T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SİSTEMİK KANDİDEMİ ETKENİ *Candida albicans* SUŞLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TİPLENDİRİLMESİ VE SAP4 GENİ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

DOKTORA

Kemal BİLGİN

Samsun
Ağustos-2011

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SİSTEMİK KANDİDEMİ ETKENİ *Candida albicans* SUŞLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TİPLENDİRİLMESİ VE SAP4 GENİ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

DOKTORA

Kemal BİLGİN

I. Danışman; Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ

II. Danışman; Yrd. Doç. Dr. Tuba YILDIRIM

Samsun
Ağustos-2011

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bu çalışma jürimiz tarafından **Tıbbi Mikrobiyoloji** programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Belma DURUPINAR	Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ	Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Cafer EROĞLU	Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Ayşe Esin AKTAŞ	Atatürk Üniversitesi
Üye	: Doç. Dr. Nurten KARA	Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Tezin Adı: Sistemik Kandidemi Etkeni Candida Albicans Suşlarının Moleküler Yöntemlerle Tiplendirilmesi ve Sap4 Geni Varlığının Araştırılması.

Tezi Teslim Eden: Kemal BİLGİN

Tez Savunma Sınav Tarihi: 22.09.2011

Tez Danışmanı: I. Danışman; Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ
II. Danışman; Yrd. Doç. Dr. Tuba YILDIRIM

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurul'unca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Süleyman KAPLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benden hiç esirgemeyen birinci danışmanım Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ ve ikinci danışmanım Yrd. Doç. Dr. Tuba YILDIRIM hocalarıma çok teşekkür ederim. Ayrıca bu süreçte beni hep destekleyen bölümümüz öğretim üyelerinden Prof. Dr. Belma DURUPINAR, Prof. Dr. Murat GÜNAYDIN, Prof. Dr. Murat HÖKELEK, Prof. Dr. Cafer EROĞLU, Doç. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN ve Yrd. Doç. Dr. Adil KARADAĞ hocalarıma da teşekkür ederim. Tez izleme jürimde bulunan ve değerli katkılarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji AD'dan Doç. Dr. Nurten KARA hocama da teşekkür ederim.

Yıllardır çalışmaktan mutluluk duyduğum Tıbbi Mikrobiyoloji AD asistan ve laboratuar personeli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca hep yanımda olan, destek ve sabırlarını benden hiç esirgemeyen aileme ve sevgili eşime de teşekkür ederim.

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından T.592'nolu proje olarak desteklenmiştir.

ÖZET

SİSTEMİK KANDİDEMİ ETKENİ *Candida albicans* SUŞLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TİPLENDİRİLMESİ VE SAP4 GENİ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Kemal BİLGİN, Doktora

Son yıllarda mantarlara bağlı enfeksiyonlarda ciddi artış dikkati çekmektedir. Özellikle *C. albicans* sahip olduğu virülans faktörleri sayesinde en sık karşılaştığımız enfeksiyon etkenlerindendir. Ayrıca, *C. albicans* önemli bir hastane enfeksiyonu etkeni olarak, morbidite ve mortalite artışına neden olabilmektedir. Bu nedenle hastanemizden izole edilen *C. albicans* suşlarının doğru tanımlanabilmesi, moleküler genotiplendirme yöntemleriyle hastanemizdeki yayılımlarının takip edilmesi ve virülans faktörlerinin incelenmesi önem arz etmektedir.

Bu çalışmada; Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatan hastaların kan örneklerinden izole edilen *C. albicans* suşlarının moleküler yöntemler kullanılarak tiplendirilmesi ve bu mikroorganizmaların virülansında önemli bir rolü olan Salgısal Aspartil Proteinaz 4 (SAP4) gen bölgesi varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya hastanemizin çeşitli servislerinden, laboratuarımıza gönderilen kan kültürlerinden izole edilmiş 50 *C. albicans* suşu dahil edildi. İzolatlar fenotipik ve genotipik olarak tanımlandı. Çalışmaya dahil edilen hastaların epidemiyolojik bilgileri ve enfeksiyon oluşumuna neden olabilecek risk faktörleri araştırıldı. Suşların moleküler tiplendirilebilmesi için Arbitrarily Primed Polimeraz Zincir Reaksiyonu (AP-PZR) ve Pulsed Field Gel Elektroforezi (PFGE) yöntemleri kullanıldı. Ayrıca *C. albicans* için bir virülans faktörü olan SAP4 gen varlığı PZR yöntemi ile araştırıldı.

Çalışmaya alınan 50 *C. albicans* izolatı, AP-PZR yöntemi ile 26, PFGE yöntemi ile 41 genotipe ayrılmıştır ve 50 izolatın 49'unda SAP4 geni varlığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak hastanemizde kandan izole edilen *C. albicans* izolatlarının kümelendiği baskın genotipler tespit edilmemiştir. Bazı hastalarda ekzojen bulaş olabileceği görülse de hastaların önemli bir kısmında enfeksiyonun endojen kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca izolatların %98'inde SAP4 geni tespit edilmiştir ve bu gen bölgesinin kan izolatlarında önemli oranda bulunduğu gösterilmiştir.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Ağustos-2011

ABSTRACT

TYPING OF SYSTEMICAL CANDIDEMIA AGENTS OF *Candida albicans* ISOLATES BY MOLECULAR METHODS AND INVESTIGATION OF SAP4 GENE PRESENCE

Kemal BİLGİN, Doctoral

In recent years increasing infections due to the fungus draw attention. Especially, *C. albicans* is one the most freuquent infectious agent with its virulance factors. Furthermore, *C. albicans* is a nasocomial infection agent because of this it can lead an increase in the mortality and morbidity. Therefore, correct identification of *C. albicans* strains in our hospital and following distrubition of these strains by moleculer genotyping and investigating their virulance factors get importance.

In this study; it is aimed to genotype *C. albicans* strains that isolated from blood cultures of hospitalised patients in Ondokuz Mayıs University Medicine School Hospital by molecular methods and to investigate one of the most important virulance factor Secreted Aspartyl Proteinases (SAP4) .

Our study included 50 *C. albicans* strains that isolated in our laboratory from blood cultures of patients from different clinics. The isolates were identified both phenotypically and genotypically. Epidemiological datas and predisposing factors for infection were also evaluated for patients included our study. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) methods were used for molecular genotyping of strains. Furthermore, SAP4 a virulance factor for *C. albicans* was investigated by PCR.

The 50 *C. albicans* isolates included in our study were separated to 26 genotype by AP-PCR, 41 genotype by PFGE and SAP4 was detected in 49 of 50 isolates.

In conclusion, it was not detected any dominant genotype clusture of *C. albicans* isolates that isolated from blood culture in our hospital. It was thought that source of infection is endogeneous in most of the patients, may be some of them exogenous. In addition, SAP4 gene were detected in 98% of isolates and was indicated that this gene region has significant proportion in bloodstream infections.

University of Ondokuz Mayıs Samsun, August-2011

SİMGELER VE KISALTMALAR

AFLP; Amplified fragment length polymorphism

AIDS; Acquired immune deficiency syndrome

AmB; Amfoterisin B

AP-PZR; Arbitrarily primed PZR

ARDRA; Amplified rDNA restriction analysis

CHEF; Counter-clamped homogeneous electric field electrophoresis

DI; Diskriminasyon indeksi

DNA; Deoksiribo nükleik asit

dNTP; Deoksiribonükleotide triphosphate

EDTA; Ethylenediaminetetraacetic acid

EMB; Eosin-methylene blue

FIGE; Field inversion gel electrophoresis

HIV; Human immunodeficiency virus

ITS; Internal transcribed spacer

PFGE; Pulsed field gel electrophoresis

PP; Pankreatik psödokist

PZR; Polimeraz zincir reaksiyonu

PZR-RFLP; Polimeraz zincir reaksiyon-restriction fragment length polymorphism

RAPD; Random amplified polymorphic DNA

REP-PZR; Repetitive extragenic palindrome PZR

RT-PZR; Geri (Revers) transkripsiyon PZR

SAP; Salgısal aspartil proteinazlar

SDA; Sadouraud dekstroz agar

SDS; Sodium dodecyl sulfate

SF; Serum fizyolojik

SPSS; Statistical Package for the Social Sciences

UPGMA; Unweighted pair group method with mathematical averaging

İÇİNDEKİLER

ÖZET IV

ABSTRACT V

SİMGELER ve KISALTMALAR VI

İÇİNDEKİLER VII

GİRİŞ 1

GENEL BİLGİLER 4

1. *C. albicans*'ın GENEL ÖZELLİKLERİ 4

2. *C. albicans*'ın PATOGENEZİ 5

3. *C. albicans*'ta SALGISAL ASPARTİL PROTEİNAZLAR (SAP) 7

3. 1. *C. albicans* SAP Gen Grupları 8

3. 2. *C. albicans* Sap Proteinlerinin Biyokimyasal Özellikleri 8

3. 3. Salgısal Aspartil Proteinaz'lar ve *C. albicans*'ın Patogenezi 8

4. *C. albicans*'ın EPİDEMİYOLOJİSİ 9

5. LABORATUVAR TANI 9

5. 1. Kültür 9

5. 2. İdentifikasyon 9

5. 2. 1. Germ Tüp Testi 9

5. 2. 2. Mikroskobik Morfoloji 10

5. 2. 3. Biyokimyasal Özellikler 10

5. 3. Kültür Dışı Tanı Yöntemleri 10

5. 3. 1. Serolojik Testler 10

5. 3. 2. Moleküler Testler 11

6. *C. albicans*'ın HASTANE ENFEKSİYONLARINDAKİ YERİ 12

7. MOLEKÜLER TİPLENDİRME YÖNTEMLERİ 16

7. 1. Pulsed-Field Gel Electrophpresis (PFGE) 17

7. 2. Arbitrarily Primed PZR (AP-PZR) 19

8. TEDAVİDE KULLANILABİLECEK ANTİFUNGAL İLAÇLAR 20

MATERYAL VE METOT 21
1. İZOLATLAR 21
1. 1. Suşların İzolasyonu 21
2. HASTALARA AİT BİLGİLER 21
3. İZOLATLARIN FENOTİPİK TANIMLANMASI 22
3. 1. Germ Tüp Testi 22
3. 2. Pirinç Ekstresi-Tween 80 Agar 22
3. 3. Kromojenik Besiyeri 22
3. 4. ID 32C Maya İdentifikasyon Sistemi 23
4. İZOLATLARIN GENOTİPİK TANIMLANMASI 23
4. 1. *C. albicans*'ın EO3 Gen Bölgesinin PZR İle Tanımlanması 23
4. 1. 1. DNA Ekstraksiyonu 23
4. 1. 2. EO3 PZR Optimizasyonu 24
4. 1. 3. EO3 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu 25
4. 1. 4. EO3 Gen Bölgesi Elektroforezi 26
5. *C. albicans*'ı AP-PZR (ARBITRARILY PRIMED-PZR) İLE MOLEKÜLER TİPLENDİRME 26
5. 1. DNA Ekstraksiyonu 26
5. 2. AP-PZR Optimizasyonu 27
5. 2. 1. AP-PZR Magnezyum Klorür Optimizasyonu 27
5. 2. 2. AP-PZR Primer Bağlanma Isı Optimizasyonu 28
5. 3. AP-PZR Amplifikasyonu 28
5. 4. AP-PZR Elektroforezi 29
5. 5. AP-PZR Sonuçlarının Yorumlanması 30
6. *C. albicans*'ın PFGE İLE MOLEKÜLER TİPLENDİRME 30
6. 1. Kalıpların Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler 30
6. 2. Kalıpların Hazırlanması 30
6. 3. Kalıpların Jele Yüklenmesi 31
6. 4. PFGE Elektroforez Koşullarının Optimizasyonu 32
6. 5. PFGE Elektroforez Koşulları 32
6. 6. PFGE'de Jelin Görüntülenmesi 32
6. 7. PFGE Sonuçların Yorumlanması 33

7. DİSKRİMİNASYON İNDEKSİ 33
8. SAP4 GEN BÖLGESİNİN PZR İLE TESPİTİ 33
8. 1. SAP4 PZR Optimizasyonu 33
8. 1. 1. SAP4 PZR Magnezyum Klorür Optimizasyonu 33
8. 1. 2. SAP4 PZR Primer Bağlanma Isı Optimizasyonu 34
8. 2. SAP4 Gen Bölgesi Amplifikasyonu 35
8. 3. SAP4 Gen Bölgesi Elektroforezi 35

BULGULAR 36
1. HASTALARIN EPİDEMİYOLOJİK DURUMLARINA AİT BİLGİLER 36
2. RİSK FAKTÖRLERİNİN DAĞILIMI 40
3. FENOTİPİK TANIMLAMA 42
4. GENOTİPİK TANIMLAMA 42
4. 1. EO3 PZR Optimizasyon Sonuçları 42
4. 1. 1. EO3 PZR Magnezyum Klorür Optimizasyonu 42
4. 1. 2. EO3 PZR Primer Bağlanma Isısı Optimizasyonu 43
4. 2. İzolatların EO3 PZR Sonuçları 44
5. AP-PZR SONUÇLARI 45
5. 1. AP-PZR Optimizasyon Sonuçları 45
5. 1. 1. AP-PZR Magnezyum Klorür Optimizasyonu 45
5. 1. 2. AP-PZR Primer Bağlanma Isısı Optimizasyonu 45
5. 2. İzolatların AP-PZR Sonuçları 46
6. PFGE SONUÇLARI 50
7. SAP4 PZR SONUÇLARI 54
7. 1. SAP4 PZR Optimizasyon Sonuçları 54
7. 1. 1. SAP4 PZR Magnezyum Klorür Optimizasyonu 54
7. 1. 2. SAP4 PZR Primer Bağlanma Isısı Optimizasyonu 55
7. 2. İzolatların SAP4 PZR Sonuçları 55

TARTIŞMA 61

SONUÇ ve ÖNERİLER 72

KAYNAKLAR 73

ÖZGEÇMİŞ 81

GİRİŞ

Son 20-30 yıllık süre içinde tıbbi teknolojideki ilerlemeler ile birlikte kritik hastaların yaşam süresinin uzaması, immün sistemi baskılayıcı ilaçların daha yoğun ve uzun süre kullanılması ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin akılcı kullanılmaması gibi nedenlerle invaziv mikozlarla daha sık karşılaşılır hale gelinmiştir (Yıldıran, 2004; Akalın, 2008).

