, Vazquez ve ark 1991, Vazquez ve ark 1993).

Çeşitli moleküler yöntemleri (RFLP, CHEF, RAPD) içeren DNA parmakizi yöntemleriyle, fenotipik benzerliği olan ve birbirine çok yakın ilişkili olan kökenlerin ayrımını yapmak mümkün olabilmektedir (Dembry ve ark 1994, Howell ve ark 1996, Khattak ve ark 1992, Steffan ve ark 1997, Vazquez ve ark 1991, Vazquez ve ark 1993).

Epidemiyolojik çalışmalar göstermiştir ki insanlar yiyecek ve diğer kaynaklar yoluyla, defalarca Candida'lara maruz kalmaktadır. Candida'ların normal florada kolonizasyonlarının haftalarca, aylarca ve yıllarca kommensal olarak bulunması yeterince anlaşılammıştır. Bireylerde en sık kolonize olan tür hala *C. albicans*'tır ve hiçbir *C. albicans* suşu veya non-albicans türlerinden hiçbiri spesifik olarak gastrointestinal sistemden identifiye edilememiştir.

2.12.Filamentöz büyüme

Doku invazyonunda hifaların büyük rol oynadığı ve *in vitro* araştırmalar hifa formu olmayan *C. albicans*'ın vahşi tip *C. albicans*'a göre dokulara daha az invaze olduğu gösterilmiştir (Jayatilake ve ark 2006). Ayrıca, Candida türlerinin filamentöz formları (hif/psödohif) mayalarla karşılaştırıldığında fagositoza karşı daha dirençli olduğu grlmştir (Gow ve ark 2002). *C. tropicalis*'in morfolojik yapısı, *C. albicans*'a benzerlik göstermekte ancak, birkaç çalışmada *C. tropicalis*'in morfolojisinin virulanstaki önemi gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada *C. tropicalis*'in sadece filamentöz formlarının oral epitelyuma invaze olabileceği gösterilmiştir. *C. parapsilosis* de ise hifal dönüşümün suşa özgü bir biçim sergilediği gösterilmiş, *C. albicans* ve *C. tropicalis*'ten farklı olarak oral epitelyuma invazyonu psödohifal ürün ile ilişkilendirilmemiştir (Enger ve ark 2001, Silva ve ark 2009b).

2.13. Antifungal Tedaviler ve NCAC Türlerine Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

Antibiyotiklerle karşılaştırıldığında antifungal ajanların gelişmesi belirli ölçüde sınırlı kalmıştır. Bu durumun konak hücreye zarar vermeyen ökaryotik mantar hcreti üzerinde etkili bir ajanın identifikasyonunda karşılaşılan doğal problemlerin bir sonucundan kaynaklandığı düşünülebilir. Antifungal ilaçlara karşı direnç gelişimi büyük bir problemdir. İlaça ve tre bağlı olarak antifungal direnç mekanizması hem doğal, hem de önceden duyarlı mikroorganizmanın ajanla karşı karşıya gelmesinden sonra gelişen direnç gibi sonradan kazanılmış olabilir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Ocak 2011, Haziran 2012 tarihleri arasında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na identifikasyon amacıyla getirilen numuneler kullanılarak yapılmıştır.

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Araçlar

- Etüv (Heal Force HF90, Çin)
- Santrifüj (NF 048; Nüve, Türkiye)
- PCR Cihazı (Thermal cycler, Techne Flexigene™, İngiltere)
- Elektroforez ünitesi (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD)
- UV Transillumunator (Wealtec, Dolphin-View, ABD)
- Otomatik pipetler (Discovery Autoclavable, Polonya)
- VITEK-2 Compact (bioMérieux S. A., Fransa)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- AST-YS06 antifungal duyarlılık kiti (bioMérieux S. A., Fransa)
- Agaroz (Sigma-Aldrich, Almanya)
- *Bln I* (*Avr I*) restriksiyon enzimi (Roche Diagnostics®, Mannheim, Almanya)

- Brom-fenol (Sigma-Aldrich, Almanya)
- DNA Ladder (100 bp, Fermentas, Vilnius, Litvanya)
- Etil Alkol (Merck, Almanya)
- Etidium Bromid (Sigma-Aldrich, Almanya)
- *Msp* I restriksiyon enzimi (SibEnzyme®, Novosibirsk, Rusya)
- Potasyum dihidrojen fosfat, KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Proteinaz K (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Potasyum klorür, KCl (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Sodyum hidrojen fosfat, Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Sodyum klorür, NaCl (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Sükröz (Sigma-Aldrich, Almanya)
- TAE Elektroforez Tamponu 50X
- ZR Fungal/Bacterial DNA kiti (Zymo Research, ABD)

3.2. Örneklerin Toplanması ve Kültivasyon

Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nin çeşitli poliklinik ve servislerinde tedavi gören hastalardan alınan numuneler (idrar, vajen sürüntüsü, yara, bronkoalveoler lavaj, kan, torakosentez mayii, diğer) mikrobiyoloji laboratuvarında incelemeye alınmıştır (Çizelge 3.1). Örneklerin bölümlere göre toplandığı birimler Çizelge 3.2'de verilmiştir. Bölümlerden gönderilen klinik örneklerin kültürü için SDA (Sabouraud Dekstroz Agar) besiyeri kullanıldı. Ekim yapılan plaklar 37 °C'de 48 saat inkübe edildi. İdrar kültürlerinde koloni sayısının $\geq 10^5$ cfu/ml olması, diğer klinik örneklerde ise saf ya da baskın

üreme olması patojenite kriteri olarak kabul edildi (Forbes BA ve ark, 2002). *Candida* kökenleri örnek tipine göre koyun kanlı agar (bioMèrieux, Fransa) veya Saboraud-Dextroz agar (bioMèrieux, Fransa) besiyerlerinde 37 °C'de 48 saat inkübasyondan sonra saf olarak elde edildi (Şekil 3.1, 3.2). Mikrobiyolojik değerlendirmede germ tüp testi pozitif olan kökenler *Candida albicans* olarak değerlendirildi. Albicans dışı türlerin ise değerlendirilmesi için biyokimyasal testlerin kullanımı esasına dayanan otomatize sistem (Vitek-2, bioMèrieux, Fransa) ve kiti ile yapıldı. Ayrıca, izole edilen *Candida* kökenlerinin ticari firma önerileri

doğrultusunda AST-YS06 (bioMèrieux, Fransa) kiti kullanarak antifungal direnç durumları belirlendi.

Çalışmada standart kökenler olarak; *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 22019), *Candida glabrata* (ATCC 32554) suşları kalite kontrolü amacıyla kullanıldı. *Candida* türlerinin antifungal ajanlara karşı MİK değerleri CLSI kriterleri doğrultusunda duyarlı (S), orta duyarlı (I) ve dirençli (R) şeklinde değerlendirildi. Amfoterisin B MİK aralığı standart olmadığından MİK ≥ 2 mg/l ise dirençli kabul edildi (National Committee for Clinical Standarts 2002).



(Şekil 3.1) SDA Besiyerinde *Candida* kolonileri



(Şekil 3.2) Kanlı Agarda Candida kolonileri

İdentifikasyonu fenotipik yöntemlerle belirlenen kökenlerin PCR-RFLP analizleri için genomik DNA ekstraksiyonları ve PCR amplifikasyonu yapılarak, *Msp* I ve *Bln* I enzimleri ile amplifikasyon ürünleri kesimleri yapılarak restriksiyon fragment analizleri sonucu genotipik identifikasyonları da yapıldı.

Çizelge 3.1. Suşların izolasyonunun yapıldığı örnek tipleri.

Örnek tipi	Sayı
İdrar	120
Vajen sürüntü örneği	17
Yara	5
Kan	3
Bronkoalveoler lavaj	2
Torakosentez mayii	1
Diğer	2

Çizelge 3.2. Klinik örneklerin bölümlere göre toplandığı birimler.

Suşların izole edildiği servisler	Hasta sayısı
Dahili Yoğun Bakım	33
Kadın Hastalıkları ve Doğum	27
Dahiliye	19
Cerrahi Yoğun Bakım	18
Üroloji	11
Beyin ve Sinir Cerrahisi	8
Göğüs Hastalıkları	6
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	5
Dahiliye-Endokrinoloji	4
Ortopedi ve Travmatoloji	4
Enfeksiyon Hastalıkları	4
Dermatoloji	4
Koroner Yoğun Bakım	2

Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	2
Kardiyoloji	1
Çocuk Nörolojisi	1
Göz Hastalıkları	1
Toplam	150

3.3. Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar

3.3.1. Kanlı Agar

Ticari olarak toz kanlı agar besiyeri (Blood-Agar, bioMèrieux, Fransa) 40 gr tartılıp, 1000 ml'ye tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Sterilazyondan sonra oda ısısında 30 dk bekletilen karışım içerisine 50 ml koyun kanı katılıp karıştırıldı. Hazırlanan besiyeri 9 cm çapında steril petri plaklarına dökülerek katılaştıktan sonra kullanıldı.

3.3.2. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)

Ticari olarak toz SDA besiyeri (Sabouraud %4 Dextrose Agar, bioMèrieux S. A. France) 65 gr tartılıp, 1000 ml tamamlandı. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildikten sonra içine, 0.04 gr Kloramfenikol ve 0.5 gr sikloheksimid katılarak karıştırıldı. Kloramfenikol 10 ml % 70'lik alkolde eritildikten sonra ilave edildi. Hazırlanan besiyeri 9 cm çapında steril petri plaklarına dökülerek katılaştıktan sonra kullanıldı.

3.3.3. 50X TAE Elektroforez Tamponu: 1 litre

– 242 gr Tris Base (Sigma-Aldrich, Almanya)

- 57.1 ml Glasiyal asetik asit
- 100 ml 0.5 M etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (pH 8) (Sigma-Aldrich, Almanya)

Tris base, 600 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra glasiyal asetik asit ve son olarak EDTA eklendi. Son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. TAE 50X olacak şekilde stok solüsyon olarak hazırlandı ve 1xTAE olacak şekilde sulandırılarak kullanıldı.

3.3.4. Yükleme Tamponu (6X)

- 40 gr sükkroz
- 0.25 gr Bromfenol mavisi

Yukarıda miktarları verilen maddeler karıştırılarak 100 ml olacak şekilde bidistile su içinde çözdürüldü. Porsiyonlanarak -20 °C'de muhafaza edildi.

3.3.5.Fosfat Buffer Tamponu (PBS)

- 8.0 gr NaCl
- 0.2 gr KCl
- 1.15 gr Na₂HPO₄
- 0.2 gr KH₂PO₄

tartılarak distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. pH'sı 7.2 olacak şekilde ayarlanarak +4°C'de saklanır.

3.4. Genomik DNA ekstraksiyonu

Genomik DNA ekstraksiyonu için ticari olarak temin edilen ZR Fungal/Bacterial DNA kiti (Zymo Research) kullanıldı. Ekstraksiyon adımları aşağıdaki şekilde uygulandı.

- Parçalayıcı boncuk ihtiva eden tüpler numaralandırıldı. Bu tüplerin içerisine 750 µl lizis solüsyonu kondu.

- Üzerine 200 µl su veya izotonik bufferda (örnek PBS) bekletilen 50-100 mg (ıslak ağırlık) mantar hücresi alındı. 5 dk vortekslendi.
- 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Spin filtrelerine (Zymo-Spin™ IV Spin Filter) 400 µl süpernatant alındı. Yeni toplama tüplerinin içine oturtuldu ve 7000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Üstteki filtreler atıldı. Toplama tüplerindeki filtrat üzerine 1200 µl mantar DNA'sı bağlama tamponu eklendi.
- Bu karışımdan 800 µl Zymo-Spin™ IIC Column içerisine alındı ve toplama tüplerinin üzerine oturtuldu.
- 10000 rpm'de 1 dk vortekslendi.
- Alttaki tüpler atıldı. Yeni toplama tüpleri üzerine oturtuldu.
- Üzerine 200 µl DNA Pre-Wash Buffer eklendi. 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Zymo-Spin™ IIC Column içerisine 500 µl yıkama tamponu kondu ve 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Collection tüpleri atıp Zymo-Spin™ IIC Column'ları 1,5 µl'lik ependorflara oturtuldu.
- Zymo spin II'lerin üzerine 75 µl elüsyon tamponu kondu. 10000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi.

3.5. PCR Amplifikasyonu

İzole edilen genomik DNA örneklerinden, ITS 1 ve ITS 4 primerleri kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı. Bu işlem öncesinde PCR reaksiyon karışımı hazırlandı. Buna göre, her hasta numunesi için bir ependorf tüpüne 36.8 µl distile su, 5 µl buffer, 1 µl dNTP, 0.2 µl Taq DNA polimeraz, 3 µl MgCl₂, 1 µl forward primer, 1 µl reverse primer koyuldu. İyice vortekslendi ve üzerine 2 µl genomik DNA ilave edildi. Toplamda 50 µl bir hacim elde edildi ve aşağıdaki amplifikasyon döngüsü uygulandı (Çizelge 3.3) (Şekil 3.3).

Çizelge 3.3. Thermal cycler amplifikasyon döngüsü

Aşama	Tanımlama	Sıcaklık	Süre	
1	İlk denatürasyon	94 °C	5 dk.	
2	Denatürasyon	94 °C	1 dk.	} 35 döngü
	Bağlanma (Annealing)	56 °C	1 dk.	
	Uzama	72 °C	1 dk.	
3	Son uzama (final extension)	72 °C	7 dk.	
4	Bekleme	+4 °C		



Şekil 3.3. PCR Cihazı (Thermal cycler, Techne Flexigene™, İngiltere)

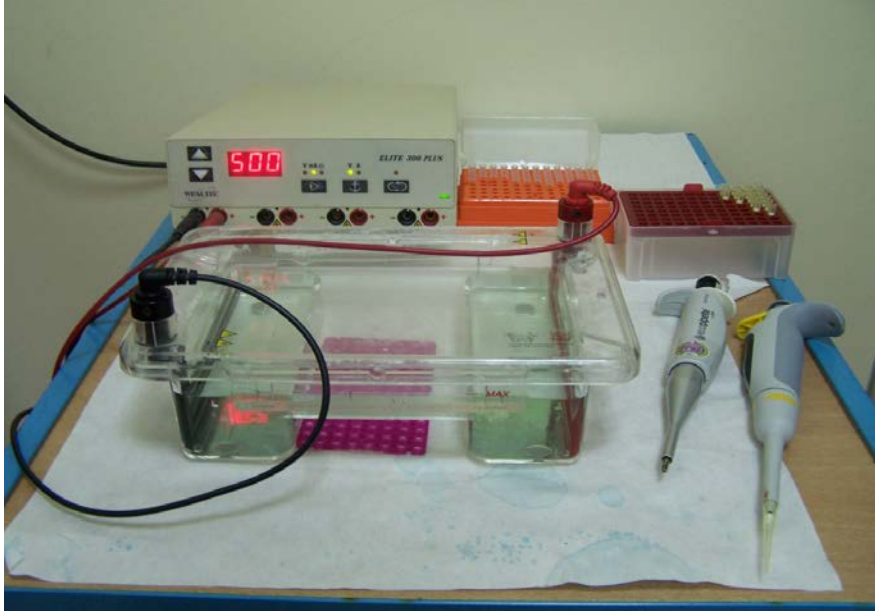
3.5.1. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrez Tekniği ile Görüntülenmesi

PCR işleminden sonra amplifikasyon ürünlerinin varlığı % 2'lik agaroz jelde yürütülerek araştırıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu kullanıldı. TAE 50X olacak şekilde stok solüsyon olarak hazırlandı ve 1xTAE olacak şekilde sulandırılarak kullanıldı.

- 50X TAE Elektrofrez Tamponu: 1 litre
- 242 gr Tris Base (Sigma-Aldrich, Almanya)
- 57.1 ml Glasiyal asetik asit
- 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) (Sigma-Aldrich, Almanya)

242 Gram Tris base 600 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra glasiyal asetik asit eklendi. En son olarak EDTA eklendi ve son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

1. Elektroforez için stok TAE solüsyonundan 1xTAE olacak şekilde distile su ile dilüe edildi.
2. 1 gr agaroz tartılarak 100 ml'lik bir erlenmayere konuldu, 50 ml 01X TAE tamponu eklendi (%2'lük agaroz) ve 10 mg/ml'lik etidyum bromid'den 4 µl ilave edildi.
3. Mikrodalga fırında 1-2 dk kaynatıldı.
4. Elektroforez tarakları jel dökme kabına, tabanda 1mm boşluk kalacak şekilde ayarlanarak yerleştirildi.
5. Yaklaşık 60° C'ye kadar soğutulan agaroz jeli, jel kabına dökülüp donması için oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.
6. Taraklar dikkatlice çıkartılarak jel kabı elektroforez tankına (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD) yerleştirildi (Şekil 3.4)
7. Amplifiye edilen örneklerden 7'şer µl 3µl loading (yükleme) tamponu ile karıştırılarak jelde açılan kuyucuklara yerleştirildi.
8. Yükleme sırasında DNA marker (100 bp'lik, Fermentas, Vilnius, Litvanya) kullanıldı.
9. Jele elektrik akımı (15 Volt/cm) verilerek 30 dk elektroforez yapıldı.
10. Yaklaşık 30 dk sonra yürütme işlemi durdurularak jel görüntüleme cihazı (Wealtec, Dolphin-View, ABD) ile bantların varlığı incelendi (Şekil 3.5).



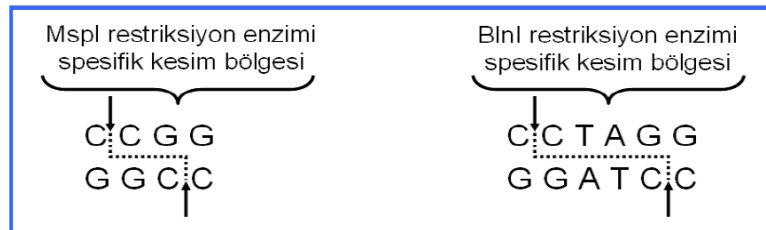
Şekil 3.4. PCR ürünlerinin yürütüldüğü elektroforez ünitesi (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD).



Şekil 3.5. Jel elektroforez sonrası PCR ürünleri görüntüleme cihazı (Wealtec Dolphin-View, ABD, UV Transilluminator).

3.6 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Amplifikasyondan sonra elde edilen PCR ürünlerinin, RFLP analizi için *Msp* I ve *Bln* I restriksiyon enzimleriyle kesimleri yapıldı. *Msp* I ve *Bln* I enzimlerinin DNA üzerindeki hedef bölgeleri Şekil 3.6’da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. *Msp* I ve *Bln* I enzimlerinin DNA üzerindeki hedef bölgeleri

3.6.1. *Msp* I ve *Bln* I ile Restriksiyon Enzim Analizi

PCR amplifikasyon ürünü toplam hacmi *Msp* I/*Bln* I enzimi ile 25 µl olacak Çizelge 4 ve Çizelge 5’de belirtilen oranlarda hazırlandı. Kesim işlemi 37 °C’de 4 saat inkübe edilerek gerçekleştirildi.

Çizelge 3.4. Kesim Karışımı (*Msp* I)

Kimyasal	Hacim
PCR ürünü	10 µl
Distile su	9 µl
10xBuffer	5 µl
<i>Msp</i> I enzimi	1 µl

Çizelge 3.5. Kesim Karışımı (*Bln* I)

Kimyasal	Hacim
PCR ürünü	10 µl
Distile su	9 µl
10xBuffer	5 µl
<i>Bln</i> I enzimi	1 µl

3.6.2. Kesim Ürünlerinin Analizi

Kesim ürünlerinin kontrolü %3 konsantrasyonda hazırlanan agaroz jelde yapıldı. *Msp* I ve *Bln* I kesim enzimleriyle kesilen PCR ürünlerinden 10 µl ve yükleme (loading) tamponundan 3 µl alındı, karıştırılarak jele yüklemeleri yapıldı. Kesim ürünleri 100 bp DNA ladder ile birlikte yürütülerek ve jel üzerinde kesim ürünleri jel görüntüleme cihazında görüntülendi [UV Transillumunator (Wealtec, Dolphin-View, ABD)], kontrol edildi.

3.6.3. İstatiksel Analiz

Çalışmada tüm veriler χ^2 testi ile analiz edildi. P değeri < .05 anlamlı kabul edildi. İstatiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS1 for Windows V. 17.0, Chicago, ABD) programı kullanılarak yapıldı.

4.BULGULAR

Çalışmada izole edilen Candida kökenlerinin %80'i (120/150) idrar, % 11.3'ü (17/150) vajinal örneklerden, % 3.3'ü (5/150) yara örneklerinden, % 2'si (3/150) kandan izole edildi. Suşların kökenleri ve cinsiyete göre dağılımları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Suşların kökenleri ve cinsiyete göre dağılımı

Örnek tipi	Sayı	E	K
İdrar	120	48 (%40.0)	72 (% 60.0)

Vajinal sürüntü örneği	17	-	17
Yara	5	3 (% 60)	2 (% 40)
Kan	3	1 (% 33.3)	2 (% 66.6)
Diğer	5	5	-

Toplam 150 suşun klinik örneklerinin bölümlere göre dağılımları şöyle idi; izolatların 33'ü (%22.0) dahili yoğun bakım, 27'si (% 18.0) kadın hastalıkları ve doğum, 19'u (% 12.6) dahiliye, 18'i (% 12.0) cerrahi yoğun bakım, 11'i (% 7.3) üroloji, 8'i (% 5.3) beyin ve sinir cerrahisi, 6'sı (% 4.0) göğüs hastalıkları, 5'i (% 3.3) çocuk sağlığı ve hastalıkları, 4'ü (% 2.6) ortopedi ve travmatoloji, 4'ü (% 2.6) enfeksiyon hastalıkları, 4'ü (% 2.6) dermatoloji, 4'ü (% 2.6) endokrinoloji, 2'si (% 1.3) fizik tedavi ve rehabilitasyon, 2'si (% 1.3) kardiyoloji yoğun bakım, 1'i (% 0.6) kardiyoloji, 1'i (% 0.6) çocuk nörolojisi ve 1'i (% 0.6) de göz hastalıkları servisinden izole edildi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Suşların izole edildiği servisler

Suşların izole edildiği servisler	Hasta sayısı ve yüzde oranları
Dahili Yoğun Bakım	33 (% 22)
Kadın Hastalıkları ve Doğum	27 (% 18)
Dahiliye	19 (% 12.6)
Cerrahi Yoğun Bakım	18 (% 12)
Üroloji	11 (% 7.3)
Beyin ve Sinir Cerrahisi	8 (% 5.3)
Göğüs Hastalıkları	6 (% 4)

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	5 (% 3.3)
Ortopedi ve Travmatoloji	4 (% 2.6)
Enfeksiyon Hastalıkları	4 (% 2.6)
Dermatoloji	4 (% 2.6)
Dahiliye-Endokrinoloji	4 (% 2.6)
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	2 (% 1.3)
Koroner Yoğun Bakım	2 (% 1.3)
Kardiyoloji	1 (% 0.6)
Çocuk Nörolojisi	1 (% 0.6)
Göz Hastalıkları	1 (% 0.6)
Toplam	150

Çalışmada fenotipik yöntemlere göre yapılan identifikasyonda kökenlerin tür dağılımı incelendiğinde suşların % 48.6'sının (73/150) *C.albicans*, % 17.3'ünün (26/150) *C. tropicalis*, yine % 17.3'ünün (26/150) *C. glabrata*, % 4.0'ünün (6/150) *C. parapsilosis*, % 4.0'ünün (6/150) *C. krusei*, % 0.6'sının (1/150) *C. lusitaniae*, % 0.6'sının (1/150) *C. kefyr*, % 0.6'sının (1/150) *C. famata*, % 0.6'sının (1/150) *C. lyopolitica* ve % 6.0'sının (9/150) diğer *Candida* türleri olduğu tespit edildi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Klinik örneklerden fenotipik yöntemle göre izole edilen türlerin dağılımı

Türler	İzolat sayısı	Oran
<i>C. albicans</i>	73	% 48.6
<i>C.tropicalis</i>	26	% 17.3
<i>C. glabrata</i>	26	% 17.3

<i>C. parapsilosis</i>	6	% 4.0
<i>C. krusei</i>	6	% 4.0
<i>C. lusitaniae</i>	1	% 0.6
<i>C. kefyr</i>	1	% 0.6
<i>C. famata</i>	1	% 0.6
<i>C. lypolitica</i>	1	% 0.6
<i>Candida spp.</i>	9	% 6.0

Çalışmada genotipik yöntemlere göre yapılan identifikasyonda ise kökenlerin tür dağılımı incelendiğinde suşların % 45.3'ünün (68/150) *C.albicans*, % 19.3'ünün (29/150) *C. glabrata*, % 14.6'sının (22/150) *C. tropicalis*, % 5.3'ünün (8/150) *C. parapsilosis*, yine % 5.3'ünün (8/150) *C. krusei*, % 0.6'sının (1/150) *C. lusitaniae* ve geri kalanının ise (14; % 9.3) diğer *Candida* türleri olduğu tespit edildi (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Klinik örneklerden genotipik yöneme göre izole edilen türlerin dağılımı

Türler	İzolatların sayısı	Yüzde oranları
<i>C. albicans</i>	68	% 45.3
<i>C.glabrata</i>	29	% 19.3

<i>C. tropicalis</i>	22	% 14.6
<i>C. parapsilosis</i>	8	% 5.3
<i>C. krusei</i>	8	% 5.3
<i>C. lusitaniae</i>	1	% 0.6
<i>Candida spp.</i>	14	% 9.3

Suşların fenotipik yöntemlerle identifikasyonu yapıldığında, izolatların bölümlere göre dağılımı aşağıdaki gibiydi. Dahiliye yoğun bakım ünitesinden izole edilen toplam 33 *Candida spp.*'nin 16'sı (% 48.48) *C. albicans*, 9'u (% 27.2) *C. tropicalis*, 4'ü (% 12.1) *C. glabrata* ve 2'sinin (% 6.06) ise *C. parapsilosis* olduğu tespit edildi. Dahili yoğun bakım ünitesinden sonra en yüksek oranda izolasyonun yapıldığı kadın hastalıkları ve doğum servisinde gelen *Candida*'ların tür dağılımı incelendiğinde en yüksek oranda izole edilen suşun, *C. albicans* (13/27; % 48.1) olduğu saptanırken, bunu % 25.9 (7/27) oranıyla *C. glabrata*, % 7.4 (2/27) oranlarıyla *C. tropicalis* ve *C. krusei*, % 3.7 (1/27) oranlarıyla *C. parapsilosis* ve *C. famata* türlerinin takip ettiği tespit edildi. Toplam 18 suşun izole edildiği cerrahi yoğun bakımından soyutlanan *Candida*'ların tür dağılımı ise; *C. albicans* % 44.4 (8/18), *C. glabrata* % 22.2 (4/18), *C. tropicalis* % 11.1 (2/18) ve *C. krusei* % 11.1 (2/18) şeklindeydi. Çizelge 4.5'de çalışmada fenotipik yöntemlerle bölümlere göre tür dağılımı verilmiştir.

Çizelge 4.5. Fenotipik yöntemle poliklinik ve servislere göre *Candida* suşlarının tür dağılımı.

Servis	<i>C.alb</i>	<i>C.tro</i>	<i>C.gla</i>	<i>C.par</i>	<i>C.kru</i>	<i>C.lusi</i>	<i>C.kefyr</i>	<i>C.lyp</i>	<i>C.fam</i>	<i>Can.spp</i>
D.Y.B.	16	9	4	2	-	-	-	-	-	2
K.H.D.	13	2	7	1	2	-	-	-	1	1
Dahiliye	9	4	4	-	-	-	1	-	-	1
C.Y.B.	8	2	4	1	2	-	-	-	-	1

Üroloji	4	2	2	-	2	1	-	-	-	-
Bey.C.	4	2	1	1	-	-	-	-	-	-
Göğ.H.	2	2	-	-	-	-	-	1	-	1
Pediatri	2	1	1	-	-	-	-	-	-	1
Ortopedi	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Enf.H.	2	1	-	1	-	-	-	-	-	-
Derma.	2	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Endok.	2	1	-	-	-	-	-	-	-	1
F.T.R.	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
K.Y.B.	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kardio.	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Çoc.N.	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Göz H.	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	72	28	25	6	6	1	1	1	1	9

D.Y.B.: Dahili Yoğun Bakım, **C.Y.B.:** Cerrahi Yoğun Bakım, **K.H.D.:** Kadın Hastalıkları ve Doğum **K.Y.B.:** Koroner Yoğun Bakım **F.T.R.:** Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon **Bey. C.:** Beyin ve Sinir Cerrahisi **Göğ. H.:** Göğüs Hastalıkları **Enf. H.:** Enfeksiyon Hastalıkları **Derma.:** Dermatoloji **Endok.:** Endokrinoloji **Çoc.N.:** Çocuk Nörolojisi **Göz H.:** Göz Hastalıkları

C.alb: *Candida albicans*, **C.tro:** *Candida tropicalis*, **C.par:** *Candida parapsilosis*, **C.kru:** *Candida krusei*, **C.lusi:** *Candida lusitanae*, **C.lyp:** *Candida lypolitica*, **C.famata:** *Candida famata*, **Can.spp:** *Candida spp.*

Suşların genotipik yöntemlerle identifikasyonu yapıldığında, izolatların bölümlere göre dağılımı aşağıdaki gibiydi. Dahili yoğun bakım ünitesinden izole edilen toplam 33 *Candida spp.*'nin 15'inin (%45.4) *C. albicans*, 5'inin (% 15.1) *C. tropicalis*, 5'inin (% 15.1) *C. glabrata* ve 3'ünün (% 9.09) ise *C. parapsilosis* olduğu tespit edildi. Dahiliye yoğun bakım ünitesinden sonra en yüksek oranda izolasyonun yapıldığı kadın hastalıkları ve doğum servisinde gelen *Candida*'ların tür dağılımı incelendiğinde en yüksek oranda izole edilen

suşun, *C. albicans* (14/27; % 51.8) olduğu saptanırken, bunu % 18.5 (5/27) oranı ile *C. glabrata*, % 11.1 (3/27) ile *C. tropicalis*, % 7.4 (2/27) ile *C. krusei*, ve yine % 7.4 (2/27) ile *C. parapsilosis*'in takip ettiği tespit edildi. Toplam 19 suşun izole edildiği dahiliye servisinden soyutlanan Candida'ların tür dağılımı ise; *C. albicans* % 47.3 (9/19), *C. tropicalis* % 21.05 (4/19) ve *C. glabrata* % 15.7 (3/19) şeklindeydi. Çizelge 4.6'da çalışmada genotipik yöntemlerle bölümlere göre tür dağılımı verilmiştir.