Yaklaşık 150 mantar türünün insanlarda hastalık oluşturduğu bilinmekle beraber, fırsatçı patojen mantarlar içinde *Candida* türleri en sık karşılaşılan gruptur. Son yıllarda, *Candida*'ya bağlı kan dolaşımı enfeksiyonu sıklığı tüm yaş gruplarında sürekli bir artış göstermiştir (Yıldıran, 2004; Tümbay, 2010). *Candida* türleri içinde *Candida albicans* (*C. albicans*) klinik örneklerden en sık izole edilen türdür ve kan dolaşımı enfeksiyonlarının %50-70'ini oluşturur (Yıldıran, 2004; Tümbay, 2010).

Candida enfeksiyonları açısından; kan ve kemik iliği transplantasyonu olanlar, solid organ transplantasyonu ve büyük cerrahi geçirenler, AIDS'liler, neoplastik hastalığı bulunanlar, immünsüpresiv kemoterapi alanlar, uç yaşlarda olanlar (1 yaşından küçük 60 yaşından büyük), prematüre doğanlar ve uzün süre hastanede kalanlar yüksek risk altındaki gruplardır (Forbes ve ark., 2007; Tümbay, 2010).

Candida türleri arasında, *C. albicans* birçok enfeksiyon tipinde baskın bir rol oynamaktadır (Tümbay, 2010). Hastalık etkeni olarak sık görülme nedeni, normal florada yüksek prevalans göstermesinin yanı sıra bazı virülans faktörlerine de sahip olmasıdır (Çerikçioğlu, 2008; Tümbay, 2009). *C. albicans*'ın en önemli virülans faktörlerinden biri olan salgısal aspartil proteinazlar (SAP) 10 SAP geni tarafından kodlanır. Salgısal aspartil proteinazlardan, SAP4'ün oluşturduğu hidrolitik enzimler sistemik enfeksiyonlarda etki gösterir (Naglik ve ark., 2003; Lian ve Liu, 2007; Costa ve ark., 2009).

C. albicans hem endojen hem ekzojen enfeksiyonlara yol açabilen bir mikroorganizmadır. Enfeksiyon kaynağının endojen yada ekzojen olduğunun belirlenmesi, epidemiyolojisini anlamada ve önlemede en önemli basamaktır. Bunun yapılabilmesi için suşların tiplendirilmesine gerek duyulmaktadır (Ener, 1999; Tümbay, 2009).

Tiplendirmede kullanılacak yöntemler test edilen suşlardan kesin sonuçlar çıkartabilmeli, yer ve zaman bağımlılığı olmaksızın her çalışmada aynı sonuçları verebilmeli ve epidemiyolojik olarak ilgisiz suşları belirleyebilmelidir (Köksal, 1999). Suşların tiplendirilmesinde fenotipik ya da moleküler birçok yöntemden yararlanılabilir. Son yıllarda yaygın kullanılmaya başlanan moleküler tiplendirme yöntemleri, özellikle *Candida* türleri başta olmak üzere mantarlar için de uygulanabilir (Ener, 1999).

En çok kullanılan moleküler tiplendirme yöntemleri; pulsed field gel electrophoresis (PFGE), polimeraz zincir reaksiyon-restriction fragment length polymorphism (PZR-RFLP), repetitive extragenic palindromic element-PZR (REP-PZR), arbitrarily primed PZR (AP-PZR), amplified fragment length polymorphism (AFLP) ve dizi analizi şeklinde sıralanabilir (Köksal, 1999; Durmaz, 2001).

Günümüzdeki en basit ve en yaygın DNA temelli alt tiplendirme yöntemi olarak bilinen AP-PZR, nükleotid dizilimi rasgele seçilmiş primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonudur. Bu yöntemde, bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine birçok bölge çoğaltılmaktadır (Yağcı, 2001; Arı, 2004; Dolapçı, 2006). Bu sayede meydana gelecek olan farklı bant profilleri çalışılan suşların epidemiyolojik olarak ilişkili olup olmadıklarını ortaya koymaktadır (Yağcı, 2001).

Ayrım gücü oldukça yüksek olmakla birlikte, zaman alıcı ve kompleks bir sistem olan PFGE, geleneksel elektroforez ile ayrılamayan kromozomları veya büyük DNA parçalarını elektroforez ile ayırmayı sağlar. Bu yöntemde, düşük erime ısılı agaroza gömülen DNA parçaları, periyodik olarak değişen yönlerde elektrik alanına tabi tutularak birbirlerinde ayrılmaları sağlanır (Durmaz ve Durmaz, 2001; Tümbay, 2009; Wu ve Della-Latta, 2010).

Moleküler tiplendirmenin temel hedefleri, hastane ortamı gibi epidemiyolojik inceleme alanlarında mevcut olan klonların tanımlanması, genomik değişikliklerin izlenmesi ve mikroorganizmaların patojenitesine neden olan faktörlerin aydınlatılması şeklinde ifade edilmektedir (Saraçlı, 2008). Hastane enfeksiyonlarına bağlı olarak morbidite, mortalite ve tedavi maliyetlerinin artması, enfeksiyon kontrol stratejilerinin uygulanmasını zorunlu hale getirmiştir. Her merkezin kendi hasta profilini, hastane florasını oluşturan mikroorganizmaları, her bölümdeki hastane enfeksiyonu dağılımını ve sıklığını bilmesi, doğru stratejilerin geliştirilmesine imkan sağlayacaktır (Şardan, 2008).

Bu bağlamda hastanemizden izole edilen *C. albicans* suşlarının doğru tanımlanabilmesi, moleküler genotiplendirme yöntemleriyle hastanemizdeki yayılımlarının takip edilmesi ve virülans faktörlerinin incelenmesi önem arz etmektedir.

Bu çalışmanın amacı; Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatan hastaların kan örneklerinden izole edilen *C. albicans* suşlarının moleküler yöntemlerle tür tayininin yapılması, PFGE ve AP-PZR yöntemleri kullanılarak moleküler tiplendirilmesi ve bu mikroorganizmaların virülansında önemli bir rolü olan SAP4 gen bölgesi varlığının araştırılmasıdır.

GENEL BİLGİLER

1. *C. albicans*'ın GENEL ÖZELLİKLERİ

Candida'lar ile ilgili bilgiler Hippocrates'e kadar uzanır. Pamukçuğun mantar niteliğinde bir etiyolojiye bağlı olduğunu ilk olarak Berg 1841'de ve Bennet 1844'de ortaya koymuşlardır. Berg sağlıklı çocuklara aft membranını aktararak onlarda pamukcuk oluşturmuştur. Robin 1853'de pamukçuğun etkeninin sistemik enfeksiyonlar da yapabileceğini gözlemlemiştir. Bunu izleyen yıllarda birçok araştırıcı tarafından deri ve deri altı kandidozları, sistemik kandidozlar, hematojen yayılma, bağırsak ve merkezi sinir sistemi kandidozları bulunmuştur. *C. albicans*'ın adlandırılması da uzun ve karışık evrelerden geçmiş ve bu mayaya ilk olarak Robin tarafından *Oidium albicans* adı verilmiştir (Erbakan, 1989).

Günümüzde *Candida*'ların taksonomik sınıflandırılması şu şekilde yapılmaktadır (Forbes ve ark., 2007).

- Subdivision: Deuteromycotina
- Class: Blastomycetes
- Order: Cryptococcales
- Genus: *Candida*

Candida'ların kabul edilmiş 200'ün üzerinde türü bulunduğu bilinmektedir (Tünger ve ark., 2005; Tümbay, 2009). *C. albicans* klinik örneklerden en sık izole edilen tür olup, mukozaya ait kökenlerin %90-100'ünü ve kan dolaşımı enfeksiyonu kökenlerinin ise %50-70'ini oluşturur (Tünger ve ark., 2005; Tümbay, 2010). Tıbbi önemi olan diğer türler; *C. parapsilosis, C. glabrata, C. guilliermondii, C. tropicalis, C. krusei, C. kefyr, C. dubliniensis, C. lipolytica, C. lusitaniae, C. catenulata, C. ciferrii, C. famata, C. haemulonii, C. norvegensis, C. pulcherrima, C. rugosa, C. utilis, C. viswanathii, C. zeylanoides* şeklinde sıralanabilir (Tümbay, 1999; Tünger ve ark., 2005; Tümbay, 2009).

Germ tüp testi ve klamidosporların görülmesi gibi morfolojik özellikler *C. albicans*'ın diğer *Candida* türlerinden ayırt edilebilmesinde yardımcı olur (Tümbay, 1999; Çerikçioğlu, 2008; Tümbay, 2009). Ancak istisnai olarak *C. dubliniensis* fenotipik özellikleri *C. albicans*'a benzeyen ve kesin ayırımı moleküler yöntemlerle mümkün olabilen bir *Candida* türüdür (Arıkan, 2003; Iwen, 2007).

Candida türleri yaygın görülen mayalar olup birçok bitki üzerinde, memelilerin sindirim kanalı normal florasında ve insanın mukoza ve derisinde bulunur. İnsan gastrointestinal kanalından en sık izole edilen tür *C. albicans*'tır (Tümbay, 2009). Sağlıklı kişilerin %25-50'sinin normal ağız florasının bir parçası olarak *Candida*'yı taşıdıkları ve kökenlerin %70-80'inin *C. albicans* olduğu tahmin edilmektedir (Tümbay, 2010).

Candida cinsi içindeki mayaların makroskopik özellikleri farklılık göstermez. Hepsi, 25-37°C'de 2-3 günde Sadouraud dekstroz agarda (SDA) 2-3 mm çapında, beyaz veya krem renginde, düzgün yüzeyli koloniler oluştururlar (Çerikçioğlu, 2008; Tümbay, 2010). *C. albicans* için 37°C optimal üreme ısısıdır. Çoğalma hızları ortama göre değişmekle birlikte *C. albicans* için 1 saatten daha kısa bir süredir (Çerikçioğlu, 2008).

Klinik örneklerde ve kültürlerinde *Candida* türleri 3-6 µm büyüklüğünde oval veya yuvarlağımsı, tomurcuklanan hücreler (blastokonidiyum) olarak görülürler. Ayrıca yalancı hif (psödohif) de oluştururlar. *Candida* türleri arasında *C. albicans* blastokonidiyum ve yalancı hif yanında gerçek hifler de oluşturarak dimorfik özellik gösterir (Tümbay, 1999).

C. albicans'ın A ve B olarak adlandırılan iki serotipi vardır ve bunlar bağışıklığı sağlam bireylerde yaklaşık olarak eşit dağılım gösterirler. Ancak bağışıklığı bozulmuş hastalarda serotip B'nin prevalansı daha yüksektir (Tümbay, 2009).

Hücre duvarının en temel komponentleri; karbonhidratlar (%80-90), proteinler (%5-15) ve lipidlerdir (%2-5). Karbonhidratların ise %20-30'u mannoproteinler, %50-60'ı b-glukanlar, %0.6-9'u kitinden oluşur (Çerikçioğlu, 2008).

2. *C. albicans*'ın PATOGENEZİ

Candida'lar vücut, deri yüzeyi, ağız mukozası, bağırsak lümeni ve vajina mukozasında düzenli ve yaygın olarak bulunan fırsatçı patojen mikroorganizmalardır (Erbakan, 1989).

Normal florada bulunan *Candida* türleri, bir hastalık veya tedavi girişimleri nedeniyle bağışıklık savunması bozuk hastalarda, dokuları istila ederek yaşamı tehdit eden patolojilere yol açabilirler (Tümbay, 2009).

Kandidozun gelişmesinde bazı predispozan faktörlerin varlığı söz konusudur. Enfeksiyonun gelişimine yol açan bu hazırlayıcı faktörler Tablo 1'de görülmektedir (Tümbay, 1999; Tümbay, 2010).

Tablo 1. Kandidozlarda predispozan faktörler

- Antimikrobiyal ilaçlar
- Kemoterapi
- Hematolojik/Solid organ malinitesi
- Önceden var olan kolonizasyon
- Kalıcı kateter
- Total parenteral beslenme
- Nötropeni (Lökosit <500/mm^3)
- Geniş cerrahi veya yanıklar
- Solunum desteği
- Hastanede veya yoğun bakım ünitesinde kalma
- Hemodiyaliz, periton diyaliz
- Kötü beslenme
- HIV enfeksiyonu
- Uç yaşlar

İnsanda enfeksiyon yapabilen çeşitli *Candida* türleri arasında, *C. albicans* birçok enfeksiyon tipinde baskın bir rol oynamaktadır (Tümbay, 2010). Hastalık etkeni olarak sık görülme nedeni, normal florada yüksek prevalans göstermesinin yanı sıra bazı önemli virülans faktörlerine de sahip olmasıdır. Bu virülans faktörleri; kan dolaşımından dokuya geçtiğinde oldukça hızlı bir şekilde üremesi, proteaz oluşturması, hücre dışı matriks proteinlerine yapışmayı sağlayan yüzey integrin-benzeri moleküller, kompleman proteinini bağlayıcı bir reseptör, fenotipik değişiklik, yüzey varyasyonu ve fosfolipaz aktivitesine sahip hidrolitik enzimlerin üretilmesi olarak sıralanabilir (Çerikçioğlu, 2008; Tümbay, 2009).