Çizelge 4.6. Genotipik yöntemle poliklinik ve servislere göre Candida suşlarının tür dağılımı.

	Poliklinik ve Servisler
--	--------------------------------

Türler	D.Y.B.	K.H.D.	Dahiliye	C.Y.B.	Üroloji	Beyin ve Sinir Cerrahisi	Göğüs Hastalıkları	Pediyatri	Ortopedi	Enfeksiyon Hastalıkları	Dermatoloji	Endokrinoloji	F.T.R.	K.Y.B.	Kardiyoloji	Çocuk Nörolojisi	Göz Hastalıkları	TOPLAM
<i>C. albicans</i>	15	14	9	4	5	5	2	2	3	2	1	2	1	2	1	-	1	72
<i>C. glabrata</i>	5	5	3	7	2	1	-	1	1	-	2	-	-	-	-	1	-	25
<i>C. tropicalis</i>	5	3	4	3	1	1	1	1	-	1	-	1	1	-	-	-	-	28
<i>C. parapsilosis</i>	3	2	-	1	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>C. krusei</i>	2	2	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
<i>C. lusitaniae</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>Candida spp.</i>	3	1	3	1	-	-	3	1	-	-	1	1	-	-	-	-	-	14

D.Y.B.: Dahili Yoğun Bakım, **C.Y.B.:** Cerrahi Yoğun Bakım, **K.H.D.:** Kadın Hastalıkları ve Doğum **K.Y.B.:** Koroner Yoğun Bakım **F.T.R.:** Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon

Çalışmada en yüksek oranda izole edilen *Candida* türü olan *C.albicans*'ın PCR-RFLP analizleri ile fenotipik yöntem arasında %5.5 oranında uyumsuzluk olduğu bulunmuştur. Bunun yanında *C.tropicalis*'in tanısında %21.4 oranında, *C. glabrata* tanısında %16.0 ve

C.parapsilosis tanısında %33.3 oranında bu iki yöntem arasında uyumsuzluk olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Genotipik ve fenotipik yöntemlere göre tür dağılımı.

Tür	Fenotipik identifikasyon	Genotipik identifikasyon	Fark	P Değeri
<i>C. albicans</i>	72	68	4	p>.05
<i>C. tropicalis</i>	28	22	6	p<.05
<i>C. glabrata</i>	25	29	4	p<.05
<i>C. parapsilosis</i>	6	8	2	p<.05
<i>C. krusei</i>	6	8	2	p<.01
<i>C. lusitaniae</i>	1	1	-	-
<i>C. kefyr</i>	1	-	1	p<.00
<i>C. lyopolitica</i>	1	-	1	p<.00
<i>C. famata</i>	1	-	1	p<.00
<i>Candida spp.</i>	9	14	5	p<.01

Msp I ve *Bln I* restriksiyon enzimleri kullanılarak genotipik olarak yapılan tür dağılımı incelendiğinde; *C. albicans*' ın % 45.3, *C. glabrata*'nın % 19.3 oranında olduğu tespit edilirken en düşük düzeyde % 5.3 oranlarında *C. parapsilosis* ve *C. krusei*'nin identifiye

edildiği tanımlandığı saptandı. RFLP analizi ile kökenlerin %10'unun ise tür düzeyinde tanımlaması yapılamadı (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. *Msp* I ve *Bln* I enzimleri kullanılarak yapılan genotipik identifikasyona göre türler ve yüzde oranları

Türler	İzolat sayısı	Oran
<i>C. albicans</i>	68	% 45.3
<i>C. glabrata</i>	29	% 19.3
<i>C. tropicalis</i>	22	% 14.6
<i>C. parapsilosis</i>	8	% 5.3
<i>C. krusei</i>	8	% 5.3
<i>C. lusitaniae</i>	1	% 0.6
<i>Candida spp.</i>	14	% 9.3

Kökenlerin RFLP analizi sonucu örneklerin klinik orjinine göre tür dağılımı yapıldığında, idrar örneklerinden izole edilen *Candida*'ların % 47.5'inin (57/120) *C. albicans*, % 19.1'inin (23/120) *C. glabrata*, % 14.1'inin (17/120) *C. tropicalis*, % 4.1'inin (5/120) *C. krusei*, % 3.3'ünün (4/120) *C. parapsilosis*, % 0.8'inin (1/120) *C. lusitaniae* olduğu tespit edilirken, % 10'unun (12/120) ise tür düzeyinde tanımlaması yapılamadı. İdrar örneklerinden sonra suşların en yüksek oranda izole edildiği vajinal sürüntü örneklerinde de en yüksek oranda *C. albicans* türünün tespit edildiği (% 37.5; 6/16), bunu % 18.7 (3/16) oran ile *C. tropicalis* ve *C. glabrata* türlerinin takip ettiği saptanırken, *C. parapsilosis* % 12.5 (2/16) ve

C. krusei'nin de % 6.2 (1/16) oranında izole edildiği bulunmuştur. Vajinal sürüntü örneklerinden sadece 1 (% 6.2) hastada tür düzeyinde tanımlama yapılamamıştır. Klinik örneklere göre tür dağılımı Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Genotipik yöntemle klinik örneklere göre tür dağılımı

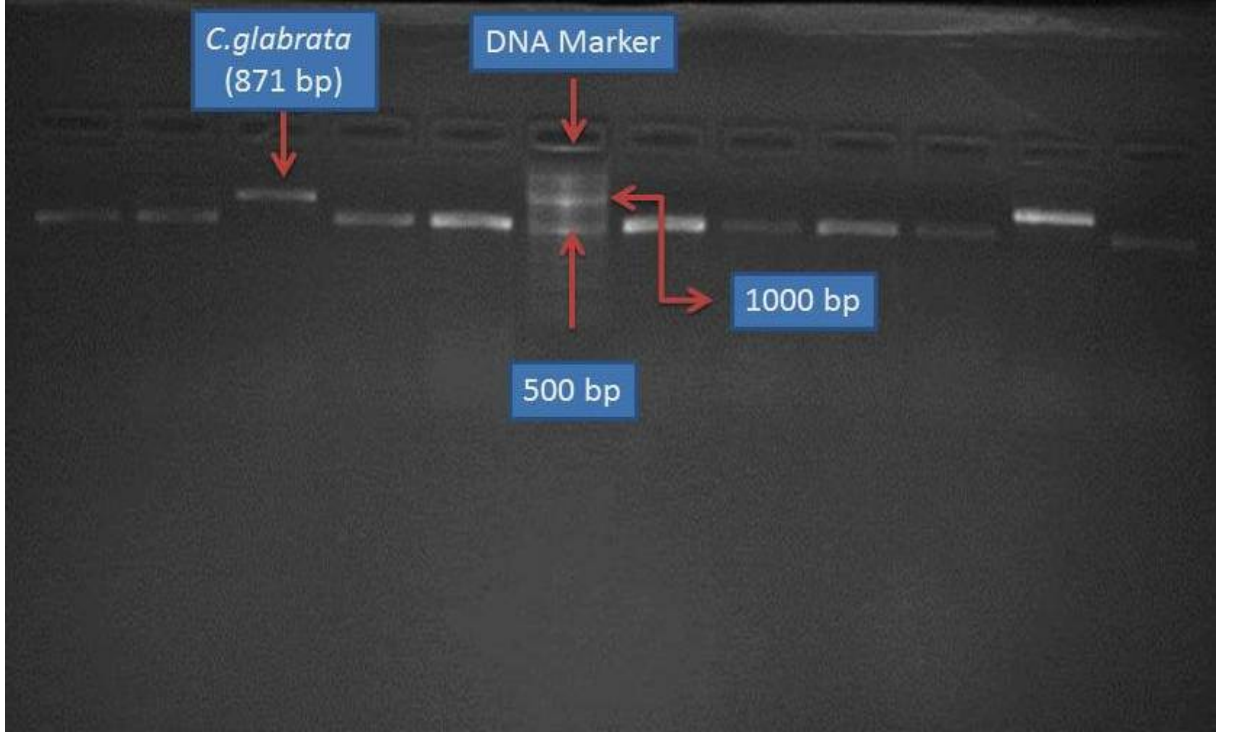
Örnek tipi	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. lusitaniae</i>	Candida spp.
İdrar	58	23	17	4	5	1	12
Vajen sürüntüsü	7	3	3	2	1	-	1
Yara	2	1	-	-	1	-	1
Kan	-	-	1	2	-	-	-
Diğer	1	2	1	-	1	-	-
Toplam (n)	68	29	22	8	8	1	14
Toplam (%)	45.3	19.3	14.6	5.3	5.3	0.6	9.3

Çalışmada farklı bölümlerde tedavi görmekte olan 37 hastadan izole edilen Candida türlerinde amfoterisin B, flusitozin, flukonazol ve vorikonazole karşı antifungal duyarlılık paternleri belirlenmiştir. Buna göre türlerin MİK değerleri Çizelge 4.10'da verilmiştir. Birer adet *C. tropicalis* ve *C. glabrata* suşunun flukonazol dirençleri çizelgede net olarak görülmektedir.

Çizelge 4.10. İzole edilen türlerin antifungal direnç paternleri

Candida türleri (n)	Antifungal ilaçlar	MİK Değerleri (mg/l)										
		≥ 64	32	16	8	4	2	1	0.5	≤0.25	≤ 1	≤0.12
<i>C. albicans</i> (21)	Amfoterisin B							13	7	1		
	Flusitozin										21	
	Flukonazol			1	2						18	
	Vorikonazol											21
<i>C. glabrata</i> (5)	Amfoterisin B							2	3			
	Flusitozin										5	
	Flukonazol		1			1					3	
	Vorikonazol					1						4
<i>C. tropicalis</i> (4)	Amfoterisin B						1	1	2			
	Flusitozin										4	
	Flukonazol	1				1	1				1	
	Vorikonazol											4
<i>C. parapsilosis</i> (3)	Amfoterisin B						1		2			
	Flusitozin										3	
	Flukonazol					1					2	
	Vorikonazol											3
<i>C. lusitaniae</i> (1)	Amfoterisin B								1			
	Flusitozin										1	
	Flukonazol										1	
	Vorikonazol											1
<i>Candida spp.</i> (3)	Amfoterisin B							1		2		
	Flusitozin										3	
	Flukonazol										3	
	Vorikonazol											3

Çalışmada 150 klinik örnekte ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak PCR amplifikasyonu yapıldı. Amplifikasyon ürünleri 900 bp'lik *Candida* kökenlerine ait bant büyüklüğü elde edildi (Şekil 4.1)



Şekil 4.1. Çeşitli *Candida* türleri için ITS1-ITS4 primer ürünlerinin büyüklükleri.

C. glabrata (871 bp), *C. albicans* (535 bp), *C. tropicalis* (524 bp), *C. krusei* (510 bp), *C. parapsilosis* (520 bp)

Çalışmada *Msp* I enzimi ile kesim sonucu yapılan RFLP analizlerinde 261 bp ve 557 bp büyüklüğünde kesim ürünleri arandı (Şahiner F, 2008). Kesim ürünleri analizleri sonucunda 68 adet *C. albicans* (% 45.3), 29 adet *C. glabrata* (% 19.3), 22 adet *C. tropicalis* (% 14.6), 8 adet *C. parapsilosis* (% 5.3), 8 adet *C. krusei* (% 5.3), 1 adet *C. lusitanae* (%0.6) türlerinin varlığı belirlendi. Geri kalan suşlar diğer *Candida* türleri olarak değerlendirildi (Çizelge 4.11).

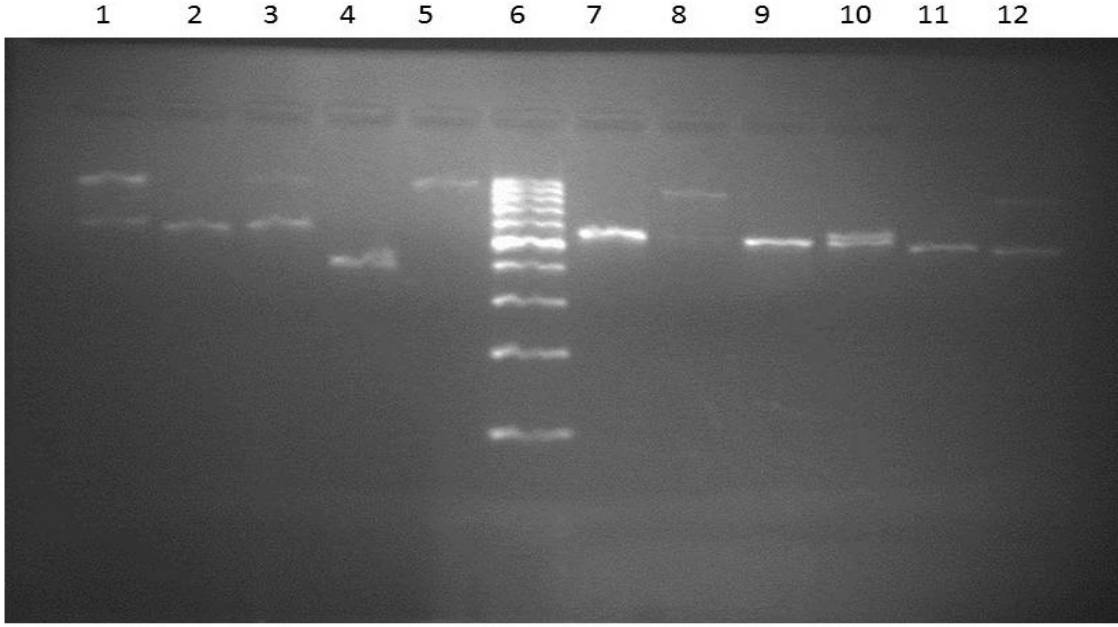
Çizelge 4.11. *Msp* I restriksiyon enzimi ile yapılan identifikasyon

Türler	Adet
<i>C. albicans</i>	68
<i>C. glabrata</i>	29
<i>C. tropicalis</i>	22
<i>C. parapsilosis</i>	8
<i>C. krusei</i>	8
<i>C. lusitaniae</i>	1
<i>Candida spp.</i>	14
	Toplam: 150

Bln I enzimi ile yapılan kesim ürünlerinin analizlerinde ise toplam 82 non-*albicans* türünün identifikasyonu yapıldı. Çalışmada *Bln* I enzimi kesimi sonucu 29 adet *C. glabrata* (% 35.3), 22 adet *C. tropicalis* (% 26.8), 8 adet *C. parapsilosis* (% 9.75), 8 adet *C. krusei* (% 9.75), 1 adet (% 1.2) *C. lusitaniae* kökenlerinin varlığı tespit edildi. Geri kalan suşlar (14/82; %17.07) diğer *Candida* türleri olarak değerlendirildi (Çizelge 4.12).

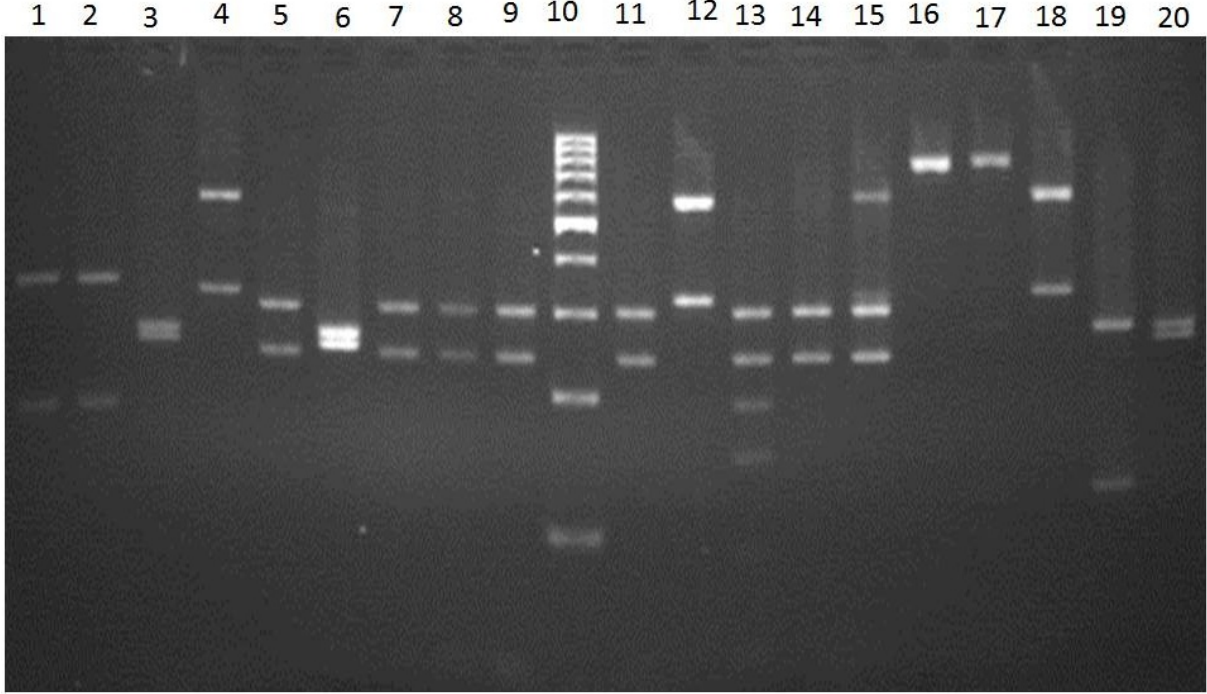
Çizelge 4.12. *Bln* I restriksiyon enzimi ile yapılan diskriminasyon

Türler	Adet
<i>C. glabrata</i>	29
<i>C. tropicalis</i>	22
<i>C. parapsilosis</i>	8
<i>C. krusei</i>	8
<i>C. lusitaniae</i>	1
<i>Candida spp.</i>	14
	Toplam: 82



Şekil 4.2. *Bln* I restriksiyon enzimi kullanılarak çeşitli *Candida* türlerinin kesim görüntüsü.

ITS 1 ve ITS 2 bölgeleri PCR amplifikasyon ürünlerinin *Bln* I restriksiyon enzimiyle kesim ürünleri. 1000bp DNA Ladder (6), *C. glabrata* (5), *C. krusei* (10), *C. tropicalis* (2,9), *C. parapsilosis* (7), *Candida spp.* (1,3,4,8,11,12).



Şekil 4.3. *Msp* I restriksiyon enzimi kullanılarak çeşitli *Candida* türlerinin kesim görüntüsü.

ITS 1 ve ITS 2 bölgeleri PCR amplifikasyon ürünlerinin *Msp* I restriksiyon enzimiyle kesim ürünleri. 1000bp DNA Ladder (10), *C.albicans* (5,7,8,9,11,14), *C.glabrata* (4,12,18), *C.tropicalis* (1,2), *C.krusei* (3,6,20), *C.parapsilosis* (16,17), *Candida spp.* (13,15,19).

5.TARTIŞMA

Candida'ların hastalık oluşturma potansiyelleri ve antifungal duyarlılıkları türlere göre değişkenlik gösterdiğinden hastalık etkeni Candida tiplerinin tanımlanması oldukça önemlidir. Çalışmamızda hastanemizde çeşitli yoğun bakım üniteleri ve servislerde yatmakta olan hastalara ait çeşitli klinik örneklerden izole edilen Candida kökenlerinde tür dağılımını fenotipik olarak otomatize sistemle ve genotipik olarak ise rDNA'nın ITS1 ve ITS2 bölgelerinin amplifikasyonunu takiben PCR ürünlerinin *Msp* I ve *Bln* I restriksiyon enzimleri kesimine dayalı RFLP yöntemiyle identifiye etmeyi, ayrıca bu infeksiyonların tedavisinde konvansiyonel olarak kullanılan antifungallere (amfoterisin B, flusitozin, flukonazol ve vorikonazole) karşı antifungal duyarlılıklarını araştırdık.

Son yıllarda fırsatçı patojen Candida infeksiyonlarının dikkate değer ölçüde arttığı gözlenmektedir (Lass-Flörl 2009). Bu infeksiyonlar deri, saç, tırnak ve mukozal membranlar gibi yüzeysel kısımları tutabildiği gibi, sistemik ve organlarını da tutabilmektedir (Ruping ve ark 2008) Candida infeksiyonlarının sıklığı özellikle HIV, kanser hastaları gibi immünosupresif kişilerde veya immünosupresif kemoterapinin yaygın olarak kullanılmasıyla ciddi şekilde artmıştır. Candida infeksiyonları son zamanlarda hastane infeksiyonlarının en önemli etkenleri arasına gösterilmektedir. Bu infeksiyonlara karşı hastaların duyarlılığını giderek arttıran faktörler arasında uzun süreli antibiyotik tedavisi, hospitalizasyon sürelerinin uzaması, ileri yaş, diabetes mellitus, cinsiyet (kadınlarda daha fazla) ve immünosupresif tedaviler sayılabilir. (Samaranayake ve ark 2002, Hagerty ve ark 2003, Kojic & Darouiche 2004).

Candida ailesinde 150'den fazla türün olduğu bildirilse de (Calderone 2002) bu türlerin çok azının insanlarda kandidiazis etkeni olduğu bilinmektedir. Candida türlerinin yaklaşık %65'inin, 37°C'de üreyememesi, çoğu türün insanda gerçek anlamda patojenite oluşturmalarını kısıtlamaktadır (Calderone 2002)

Candida infeksiyonlarının yoğun bakım ünitelerinde gelişen infeksiyonlar arasında üçüncü, kan dolaşımı infeksiyonları arasında ise dördüncü sırada yer aldığı bildirilmiştir.

Candida infeksiyonları, hastanede yatış süresinde artış, morbidite ve mortaliteye yol açmaları bakımından oldukça önemlidir. İnsanlardan izole edilen Candida türlerinden hem sağlıklı bireylerde hem de hastalarda en sık izole edileni *Candida albicans*'dır (Calderone 2002, Samaranayake ve ark 2002). Son 20 yılda yapılan çalışmalar insan kandidiazislerinden izole edilen tüm formlarının %80'inden fazlasının *C. albicans* olduğunu göstermektedir. Öte yandan özellikle son yıllarda non-albicans Candida türlerinin sebep olduğu infeksiyonlarda önemli artışlar olduğu da bildirilmektedir (Kauffman ve ark 2000, Manzano-Gayosso ve ark 2008, Ruan & Hsueh 2009). İnsan kandidiazis etkeni olarak non-albicans Candida türlerinin görülme sıklığındaki bariz artışın diagnostik yöntemlerin gelişmesiyle ilişkili olabileceği bildirilmektedir. Buna en güzel örnek olarak fungemi vakalarından izole edilen Candida tür tiplendirilmesinde kromojenik besi yerlerinin en az rutin moleküler teknikler kadar başarılı olduğu gösterilebilir (Liguori ve ark 2009).

Candida infeksiyonlarının önlenmesinde etkenin identifikasyonu ve tedavide uygun antifungal seçimi oldukça önemlidir. Ne yazık ki, günümüzde çoğu merkezde antifungal duyarlılık testleri yapılamamaktadır. Antifungallara doğal dirençli olan ya da yüksek direnç paternleri gösteren non-albicans türlerinin identifikasyonunun yapılması empirik tedavide yol gösterici olmaktadır. Non-albicans Candida türlerinin *C. albicans* ile karşılaştırıldığında doğal olarak antifungal ilaçlara karşı yüksek dirençli olmaları, son yıllarda infeksiyon etkeni olarak daha sık izole edilmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Gonzalez ve ark, 2008).

Çalışmamızda Candida'ların izole edildiği klinik örnekler arasında üriner örnekler (%78.6) ilk sırada yer alırken, bunu vajinal (%11.3) ve yara (%3.3) örneklerinden izole edilen suşlar oluşturmaktadır. Kandidüri genellikle hospitalize edilen hastalarda sık görüldüğü bildirilmektedir. Ancak son yıllarda risk faktörlerinin de artmasıyla daha sık etken olarak izole edilmektedir (Bukhary 2008). Kandidürinin ortaya çıkmasında etkili faktörler arasında uzun süreli geniş spektrumlu antibiyotik tedavileri, uzayan hospitalizasyon süreleri, metabolik hastalıklar ve immunsupresif tedaviler olarak sayılabilir (Bukhary ve ark 2008, Kobayashi ve ark 2004) Bir çalışmada kateter ilişkili infeksiyonların %27'sinin Candida türleri tarafından oluşturulduğu bildirilmiştir (Platt ve ark 1986). Kateterler patojenik mikroorganizmalar için üriner sisteme iyi bir giriş yolu olup uzun süre kateterizasyon mikroorganizma kolonizasyonunu da beraberinde getirmektedir (Kauffman 2005). Kandidürili hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada ilk sırada %51 oranda görülme sıklığı ile *C. albicans*'ın yer

aldığı, bu türü %16 ile *C. glabrata*'nın takip ettiği bildirilmiştir (Kauffman ve ark 2000, Güler ve ark 2006).

Kandidüri etkenlerinin hem fenotipik hem de genotipik analizler ile ortaya konması ve kateterize hastalarda kandidüri sıklığının belirlenmesi amacıyla yapılan bir başka çalışmada ise kateterize edilen 250 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Mayaların identifikasyonunda ilk olarak germ tüp yöntemi, hif veya psödohiplerin ya da klamidosporların, CMA+TW80 ve CHROMagar Candida besiyerlerinde üremesi gibi fenotipik değerlendirmeler yapılmıştır. Tüm türlerin genomik DNA'sı, PCR ve sonrasında RFLP yöntemleriyle analiz edilmiştir. Toplam 95 kadın ve 155 erkeğin idrar analizleri sonucunda, 40 örnekte etken izolasyon olarak Candida türleri tespit edilmiştir. Kadınlarda infeksiyon oranı %55, erkeklerde ise %45 olarak hesaplanmıştır. Tür dağılımı incelendiğinde ise etkenlerin %45'inin *C. albicans*, %32.5'inin *C. glabrata*, %15'inin *C. tropicalis*, %5'inin *C. parapsilosis* ve %2.5'inin ise *C. krusei* olduğu bildirilmiştir. Kandidüri görülme sıklığı ise yaklaşık %16 olarak hesaplanmıştır (Ghahri ve ark 2012).

Bizim çalışmamızda PCR-RFLP yöntemine göre yapılan identifikasyonda kökenlerin tür dağılımının literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir (Kauffman ve ark 2000, Güler ve ark 2006). Çalışmamızda 118 üriner örnekten 57'sinde (%48.3) *C. albicans* izolasyonu yapılmıştır. *C. albicans*'ı %19.4'lük oran ile *C. glabrata* ve %14.4'lük oranla da *C. tropicalis*'in takip ettiği tespit edilmiştir. Bu türleri %4.2 oranı ile *C. krusei*, %3.3 oranı ile *C. parapsilosis* ve % 0.8 oranı ile de *C. lusitaniae* izlediği bulunurken, % 10.1'inin (12/118) ise tür düzeyinde tanımlaması yapılamamıştır.

Üriner örneklerde olduğu gibi vajinal örnekte de en sık izole edilen türün *C. albicans* olduğu (%37.5; 6/16), bunu %18.7 (3/16)'lık oran ile *C. tropicalis* ve *C. glabrata* türlerinin takip ettiği saptanmıştır. Bu türler dışında *C. parapsilosis* %12.5 ve *C. krusei*'nin de % 6.2 oranında vajinal sürüntü örneklerinden etken olarak izole saptanmıştır.

Patojen Candida türlerinin çeşitliliği ve dağılımı anatomik lokalizasyona ve çevre şartlarına bağlıdır. Non-albicans Candida türleri, boğaz ve vajinada daha sık izole edilir (Strofer ve ark 1994). Antifungal ajan seçimi hastanın klinik durumu, infekte bölge, farmakodinamik ve farmakokinetik faktörlere göre yapılmaktadır. Flukonazol, üriner sistem infeksiyonlarında en çok tercih edilen ve birçok Candida türüne karşı etkin olarak kullanılan

bir antifungal ajandır (Malani ve ark 2007). Literatürle uyumlu olarak çalışmamızda non-albicans türlerin antifungal dirençlerinin *C.albicans* kökenlerine göre oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Candida türlerinin tanısında birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler genotipik yöntemler ve fenotipik yöntemler olarak iki ana gruba ayrılabilir. Fenotipik yöntemler Saboraud Dekstroz agar, Malt Ekstrakt agar gibi besiyerlerinde maya koloni morfolojisi ve şeker absorpsiyonu ve fermentasyon testleri temeline dayanan testleri kapsar. Genotipik yöntemler ise PCR ve multiplex PCR (Reiss ve ark 1998), spesifik prob testleri (Fujita ve ark 1995), PCR-RFLP yöntemi (Pinto ve ark 2004), sekans analizi (Chen ve ark 2000) ve real-time PCR yöntemlerini kapsamaktadır. Adı geçen bu yöntemlerden her birinin kendine göre avantaj ve dezavantajları olduğu bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda klinik örneklerden izole edilen infeksiyon etkenleri *Candida*ları hem fenotipik hem de PCR-RFLP yöntemi kullanarak karakterize ettik. Çalışmada koloni morfolojisi, germ tüp testi ve biyokimyasal asimilasyon testlerine dayalı Vitek-2 otomatize sistemi ve kitlerinin kullanıldığı fenotipik yöntemlere göre yapılan identifikasyonda en yüksek oranda *C.albicans* (%48.6) izolasyonu yapılırken bunu *C. tropicalis* (%17.3) ve *C. glabrata* (%17.3)'nın takip ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca izolatların fenotipik yöntemle 6'şar izolatın *C.parapsilosis* ve *C.krusei*, 1 (%0.6)'er izolatın ise *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. famata* ve *C. lypolitica* olduğu tespit edilirken bu yöntemle 9 (%6) örnek ise tiplendirilememiştir. Çalışmada genotipik yöntemlere göre yapılan identifikasyonda ise kökenlerin tür dağılımı incelendiğinde suşların % 45.3'ünün *C.albicans*, % 19.3'ünün *C. glabrata*, % 14.6'sının *C. tropicalis*, %5.3'ünün *C. parapsilosis*, yine %5.3'ünün *C. krusei*, %0.6'sının *C. lusitaniae* olarak identifiye edilirken bu yöntemle ise toplam 14 izolatın (%9.3) tiplendirilmesi yapılamamıştır.