Kandidozlar, yüzeyel ve derin infeksiyonlar olarak iki grupta incelenebilirler. Yüzeyel kandidozlar deri ve mukozaların, derin kandidozlar ise iç organ ve sistemlerin infeksiyonlarıdır (Tümbay, 1999).

Kandidemi; en az bir kan kültüründe *Candida* üremesi olarak tanımlanabilir (Iwen, 2007). En sık rastlanan belirtisi yüksek ateştir (>38°C). *Candida*'ya bağlı mortalitenin %40 olduğunun belirlenmesi, kandideminin önemini göstermiştir (Çerikçioğlu, 2008). *Candida*'ların hematojen yayılımı sonucu bir veya birden çok organ tutulumu görülebilir (Iwen, 2007). Hematojen kandidoz, gastrointestinal veya genitoüriner kanaldan kaynaklanan endojen bir enfeksiyon olabilmekle birlikte, kalıcı bir kateterin kontaminasyonu sonucu da oluşabilir (Tümbay, 2010). Kandidemiye neden olan risk faktörleri; cerrahi girişimler, intravenöz kateterler, geniş spektrumlu antibiyotikler ve immun sistemin baskılanmış olması, olarak sıralanabilir (Tümbay, 1999; Iwen, 2007).

3. *C. albicans*'ta SALGISAL ASPARTİL PROTEİNAZLAR (SAP)

C. albicans, salgısal aspartil proteinazlar, fosfolipaz B enzimi ve lipaz olmak üzere 3 önemli ekstraselüler hidrolitik enzim üretir (Naglik ve ark., 2003). Proteinazların görevi, enfeksiyon sırasında besin sağlamak için konak proteinlerinin parçalanması, immünglobulinleri, kompleman sistem proteinlerini degrede ederek konak direnç mekanizmalarından kaçınma ve adhezyon, invazyon, sırasında konak bariyerlerinin degradasyonunu sağlamaktır (Abacı ve Haliki, 2004).

Salgısal aspartik proteazlar, 10 SAP geninden oluşan bir gen ailesi tarafından kodlanır ve *C. albicans*'ın en önemli virulans faktörlerinden birini oluşturur (Naglik ve ark., 2003; Abacı ve Haliki, 2004; Kalkancı ve ark., 2005; Costa ve ark., 2009). SAP1, SAP2, SAP3 genlerinin yalnızca maya hücrelerinde, SAP4, SAP5, SAP6'nın ise hif hücrelerinde eksprese olduğu bilinmektedir (Yücel ve Kantarcıoğlu, 2000).

Candida türleri içinde ekstrasellüler protein üreten tek tür *C. albicans* değildir. *C. dubliniensis, C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'in de içlerinde bulunduğu patojen bir çok *Candida* türünün SAP genlerine sahip oldukları *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir. Bunlardan *C. tropicalis* 4, *C. parapsilesis* en az 2, *C. dubliniensis* ise 7 farklı SAP genine sahiptir (Naglik ve ark., 2003; Abacı ve Haliki, 2004; Çerikçioğlu, 2008).

3. 1. *C. albicans* SAP Gen Grupları

C. albicans'ın SAP gen ailesinin, amino asit sekans homolojilerine bakıldığında ailenin 3 gruba ayrıldığı görülmektedir. Bu gruplardan; SAP1, SAP2 ve SAP3 %67 uyumlu, SAP4, SAP5 ve SAP6 %89 uyumludur. SAP7 diğer SAP proteinleri ile yalnız %20-27 özdeş bulunmuştur. Bunların yanında SAP9 ve SAP10 üçüncü özdeş grubu oluşturmaktadır (Naglik ve ark., 2003; Kalkancı ve ark., 2005).

3. 2. *C. albicans* Sap Proteinlerinin Biyokimyasal Özellikleri

Salgısal aspartil proteinaz, kimyasal özelliklerinden dolayı karboksil proteinaz veya asit proteinaz isimlerini de alırlar (Çerikçioğlu, 2008). Sap1 – Sap10 proteinleri 35-50 kDa arası büyüklüktedir ve *C. albicans*'ın ekstraselüler proteolitik aktivitesinden sorumludurlar. Farklı pH değerlerinde farklı proteinler eksprese olur. Sap1 – Sap3 en yüksek aktivitelerini düşük pH değerlerinde, Sap4 – Sap6 aktivitelerini yüksek pH değerlerinde gösterirler (Naglik ve ark., 2003).

3. 3. Salgısal Aspartil Proteinaz'lar ve *C. albicans*'ın Patogenezi

Candida türlerinin çeşitli enzimler salgılama yeteneği organizmanın patojenitesini etkileyebilir. Bazı *Candida* türleri, enfeksiyon savunmasında görev alan proteinleri hidrolize eden aspartil proteinazlar salgılar ve böylece maya hücreleri bağ dokusundaki bariyerleri yıkar (Saraçlı, 2010).

Proteinaz; serum albumini, ovalbumin, hemoglobin, keratin, kollajen, laminin, fibronektin, IgA, IgG'nin Fc kısmı ve komplemanın C3 komponentini hidrolize ederek, başta *C. albicans* olmak üzere *Candida* kökenlerinin dokularda invazyon oluşturma yeteneklerini artırıcı etki göstermektedir (Çerikçioğlu, 2008).

C. albicans infeksiyon modeli sonuçlarına göre SAP1-3 yüzeyel enfeksiyon sırasında eksprese edilirken, SAP4-6 genlerinin ekspresyonunun sistemik hastalıklar ile bağlantılı olduğu bulunmuştur (Abacı ve Haliki, 2004; Kalkancı ve ark., 2005; Lian ve Liu, 2007).

SAP4-6 genleri makrofajlar ve nötrofillerin fagolizozomları içinde *C. albicans* tarafından eksprese edilmekte ve bu sayede fagositik saldırıya direnç geliştirerek mayanın virulansını artırmaktadırlar. Bu nedenle SAP4-6 mutantları makrofajlar tarafından fagositik öldürmeye karşı çok hassastır (Abacı ve Haliki, 2004).

4. *C. albicans*'ın EPİDEMİYOLOJİSİ

Candida'lar doğada yaygın olarak bulunabilen mantarlardır. Bunlardan bir bölümü insan ve hayvanlarda kommensal olarak bulundukları gibi, bitkisel maddelerde ve nemli topraklarda da yaşamlarını sürdürebilir hatta çoğalabilirler (Erbakan, 1989).

Yiyecekler, bitkiler, şişelenmiş sular ve meyve sularında çevresel örnekler alınıp incelendiğinde, bunların şaşırtıcı sayıda fırsatçı patojen olarak bilinen mayaları içerdiği görülmüştür. Bu gözlemler, bağışık yetmezlikli hastaların, kendi mikrofloralarında bulunanlar dışında, sürekli olarak potansiyel patojen mayalarla temas ettiklerini göstermektedir (Tümbay, 2009).

C. albicans florada en sık bulunan tür ve tüm kandidozlarda en sık görülen etkendir (Tümbay, 1999; Fothergill, 2007). *Candida* enfeksiyonlarının çoğu endojen kaynaklı olup, konağın normal kommensal florasından köken alır. Belirli kandidoz tiplerinin oluşumunda *Candida*'nın ekzojen bulaşı da rol oynayabilir (Tümbay, 1999; Tümbay, 2010). *Candida* türlerine bağlı nozokomiyal enfeksiyonların ortaya çıkışında, hastane personelinin ve kontamine materyalin önemli bir etken olduğu bilinmektedir (Tümbay, 1999; Çerikçioğlu, 2008).

5. LABORATUVAR TANI

5. 1. Kültür

Candida türlerinin primer izolasyonunda SDA, Mycosel veya Mycobiotic agar gibi besiyerleri kullanılabilir (Yıldıran, 1999; Winn ve ark., 2006).

Sistemik kandidozlarda *Candida*'ların tespit edilebilmesi için BACTEC sistem ve BacT/Alert gibi kan kültürü sistemleri kullanılabilir (Forbes ve ark., 2007; Iwen, 2007).

5. 2. İdentifikasyon

5. 2. 1. Germ Tüp Testi

Germ tüp testi çabuk, kolay ve ucuz bir testtir. *Candida* suşları insan veya tavşan serumu içeren tüplerde 2 saat 37°C'de bekletilerek germ tüp oluşumu yönünden incelenebilir. Maya hücresinden direkt ve kısa bir hif başlangıcı şeklinde, septumlarında boğumlanmasının olmadığı germ tüpler oluşturulur. *C. albicans* diğer *Candida* türlerinden farklı olarak germ tüp pozitiftir (Yıldıran, 1999; Winn ve ark., 2006).

5. 2. 2. Mikroskobik Morfoloji

Candida'ların pseudohif, blastospor ve klamidospor üretme özelliklerinin mikroskobik olarak değerlendirilmesi için mısır unlu (cornmeal)-Tween 80 agara çizgi ekimi yapılarak üzeri lamelle kapatılır. 26-27°C'de 24-72 saat inkübe edilir. Kapatılan lamel ortamın oksijenini azaltarak, Tween 80 ise yüzey gerilimini düşürerek klamidospor ve pseudohif yapımını arttırır. *C. albicans* izolatlarının büyük çoğunluğu (>%90) karakteristik klamidosporlar oluştururlar (Yıldıran, 1999; Arıkan, 2003; Winn ve ark., 2006).

5. 2. 3. Biyokimyasal Özellikler

Karbonhidrat asimilasyon testi

Mayaların tür düzeyine kadarki identifikasyonunda esas dayanak noktası, karbohidrat asimilasyon testidir. Bu test, bir mayanın oksijen varlığında belirli bir karbohidratı tek karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini ölçer. Klasik olarak mayaların karbonhidrat kullanma özellikleri Wickerham'ın asimilasyon ve fermentasyon yöntemleriyle incelenir. Klinik laboratuvarların çoğunda bu testlerin yerini "API 20 C, ID 32 C ve Uni-Yeast-Tek System" gibi hazır ticari test sistemler almıştır (Yıldıran,1999; Arıkan, 2003; Tümbay, 2009).

Kromojenik Besiyerleri

Koloni identifikasyonu, ekzoenzim aktivitesi sonrası parçalanan çeşitli substratlardan, farklı kromojenik yıkım ürünlerinin salınması temeline dayanmaktadır (Tümbay, 2009). CHROMagar *Candida*, birçok laboratuarda özellikle *C. albicans* ve birkaç farklı *Candida* türünün izolasyon ve identifikasyonu amacıyla kullanılmaktadır (Winn ve ark., 2006; Fothergill, 2007). Günümüzde ticari olarak başka kromojenik besiyerleri de bulunmaktadır. Burada identifikasyonların yaklaşık olduğunun bilinmesi önemlidir (Tümbay, 2009).

5. 3. Kültür Dışı Tanı Yöntemleri

5. 3. 1. Serolojik Testler

Fungal serolojik testler genellikle fikir verici ya da kültür ve histopatolojik bulguları destekleyici özelliktedirler. Mantar enfeksiyonlarında serolojik testlerin

kullanımı özellikle *Candida* enfeksiyonlarının tanısına yönelik olarak yoğunlaşmıştır (Çerikçioğlu, 1999).

Derin kandidoz kuşkusunda *Candida* antikor ve antijenini aramaya yönelik serolojik testler kullanılmaktadır. Ancak bu testler, özgüllük ve duyarlılıkları sınırlı olduğundan dikkatle yorumlanmalıdır. Presipitin testi ile mannan ve somatik antijenler kullanılarak antikorlar aranır. Ancak tek bir test ile mukozadaki kolonizasyon veya yüzeyel enfeksiyona bağlı olarak oluşmuş antikorlar, derin kandidozdan oluşmuş antikorlardan ayırt edilemezler (Tümbay, 1999).

Özellikle immunsuprese hastalarda presipitin testleri güvenilir sonuç vermediğinden bu gibi hastalarda kanda dolaşan *C. albicans* mannan antijeni aranabilir. Hücre duvarı maddesi mannan derin kandidozlu hastaların serumunda lateks partikül aglütinasyon testi ile düşük düzeyde saptanmaktadır. Ancak mannan dolaşımdan hızla uzaklaştırıldığından, hastadan arka arkaya alınan çok sayıda kan örneği ile testin yenilenmesi gerekebilir (Tümbay, 1999).

Candida mannanına karşı oluşan antikoru saptayan testler, antijen seviyelerini saptayan testlerle birlikte değerlendirildiğinde maksimum düzeyde fayda sağlanabilir. Çünkü hastalığın seyri sırasında antikor ve antijen düzeyleri birbiri ile ters orantılı olabilir (Tümbay, 2009).

5. 3. 2. Moleküler Testler

Mikoloji laboratuarlarında moleküler yöntemlerin kullanılma amacı; patojen mantarın klinik örnekte (kan, doku, bronkoalveolar lavaj sıvısı ve diğer vücut sıvıları) kültürü yapılmadan önce saptanması veya geleneksel yöntemlerle kültürde üretilmiş olan mantarın hızlı tanımlanmasıdır (Sarıbaş ve Arıkan, 2006).

Günümüzde klinik örneklerde mantara spesifik nükleik asitlerin direkt olarak saptanması amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulamaları, mantar enfeksiyonlarının hızlı tanısı için büyük ümit vermektedir (Sarıbaş ve Arıkan, 2006; Tümbay, 2009; Yıldıran, 2010). Dolaşımdaki *Candida* genomunun PZR ile saptanabilmesinin yanı sıra tür düzeyinde de tanımlama yapılabilmektedir (Çerikçioğlu, 2008).

Mirhendi ve arkadaşları 2006 yılında yayınlamış oldukları bir çalışmada, PZR ürünlerinin bir restriksiyon enzimi ile kesilmesi sonucu *C. albicans, C. parapsilosis, C.*

glabrata, C. guilliermondii, C. tropicalis, C. krusei gibi patojen mayaların tanısının yapılabildiği gösterilmiştir (Mirhendi ve ark., 2006).

Bunların yanında, özellikle "Real Time PCR" teknolojisindeki son gelişmeler ümit verici görünmektedir (Çerikçioğlu, 2008; Yıldıran, 2010).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, spesifik bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak selektif amplifikasyonuna imkan veren *in vitro* bir yöntemdir (Köksal, 2001; Arı, 2004).

PZR tıbbi araştırma alanlarının birçoğunda önemli kullanım imkanı bulmuştur. Özellikle mikrobiyolojide birçok mikroorganizmanın direkt tanısında oldukça başarı sağlamaktadır (Köksal, 2001). Klinik örneklerden PZR ile kısa sürelerde *C. albicans*'ı tanımlayan yöntemlerde geliştirilmiştir (Uzun, 2002).

PZR'nin temel bileşenleri, hedef DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, primerler, dNTP karışımı, tampon ve $MgCl_2$ şeklinde sıralanabilir (Arı, 2004; Kılıç, 2009)

PZR temel olarak tekrarlayan üç aşamalı bir döngü içerir, bunlar; i) denatürasyon, ii) primer bağlanması (annealing), iii) uzama (extension) (Köksal, 2001; Arı, 2004; Dolapçı, 2006). Her döngünün sonunda PZR ürünleri teorik olarak iki katına çıkar. Böylece hedef dizi reaksiyon sonunda 2^n (n=PZR siklus sayısı) sayıda amplifiye edilmiş olacaktır (Dolapçı, 2006; Kılıç, 2009).

Temel PZR çeşitleri şu şekilde sıralanabilir; Hot-Start PZR, Multipleks PZR, Nested PZR, Geri (Revers) Transkripsiyon PZR (RT-PZR), Broad-Range PZR, Arbitrarily Primed PZR, Niceliksel (Kantitatif) PZR, Real-time PZR (Durmaz, 2001; Arı, 2004; Dolapçı, 2006).

6. *C. albicans*'ın HASTANE ENFEKSİYONLARINDAKİ YERİ

Hastane enfeksiyonları (nozokomiyal enfeksiyonlar), hastanın hastaneye yatış nedeninin dışında gelişen, başvuru anında inkübasyon döneminde olmayan ve kaynağını hastaneden alan enfeksiyonlardır. Hastane enfeksiyonları, hastalar hastanede yatarken ortaya çıkabileceği gibi (en erken hastaneye yattıktan 48-72 saat sonra) hastaneden

taburcu olduktan sonra da (10 gün içinde) ortaya çıkabilir. (Erdem, 1999; Şardan, 2008; Beşirbellioğlu, 2009).

Hastane enfeksiyonları, ciddi morbidite ve mortaliteye yol açabileceği gibi hastanın hastanede yatış süresinin uzamasına, maliyet artışına, işgücü ve üretkenlik kaybına da neden olurlar (Ener, 1999; Şardan, 2008).

Hastane enfeksiyonları kontrol programının temelini sürveyans çalışmaları oluşturur. Belirli bir amaca yönelik olarak veri toplanması, toplanan verilerin bir araya getirilerek yorumlanması ve sonuçların ilgililere bildirilmesinden oluşan süreç sürveyans olarak isimlendirilir (Şardan, 2008).

Sürveyans sırasında toplanması gereken en temel veriler; ad-soyad, yaş, cinsiyet, dosya numarası, yattığı servis, yatış tarihi, tanı konulan tarih, enfeksiyonun yeri ve türü, etken mikroorganizma, antibiyotik duyarlılık paterni şeklinde sıralanabilir (Şardan, 2008).

Mikrobiyoloji laboratuvarı hem salgınların tespitinde hem de rutin sürveyans bilgilerinde kritik rol oynar. Bu laboratuvarlar kültür, seroloji, antibiyogram ve PFGE gibi yöntemler kullanırlar (Taylor ve Manuselis, 2007).

Nozokomiyal enfeksiyonlar, enfeksiyon kaynağına bağlı olarak iki genel kategoride sınıflandırılabilirler. I. Ekzojen enfeksiyon; Çevre ve diğer kişiler gibi eksternal kaynaklı mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlardır. II. Endojen enfeksiyonlar; Kişinin kendi normal florasının bir parçası olan mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlardır (Pelczar ve ark., 1993).

Endojen ya da ekzojen olsun bu enfeksiyonların kaynağının belirlenmesi önlem almada en önemli basamak olup bunun için suşların tiplendirilmesine gerek duyulmaktadır. Suşların tiplendirilmesinde fenotipik ya da moleküler metotlardan yararlanılabilir. Fenotipik yöntemler arasında biyotiplendirme (biyokimyasal karakteristik analizi), antibiyogram (antimikrobiyal duyarlılığın analizi) ve serotiplendirme (serolojik analiz) sayılabilir, ancak bu yöntemler laboratuvarlara aşırı yük getiren, pratik yararlılığı olmayacak kadar geç sonuç veren ve doğruluğu kesin olmayan yöntemlerdir. Son yıllarda nozokomiyal bakteri patojenlerinin epidemiyolojik çalışmalarında yaygın kullanılmaya başlanan moleküler tiplendirme yöntemleri, özellikle *Candida* türleri başta olmak üzere mantarlar içinde uygulanabilmekte ve fenotipik yöntemlerin yerini almaya başlamaktadır (Ener, 1999; Forbes ve ark., 2007).

Tiplendirmede kullanılan fenotipik ve genotipik yöntemlerin listesi Tablo 2'de sıralanmıştır (Durmaz, 2001).

Tablo 2. Alt-tiplemede kullanılan yöntemler

Fenotipik yöntemler

- Antibiyotik duyarlılık testi
- Biyotipleme
- Serotipleme
- Bakteriyosin tipleme
- Faj tipleme
- Protein-bazlı yöntemler
  - Multilokus enzim elektroforezi
  - Hücresel proteinlerin poliakrilamit jel elektroforezi
  - İmmünoblot fingerprinting

Genotipleme metotları

- Plazmit fingerprinting
- Kromozomal DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi-RFLP
- PFGE
- PZR-RFLP
- REP-PZR
- RAPD
- ARDRA
- AFLP

Her yıl, Amerika Birleşik Devletlerindeki 35 milyon hastadan 1.75 ve 3 milyonunda (%5-10) nozokomiyal infeksiyon görülmektedir. Nozokomiyal infeksiyonlar, sağlık harcamalarına ek maliyet getirerek ciddi bir ekonomik problem oluşturmaktadır (Ener, 1999; Erdem, 1999; Forbes ve ark., 2007). Ayrıca hastane infeksiyonları, hastaların hastanede ortalama 4-10 gün daha fazla yatmasına neden olmaktadır (Ener, 1999).

Nozocomial infeksiyonlar genellikle, idrar yolu infeksiyonları (%33), pnömoniler (%15), cerrahi alan enfeksiyonları (%15), kan infeksiyonları (%13) ve

diğerleri (%24) olmak üzere başlıca beş şeklinde görülür (Ener, 1999; Forbes ve ark., 2007; Beşirbellioğlu, 2009). Hastaneden kan dolaşımı ya da akciğer infeksiyonu alanların %40-60'ı ölmektedir (Forbes ve ark., 2007).

Her merkezin kendi hasta profilini, hastane florasını oluşturan mikroorganizmaları, bunların direnç paternlerini, her bölümdeki hastane enfeksiyonu dağılımını ve sıklığını bilmesi, doğru stratejilerin geliştirilmesini sağlayabilir (Şardan, 2008).

Nozokomiyal infeksiyonlara neden olan mikroorganizmalar çeşitli faktörlere bağlı olarak periyodik değişimler göstermektedir. Son 25-30 yıl içinde, mantarların neden olduğu infeksiyonların oranları ciddi bir artış göstermiştir. Hastane infeksiyonlarına neden olan mantarların %80'inden fazlası *Candida* türleridir (Ener, 1999; Akalın, 2008; Beşirbellioğlu, 2009).

Son yıllarda, *Candida* türlerinin insidansı ciddi bir şekilde artmış ve tüm nozokomiyal kan dolaşımı infeksiyonu etkenlerinin %8-10'unu oluşturarak 4. sıraya yerleşmiştir (Ener, 1999; Forbes ve ark., 2007; Çerikçioğlu, 2008; Senger ve Arslan, 2009; Tümbay, 2010). En fazla izole edilen fungal patojen *C. albicans* (%59.8)'dır ve bunu diğer *Candida* türleri (%18.6), *Aspergillus* türleri (%1.3), *Torulopsis* (%7.3) ve diğer mantarlar (%13) izlemektedir (Ener, 1999).

İnsanda infeksiyon yapabilen çeşitli *Candida* türleri arasında, *C. albicans* birçok enfeksiyon tipinde baskın bir rol oynamaktadır (Tümbay, 2010). 1980'lerde nozokomiyal infeksiyonlardaki *C. albicans* oranı %2'den %5'e yükselmiştir (Pelczar ve ark., 1993).

Candida ile ilişkili kan dolaşımı infeksiyonlarının en sık etkeni olan *C. albicans* hem endojen hem de ekzojen yolla infeksiyona yol açabilen, çeşitli virülans faktörlerine sahip, klasik olarak iyi tanınan bir patojendir. *C. albicans*, klinik örneklerden en sık izole edilen bir mayadır ve invaziv enfeksiyonların %50-70'inden sorumludur (Ener, 1999; Senger ve Arslan, 2009).

Nozokomiyal kan dolaşımı infeksiyonlarında risk faktörleri; 1 yaşından küçük ya da 60 yaşından büyük olmak, immunosupresiv kemoterapi, deri bütünlüğünün bozulması, altta yatan şiddetli hastalık, damar içi kateter, yoğun bakımda kalma, uzun süreli hastanede kalma, antimikrobiyal terapi, *Candida* kolonizasyonu, parenteral nutrisiyon, ventilasyon, ağır cerrahi, steroid terapi ve serebrospinal şant şeklinde

sıralanabilir (Viudes ve ark., 2002; Boo ve ark., 2005; Yapar ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007; Bouza ve Munoz, 2008; Senger ve Arslan, 2009).

Risk faktörlerine maruz kalmayan kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, yüksek risk taşıyan hastaların hastanede kandidemiye yakalanma olasılığı; aldıkları her sınıftan antibiyotik için yaklaşık 2 kez, bir santral venöz kateter takılı olanlarda 7 kez, diğer anatomik bölgelerinde *Candida* kolonizasyonu bulunuyorsa 10 kez ve hastaya akut hemodiyaliz yapılmışsa 18 kez daha fazladır (Tümbay, 2010).

Hastanede yatan hastalarda kandideminin sonuçları oldukça ağırdır (Senger ve Arslan, 2009). Kandidemili hastalarda ölüm riski, *Candida* dışı nedenlerle meydana gelen kan dolaşımı infeksiyonlu hastalara göre iki kat fazladır (Senger ve Arslan, 2009). İnvazif kandidiyazise atfedilen mortalite, değişik kaynaklarda %10-30-38-40-49-50 gibi yüksek oranlarda verilmektedir. Ayrıca hastanede kalış süresini de 3-30 gün uzatmaktadır. Modern ve girişimsel tıptaki risk faktörleri azalmayacağına göre, kritik hasta gruplarında *Candida* türleri, giderek artan sıklıkta yüksek mortaliteli hastalıklar oluşturmaya devam edecektir (Ener, 1999; Akalın, 2008; Çerikçioğlu, 2008; Beşirbellioğlu, 2009; Senger ve Arslan, 2009).

7. MOLEKÜLER TİPLENDİRME YÖNTEMLERİ

Genetik materyalin karakterize edildiği tiplendirme teknikleri moleküler teknikler olarak kabul edilmektedirler. Mikroorganizmalar arasındaki ilişkinin düzeyinin araştırıldığı tiplendirme çalışmalarında geleneksel fenotipik teknikler sınırlı düzeyde bilgi sağlamaktadırlar ve bazı durumda moleküler yöntemlerin tiplendirme çalışmalarında kullanılması gerekebilmektedir (Saraçlı, 2008).

Moleküler tiplendirmenin epidemiyolojik amaçlı kullanılmasında temel uygulama alanları; salgın araştırmaları, endemik enfeksiyonların sürveyansı (hastane ortamı gibi epidemiyolojik inceleme alanlarında mevcut olan klonların tanımlanması ve genomik değişikliklerinin izlenmesi) ve mikroorganizmaların patojenitesine neden olan faktörlerin aydınlatılması şeklinde sıralanabilir (Saraçlı, 2008).

Moleküler tiplendirmede kullanılacak yöntem seçilirken göz önünde bulundurulması gereken kriterler; tiplendirebilirliği, ayırım gücü, tekrarlanabilirliği, kullanım kolaylığı, kurulum maliyeti, sonuç verme süresi ve yorumlanma kolaylığı gibi özelliklerdir (Durmaz, 2001; Saraçlı, 2008).