İki yöntem karşılaştırıldığında fenotipik yöntemle *C.albicans* tanısı konan 72 örneğin %5.6 (4/72)'sının genotipik yöntemle *C.albicans* olmadığı belirlenmiştir. Bu türler arasında identifikasyona dair uyumsuzluk diğer non albicans türler arasında daha belirgin olarak tespit edilmiştir. Sözgelimi, fenotipik yöntemle *C. tropicalis* tanısı alan 28 izolatın %21.4

(22/28)'inin *C.tropicalis* olmadığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde fenotipik olarak 25 örnek *C.glabrata* tanısı alırken, genotipik yöntemle 29 kökenin identifikasyonu *C.glabrata* olarak yapılmıştır. Yöntemler arasındaki identifikasyon açısından bu uyumsuzluk *C.parapsilosis* ve *C.krusei* için %33.3 olarak en yüksek oranda bulunmuştur. *Candida parapsilosis* ve *C.krusei*'nin antifungallere doğal direncinin yüksek olduğu göz önüne alındığında doğru ve hızlı mikrobiyolojik tanının önemi anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda ender izole edilen tür identifikasyonunda da iki yöntem arasında benzer çelişkilerin olduğu görülmektedir. Sözgelimi fenotipik yöntemle 1'er izolatin identifikasyonu *C. kefyri*, *C. lypolitica* ve *C.famata* olarak yapılırken, genotipik yöntemle hiçbir izolatin *C. kefyri*, *C. lypolitica* ve *C.famata* olduğu tespit edilememiştir. İki yöntem arasında tek uyumluluk *C. lusitaniae* identifikasyonunda bulunmuştur. Her iki yöntemle de 1 örneğin *C. lusitaniae* olduğu tespit edilmiştir.

Bunun yanında fenotipik olarak izolatların %6'sının identifikasyonu yapılmaz iken, genotipik yöntemle ise %9.3 oranında tiplendirilemeyen suşun olduğu tespit edilmiştir. Genotipik yöntem ile identifiye edilemeyen kökenlerin identifikasyonunun restriksiyon enzimleri sayısını artırarak, duyarlılığın artırılması ile yapılabileceğini düşünmekteyiz.

Candida infeksiyonlarının büyük bölümü *C. albicans* tarafından oluşturulsa da, azol grubu antifungallere daha az duyarlı olduğu bildirilen *C. glabrata* ve *C. krusei* gibi non-*albicans* türlerinin sıklığında önemli artışların olduğu bildirilmiştir (Wingard 1995, Nguyen ve ark 1996). İnvazif mantar infeksiyonlarının erken teşhisi mortalite oranlarını düşürmek açısından oldukça önemlidir. Ayrıca antifungallere direncin her geçen gün daha da arttığı bildirilmekteyken türlerin hızlı ve doğru identifikasyonunun yapılması etkili bir antifungal tedavi için son derece önemlidir. Günümüzde asimilasyon testlerinin kullanıldığı birçok ticari *Candida* kiti mevcuttur. Bu kitlerin çoğu tür bazında 1-5 gün süre içerisinde *Candida* identifikasyonu yapabilmektedir. Son yıllarda moleküler teknikler tanı ve *Candida* türlerinin de dahil olduğu birçok patojen mantar identifikasyonu için alternatif yöntemler olarak gösterilmektedir (Reiss ve ark 1998, Yeo and Wong 2002). Bu tür testler genellikle epidemiyolojik çalışmalarda tür bazında *Candida* identifikasyonu ve uygun antifungal ilaç tespitinde kullanılmaktadır (Elie ve ark 1998, Jordan 1994, Haynes 1996). *Candida* türlerinin

identifikasyonu için, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)-PCR, DNA sekans analizi, mitokondrial ribozomal RNA gen sekans analizi gibi çeşitli yöntemler bildirilmiş olsa da, bu metodlar hem çok zaman alıcı hem de rutinde pahalı oldukları için medikal laboratuvarlar için çok uygun değildir.

Candida infeksiyonlarının tanısı için yeni birçok moleküler yaklaşımlar, yeni teknikler geliştiriliyor olma da, esas amaç olan basit, hızlı ve uygun maliyetli bir metodun geliştirilmesidir. Bu çalışmada universal ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılarak rDNA'nın 510-879 bp'lik arak çeşitli *Candida* türlerinin genomik DNA'sından ITS1-5.8S-ITS2 rDNA bölgesinin 510-879 bp'lik ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi amplifiye edilmiştir. PCR ürünlerinin RFLP analizi yapılarak en sık karşılaşılan 6 *Candida* türünün identifikasyonu başarıyla yapılmıştır (Mirhendi ve ark 2006).

ITS molekülü sekans analizleri için yüksek oranda korunan sekans bölgelerini ihtiva etmektedir fakat, molekülün diğer bölgelerinde yeterli sekans çeşitliliği ile spesifik RFLP markırı olarak görev yapabileceği bildirilmiştir (Iwen ve ark 2002). Özellikle *Candida* (Williams ve ark 1995, Chen ve ark 2000), *Aspergillus* (Henry ve ark 2000), dermatofitler (Makimura ve ark 1999), *Trichosporon* (Sugita ve ark 1999) ve *Malassezia* (Makimura ve ark 2000) gibi bazı tıbbi öneme sahip mantar türlerinin identifikasyonunda bu molekülün tamamı ya da bir kısmı araştırmacılar tarafından DNA probları, nested PCR, sekans ve RFLP gibi çeşitli teknikler doğrultusunda kullanılmaktadır. Bir çalışmada ITS1-ITS4 bölgesinin amplifikasyonunu takiben, medikal öneme sahip *Candida* türlerinin restriksiyon enzimleriyle (*HaeIII*, *DdeI*, *BfaI*) kesimleri yapılmış ancak, kesim paternlerinin belki de ilgili ITS1-ITS4 sekansına ulaşamadıkları için identifikasyon için uygun olmadığı bildirilmiştir (Williams ve ark 1995). Maiwald ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada ise klinik öneme sahip *Candida*'ların identifikasyonunda küçük ribozomal alt birim olan 18S-rRNA'nın altı enzim kullanarak amplifikasyonu ile tür düzeyinde identifikasyonu yapılmıştır (Maiwald ve ark 1994). Son dönemlerde yapılan bir çalışmada da *Candida* türlerinin identifikasyonundan PCR-RFLP yöntemi başarıyla kullanılmıştır (Deak ve ark 2004, Pinto ve ark 2004). Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada çeşitli restriksiyon enzimleri kullanılarak PCR-RFLP yönteminin *Candida* türlerinin identifikasyonunda başarıyla kullanılabilceği gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda ise ITS1 ve ITS2 gen bölgelerinin PCR amplifikasyonu ve sadece *Msp* I ve *Bln* I restriksiyon enzimleri kullanarak kesimleri sonucu *Candida* infeksiyonlarından izole edilen altı türün identifikasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, *Msp* I enzimi ile, ITS amplifikasyon ürününün restriksiyonu her tür için önceden tahmin edilmiş spesifik paternleri elde edilmiştir. Bu yöntemin kullanılması ile tüm standart türler başarıyla identifiye edilmiştir. Ayrıca, klinik izolatların PCR-RFLP analizi sonuçları standart türler karşılaştırmıştır. Çalışmada *C. albicans* ve *C. dubliniensis* türlerinin *Msp* I ile kesilmesi ile benzer paternlerin elde edildiğinden bu türlerin identifikasyonu için *Msp* I enzimi dışında başka enzimlerin kullanılmasına gerek duyulmuştur. Tıbbi mikoloji laboratuvarlarında *Candida* identifikasyonu için basit ve kolay uygulanabilir olduğu için PCR-RFLP bu yöntemi önermekteyiz.

İnvazif mantar infeksiyonlarının en yaygın sebebi, tüm invazif mikozların %70-%90'ını oluşturan *Candida* türleridir (Lamagni ve ark 2001). Kan dolaşımı infeksiyonları nedenleri arasında *Candida*'lar ABD'de dördüncü, Avrupa'da yedinci sıradadır (Wisplinghoff ve ark 2000). Kandidemi insidansının günlük 10000 hastanın başvurduğu bir hastanede %0.5 ve %1.4 arasında değiştiği ve bu oranın yoğun bakım ünitelerinde daha yüksek seyrettiği bildirilmektedir (Marchetti ve ark 2000, Gudlaugsson ve ark 2003). Her 1000 hastadan ikisinin yoğun bakım hastası olduğu tahmin edilmektedir (Charles ve ark 2003, Nolla-Salas ve ark 1997).

Son zamanlara kadar *C. albicans* uzak ara en önemli tür olarak, birçok ülkede tüm kandidiazis vakalarının üçte ikisini oluşturmaktaydı. Ancak, bir süredir ibrenin non-albicans *Candida* türleri yönüne döndüğü görülmektedir (Wingard ve ark 1991, Abi-Said ve ark 1997)

Bu değişimin en önemli nedeninin, profilakside flukonazolün yaygın olarak kullanımı ve invazif girişimlerin artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

İnvazif *Candida* infeksiyonları, özellikle yoğun bakım ünitelerinde yüksek ölüm oranları ile gündeme gelmektedir (Leleu ve ark 2002).

İnvazif *Candida* infeksiyonlarının kontrolü için en kısa zamanda tür tayininin yapılması ve uygun antifungal tedavinin gerektiği ve bu sayede mortalitenin azaltılabileceği vurgulanmaktadır (Almirante ve ark 2005, Morrell ve ark 2005, Parkins ve ark 2007).

Epidemiyolojideki değişiklikler ve ortaya çıkan antifungal direnç her ne kadar pratikte değişikliklerle seyretse de özellikle yoğun bakım üniteleri pratiğinde oldukça önemlidir. Bu bağlamda, son zamanlarda lokal epidemiyolojik trendler hakkındaki bilgiler ve antifungal duyarlılık paternlerinin bilinmesi değerlidir. Günümüzde çeşitli sayıdaki geniş srveyans çalışmaları ile kandidemi epidemiyolojisi hakkında bilgiler bulunsa da yoğun bakım ünitelerinden elde edilen bilgiler hala yetersizdir.

Yoğun bakım ünitelerinde invazif *Candida* infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve risk faktörlerinin araştırıldığı bir çalışmaya *Candida* infeksiyonu tanısı almış ve sistemik antifungal tedavi gören 300 yetişkin hasta dahil edilmiştir. Hastaların %39.5'i kandidemi, %32.1'i invazif kandidiazis tanısı konurken, hastaların %28.4'ünün ise hem kandidemi hem de invazif kandidiazisli olduğu bildirilmiştir. Vakaların %37'sinde yoğun bakımın ilk 5 günü içerisinde kandidemi gelişmiştir. Etken olarak izole edilen mikroorganizma dağılımına bakıldığında ise suşların %57'si *C. albicans*, %16.7'si *C. glabrata*, %7.5'i *C. parapsilosis* %5.2'si *C. krusei* ve %4.9'u *C. tropicalis* olarak tespit edilmiştir. Etken *Candida*'ların ise %17.1'inin flukonazole daha az duyarlı ya da dirençli olduğu grlmştir. Empirik tedavide en çok başvurulan antifungal ajanın flukonazol (%65.7) olduğu bildirilmiştir. Flukonazol takiben kaspofungin (%18.1), vorikonazol (%5.5) ve amfoterisin B (%3.7) en sık seçilen ilaç olarak bildirilmiştir. Çalışmada yoğun bakım ünitesinde invazif kandidiazisli hastaların üçte ikisinden fazlasında kandidemi tespit edildiği bildirilirken, non-albicans *Candida*'ların, izole edilen *Candida* türlerinin yaklaşık yarısını oluşturduğu grlmştir. *Candida* izolatlarının flukonazol duyarlılığının ise oldukça düşük (%17.1) olduğu tespit edilmiştir (Leroy ve ark 2006).

Son yıllarda, insanlarda klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin güvenilir olarak identifikasyonu, giderek önemli hale gelmiştir. *Candida*'lar normal florada buldukları için infeksiyon etkeni *Candida* suşlarının tespit edilmesi oldukça önemlidir. Çünkü *Candida* izolatları hem infeksiyon oluşturma yetenekleri, hem de antifungal ajanlara karşı direnç göstermeleri bakımından büyük lde farklılıklar göstermektedir. Morfolojik kültür testleri, ayırıcı besiyeri kullanımı veya biyokimyasal asimilasyon teknikleri ile izole edilen *Candida* suşlarının çeşitli fenotipik yöntemlerle identifikasyonu, epidemiyolojik araştırmalar yönünden geniş kullanım alanı bulmaktadır.

6. SONUÇ

Etkili antifungal tedavi ve hastane infeksiyonları kontrolü açısından *Candida* türlerinin hızlı ve doğru identifikasyonu yapılması oldukça önemlidir. *Candida* türlerinin identifikasyonunda fenotip bazlı metodlar her zaman zor ve zaman alıcı yöntemlerdir. Moleküler biyolojik yöntemlerin *Candida*'ların identifikasyonunda daha uygun alternatif yollar olabileceği bildirilmektedir. Mirhendi ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada 20 standart kökünde ITS1 ve ITS2 rRNA bölgelerinin amplifikasyonları yapılarak PCR ürünü bir restriksiyon enzimi (*Msp I*) ile kesilmiş ve 6 *Candida* türünün (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. guilliermondii*) identifikasyonunun başarılı bir şekilde yapıldığı bildirilmiştir. Çalışmada aynı yöntem kullanılarak 137 klinik *Candida* izolatının başarılı şekilde identifiye edildiği bildirilmiştir. Çalışma en sık izole edilen tür *C. albicans* olarak tespit edilirken, bu türü *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* ve *C. guilliermondii*'nin takip ettiği saptanmıştır. PCR-RFLP yönteminin *Candida*'ların identifikasyonunda alt türleri başarıyla tespit ettiği ve yöntemin uygulanabilir, kolay, hızlı ve uygun maliyetli bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Mirhendi ve ark 2006).