Tablo 3'de mevcut bazı genotipleme yöntemlerinin çeşitli özellikleri karşılaştırmalı olarak verilmektedir (Durmaz, 2001).

Tablo 3. Genotipleme yöntemlerinin karşılaştırılması

	PFGE	**Bölgeye özgül PZR-RFLP**	**Rep-PZR**	**RAPD**	**AFLP**	**Dizi analizi**
Tiplendirebilirlik	Mükemmel	Mükemmel	Değişken	Mükemmel	Mükemmel	Mükemmel
Laboratuar içi tekrarlababilirlik	İyi	İyi	İyi	Orta	İyi	İyi
Laboratuarlar arası tekrarlababilirlik	İyi	İyi	Orta	Kötü	İyi	İyi
Stabilite	İyi	Mükemmel	Mükemmel	İyi	Mükemmel	İyi
Ayrım gücü	Yüksek	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Uygulama kolaylığı	Orta	Kolay	Kolay	Kolay	Orta	Zor
Yorumlama kolaylığı	Kolay	Kolay	Kolay	Kolay	Kolay	Orta
Sonuç alma süresi (gün)	3	1-2	1	1	2	2
Kurma maliyeti	Orta	Orta	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek
Test başına maliyet	Orta	Düşük	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek

7. 1. Pulsed-Field Gel Electrophpresis (PFGE)

PFGE ilk defa 1980'li yılların başlarında Schwartz ve Cantor tarafından geliştirilmiştir (Mahlen, 2007; Saraçlı, 2008; Wu ve Della-Latta, 2010). Suşların karakterizasyonunda üstün bir teknik olan PFGE, geleneksel elektroforez ile ayrılamayan kromozomları veya iri DNA parçalarını ayırarak mikroorganizmaların genotiplendirilmesinde kullanılmaktadır. Ekstraksiyonun bir agaroz plağı içinde gerçekleşmesi, nükleik asitlerin zarar görmesini ve kesilmesini önleyerek ayırma işlemini kolaylaştırır (Tümbay, 2009; Wu ve Della-Latta, 2010).

Bu yöntemde, üretilen mikroorganizmalar, düşük erime ısılı agaroza karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir. Kalıp içine gömülü olan mikroorganizmalar, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanır. Lizis işlemini takiben agaroz kalıpları iyice yıkanarak veya diyalize edilerek protein ve karbonhidrat gibi kontaminanların uzaklaştırılması sağlanırken, büyük olan kromozomal DNA agaroz jel içinde tutulu kalır. Restriksiyon enzimleri kromozomal DNA'ları belirli noktalardan keserek, farklı büyüklükte parçalara ayırmak için kullanılır (Durmaz ve Durmaz, 2001; Winn ve ark.,

2006; Mahlen, 2007). *Bss*HII, *Not*I ve *Sfi*I *Candida* türlerinin kromozomal DNA'sının kesimi için kullanılabilecek restriksiyon enzimleridir (Mata-Essayag ve ark., 1997; Chen ve ark., 2005; Shin ve ark., 2005; Wu ve Della-Latta, 2010).

Candida spp.'nin PFGE genotiplendirilmesi restriksiyon enzimli ya da enzimsiz uygulanabilir. Enzim kesimi olmadan yapılan elektroforetik karyotip analiz, epidemiyolojik araştırmalar için yeterli ayrıştırmayı sağlayabilmektedir (Wu ve Della-Latta, 2010). PFGE-Elektroforetik Karyotipleme (PFGE-EK) tekniği agaroz jelde kromozomal DNA'ların büyüklüklerine göre ayrışmasını sağlayabilir ve medikal önemi olan *Candida* türleri PFGE analizi ile benzer tür-spesifik karyotipler tanımlanabilir (Doi ve ark., 1992).

PFGE yönteminde, DNA fragmentleri periyodik olarak değişen yönlerde elektrik alanına tabi tutularak birbirlerinde ayrılmaları sağlanır. DNA molekülleri bir elektriksel akıma uygun hareket ederken kısa bir süre sonra diğer akıma uygunluk göstermek zorunda kalırlar. Sonuçta küçük moleküller elektriksel alan değişimlerine daha çabuk uyum sağladıkları için daha hızlı hareket ederler (Durmaz ve Durmaz, 2001; Sarıkaya, 2004; Mahlen, 2007). Elektroforez sonucunda jel etidyum bromürle boyanarak, her bir izolata ait bant profili görünür hale getirilmektedir (Durmaz ve Durmaz, 2001; Akbaş, 2009).

PFGE yönteminin değişik tipleri bulunmaktadır. Bunlar; "orthogonal field alternation gel electrophoresis", "transverse alternating field electrophoresis", "field inversion gel electrophoresis" (FIGE) ve "counter-clamped homogeneous electric field electrophoresis" (CHEF) şeklinde sıralanabilir. Bahsedilen tekniklerin hepsi pulsed-field takımının çeşitleri olmasına rağmen günümüzde birçok laboratuvar tarafından CHEF sistemi kullanılmaktadır ve bu "PFGE" ile eş anlamlı hale gelmiştir (Durmaz ve Durmaz, 2001; Tekeli, 2006; Akbaş, 2009). Ayrıca CHEF büyük kromozomal DNA'ları ayrıştırılmasında da çok etkili bir teknik olarak bilinmektedir (Iwaguchi ve ark., 1990; Doi ve ark., 1992).

Geleneksel elektroforez de olduğu gibi PFGE'ni de etkileyen çeşitli faktörler vardır, bunlar; agaroz tipi ve konsantrasyonu, jel kalınlığı, tampon seçimi ve konsantrasyonu, sıcaklık, reoryantasyon açısı ve pulse süresi, voltaj ve toplam elektroforez süresi olarak sayılabilir (Doi ve ark., 1992; Durmaz ve Durmaz, 2001; Tekeli, 2006).

Yöntemin ayrım gücü oldukça yüksek olmakla beraber, zaman alıcı ve kompleks bir sistemdir (Durmaz ve Durmaz, 2001). PFGE birçoklarına göre suşların tiplendirilmesinde, güvenilir bir yöntem olarak kabul edilir ve yeni metodların karşılaştırılmasında da kullanılabilir (Durmaz ve Durmaz, 2001; Tekeli, 2006; Winn ve ark., 2006; Forbes ve ark., 2007).

7. 2. Arbitrarily Primed PZR (AP-PZR)

Welsh ve McClelland tarafından 1990 yılında geliştirilen arbitrarily primed PZR (AP-PZR), aynı zamanda rasgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (random amplified polymorphic DNA) (RAPD) yöntemi olarak da adlandırılır ve ökaryotik organizmaların DNA parmak izi için kullanılan yöntemlerin en yaygınlarından biridir (Yağcı, 2001; Dolapçı, 2006; Mahlen, 2007; Akbaş, 2009). Bu yöntem, doğru bir şekilde geliştirildiğinde, çözünürlüğün her düzeyde ilişkililik değerlendirmesinde oldukça etkindir (Akbaş, 2009). AP-PZR bekli de günümüzdeki en basit DNA temelli alttiplendirme yöntemidir (Dolapçı, 2006).

AP-PZR nükleotid dizilimi rasgele seçilmiş primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu olup, bilinen özgül bir DNA bölgesini çoğaltmak yerine DNA'daki birçok bölgenin çoğaltılması gerçekleşmektedir (Yağcı, 2001; Arı, 2004).

Genellikle mikroorganizmaya ait nükleotid dizi bilgisine sahip olmaksızın polimorfizmin belirlenmesini sağlar (Arı, 2004; Saraçlı, 2008).

Kullanılan primerler genellikle kısa (9-10 bazlık) ve nükleotid dizilimi rasgele seçilmiş tek çeşit primerlerdir (Yağcı, 2001; Arı, 2004; Dolapçı, 2006; Tekeli, 2006; Saraçlı, 2008; Akbaş, 2009). Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki bantların oluşmasına neden olur (Yağcı, 2001).

Aynı tür içindeki farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları değişik olacağından, PZR ile elde edilen ürünlerin jel elektroforezi ile analiz sonucu meydana gelen bantların sayı ve büyüklüğü de farklılık gösterecektir (Yağcı, 2001; Arı, 2004).

Jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılır ve aynı bant profili gösteren izolatlar epidemiyolojik olarak ilişkili

şeklinde yorumlanabilir. Bant profilleri benzer olan izolatlar ya yeni primerlerle tekrar test edilmeli ya da diğer tipleme yöntemleriyle çalışılmalıdır (Yağcı, 2001).

Bu yöntemin en önemli dezavantajı henüz standardizasyonun sağlanamamış olmasıdır ve laboratuvar içi ve laboratuarlar arası tekrarlanabilirlik oranının düşük olmasıdır (Yağcı, 2001; Akbaş, 2009; Tümbay, 2009).

Çalışma koşullarındaki ısı, reaksiyon zamanları, polimerazın kaynağı, $MgCl_2$ konsantrasyonu, kalıp DNA'nın kalite ve kantitesi ve primer büyüklüğü, konsantrasyonu ve dizisindeki değişiklikler fragmanların çoğaltılmalarının tekrarlanabilirliğini etkileyebilir (Tekeli, 2006).

Laboratuvarlar arası standardizasyonu sağlayabilmek için; M13 olarak bilinen üniversal primerin kullanılması, standardize edilmiş amplifikasyon karışımı, aynı thermocycler'da standart bir amplifikasyon protokolü uygulanması, tüm salgın izolatlarının aynı anda çalışılması ve sonuçların en az üç kez tekrarlanması gibi uygulamalara ihtiyaç duyulmaktadır (Yağcı, 2001).

8. TEDAVİDE KULLANILABİLECEK ANTİFUNGAL İLAÇLAR

Mantar enfeksiyonlarının sistemik tedavisinde kullanılabilecek antifungal ilaçların; ağır yan etki, dar antifungal spektrum, kötü doku penetrasyonu ve direnç gelişimi gibi kullanımını sınırlandıran önemli sorunlar vardır. Bu güçlüklere karşın son yıllarda gelecek için umut veren ilaçlar geliştirilmektedir. B-glukan sentezini engelleyen ekinokandinler, amfoterisin B (AmB)'nin lipit formülasyonları ve yeni azol türevleri son yıllarda kullanıma giren bu ilaçlara örnek olarak verilebilir (Tünger ve ark., 2005).

Amfoterisin B (ve lipit formülasyonları) fungisidal etkisini mantarların en önemli membran sterolü olan ergosterole bağlanmasıyla gösterir. Bu bağlanma, mantar hücre membranının ozmotik bütünlüğünü bozar; bu da hücre içeriğinin sızmasına ve hücrenin ölümüne yol açar (Arıkan, 2009; Metin, 2010).

Azol sınıfı antifungaller yapısal olarak imidazoller ve triazoller olarak ayrılabilirler. Tüm azol bileşikleri, mantara ait sitokrom P-450'ye bağımlı enzim olan lanosterol 14-α-demetilazı inhibe ederek antifungal etki gösterirler. Bu enzim, lanosterolden ergosterol sentezinde rol alan bir enzimdir. Ergosterol sentezinin inhibisyonu, mantar hücre membran sentezinin sonlanmasıyla sonuçlanır (Arıkan, 2009; Metin, 2010).

MATERYAL VE METOD

1. İZOLATLAR

Çalışmaya kan örneklerinden izole edilmiş 50 *C. albicans* suşu dahil edildi. Bu izolatlar Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda, değişik servislerde yatan hastalardan izole edildi. Hastanın hastaneye yatışından 48 saat sonra ya da hastaneden çıktıktan 10 gün sonra kan kültüründe üreyen *C. albicans* suşları çalışmaya dahil edildi. Bir hastanın birden fazla örneği çalışmaya alınmadı.

1. 1. Suşların İzolasyonu

Hastalardan alınan kan örnekleri, otomatize kan kültür sistemi şişelerine ekildi. Üreme tespit edilen şişelerden kanlı agar ve Eosin-methylene blue (EMB) agara pasaj yapılarak, kültürler 36°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kolonilerden gram boyası yapıldı. Maya olduğu görülen kolonilerden SDA'ya pasaj yapılarak 24-48 saat 36°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda krem-sarı renkli, hamurumsu-mukoit yapıdaki saf olduğundan emin olunan koloniler steril serum fizyolojik içeren ependorflara aktarılarak oda ısısında saklandı. Saklamada bulunan suşlar kullanılacakları zaman, iki kez SDA'ya pasajlanarak saf olduklarından emin olunduğunda çalışmaya dahil edildi.

2. HASTALARA AİT BİLGİLER

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların adı-soyadı, cinsiyeti, yaşı, hastaneye yatış-çıkış tarihleri, yatış yaptığı servis, izolatın izole edildiği tarih ve hastaların klinik durumu hakkında bilgi toplandı. Ayrıca hastaların *C. albicans* enfeksiyonu oluşumuna neden olabilecek risk faktörlerinden olan; antibiyotik, cerrahi, hemodiyaliz, endotrakeal entübasyon, kateter, total parenteral nutrisyon, sonda, trakeostomi ve yoğun bakım gibi predispozan faktörlerin varlığı araştırıldı.

3. İZOLATLARIN FENOTİPİK TANIMLANMASI

3. 1. Germ Tüp Testi

0.5-1 ml insan serumu içine küçük bir maya kolonisi karıştırıldı. Bu karışım 2-2.5 saat 37°C'de inkübe edildi. Sürenin sonunda lam lamel arasına alarak x400 büyütmede incelendi. Maya hücresinden direkt ve kısa bir hif başlangıcı şeklinde, septumlarında boğumlanmanın olmadığı yapılar germ tüp olarak değerlendirildi. Germ tüp pozitif olan suşlar *C. albicans* olarak değerlendirildi (Yıldıran, 1999; Winn ve ark., 2006).

3. 2. Pirinç Ekstresi-Tween 80 Agar

Tween 80 içeren pirinç ekstresinin hazırlanışı; 50 gr pirinç, 300 ml distile su içinde kaynatılıp birkaç kat gazlı bezden süzüldükten sonra 20 gr agar, 20 gr glukoz, 10 ml Tween 80 eklenip distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Bu karışım 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra steril petrilere döküldü.

SDA'da üretilen kolonilerden iğne uçlu öze ile alınarak Pirinç ekstresi-Tween 80 agar üzerine birbirine paralel üç çizgi halinde ekim yapıldı. Ekim alanının üzerine alevde steril edilip havada soğutulmuş bir lamel kapatıldı ve 26°C'de 48-72 saat inkübasyona alındı. İnkübasyon sonunda ışık mikroskobunun X400 büyütmede *Candida* türlerinin oluşturduğu mikromorfolojiler incelendi.

Yalancı ve gerçek hifler, yalancı hiflerin boğumları çevresinde kümeler oluşturmuş yuvarlak blastokonidiyumlar ve hif uçlarında türe özgü kalın duvarlı, tek veya birkaç tane klamidospor görülen mikromorfolojili mayalar *C. albicans* olarak değerlendirildi (Yıldıran, 1999; Arıkan, 2003; Winn ve ark., 2006).

3. 3. Kromojenik Besiyeri

MAST ID-CHROMagar *Candida* (Mast Diagnostics, Merseyside, United Kingdom) kromojenik besiyeri olarak kullanıldı. İçerik 100 ml distile su içinde kaynama derecesinde tamamen çözülünceye kadar karıştırıldı. Çözüldükten sonra 50°C'ye kadar soğutulup steril petrilere döküldü.

Candida'lar agar üzerine öze ile ekildi ve 37°C'de 48-72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kolonilerdeki renk değişimleri izlendi. Yeşil renkli koloniler *C. albicans* olarak değerlendirildi.

3. 4. ID 32C Maya İdentifikasyon Sistemi

ID 32C (bioMerieux) kullanılarak biyokimyasal özelliklerine göre tanımlama yapıldı. ID 32C kitleri, her birinde bir dehidrate karbonhidrat substratı bulunan 32 mikrokuyucuk içerir. Mayalar inoküle edildikleri kuyucuktaki karbonhidratı karbon kaynağı olarak kullanıyorlarsa besiyerinde üreme gözlenir.

Kültürden bir miktar maya alınarak 2 McFarland bulanıklılığında olacak şekilde Süspansiyon Medium (2 ml distile su) içine karıştırıldı. Bu karışımdan 250 µl alınarak C-Medium içine eklendi. 32 kuyucuklu kitin her kuyucuğuna C-Medium'dan 135'er µl eklendi. 30°C'de 48 saat nemli bir ortamda inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki üreme ATB Expression cihazında okutuldu.

4. İZOLATLARIN GENOTİPİK TANIMLANMASI

4. 1. *C. albicans*'ın EO3 Gen Bölgesinin PZR ile Tanımlanması

Fenotipik yöntemlerle *C. albicans* olarak tanımlanan suşlar Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile doğrulandıktan sonra çalışmaya dahil edildi.

Mikroorganizmanın DNA ekstraksiyonu, Otlu tarafından tanımlanmış olan yöntem uygulanarak yapıldı (Otlu, 2004).

4. 1. 1. DNA Ekstraksiyonu

1. SDA'a pasajlanan *C. albicans* izolatları 35°C'de 24 saat inkübe edilerek üretildi.
2. Üreyen kolonilerden 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyon 1 ml lizis tamponu (10 mM Tris pH 7.6, 10 mM EDTA pH 8.0, 50 mM $NaCl_2$, %0.2 SDS, 200 µg/ml proteinaz K) ile hazırlandı ve 65°C'de 2 saat inkübe edildi.
3. 500 µl sferoblast oluşturma tamponu (2U/ml lyticase, 50 mM Tris pH 7.6, 1 mM EDTA, %0.2 β-merkaptoetanol, %10 SDS, 4M sodyum asetat) eklenip 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
4. 5 dakika kaynatıldıktan sonra 500 µl 5 M potasyum asetat eklenerek buzda 25 dakika bekletildi.
5. 13.000Xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı yeni bir ependorf tüpe alındı.
6. 1 ml %100'lük isopropil alkol eklendi ve 13.000Xg'de 15 dakika santrifüj edildi.

7. Üst sıvı aspire edildikten sonra 1 ml soğutulmuş %70'lik etanol eklendi.
8. 13.000X g'de 10 dk santrifüj edildi.
9. Üst sıvı boşaltıldıktan sonra DNA pelletleri oda ısısında kurutuldu.
10. DNA'lar 30 µl steril distile su ile sulandırıldıktan sonra -20°C'de saklandı.

4. 1. 2. EO3 PZR Optimizasyonu

EO3 PZR Magnezyum Klorür Optimizasyonu

PZR amplifikasyonu için optimal koşulları sağlayabilmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda magnezyum klorür kullanılarak yapılan optimizasyon çalışması Tablo 4'de özetlenmiştir. Tüm optimizasyonlar aynı suş kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 4: EO3 PZR magnezyum klorür optimizasyonu

Reaksiyon Karışımı (50 µl)	**Tüp 1**	**Tüp 2**	**Tüp 3**	**Tüp 4**	**Tüp 5**	**Tüp 6**	**Tüp 7**	**Tüp 8**	**Tüp 9**
10X PZR tamponu (µl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
25 mM $MgCl_2$ (mM)	**1**	**1,25**	**1,5**	**1,75**	**2**	**2,25**	**2,5**	**2,75**	**3**
100 pmol primer 1 (µl)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
100 pmol primer 2 (µl)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Taq DNA polimeraz (µl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
10 mM dNTP (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Steril saf su (µl)	36,42	35,92	35,42	34,92	34,42	33,92	33,42	32,92	32,42
Kalıp DNA (µl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5

EO3 PZR Primer Bağlanma Isı Optimizasyonu

EO3 gen bölgesini saptamak için kullanılan primerlerin bağlanma ısıları Tm= 2 (A+T) + 4 (G+C) formülü ile hesaplandı. Belirlenen optimal magnezyum miktarı sabit tutularak, primer bağlanma ısı aralığının belirlenmesi için optimizasyon çalışması yapıldı. Uygulanan reaksiyon karışımı ve farklı bağlanma ısıları Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5: EO3 PZR primer bağlanma ısısı optimizasyonu

Reaksiyon Karışımı (50 µl)	**Tüp 1**	**Tüp 2**	**Tüp 3**	**Tüp 4**	**Tüp 5**	**Tüp 6**	**Tüp 7**	**Tüp 8**	**Tüp 9**	**Tüp 10**
Anneling ısısı (°C)	**50,0**	**50,3**	**50,8**	**51,7**	**53,0**	**5,4**	**55,8**	**57,3**	**59,0**	**60,0**
10X PZR tamponu (µl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
25 mM $MgCl_2$ (µl)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
100 pmol primer 1 (µl)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
100 pmol primer 2 (µl)	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Taq DNA polimeraz (µl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
10 mM dNTP (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Steril saf su (µl)	35,92	35,92	35,92	35,92	35,92	35,92	35,92	35,92	35,92	35,92
Kalıp DNA (µl)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

4. 1. 3. EO3 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

EO3 geninin belirlenmesi için bölgeye spesifik primerler kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Uygulamada kullanılan PZR reaksiyon karışım içeriği aşağıda verilmiştir.

Reaksiyon karışımı;

- 10X PCR buffer 5 µl
- $MgCl_2$ (25 mM) 2.5 µl (1.25 mM)
- Primer 1 (100 pmol/µl) 0.04 µl
- Primer 2 (100 pmol/µl) 0.04 µl
- Taq DNA polimeraz (5U/µl) 0.5 µl
- dNTP karışımı (10 mM) 1 µl (0.2 mM)
- Steril deiyonize su 35.92 µl
- DNA ekstraktı 5 µl

Primer olarak Miyakava ve arkadaşlarının tanımlamış oldukları EO3 gen bölgesinin *C. albicans*'a tür-spesifik 125bp'lık bölgeyi çoğaltan dizi kullanılmıştır (Miyakawa ve ark., 1993). Kullanılan primer dizileri Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. EO3 PZR'de kullanılan primer dizileri

Primer/Oligonükleotid Adı	**Primer/Oligonükleotid Dizisi**
Primer 1	5'--CAC CAA CTC GAC CAG TAG GC--3'
Primer 2	5'--CGG GTG GTC TAT ATT GAG AT--3'

Amplifikasyon Programı;

EO3 gen bölgesi amplifikasyon programı olarak Otlu'nun tanımladığı amplifikasyon programı kullanıldı (Otlu, 2004).

- 94°C'de 4 dakika ilk denatürasyon
- 94°C'de 30 saniye denatürasyon
- 56°C'de 1 dakika primer bağlanması } 35 siklus
- 72°C'de 2 dakika primer uzaması
- 72°C'de 5 dakika son uzama

4. 1. 4. EO3 Gen Bölgesi Elektroforezi

1X TBE tamponu ile hazırlanmış %2'lik agaroz jel kuyucuklarına 10 µl amplifikasyon ürünü ile 2 µl 6X yükleme tamponu karıştırılarak uygulandı. Jele 1.5 saat 100 V elektrik akımı uygulanarak DNA bantlarının moleküler büyüklüklerine göre ayrılması sağlandı. Jel, 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren solüsyon ile 20 dakika boyandı ve görüntüleme cihazında (Biorad) görüntülendi. 100 bp DNA Leader kullanılarak DNA bantları karşılaştırmalı olarak incelendi ve kaydedildi.

5. *C. albicans*'ı AP-PZR (ARBITRARILY PRIMED-PZR) ile MOLEKÜLER TİPLENDİRME

C. albicans suşlarının AP-PZR ile moleküler tiplendirilebilmesi için DNA izolasyonlarında, Otlu'nun tanımlamış olduğu ekstrasyon yöntemi kullanıldı (Otlu, 2004).

5. 1. DNA Ekstraksiyonu

1. SDA'a pasajlanan *C. albicans* izolatları 35°C'de 24 saat inkübe edilerek üretildi.

2. Üreyen kolonilerden plağın ¼'ünü kapsayacak şekilde alınarak %1'lik 1,5 ml SDS içinde süspanse edildi ve 30 sn vortekslendi.
3. 3000X g'de 5 dk santrifüj edildi.
4. Üst kısımdan 600 µl yeni bir ependorfa alındı ve 600 µl fenol eklenerek vortekslendi.
5. 13000X g'de 5 dk santrifüj edildi.
6. Üst kısım yeni bir ependorfa alındı ve 600 µl kloroform eklenerek vortekslendi.
7. 13000X g'de 5 dk santrifüj edildi.
8. Üst kısım yeni bir ependorfa alındı ve 1 ml soğutulmuş %100'lük etanol eklenip -70°C'de iki saat bekletildi.
9. Soğutmalı santrifüjde 13000X g'de 15 dk santrifüj edildi.
10. Üst sıvı aspire edildikten sonra 1 ml soğutulmuş %70'lik etanol eklendi.
11. Soğutmalı santrifüjde 13000X g'de 10 dk santrifüj edildi.
12. Üst kısımdaki sıvı boşaltıldıktan sonra DNA pelletleri oda ısısında kurutuldu.
13. DNA'lar 50 µl TE tamponu ile sulandırıldı.
14. NanoDrop kullanılarak DNA konsantrasyonu 50 ng/µl olacak şekilde ayarlandı ve çalışmaya alınıncaya kadar -20°C'de saklandı.

5. 2. AP-PZR Optimizasyonu

5. 2. 1. AP-PZR Magnezyum Klorür Optimizasyonu

Optimal magnezyum klorür miktarını tespit edebilmek amacıyla farklı konsantrasyonlar için oluşturulan uygulama basamakları Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7. AP-PZR magnezyum klorür optimizasyonu

Reaksiyon Karışımı (50 µl)	**Tüp 1**	**Tüp 2**	**Tüp 3**	**Tüp 4**	**Tüp 5**	**Tüp 6**	**Tüp 7**	**Tüp 8**	**Tüp 9**	**Tüp 10**
2X amplifikasyon karışımı (µl)	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
M13 primeri (100 pmol/µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
25 mM $MgCl_2$ (mM)	**0,5**	**1**	**1,5**	**2**	**2,5**	**3**	**3,5**	**4**	**4,5**	**5**
Steril deiyonize su	28,5	27,5	26,5	25,5	24,5	23,5	22,5	21,5	20,5	19,5
DNA ekstraktı (50 ng/µl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

5. 2. 2. AP-PZR Primer Bağlanma Isı Optimizasyonu

M13 primeri için bağlanma ısısı Tm= 2 (A+T) + 4 (G+C) formülü ile hesaplandı. Belirlenen optimal magnezyum miktarı sabit tutularak, primer bağlanma ısı aralığının belirlenmesi için optimizasyon çalışması yapıldı. Uygulanan reaksiyon karışımı ve farklı bağlanma ısıları Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. AP-PZR primer bağlanma ısısı optimizasyonu

Reaksiyon Karışımı (50 µl)	**Tüp 1**	**Tüp 2**	**Tüp 3**	**Tüp 4**	**Tüp 5**	**Tüp 6**	**Tüp 7**	**Tüp 8**	**Tüp 9**	**Tüp 10**
Bağlanma ısısı (^oC)	**40,0**	**40,3**	**40,8**	**41,7**	**43,0**	**44,4**	**45,8**	**47,3**	**49,0**	**50,0**
2X amplifikasyon karışımı (µl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
M13 primeri (100 pmol/µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Steril deiyonize su	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5
DNA ekstraktı (50 ng/µl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

5. 3. AP-PZR Amplifikasyonu

Reaksiyon karışımı daha önce Durmaz tarafından tanımlanan M13 primerinin kullanıldığı protokole uygun olarak hazırlandı (Durmaz ve Ayan, 2001).