Hastanemizin değişik birimlerinden izole edilen maya kökenlerinde yüksek oranda olmasa da, antifungallere dirençten söz edilebilmektedir. *Candida* türlerinde antifungallere karşı direnç gözlenmesi, antifungal tedavide direnç paternlerinin bilinmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Çalışmada en yüksek oranda izole edilen *Candida* türü olan *C. albicans*'ın PCR-RFLP analizleri ile fenotipik yöntem arasında %5.6 oranında uyumsuzluk olduğu bulunmuştur. Bunun yanında *C. tropicalis*'in tanısında %15.4 oranında, *C. glabrata* tanısında %11.5 ve *C. parapsilosis* tanısında %33.3 oranında bu iki yöntem arasında uyumsuzluk olduğu tespit edilmiştir. Fenotipik yöntemle PCR-RFLP yöntemleri arasında tür düzeyinde tanımlama kıyaslandığında yöntemler arasında anlamlı derecede farklılığın olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada *MspI* ve *BlnI* restriksiyon enzimleri fragmentlerinin *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* türlerinin tanımlanmasında kullanılabileceği

söylenbilir. Bu tür restriksiyon fragment ürünlerinin *Candida* türlerinin identifikasyonunda kullanılabilen bir sistem olarak geliştirilebilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. PCR-RFLP analizi hızlı ve güvenilir olması yanında DNA dizileme yöntemine göre ucuz olması da tanıdaki değerini ve kullanılabilirliğini arttırmaktadır.

7.KAYNAKLAR

1. **Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, et al:** The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* **1997**; 24:1122–1128
2. **Alexander BD, Ashley ED, Reller LB ve Reed SD.** Cost savings with implementation of PNA FISH testing for identification of *Candida albicans* in blood cultures. *Diagn Micr Infec Dis* **2006**, 54: 277–282
3. **Al-Fattani MA & Douglas LJ.** Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol* **2006**, 55: 999–1008
4. **Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L et al.** A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* **2006**, 59: 1114–1128
5. **Alleson, C.M. et al.** *Candida albicans* *INT1*-induced filamentation in *Saccharomyces cerevisiae* depends upon Sla2p. *Mol. Cell Biol.* **2001**, 21, 1272–1284
6. **Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M ve ark.** Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* **2006**, 44: 1681–1685
7. **Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, et al:** Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: Results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* **2005**; 43:1829–1835
8. **Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, Le ´on C, Palomar M, Jord´a R, Carrasco N & Bobillo F.** Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. *Intens Care Med* **2003**, 29: 1069–1076
9. **Anderson, J.M. et al.** Ultrastructure and antigenicity of the unique cell and pimple of the *Candida albicans* opaque phenotype. *J. Bacteriol.* **1990**, 172, 224–235
10. **Anil S, Ellepola AN & Samaranyake LP.** The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. *Oral Dis* **2001**, 7: 119–122
11. **Anonymous.** Management of deep *Candida* infection insurgical and intensive care unit patients. British Society forAntimicrobial Chemotherapy Working Party. *Intensive Care Med* **1994**;20:522—528
12. **Aubert D, Puygauthier-Toubas D, Leon P et al.,** “Characterization of specific anti-*Candida* IgM, IgA and IgE: diagnostic value in deep-seated infections,” *Mycoses*, **1996**, vol. 39, no. 5-6, pp.169–176
13. **Ax´ell T, Simonsson T, Birkhed D, Rosenborg J, and Edwardsson S,** “Evaluation of a simplified diagnostic aid (Oricult-N) for detection of oral candidoses,” *Scandinavian Journal of Dental Research*, **1985**, vol. 93, no. 1, pp. 52–55
14. **Baillie GS & Douglas LJ.** Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemoth* **2000**, 46: 397–403

15. **Banerjee, S. N., T. G. Emori, D. H. Culver, R. P. Gaynes, W. R. Jarvis, and T. Horan.** Secular trends in nosocomial primary blood stream infections in the United States. *Am. J. Med.* **1991**, 91:86S–89S
16. **Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari M, Rosso R & Viscoli C.** Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* **2006**, 6: 21
17. **Baveja C.** “Medicalmycology,” in *Text Book of Microbiology for Dental Students*, pp. 322–323, Arya Publications, Delhi, India, 3rd edition, **2010**, pp. 322–323
18. **Beck-Sague, C. M., and T. R. Jarvis.** Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States. *J. Infect. Dis.* **1993**, 167:1247–1251
19. **Beighton D, Ludford R, Clark DT et al.,** “Use of CHROMagar Candida medium for isolation of yeasts from dental samples,” *Journal of Clinical Microbiology*, **1995**, vol. 33, no. 11, pp. 3025–3027
20. **Benjamin DK, Ross K, McKinney RE, Benjamin DK, Auten R & Fisher RG.** When to suspect fungal infection in neonates: a clinical comparison of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* fungemia with coagulase-negative staphylococcal bacteremia. *Pediatrics* **2000**, 106: 712–718
21. **Binelli CA, Moretti ML, Assis RS et al.** Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. *Clin Microbiol Infec* **2006**, 12: 538–543
22. **Bodey G. P.** Candidiasis in cancer patients. *Am. J. Med.* **1986**, 77:13–19
23. **Bonassoli LA, Bertoli M & Svidzinski TIE.** High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. *J Hosp Infect* **2005**, 59: 159–162
24. **Borg M & Ruchel R.** Demonstration of fungal proteinase during phagocytosis of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J Med Vet Mycol* **1990**, 28: 3–14
25. **Braun, B. and Johnson, A.D.** Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science* **1997**, 277, 105–109
26. **Brito LR, Guimaraes T, Nucci M, Rosas RC, Almeida PL, Matta DA & Colombo AL.** Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol* **2006**, 44: 261–266
27. **Bross, J., G. H. Talbot, G. Maislin, S. Hurwitz, and B. L. Strom.** Risk factors for nosocomial candidemia: a case control study in adults without leukemia. *Am. J. Med.* **2006**, 87:614–620
28. **Brown, A.J.P. and Gow, N.A.R.** Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends Microbiol.* **1999**, 7, 333–338
29. **Bukhary ZA,** *Saudi Diseases And Transplantation.*, **2008**, 19 (3), 350-360)
30. **Butler G, Rasmussen MD, Lin MF ve ark.** Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459: 657–662, **2009**

31. **Budtz-Jørgensen E**, “Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. Diagnosis of oral candidosis,” *Acta Odontologica Scandinavica*, vol. 48, no. 1, pp. 37–43, **1990**
32. **Buurman, C. et al. (1998)** Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7670–7675
33. **Cafarchia C, Romito D, Caccioli C, Camarda A & Otranto D (2008)** Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. *Med Mycol* 46: 429–434
34. **Calderone RA, 2002** Introduction and historical perspectives. *Candida and Candidiasis* (Calderone R., ed), pp. 15–25. ASM Press, Washington, DC
35. **Calderone RA.** *Candida and candidiasis.* ASM Press, Washington, DC, **2002**
36. **Calderone RA.** Introduction and historical perspectives. *Candida and Candidiasis* (Calderone R., ed), pp. 15–25. ASM Press, Washington, DC, **2002**
37. **Calderone, R.A. and Braun, P.C. (1991)** Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* 55, 1–20
38. **Calera, J.A. and Calderone, R. (2001)** Signaling and the biology of human fungal pathogens. In *Fungal Pathogenesis: Principles and Clinical Applications* (Calderone, R. and Cihlar, R., eds), pp. 115–137
39. **Calera, J.A. and Calderone, R.A. (1999)** Flocculation of hyphae is associated with a deletion in the putative *CaHKL1* two-component histidine kinase gene from *Candida albicans*. *Microbiology* 145, 1431–1442
40. **Calera, J.A. et al. (1999)** Avirulence of *Candida albicans CaHKL1* mutants in a murine model of hematogenously disseminated candidiasis. *Infect. Immun.* 67, 4280–4284
41. **Camacho D, Gasparetto A & Svidzinski T (2007)** The effect of chlorhexidine and gentian violet on the adherence of *Candida spp.* to urinary catheters. *Mycopathology* 163: 261–266
42. **Cannon RD & Chaffin WL (1999)** Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol M* 10: 359–383
43. **Carvalho A, Costa-De-Oliveira S, Martins ML, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Ludovico P & Rodrigues F.** Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Med Mycol* 45: 619–627, **2007**
44. **Castellani A.** Observations on the fungi found in tropical bronchomycosis. *Lancet* 1912; 1:13-15
45. **Chaffin WL (2008)** *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol R* 72: 495–544
46. **Chakrabarti A, Chatterjee SS, Rao KLN, Zameer MM, Shivaprakash MR, Singhi S, Singh R & Varma SC.** Recent experience with fungaemia: change in species distribution and azole resistance. *Scand J Infect Dis* 41: 275–284, **2009**

47. **Chakrabarti A, Nayak N & Talwar P (1991)** In vitro proteinase production by *Candida* species. *Mycopathology* 114: 163–168
48. **Charles PE, Doise JM, Quenot JP, et al:** Candidemia in critically ill patients: Difference of outcome between medical and surgical patients. *Intensive Care Med* 2003; 29: 2162–2169
49. **Chen S, Tong Z, Lee O, Halliday C, Playford E, Widmer F, Kong F, Wu C & Sorrell T.** Clinician response to *Candida* organisms in the urine of patients attending hospital. *Eur J Clin Microbiol* 27: 201–208, 2008
50. **Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye AP & Cookson BT.** Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 3 region of the rRNA genes. *J Clin Microbiol* 38: 2302–2310, 2000
51. **Chen, J. et al. (2000)** *CRK1*, a novel cdc2-regulated protein kinase, is required for hyphal development and virulence in *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol* 20, 8696–8708
52. **Cole, G.T. et al. (1993)** Gastrointestinal candidiasis: histopathology of *Candida*–host interactions in a murine model. *Mycol. Res.* 97, 385–408
53. **Colombo AL, Guimaraes T, Silva LRBF, Monfardini LPDA, Cunha AKB, Rady P, Alves T & Rosas RC.** Prospective Observational Study of Candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence Rate, Epidemiology, and Predictors of Mortality. *Infect Cont Hosp Ep* 28: 570–576, 2007
54. **Colombo AL, Perfect J, DiNubile M, Bartizal K, Motyl M, Hicks P, Lupinacci R, Sable C & Kartsonis N.** Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized doubleblind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. *Eur J Clin Microbiol* 22: 470–474, 2003
55. **Contreras I, Ponton J & Quindos G.** Prevalence of *Candida parapsilosis* in the oral cavities of infants in Spain. *Clin Infect Dis* 18: 480–481, 1994
56. **Cormack BP, Ghori N & Falkow S (1999)** An adhesin of the yeast pathogen *Candida glabrata* mediating adherence to human epithelial cells. *Science* 285: 578–582
57. **Costa-de-Oliveira S, Pina-Vaz C, Mendonça D & Rodrigues AG.** A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur J Clin Microbiol* 27: 365–374, 2008
58. **Dagdeviren M, Cerikcioglu N & Karavus M (2005)** Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses* 48: 321–326
59. **Davenport JC and Wilton JMA,** “Incidence of immediate and delayed hypersensitivity to *Candida albicans* in denture stomatitis,” *Journal of Dental Research*, vol. 50, no. 4, pp. 892–896, 1971
60. **De Backer, M.D ve ark (2000)** Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 463–498

61. **De Las Penas A, Pan SJ, Castano I, Alder J, Cregg R & Cormack BP (2003)** Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* 17: 2245–2258
62. **Deak R, Bodai L, Aarts HJ, Maraz A:** Development of a novel, simple and rapid molecular identification system for clinical *Candida* species. *Med Mycol* 42: 311-318, 2004; Pinto PM, Resende MA, Koga-Ito CY, Ferreira JA, Tendler M: rDNA-RFLP identification of *Candida* species in immunocompromised and seriously diseased patients. *Can J Microbiol* 50: 514-520, **2004**
63. **Dembry, L. M., J. A. Vazquez, and M. J. Zervos. 1994.** DNA analysis in the study of the epidemiology of nosocomial candidiasis. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **5**:48–53
64. **Domergue R, Castano I, De Las Penas A, Zupancic M, Lockett V, Hebel JR, Johnson D & Cormack BP (2005)** Nicotinic acid limitation regulates silencing of *Candida* adhesins during UTI. *Science* 308: 866–870
65. **Donlan RM & Costerton JW (2002)** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15: 167–193
66. **Dostal J, Dlouha H, Malon P, Pichov' a I & Hruskova-Heidingsfeldova O (2005)** The precursor of secreted aspartic proteinase Sapp1p from *Candida parapsilosis* can be activated both autocatalytically and by a membrane-bound processing proteinase. *Biol Chem* 386: 791–799
67. **Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP.** Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis.* **1999** Aug;29(2):239-44
68. **Edwards Jr JE, Lehrer RI, Stiehm ER, Fischer TJ, Young LS.** Severe candidal infections: clinical perspective, immune defense mechanisms, and current concepts of therapy. *Ann Intern Med* **1978**;89:91—106
69. **Edwards Jr JE.** Invasive candida infections—evolution of a fungal pathogen. *N Engl J Med* **1991**;324:1060-1062.
70. **Eggimann P, Garbino J & Pittet D (2003)** Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill nonimmunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 3: 685–702
71. **Eisenstein, B. I., and N. C. Engleberg. 1986.** Applied molecular genetics: new tools for microbiologists and clinicians. *J. Infect. Dis.* **153**:416–430
72. **El Barkani, A. et al. (2000)** Dominant active alleles of *RIM101/PRR2* bypass the pH restriction on filamentation of *Candida albicans*. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4635–4647
73. **Elie CM, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ:** Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 36: 3260-3265, **1998**
74. **Ellepola ANB and Morrison CJ,** “Laboratory diagnosis of invasive candidiasis,” *The Journal of Microbiology*, vol. 43, pp. 65–84, **2005**

75. **Enache, E. et al. (1996)** *Candida albicans* adherence to a human oesophageal cell line. *Microbiology* 142, 2741–2746
76. **Enger L, Joly S, Pulol C, Simonson M, Pfaller MA & Soll R (2001)** Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 39: 658–669
77. **Fidel PL, Vazquez JA ve Sobel JD.** *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 12: 80–96, **1999**
78. **Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS:** Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 11th ed., Missouri, Mosby, **2002**
79. **Fox, R. I., K. R. Neal, C. L. S. Leen, M. E. Ellis, and B. K. Mandal. 1991.** Fluconazole resistant *Candida* in AIDS. *J. Infect. Dis.* **22**:201–204
80. **Fu et al. (1999)** *C. albicans* virulansında *ALSI'* in rolü, 37. Annual Meeting of the Infectious Disease Society of America, Philadelphia, PA, USA. Abstract
81. **Fu Y, Ibrahim AS, Fonzi W, Zhou X, Ramos CF & Ghannoum MA (1997)** Cloning and characterization of a gene (LIPI) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology* 143: 331–340
82. **Fujita SI, Lasker BA, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ, J. Clin. Microbiol., 1995,** 33, 962-967
83. **Furlaneto-Maia L, Specian A, Bizerra F, Oliveira M & Furlaneto M (2007)** In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida spp.* obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathologia* 166: 209–217
84. **Fusek M, Smith EA, Monod M, Dunn BM & Foundling SI (1994)** Extracellular aspartic proteinases from *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida parapsilosis* yeasts differ substantially in their specificities. *Biochemistry* 33: 9791–9799
85. **G'acser A, Schafer W, Nosanchuk JS, Salomon S & Nosanchuk JD (2007a)** Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol* 44: 1336–1341
86. **G'acser A, Trofa D, Schafer W & Nosanchuk JD (2007b)** Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest* 117: 3049–3058
87. **Galan-Ladero MA, Blanco MT, Sacristan B, Fernandez-Calderan MC, Perez-Giraldo C & Gomez-Garcia AC (2010)** Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. *Med Mycol* 48: 207–210
88. **Gale, C. et al. (1998)** Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. *Science* 279, 1355–1358
89. **Gaur, N.K. et al. (1999)** Overexpression of the *Candida albicans ALA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in aggregation following attachment of yeast cells to extracellular matrix proteins, adherence properties similar to *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 67, 6040–6047