2X amplifikasyon karışımı (1000 µl)

- 10X PZR tamponu 200 µl
- 2 mM dNTP karışımı 200 µl (0,2 mM)
- 25 mM $MgCl_2$ 320 µl (3,5 mM)
- Steril deiyonize su 280 µl

Reaksiyon karışımı (50 µl)

- 2X amplifikasyon karışımı 25 µl
- M13 primeri (100 pmol/µl) 1 µl
- Taq DNA polimeraz (5U/µl) 0,5 µl
- Steril deiyonize su 21,5 µl
- DNA ekstraktı (50 ng/µl) 2 µl

Tablo 9. AP-PZR'de kullanılan primer (M13) dizisi

Primer/Oligonükleotid Adı	**Primer/Oligonükleotid Dizisi**
Primer M13	5'--GAG GGT GGC GGT TCT—3'

Amplifikasyon programı M13 primeri için daha önce Durmaz ve arkadaşları tarafından tanımlanan protokol modifiye edilerek uygulandı (Durmaz ve Ayan, 2001).

Amplifikasyon programı;

- 94^oC'de 5 dakika denatürasyon
- 50^oC'de 5 dakika primer bağlanması } 2 siklus
- 72^oC'de 1 dakika primer uzaması
- 94^oC'de 1 dakika denatürasyon
- 50^oC'de 1 dakika primer bağlanması } 40 siklus
- 72^oC'de 2 dakika primer uzaması

5. 4. AP-PZR Elektroforezi

PZR ile amplifiye edilen DNA'ların boyutlarını belirleyebilmek için PZR ürünlerine elektroforez uygulandı. Agaroz konsatrasyonu %2 olan jel 1X TBE buffer ile hazırlandı. Tris radikallerini uzaklaştırarak bant profillerinde oluşan "smear" görüntüyü

ortadan kaldırmak amacıyla TBE tamponu içine 50 mM Thiourea eklendi. 10 µl amplifikasyon ürünü, 2 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak agaroz jel kuyucuklarına yüklendi. Önce 1 saat 100 V daha sonra 8 saat 50 V elektrik akımı uygulanan jel, 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren solüsyon ile 10 dakika boyandı ve 800 ml distile suda 15 dakika iki kez yıkandıktan sonra görüntüleme cihazında (Biorad) 1 Kb DNA Leader ile karşılaştırılarak incelendi ve görüntüler kaydedildi.

5. 5. AP-PZR Sonuçlarının Yorumlanması

AP-PZR'nin bant profil analizi BioNumerics yazılım sistemi kullanılarak yapıldı. Dendogramlar "Unweighted pair group method with mathematical averaging" (UPGMA) yöntemi ile çizildi ve Dice benzerlik katsayısına göre analiz edildi. Genotiplerin belirlenmesi için benzerlik katsayısı %96-%100 arası olan izolatlar aynı genotip, %90-%95 arası olan izolatlar benzer suş (alttip), %90'dan daha düşük olan izolatlar farklı genotip olarak tanımlandı (Kuzucu ve ark., 2008).

6. *C. albicans*'ın PFGE ile MOLEKÜLER TİPLENDİRME

C. albicans'ın PFGE ile karyotiplemesinde, Abdeljelil ve arkadaşlarının tanımlamış oldukları protokol modifiye edilerek çalışıldı (Abdeljelil ve ark., 2008). Buna göre protokolün uygulanışı aşağıda verilmiştir.

6. 1. Kalıpların Hazırlanmasında Kullanılan Tamponlar

- ET tamponu; 0,05 M EDTA, 0.01 M Tris-HCl, (pH 7,5)
- LET tamponu; 0,5 M EDTA, 0.01 M Tris-HCl, (pH 7,5)
- NDS tamponu; 0,5 M EDTA, 0.01 M Tris-HCl, (pH 7,5), %5 N-lauroylsarcosine, 2 mg/ml Proteinaz K
- 0,125 M EDTA, (pH 7,5)
- 0,5 M EDTA, (pH 9,0)

6. 2. Kalıpların Hazırlanması

1. Suşlar SDA'da 37°C'de 48 saat inkübe edildi.
2. %1,6'lık düşük erime ısılı (low melt) agaroz, 0,125 M EDTA (pH 7,5) ile hazırlandı ve 42°C'de bekletildi.

3. 1 ml SF (serum fizyolojik) ile homojenize edilen koloniler spektrofotometre kullanılarak 595 nm'de 1,5-2 bulanıklığa ayarlandı.
4. Maya hücreleri 500 g'de 5 dk +4°C'de santrifüj edildi.
5. Süpernatant atıldıktan sonra pelet 1 ml ET tamponu ile yavaşça resüspanse edildi ve 4000 g'de 5 dk +4°C'de santrifüj edilerek iki kez yıkandı.
6. Pelet 4 µl lyticase (5 mg/ml) içeren 150 µl ET tamponu ile resüspanse edildi ve 42°C'de bekletildi.
7. Düşük erime ısılı agaroz ile hücre/lyticase karışımı 1:1 oranında karıştırıldı ve karışım kalıplara yüklendi.
8. Kalıplar +4°C'de 20-30 dk katılaşmaya bırakıldı.
9. Katılaşan kalıplar 37°C'de 4 ml LET çözeltisinde bir gece inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonunda kalıplar 2 ml NDS çözeltisinde 50°C'de bir gece inkübe edildi.
11. Kalıplar 0,5 M EDTA (pH 9,0) ile bir kez yıkandı.
12. Yıkanan kalıplar 0,5 M EDTA (pH 9,0)'da 4°C'de saklandı.

6. 3. Kalıpların Jele Yüklenmesi

100 ml 0,5 X TBE (44,5 mM Trisma base, 44,5 mM Borik asit, 1 mM EDTA) içinde %1 olacak şekilde agaroz mikrodalga fırında çözüldükten sonra kullanılıncaya kadar 50°C'lik su banyosunda bekletildi.

0,5 M EDTA (pH 9,0)'da +4°C'de saklanan kalıplar bir lam üzerine alınarak lamel yardımıyla ½ oranında kesildi. Parçalardan biri tarağın dişlerinin uç kısmına yerleştirilirken diğer parça sonradan kullanılmak üzere 0,5 M EDTA (pH 9,0)'ya alınarak +4°C'de saklandı. Kalıplar fazla bekletilmeden, kalıpların olduğu kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelecek şekilde tarak agaroz kasetine yerleştirildi. Önceden eritilmiş ve 50°C'de bekletilen agaroz kaset içine döküldü. Katılaşması için 20-30 dk beklendikten sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Agaroz 1900 ml 0.5 X TBE bulunan tanka yerleştirildi ve aşağıda belirtilen elektroforez koşulları uygulandı.

6. 4. PFGE Elektroforez Koşullarının Optimizasyonu

Elektroforez koşullarının optimizasyonu için volt, başlangıç ve bitiş zamanları, toplam süre ve agaroz konsantrasyonu gibi koşullar değiştirilerek çeşitli denemeler yapıldı. Bu denemelerde kullanılan değerler Tablo 10'de verilmiştir.

Tablo 10. PFGE-EK için elektroforez koşulları optimizasyonu

	Volt (V/cm)	Toplam süre (saat)	Başlangıç ve bitiş zamanları (saniye)	Agaroz konsantrasyonu (%)
1. Deneme	3,5	36	90-360	0,8
2. Deneme	3,5	48	90-360	0,8
3. Deneme	4	48	90-360	0,8
4. Deneme	3,5	48	90-360	0,7
5. Deneme	4,5	24	120	0,8
		36	240	
6. Deneme	3,7	48	90-360	0,7
7. Deneme	4	48	90-325	1
8. Deneme	3,8	48	90-325	0,8
9. Deneme	3,9	48	90-325	0,9

6. 5. PFGE Elektroforez Koşulları

- Isı; $14^{o}C$
- Voltaj; 4 V/cm
- Açı; 120°
- Başlangıç vuruş zamanı; 90 saniye
- Bitiş vuruş zamanı; 325 saniye
- Toplam süre; 48 saat
- Agaroz konsantrasyonu; %1

6. 6. PFGE'de Jelin Görüntülenmesi

Elektroforez tamamlandıktan sonra jel, 0,5 µg/ml etidyum bromid içeren distile su ile 20 dakika boyandı, görüntüleme cihazında (Biorad) görüntülendi ve kaydedildi.

6. 7. PFGE Sonuçların Yorumlanması

PFGE-EK bant profil analizi BioNumerics yazılım sistemi kullanılarak yapıldı. Bant farkı bir veya daha fazla olan izolatlar farklı karyotip olarak değerlendirildi (Espinel-Ingroff 1999; Otlu 2004; Shin ve ark., 2005; Abdeljelil ve ark., 2008).

7. DİSKRİMİNASYON İNDEKSİ

Genotiplemede kullanılan AP-PZR ve PFGE-EK yöntemlerinin diskriminasyon indeksi (ayırım güçleri) Hunter ve Gaston'un aşağıda verilen formülü kullanılarak hesaplandı (Hunter ve Gaston, 1988).

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{S} n_j (n_j - 1)$$

D: Ayrılabilirlik indeksi, N: Çalışmada test edilen suş sayısı, S: Belirlenen toplam tip sayısı, n_j: J'inci tipe ait suş sayısı

8. SAP 4 GEN BÖLGESİNİN PZR ile TESPİTİ

SAP4 gen bölgesinin tespiti için fenol-kloroform ekstraksiyon ürünleri kullanıldı. Uygun magnezyum klorür miktarını ve bağlanma ısısını tespit edebilmek için optimizasyon yapıldı.

8. 1. SAP4 PZR Optimizasyonu

8. 1. 1. SAP4 PZR Magnezyum Klorür Optimizasyonu

PZR amplifikasyonu için optimal koşulları sağlayabilmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda magnezyum klorür kullanılarak yapılan optimizasyon çalışması Tablo 11'de özetlenmiştir.

Tablo 11. SAP4 PZR magnezyum klorür optimizasyonu

Reaksiyon Karışımı (25 µl)	**Tüp 1**	**Tüp 2**	**Tüp 3**	**Tüp 4**	**Tüp 5**	**Tüp 6**	**Tüp 7**	**Tüp 8**	**Tüp 9**
10X PZR tamponu (µl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
25 mM $MgCl_2$ (mM)	**1**	**1,5**	**2**	**2,5**	**3**	**3,5**	**4**	**4,5**	**5**
10 pmol primer 1 (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10 pmol primer 2 (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Taq DNA polimeraz (µl)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
10 mM dNTP (µl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Steril saf su (µl)	16,4	15,9	15,4	14,9	14,4	13,9	13,4	12,9	12,4
Kalıp DNA (µl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

8. 1. 2. SAP4 PZR Primer Bağlanma Isı Optimizasyonu

SAP4 gen bölgesini saptamak için kullanılan primerlerin bağlanma ısıları Tm= 2 (A+T) + 4 (G+C) formülü ile hesaplandı. Belirlenen optimal magnezyum miktarı sabit tutularak, primer bağlanma ısı aralığının belirlenmesi için optimizasyon çalışması yapıldı. Uygulanan reaksiyon karışımı ve farklı bağlanma ısıları Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. SAP4 PZR primer bağlanma ısısı optimizasyonu

Reaksiyon Karışımı (25 µl)	**Tüp 1**	**Tüp 2**	**Tüp 3**	**Tüp 4**	**Tüp 5**	**Tüp 6**	**Tüp 7**	**Tüp 8**	**Tüp 9**	**Tüp 10**
Anneling ısısı (^oC)	**55,5**	**56,5**	**57,8**	**59,5**	**61,4**	**63,4**	**65,4**	**67,6**	**69,0**	**70,3**
10X PZR tamponu (µl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
25 mM $MgCl_2$ (µl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
10 pmol primer 1 (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10 pmol primer 2 (µl)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Taq DNA polimeraz (µl)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
10 mM dNTP (µl)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Steril saf su (µl)	14,9	14,9	14,9	14,9	14,9	14,9	14,9	14,9	14,9	14,9
Kalıp DNA (µl)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

8. 2. SAP4 Gen Bölgesi Amplifikasyonu

Reaksiyon Karışımı;

- 0,5 U Taq DNA polimeraz
- 200 µmol/L dNTP
- 10 pmol (her primerden)
- 2,5 mmol/L $MgCl_2$
- 2,5 µl 10X PZR tamponu
- 2,5 µl DNA

Gen bölgesinin tespitinde Lian ve arkadaşlarının ve Costa ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada kullandıkları primer dizileri kullanıldı (Lian ve Liu, 2007; Costa ve ark., 2010).