- 90. Ghahri M, Farasat A, Mirhendi H and Beiraghi S.** Identification of *Candida* Species Screened from Catheter Using Patients with PCR-RFLP Method. *Euro.J.Exp.Bio.*, **2012**, 2(3):651-656
- 91. Ghannoum MA (2000)** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 13: 122–143
- 92. Ghannoum, M.A. ve ark (1995)** Reduced virulence of *Candida albicans PHR1* mutants. *Infect. Immun.* 63, 4528–4530
- 93. Gonzalez GM, Elizondo M & Ayala J (2008)** Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. *J Clin Microbiol* 46: 2902–2905
- 94. Gow NAR, Brown AJP & Odds FC (2002)** Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* 5: 366–371
- 95. Guarro J, Gene J, Stchigel AM.** Developments in Fungal Taxonomy. *Clin Microbiol Rev* **1999**;12: 454-500
- 96. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, et al:** Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* **2003**; 37: 1172–1177
- 97. Guler S, Ural O, Findik D, Arslan U, Saudi Med J., 2006, 27 (11), 1706-1710**
- 98. Gutierrez J, Morales P, Gonzales M, Quindos G. (2002)** *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen In: *Journal of Basic Microbiology*, 3, pp.207-227
- 99. Hagerty JA, Ortiz J, Reich D & Manzarbeitia C (2003)** Fungal infections in solid organ transplant patients. *Surg Infect (Larchmt)* 4: 263–271
- 100. Hagerty JA, Ortiz J, Reich D & Manzarbeitia C.** Fungal infections in solid organ transplant patients. *Surg Infect (Larchmt)* 4: 263–271, **2003**
- 101. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH ve ark.** Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 42: 1519–1527, **2004**
- 102. Han, Y. et al. (1998)** A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. *Infect. Immun.* 66, 5771–5776
- 103. Harrington BJ and Hageage GJ.** “Calcofluor white: tips for improving its use,” *Clinical Microbiology Newsletter*, vol. 13, no. 1, pp. 3–5, **1991**
- 104. Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N & Fries BC (2009)** Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect* 11: 753–761

- 105.Haynes KA &Westerneng TJ.** Rapid identification of *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. krusei* by species-specific PCR of large subunit ribosomal DNA. *J Med Microbiol* 44: 390–396, **1996**
- 106.Haynes KA, Westerneng TJ:** Rapid identification of *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. krusei* by species-specific PCR of large subunit ribosomal DNA. *J Med Microbiol* 44: 390–396, **1996**
- 107.Hazen KC, Plotkin BJ & Klimas DM (1986)** Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Infect Immun* 54: 269–271
- 108.Henriques M, Gasparetto K, Azeredo J & Oliveira R (2002)** Experimental methodology to quantify *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. *Biotechnol Lett* 24: 1111–1115
- 109.Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH:** Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol* 38: 1510–1515, **2000**
- 110.Hickey, W. F., L. H. Sommerville, and F. J. Schoen. 1983.** Disseminated *Candida glabrata*: report of a uniquely severe infection and a literature review. *Am. J. Clin. Pathol.* **80**:724–727
- 111.Horn, R., B. Wong, T. E. Kiehn, and D. Armstrong. 1985.** Fungemia in a cancer hospital: changing frequency, earlier onset, and results of therapy. *Rev. Infect. Dis.* **7**:646–655
- 112.Howell, S. A., and W. C. Noble. 1990.** Typing tools for the investigation of epidemic fungal infection. *Epidemiol. Infect.* **105**:1–9
- 113.Howell, S. A., R. M. Anthony, and E. Power. 1996.** Application of RAPD and restriction enzyme analysis to the study of oral carriage of *Candida albicans*. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**:125–128
- 114.Hoyer, L.L. (2001)** The *ALS* gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* **9**, 176–180
- 115.Hube, B. et al. (1997)** Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect. Immun.* **65**, 3529–3538
- 116.Hull CM, Raisner RM, Johnson AD.** Evidence for mating of the asexual yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **2000**;289:307—310
- 117.Isenberg HD, Tucci V, Cintron F, Singer C, Weinstein GS & Tyras DH.** Single-source outbreak of *Candida tropicalis* complicating coronary bypass surgery. *J Clin Microbiol* 27: 2426–2428, **1989**
- 118.Ishii, N. et al. (1997)** Biochemical characterization of Rbf1p, a putative transcription factor of *Candida albicans*. *Microbiology* 143, 429–435
- 119.Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME:** Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* 40: 87–109, **2002**
- 120.Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Chang T & Fries BC (2007)** Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine. *Appl Environ Microb* 73: 1697–1703

- 121. Jayatilake JA, Samaranayake YH, Cheung LK & Samaranayake LP (2006)** Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and nonalbicans *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med* 35: 481–491
- 122. Joachim H & Polayes S.** Subculture endocarditis and systemic mycosis (monilia). *JAMA* 115: 205–208, **1940**
- 123. Jones, S. et al. (1994)** Increased phenotypic switching in strains of *Candida albicans* associated with invasive infections. *J. Clin. Microbiol.* 132, 2869–2870
- 124. Jordan JA:** PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. *J Clin Microbiol* 32: 2962-2967, **1994**
- 125. Kantarcioglu AS & Yücel A (2002)** Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 45: 160–165
- 126. Kauffman CA, Clin Infect Dis., 2005,** 41, 371-376; T. Lundstorm, J. D. Sobel, *Clin Infect Dis.*, **2001,** 32 (11), 1602-1607
- 127. Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD et al. (2000)** Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 30: 14–18
- 128. Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD et al. (2000)** Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 30: 14–18
- 129. Khattak, M. N., J. P. Burnie, R. C. Matthews, and B. A. Oppenheim. 1992.** Clamped homogenous electric field gel electrophoresis typing of *Torulopsis glabrata* isolates causing nosocomial infections. *J. Clin. Microbiol.* **30:**2211– 2215
- 130. Kiehn TE, Edwards FF & Armstrong D.** The prevalence of yeasts in clinical specimens from cancer patients. *Am J Clin Pathol* 73: 518–521, **1980**
- 131. Kikutani H & Makino S (1992)** The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol* 51: 285–322
- 132. Kobayashi CC, O. F. de Fernandes, K. C. Miranda, E. D. de Sousa, R. Silva Mdo, Mycopathologia., 2004,**158(1), 49-52
- 133. Kojic EM & Darouiche RO (2004)** *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* 17: 255–267
- 134. Komshian, S. V., A. K. Uwaydah, and J. D. Sobel. 1989.** Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. *Rev. Infect. Dis.* **11:**379–390
- 135. Kontoyiannis DP, Vaziri I, Hanna HA, Boktour M, Thornby J, Hachem R, Bodey GP & Raad II (2001)** Risk Factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. *Clin Infect Dis* 33: 1676–1681

- 136.Kossoff EH, Buescher ES & Karlowicz MG.** Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. *Pediatr Infect Dis J* 17: 504–508, **1998**
- 137.Krcmery V & Barnes AJ.** Non-albicans *Candida spp.* causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 50: 243–260, **2002**
- 138.Krcmery V (1999a)** *Torulopsis glabrata* an emerging yeast pathogen in cancer patients. *Int J Antimicrob Ag* 11: 1–6
- 139.Krcmery VJ (1999b)** Candidemia in cancer patients: risk factors and outcome in 140 episodes from a single cancer institution. *Acta Chemoth* 5: 133–145, **1997**
- 140.Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK & Ghannoum MA (2002)** Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 70: 878–888
- 141.Kumamoto CA (2002)** *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 5: 608–611
- 142.Kumar VG, Latha R, Vedhagiri K, Sathiamoorthi T, Jayarani G, Sasikala R, Selvin J & Natarajaseenivasan K (2009)** Phospholipase C, proteinase and hemolytic activities of *Candida spp.* isolated from pulmonary tuberculosis patients. *J Mycol Med* 19: 3–10
- 143.Kurtzman CP, Fell JW.** The yeasts: a taxonomic study, 4th edn. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands, **1998**
- 144.Kwon-hung KJ, Bennet JE.** Medical mycology, **1992**
- 145.Lamagni TL, Evans BG, Shigematsu M, et al:** Emerging trends in the epidemiology of invasive mycoses in England and Wales (1990 –9). *Epidemiol Infect* **2001**; 126: 397–414
- 146.Larone D.** Medically Important Fungi; A Guide to Identification. 4th edn. ASM Press, Washington, **2002**
- 147.Lass-Floerl C, 2009** The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 52: 197–205
- 148.Lattif AA, Mukherjee PK, Chandra J, Swindell K, Lockhart SR, Diekema DJ, Pfaller MA & Ghannoum MA (2009)** Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. *Int J Med Microbiol* 300: 265–270
- 149.Leleu G, Aegerter P, Guidet B:** Systemic candidiasis in intensive care units: A multicenter, matched-cohort study. *J Crit Care* **2002**; 17:168–175
- 150.Lengeler, K.B. et al. (2000)** Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*64, 746–785
- 151.Lermann U & Morschhauser J (2008)** Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by *Candida albicans*. *Microbiology* 154: 3281–3295

- 152.Lermann ve Morschhauser 2008, Naglik ve ark 2008, Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R,Williams D & Azeredo J (2010b)** Silicone colonisation by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. *J Med Microbiol* 59: 747–754
- 153.Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, Mira JP, Gouin F, Sollet JP, Carlet J, Reynes J, Rosenheim M, Regnier B, Lortholary O, Amarcard Study Group.,Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006)**
- 154.Liguori G, Onofrio V, Lucariello A, Galle F, Signoriello G, Colella G, D’Amora M & Rossano F (2009)** Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. *Oral Microbiol Immun* 24: 76–78
- 155.Lo, H-J. et al. (1997)** Nonfilamentous *Candida albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90, 939–949
- 156.Luo G, Samaranayake LP, Cheung BPK & Tang G (2004)** Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in vitro haemolysin production. *APMIS* 112: 283–290
- 157.Maiwald M, Kappe R; Sonntag HG:** Rapid presumptive identification of medically relevant yeasts to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Med Vet Mycol* 32: 115-122, **1994**
- 158.Makimura K, Tamura Y, Kudo M, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H:** Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 region. *J Med Microbiol* 49: 29-35, **2000**
- 159.Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, Hasegawa A, Tajiri Y, Hanazawa R, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H:** Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Clin Microbiol* 37: 920-924, **1999**
- 160.Malani AN, Kauffman CA, Expert Review of Anti-infective Therapy., 2007, 5 (2), 277-284**
- 161.Manns JM, Mosser DM & Buckley HR (1994)** Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun* 62: 5154–5156
- 162.Manzano-Gayosso P, Hernandez-Hernandez F, Zavala-Velasquez N, Mendez-Tovar LJ, Naquid-Narvaez JM, Torres-Rodriguez JM & Lopez-Martinez R (2008)** Candiduria in type 2 diabetes mellitus patients and its clinical significance. *Candida spp. antifungal susceptibility. Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 46:603–610
- 163.Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, et al:** Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: Secular trends, **1991–2000**. *Clin Infect Dis* 2004; 38:311–320
- 164.Marsh PD ve Martin M.** “Oral fungal infections,” in *Oral Microbiology*, pp. 166–179, Churchill Livingstone, Edinburgh, UK, **2009**
- 165.Martin MV.** Germ-tube formation by oral strains of *Candida tropicalis*. *J Med Microbiol* 12: 187–194, **1979**

- 166.Martins M, Henriques M, Ribeiro AP, Fernandes R, Goncalves V, Seabra A, Azeredo J & Oliveira R (2010a)** Oral *Candida* carriage of patients attending a dental clinic in Braga, Portugal. *Rev Iberoam Micol* 27: 119–124
- 167.Martins M, Uppuluri P, Thems DD, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot LJ & Oliveira R (2010b)** Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia* 5: 323–331
- 168.Merkerova M, Dostal J, Hradilek M, Pichova I & Hruskova-Heidingsfeldova O (2006)** Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from *Candida parapsilosis*. *FEMS Yeast Res* 6: 1018–1026
- 169.Merz, W. G. 1986.** *Candida albicans* strain delineation. *Clin. Microbiol. Rev.* 3:321–334
- 170.Merz, W. G., J. E. Karp, D. Schron, and R. Saral. 1986.** Increased incidence of fungemia caused by *Candida krusei*. *J. Clin. Microbiol.* 24:581–584
- 171.Meunier, F. M., M. Paesmans, and P. Autier. 1994.** Value of antifungal prophylaxis with antifungal drugs against oropharyngeal candidiasis in cancer patients. *Eur. J. Cancer* 30B:196–199
- 172.Miller MG, Johnson AD.** White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* 2002;110: 293—302
- 173.Miranda LN, van der Heijden IM, Costa SF, Sousa AP, Sierra RA, Gobara S, Santos CR, Lobo RD, Pessoa VP & Levin AS (2009)** *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect* 72: 9–16
- 174.Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H.** One-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species, *Jpn. J. Med. Mycol.*, 2006, Vol. 47,225-229
- 175.Monod, M et al. (1994)** Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol. Microbiol.* 13, 357–368
- 176.Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH:** Delaying the empiric treatment of *Candida* bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: A potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:3640–3645
- 177.Muhlschlegel, F.A. ve Fonzi, W.A. (1997)** *PHR2* of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene *PHR1* with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol. Cell Biol.* 17, 5960–5967
- 178.Murray PR et al.** *Manual of Clinical Microbiology*, 1995, 6th ed
- 179.Naglik JR, Moyes D, Makwana J et al. (2008)** Quantitative expression of the *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase gene family in human oral and vaginal candidiasis. *Microbiology* 154: 3266–3280

- 180.Nassar A, Zapata M, Little JV, and Siddiqui MT**, “Utility of reflex gomori methenamine silver staining for *Pneumocystis jirovecii* on bronchoalveolar lavage cytologic specimens: a review,” *Diagnostic Cytopathology*, vol. 34, no. 11, pp. 719–723, **2006**
- 181.National Committee for Clinical Standarts**: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, Approved Standart-Second edition, M27-A2, National Committee for Clinical Standarts,Wayne, Pennsylvania, **2002**
- 182.Negri M, Gonc,alves V, Silva S, Henriques M, Azeredo J & Oliveira R (2010a)** Crystal violet staining to quantify *Candida* adhesion to epithelial cells. *Brit J Biomed Sci* 67: 120–125
- 183.Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinski T, Azeredo J & Oliveira R (2010b)** Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia* 169: 175–182
- 184.Neugnot V, Moulin G, Dubreucq E & Bigey F (2002)** The lipase/ acyltransferase from *Candida parapsilosis*: molecular cloning and characterization of purified recombinant enzymes. *Eur J Biochem* 269: 1734–1745
- 185.Nguyen MH, Peacock JE, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, Yu VL**: The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* **100**: 617-623, **1996**
- 186.Nolla-Salas J, Sitges-Serra A, Leon-Gil C, et al**: Candidemia in non-neutropenic critically ill patients: Analysis of prognostic factors and assessment of systemic antifungal therapy. Study Group of Fungal Infection in the ICU. *Intensive Care Med* 1997; 23:23–30
- 187.Nosek J, Holesova Z, Kosa P, G´acser A &Tomaska L (2009)** Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet* 55: 497–509
- 188.Nucci M & Colombo AL (2007)** Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn Micr Infec Dis* 58: 77–82)
- 189.Odds F**. *Candida and Candidiasis*. 2nd edn. Bailliere Tindall, London, **1998**
- 190.Odds, F. C. 1988**. Ecology and epidemiology of candidiasis, *In* *Candida and candidosis*. University Park Press, Baltimore, Md. p. 89
- 191.Odds, F.C. (1988)** *Candida and Candidosis* (2nd edn), pp. 42–59, Baillière Tindall
- 192.Oliveira R,Williams D & Azeredo J (2010b)** Silicone colonisation by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. *J Med Microbiol* 59: 747–754
- 193.Orazio R, Scordino F, Pernice I, Passo CL & Criseo G**. A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. *J Microbiol Meth* 79: 117–120, **2009**

- 194.Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Bennett J, Kullberg BJ.** Deeply invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* **2002**;16: 821—835
- 195.Panagoda GJ, Ellepola ANB & Samaranayake LP (2001)** Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 44: 29–35
- 196.Parkins MD, Sabuda DM, Elsayed S, et al:** Adequacy of empirical antifungal therapy and effect on outcome among patients with invasive *Candida* species infections. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 60:613–618
- 197.Pfaller MA & Diekema DJ.** Epidemiology of invasive Candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133–163, **2007**
- 198.Pfaller MA, Castanheira M, Messer AS, Moet GJ & Jones RN.** Variation in *Candida spp.* distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Diagn Micr Infec Dis* 68: 278–283, **2010**
- 199.Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond M & Wenzel RP.** National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Micr Infec Dis* 31: 327–332, **1998**
- 200.Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP.** National surveillance of nosocomial bloodstream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1998**;31:327—332
- 201.Pfaller MA.** Laboratory aids in the diagnosis of invasive candidiasis. *Mycopathology* 120: 65–72, **1992**
- 202.Pfaller, M.A. et al. (2000)** Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 747–751
- 203.Pichov´a I, Pavlickova L, Dostal J, Dolejsi E, Hruskova-Heidingsfeldova O, Weber J, Ruml T & Soucek M (2001)** Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*: inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem* 268: 2669–2677
- 204.Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, and Coleman D,** “Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 36, no. 7, pp. 2093–2095, **1998**
- 205.R. Platt, B. F. Polk, B. Murduok, B. Rosner,** *Am J Epidemiol.*, **1986**,124 (6), 977-985
- 206.Ramage G, Martinez JP & Lopez-Ribot JL (2006)** *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 6: 979–986
- 207.Ramage G, Martinez JP & Lopez-Ribot JL (2006)** *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 6: 979–986

- 208.Redding SW, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Sadkowski L, Fothergill AW, Rinaldi MG, Eng TY & Patterson TF.** *Candida glabrata* oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation treatment for head and neck cancer. *J Clin Microbiol* 40: 1879–1881, **2002**
- 209.Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeaupuis JP, Hanazawa R, Latge JP, Lortholary J, Makimura K, Morrison CJ, Murayama SY, Naoe S, Paris S, Sarfati J, Shibuya K, Sullivan D, Uchida K, Yamaguchi H:** Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med Mycol* 36(Suppl 1): 249-257, **1998**
- 210.Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, et al.** Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **2000**;30:662—678
- 211.Rho J, Shin J, Song J, Park M, Kee S, Jang S, Park Y, Suh S & Ryang D (2004)** Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida tropicalis* candiduria using pulsed-field gel electrophoresis. *J Microbiol* 42: 80–86
- 212.Rigby S, Procop GW, Haase G ve ark.** Fluorescence In Situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 40: 2182–2186, **2002**
- 213.Riggle, P.J. et al. (1999)** Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. *Infect. Immun.* 67, 3649–3652
- 214.Rousselle P, Freydiere AM, Couillerot PJ, De Montclos H, and Gille Y,** “Rapid identification of *Candida albicans* by using albicans ID and fluoroplate agar plates,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 32, no. 12, pp. 3034–3036, **1994**
- 215.Ruan S & Hsueh P (2009)** Invasive candidiasis: an overview from Taiwan. *J Med Assoc* 108: 443–451
- 216.Ruping MJ, Vehreschild JJ & Cornely OA, (2008)** Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat. *Drugs* 68: 1941–1962
- 217.Rüchel R (1999)** Proteinases of pathogenic fungi. *Mycoses* 42: 48–52
- 218.Rüchel R, de Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA & Cole GT (1992)** *Candida* acid proteinases. *J Med Vet Mycol* 30: 123–132
- 219.Safdar A, Perlin DS, Armstrong D.** Hematogenous infections due to *Candida parapsilosis*: changing trends in fungemic patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2002**;44:11—16
- 220.Saiman L, Ludington E, Dawson JD ve ark.** Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J* 20: 1119–1124, **2001**
- 221.Samaranayake LP, Fidel PL, Naglik JR, Sweet SP, Teanpaisan R, Coogan MM, Blignaut E & Wanzala P.** Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis* 8: 151–160, **2002**
- 222.Samaranayake LP, Fidel PL, Naglik JR, Sweet SP, Teanpaisan R, Coogan MM, Blignaut E & Wanzala P (2002)** Fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis* 8: 151–160

- 223.Samaranayake LP, MacFarlane TW, and Williamson MI**, “Comparison of Sabouraud dextrose and Pagano-Levin agar media for detection and isolation of yeasts from oral samples,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 25, no. 1, pp. 162–164, **1987**
- 224.Samaranayake YH & Samaranayake LP (2001)** Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev* 14: 389–429
- 225.Sanglard, D. et al. (1997)** A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes, *SAP4*, *SAP5*, and *SAP6* of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect. Immun.* 65, 3539–3546
- 226.Saparito-Irwin, S.M. ve ark (1995)** *PHR1*, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol. Cell Biol.* 15, 601–613
- 227.Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP.** Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* **1991**; 91(Suppl. B):72S—75S
- 228.Shepard JR, Addison RM, Alexander BD et al.**, “Multicenter evaluation of the *Candida albicans/Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 46, no. 1, pp. 50–55, **2008**
- 229.Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP & Ryang DW (2002)** Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 40: 1244–1248
- 230.Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D & Azeredo J (2009a)** Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol* 47: 681–689
- 231.Silva S, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J, Malic S, Hooper SJ & Williams DW (2009b)** Characterization of *Candida parapsilosis* infection of an in vitro reconstituted human oral epithelium. *Eur J Oral Sci* 117: 669–675
- 232.Silva S, Negri M, Henriques M, Cassone A, De Bernardis F, Pontieri E, Carruba G, Girmenia C, Martino P, Fernandez-Rodriguez M, Quindos G & Ponton J (1995)** Biotype diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J Infect Dis* 171: 967–975
- 233.Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D & Azeredo J (2010b)** Silicone colonisation by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. *J Med Microbiol* 59: 747–754
- 234.Slutsky, B. et al. (1985)** High frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science* 230, 666–669
- 235.Slutsky, B. et al. (1987)** White–opaque transition: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 169, 5579–5588
- 236.Soll, D. (1988)** High-frequency switching in *Candida albicans* and its relationship to vaginal candidiasis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 158, 997–1001

- 237. Staab, J.F. et al. (1996)** Developmental expression of a tandemly repeated, proline and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 271, 6298–6303
- 238. Staab, J.F. et al. (1999)** Adhesive and mammalian transglutaminase properties of the *Candida albicans* HWPI. *Science* 283, 1535–1538
- 239. Steffan, P., D. Boikov, C. Xu, J. D. Sobel, R. A. Akins, and J. A. Vazquez. 1997.** Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. *J. Clin. Microbiol.* 35:2031–2039
- 240. St-Germain G, Laverdiere M, Pelletier R, Bourgault A, Libman M, Lemieux C, Noe G. (2001)** Prevalance and Antifungal Susceptibility of 442 *Candida* Isolates from Blood and Other Normally Sterile Sites: Results of a 2-Year (1996 to 1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. In: *Journal of Clinical Microbiology*, 39, March, pp 949-953
- 241. Strofer SP, Medoff G, Fraser VJ, Powderly WG and Dunagan WC, Infect Dis Clin Pract., 1994, 3, 23-29**
- 242. Sugita T, Nishikawa A, Ikeda R, Shinoda T:** Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *trichosporon* identification. *J Clin Microbiol* 37: **1985-1993, 1999**
- 243. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, and Coleman DC, “Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals,” Microbiology, vol. 141, no. 7, pp. 1507–1521, 1995**
- 244. Sundstrom, P. (1999)** Adhesins in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 353–357
- 245. Symersky J, Monod M & Foundling SI (1997)** High-resolution structure of the extracellular aspartic proteinase from *Candida tropicalis* yeast. *Biochemistry* 36: 12700–12710
- 246. Şahiner F.** Hastane enfeksiyonu olarak izole edilen *Candida* suşlarının genotip ve fenotipik olarak tiplendirilmesi (2008), İstanbul
- 247. Timpel, C. et al. (1998)** Multiple functions of Pmt1p-mediated protein O-mannosylation in the fungal pathogen, *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 273, 20837–20846
- 248. Togni G, Sanglard D, Falchetto R & Monod M (1991)** Isolation and nucleotide sequence of the extracellular acid protease gene (ACP) from the yeast *Candida tropicalis*. *FEBS Lett* 286: 181–185
- 249. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L & Grillot R.** Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Ag* 27: 359–366, **2006**
- 250. Trnovsky J, Merz W, Della-Latta P, Wu F, Arendrup MC, and Stender H, “Rapid and accurate identification of *Candida albicans* isolates by use of PNA FISHFlow,” Journal of Clinical Microbiology, vol. 46, no. 4, pp. 1537–1540, 2008**

- 251. Trofa D, Gacser A & Nosanchuk JD (2008)** *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21: 606–625
- 252. Tsuchimori, N. et al. (2000)** Reduced adherence of *HWP1*-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. *Infect. Immun.* 68, 1997–2002
- 253. Vazquez JA, Sanchez V, Dmuchowski C, Dembry LM, Sobel JD & Zervos MJ.** Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study. *J Infect Dis* 168: 195–201, **1993**
- 254. Vazquez, J. A., A. Beckley, J. D. Sobel, and M. J. Zervos. 1991.** Comparison of restriction enzyme analysis versus pulse-field gradient gel electrophoresis as a typing system for *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **29**:962–967
- 255. Vazquez, J. A., C. Sanchez, C. Dmuchowski, L. Dembry, J. D. Sobel, and M. J. Zervos. 1993.** Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study. *J. Infect. Dis.* 168:195–201
- 256. Vazquez, J. A., L. M. Dembry, V. Sanchez, M. A. Vazquez, J. D. Sobel, C. Dmuchowski, and M. J. Zervos. 1998.** Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study. *J. Clin. Microbiol.* **36**:421–426
- 257. Verweij PE, Breuker IM, Rijs AJ ve Meis JF.** Comparative study of seven commercial yeast identification systems. *J Clin Pathol* 52: 271–273, **1999**
- 258. Voss A.** Therapeutic approach to the patient with candidemia. *Clin Microbiol Infect* 1999;5(Suppl. 2):S54—S57
- 259. Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, and Schnitzler P,** “Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, no. 8, pp. 3016–3021, **2000**
- 260. Warnock, D., J. Burke, N. J. Cope, E. Johnson, N. Von Fraunhofer, and E. Williams. 1988.** Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Lancet* **ii**:1310. (Letter.)
- 261. Watanabe T, Takano M, Murakami M, Tanaka H, Matsuhisa A, Nakao N, Mikami T, Suzuki M & Matsumoto T (1999)** Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology* 145: 689–694
- 262. Weems JJ (1992)** *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* 14: 756–766
- 263. Wenzel, R.P. (1995)** Nosocomial candidiasis: risk factors and attributable mortality. *Clin. Infect. Dis.* 20 1531–1534
- 264. Wey, S. B., M. Motomi, M. A. Pfaller, R. F. Wolsen, and R. P. Wenzel. 1989.** Risk factors for hospital-acquired candidemia: a matched case control study. *Arch. Intern. Med.* **149**:2249–2253
- 265. Williams DW and Lewis MAO.** “Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity,” *Oral Diseases*, vol. 6, no. 1, pp. 3–11, **2000**

- 266. Williams DW, Wilson MJ, Lewis MA, Potts AJ:** Identification of *Candida* species by PCR and restriction fragment length polymorphism analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol* 33: 2476-2479, **1995**
- 267. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, et al:** Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med* **1991**; 325: 1274–1277
- 268. Wingard JR:** Importance of *Candida* species other than *C albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis* **20**: 115-125, **1995**
- 269. Wingard, J. R. 1994.** Infections due to resistant *Candida* species in patients with cancer who are receiving chemotherapy. *Clin. Infect. Dis.* **19**:S49–S53
- 270. Wingard, J. R., W. G. Merz, M. G. Rinaldi, C. B. Miller, J. E. Karp, and R. Saral. 1993.** Association of *Torulopsis glabrata* infections with fluconazole prophylaxis in neutropenic bone marrow transplant patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1847–1849
- 271. Wingard, J. R., W. G. Merz, M. G. Rinaldi, T. R. Johnson, J. E. Karp, and R. Saral. 1991.** Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N. Engl. J. Med.* 18:1274–1277
- 272. Wingard, J., W. Merz, and R. Saral. 1979.** *Candida tropicalis*: a major pathogen in immunocompromised patients. *Ann. Intern. Med.* **91**:529–543
- 273. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al:** Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **2004**; 39:309–317
- 274. Yeo SF and Wong B,** “Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections,” *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 15, no. 3, pp. 465–484, **2002**
- 275. Yoshio O ve Kouji G.** Antigenicity of *Candida tropicalis* strain cells cultured at 27 and 37 1C. *FEMS Immunol Med Mic* 46: 438–443, **2006**
- 276. Zaugg C, Borg-von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D & Monod M (2001)** Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun* 69: 405–412
- 277. Zaugg C, Borg-von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D & Monod M (2001)** Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun* 69: 405–412

ÖZGEÇMİŞ

Hamdullah Suphi BAYRAKTAR 22.03.1975 tarihinde Antakya'da doğdu. İlköğrenimini Hatay İlkokulunda, orta ve lise öğrenimini Hatay Osman Ötken Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Üniversite eğitimini 1995-2001 yılları arasında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde tamamlayarak 2009 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji bölümünde yüksek lisans yapmaya hak kazandı ve yüksek lisans eğitimini 2013 yılında "Klinik örneklerden izole edilen Candida suşlarının PCR-RFLP yöntemiyle identifikasyonu" adlı tezle bitirdi.