Tablo 13. SAP4 PZR'de kullanılan primer dizileri

Primer/Oligonükleotid Adı	Primer/Oligonükleotid Dizisi
Primer 1	5'--CATTCATTCCTTTAATACCGACTATC--3'
Primer 2	5'--GGTAACAAACCCTGTAGATCTTTTAA--3'

SAP4 gen bölgesi için amplifikasyon programı;

- 94°C'de 3 dakika ilk denatürasyon
- 94°C'de 30 saniye denatürasyon
- 62°C'de 50 saniye primer bağlanması } 30 siklus
- 72°C'de 1 dakika primer uzaması
- 72°C'de 5 dakika son uzama

8. 3. SAP4 Gen Bölgesi Elektroforezi

1X TBE tamponu ile hazırlanmış %2'lik agaroz jel kuyucuklarına 10 µl amplifikasyon ürünü ile 2 µl 6X yükleme tamponu karıştırılarak uygulandı. Jele 1 saat 120 V elektrik akımı uygulanarak DNA bantlarının jelde yürümesi sağlandı. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel, 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren solüsyon ile 20 dakika boyandı ve görüntüleme cihazında (Biorad) görüntülendi. 100 bp DNA Leader kullanılarak DNA bantları karşılaştırmalı olarak incelendi ve kaydedildi.

BULGULAR

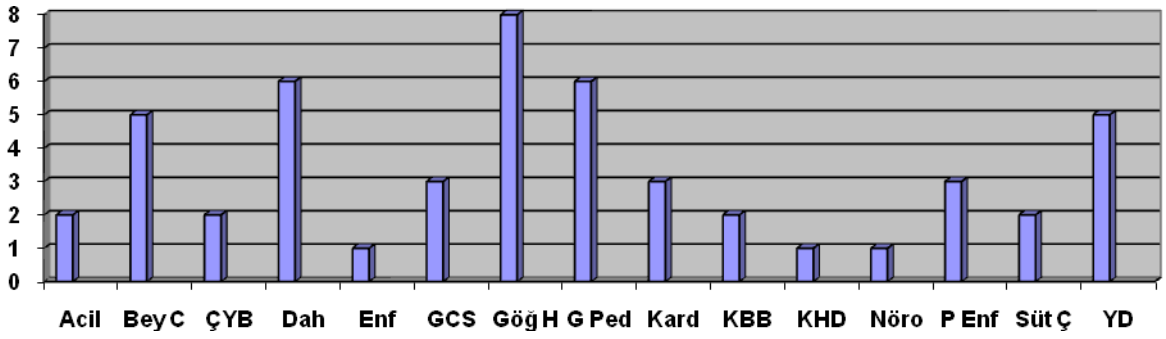
1. HASTALARIN EPİDEMİYOLOJİK DURUMLARINA AİT BİLGİLER

Çalışmada kullanılan *C. albicans* suşları, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli servislerinde yatmakta olan hastaların kan örneklerinden 18 aylık bir dönemde izole edildi.

Çalışmaya dahil edilen hastaların 28'i (%56) erkek, 22'si (%44) kadındı.

Hastaların en küçüğü 1 aylıkken en büyüğü 83 yaşındaydı. Yaşa göre hastaların sayısındaki dağılım; 0-9 yaş 18 (%36) hasta, 10-19 yaş 3 (%6) hasta, 20-29 yaş 3 (%6) hasta, 30-39 yaş 5 (%10) hasta, 40-49 yaş 4 (%8) hasta, 50-59 yaş 5 (%10) hasta, 60-69 yaş 4 (%8) hasta, 70-79 yaş 6 (%12) hasta ve >=80 yaş 2 (%4) hasta şeklindeydi. 0-9 yaş grubundaki 18 hastanın 14 tanesi <=2 yaşındaydı. Yaş gruplarına yapılan tek değişkenli düzende ki-kare analizine göre 0-9 yaş diğer yaş aralıklarına göre anlamlı bir şekilde daha riskli bulundu (X^2 = 33,5; sd = 8; P<0,001).

Örnekler farklı sayılarda olmak üzere 15 farklı servisten toplanmıştır. Servislere göre örnek sayılarının dağılımı; acil servis 2 (%4) örnek, beyin cerrahisi sevisi 5 (%10) örnek, çocuk yoğun bakım servisi 2 (%4) örnek, dahiliye sevisi 6 (%12) örnek, enfeksiyon sevisi 1 (%2) örnek, genel cerrahi servisi 3 (%6) örnek, göğüs hastalıkları servisi 8 (%16) örnek, genel pediatri servisi 6 (%12) örnek, kardiyoloji servisi 3 (%6) örnek, kulak burun boğaz servisi 2 (%4) örnek, kadın hastalıkları ve doğum servisi 1 (%2) örnek, nöroloji servisi 1 (%2) örnek, pediatrik enfeksiyon servisi 3 (%6) örnek, süt çocuğu servisi 2 (%4) örnek, yeni doğan servisi 5 (%10) örnek şeklindeydi. Örnek sayıları açısından, servisler arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Servislere göre örnek sayıları Şekil 1'de gösterilmiştir.



Acil: Acil servis, Bey C: Beyin cerrahisi servisi, ÇYB: Çocuk yoğun bakım servisi, Dah: Dahiliye servisi, Enf: Enfeksiyon servisi, GCS: Genel cerrahi servisi, Göğ H: Göğüs hastalıkları servisi, G Ped: Genel pediatri servisi, Kard: Kardiyoloji servisi, KBB: Kulak burun buğaz servisi, Nöro: Nöroloji servisi, P Enf: Pediatrik enfeksiyon servisi, Süt Ç: Süt çocuğu servisi, YD: Yeni doğan servisi

Şekil 1: Örneklerin toplandığı hastaların servis dağılımı

Çalışmaya aldığımız hastaların hastaneye yatış nedeni incelendiğinde; 7'si (%14) enfeksiyon (pnömoni [n=2], menenjit [n=1], kandidiazis [n=1], septisemi [n=1], endokardit [n=1], ÜSYE [n=1]), 16'sı (%32) malignite, 2'si (%4) beyin damar hastalıkları (SVO [n=1], SAK [n=1]), 2'si (%4) kardiyovasküler hastalıklar (mitral kapak yetmezliği), 2'si (%4) enfeksiyon dışı akciğer hastalıkları (kronik solunum yetmezliği [n=1], pulmoner emboli [n=1]), 2'si (%4) renal hastalıklar (böbrek yetmezliği), 2'si (%4) karaciğer hastalıkları (siroz [n=1], asit [n=1]), 2'si (%4) hematolojik hastalıklar (DIC [n=1], demir eksikliği anemisi [n=1]), 3'ü (%6) travma (servikal vertebra kırığı [n=1], kafa travması [n=1], travma [n=1]), 5'i (%10) gastrointestinal sistem hastalıkları (ileus [n=1], GÖRH [2], özefagus perforasyonu [n=1], akut batın [n=1]), 2'si (%4) konjenital malformasyon (mesane ekstrofisi [n=1], konjenital malformasyon [n=1]) ve 5'i (%10) diğer (prematürite [n=1], NBA [n=1], kistik fibrozis [n=1], immün yetmezlik [n=1], polinöropati [n=1]) olarak gruplandırıldı. Hastaların hastaneye yatış nedenlerine yapılan, tek değişkenli düzende ki-kare analizine göre malignite diğer yatış nedenlerine göre anlamlı bir şekilde daha riskli bulundu (X^2 = 44,1; sd = 11; P<0,001).

Çalışmada kullanılan 50 adet *C. albicans* suşunun izole edildiği hastaların klinik ve epidemiyolojik verileri Tablo 14'de gösterilmiştir.

Tablo 14. Örneklerin izole edildiği hastalara ait klinik ve epidemiyolojik veriler

No	Cinsiyet	Yaş	Servis	Yatış Tarihi	Taburcu Tarihi	İzolasyon Tarihi	Tanı
1	E	38	Göğ H	07.02.07	03.05.07	24.04.07	Pulmoner emboli
2	K	2	G Ped	25.04.07	21.05.07	02.05.07	Pneumoni
3	E	8	Bey C	21.04.07	07.06.07	10.05.07	Pneumoni
4	E	68	Acil	28.06.07	14.09.07	02.08.07	Pankreas CA
5	K	13	P Enf	18.07.07	20.08.07	06.08.07	Siroz
6	E	65	Dah	06.07.07	13.09.07	10.08.07	Özefagus CA
7	K	65	Dah	25.05.07	17.08.07	15.08.07	Pankreas CA
8	K	33	KHD	01.08.07	22.08.07	20.08.07	Retroperiton malign neoplazmi
9	E	33	Bey C	12.05.07	10.09.07	24.08.07	SVO
10	K	7	P Enf	09.08.07	25.09.07	27.08.07	DIC
11	K	1	YD	15.07.07	03.10.07	27.08.07	Prematüre
12	E	25	Bey C	23.08.07	12.09.07	10.09.07	SAK
13	E	75	Göğ H	13.06.07	22.02.08	17.09.07	Akciğer CA
14	E	1	ÇYB	06.09.07	14.10.07	17.09.07	Menenjit
15	E	1 a	G Ped	28.09.07	04.10.07	05.10.07	NBA
16	K	39	Kard	07.10.07	04.12.07	17.10.07	Böbrek yetmezliği
17	K	3	G Ped	04.10.07	23.10.07	25.10.07	Böbrek malign neoplazmi
18	E	11 a	YD	04.10.07	13.11.07	30.10.07	Kandidiazis
19	E	47	Göğ H	24.10.07	21.11.07	14.11.07	Özefagus CA
20	E	65	KBB	15.10.07	22.11.07	14.11.07	Larinks CA
21	E	83	GCS	18.10.07	14.11.07	16.11.07	İleus
22	E	1	G Ped	15.11.07	27.12.07	26.11.07	Demir eksikliği anemisi
23	E	43	Dah	14.10.07	25.11.07	03.12.07	Mide CA
24	K	19	GCS	01.11.07	14.03.08	05.12.07	Kolon CA
25	E	44	KBB	18.10.07	30.12.07	17.12.07	Larinks CA
26	K	58	Acil	24.11.07	19.12.07	19.12.07	Serviks CA
27	E	57	Göğ H	05.12.07	09.01.08	24.12.07	Özefagus CA

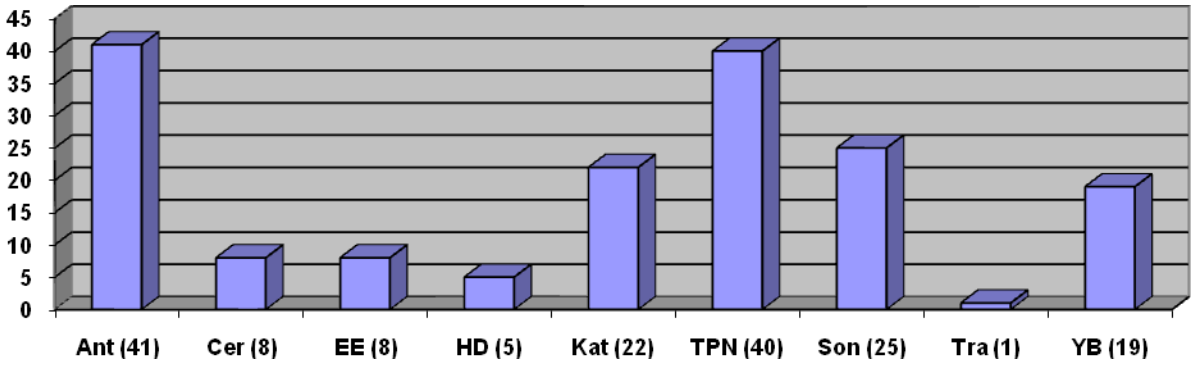
Tablo 14. 'Devam' Örneklerin izole edildiği hastalara ait klinik ve epidemiyolojik veriler

28	E	11 a	ÇYB	29.11.07	14.02.08	10.01.08	Septisemi
29	K	53	Enf	07.01.08	16.04.08	15.02.08	Mitral kapak yetmezliği
30	K	81	Göğ H	29.01.08	10.03.08	11.03.08	Kronik solunum yetmezliği
31	E	78	Kard	20.02.08	10.04.08	14.04.08	Karaciğer CA
32	E	28	Göğ H	28.04.08	29.07.08	29.05.08	Endokardit
33	K	75	Göğ H	29.05.08	16.06.08	04.06.08	Özefagus perforasyonu
34	E	5 a	YD	20.05.08	05.06.08	05.06.08	Mesane ekstrofisi
35	K	77	Dah	24.04.08	10.06.08	09.06.08	Assit
36	K	4	G Ped	11.06.08	31.07.08	14.07.08	ÜSYE
37	K	29	Bey C	09.07.08	19.08.08	22.07.08	Servikal vertebra kırığı
38	K	56	Dah	08.07.08	06.08.08	30.07.08	Pankreas CA
39	E	2 a	YD	28.06.08	01.11.08	31.07.08	Kistik fibrozis
40	K	1	Süt Ç	20.05.08	17.12.08	04.08.08	İmmün yetmezlik
41	E	71	Kard	27.07.08	06.08.08	08.08.08	Mitral kapak yetmezliği
42	E	2	Süt Ç	26.07.08	20.08.08	11.08.08	Travma
43	K	58	GCS	25.07.08	10.08.08	11.08.08	Böbrek yetmezliği
44	E	1 a	YD	29.07.08	16.09.08	11.08.08	Konjenital malformasyon
45	K	31	Göğ H	22.07.08	07.10.08	22.08.08	Akut batın
46	E	2	P Enf	28.07.08	22.09.08	22.08.08	GÖRH
47	E	19	Bey C	22.07.08	20.10.08	26.08.08	Kafa travması
48	E	2	G Ped	22.08.08	30.08.08	29.08.08	GÖRH
49	K	44	Dah	29.07.08	01.09.08	01.09.08	Over CA
50	K	75	Nöro	28.08.08	10.10.08	22.09.08	Polinöropati

a: Ay, E: Erkek, K: Kadın
SVO: Serebro Vasküler Olay, DIC: Dissemine İntravasküler Koagülasyon, SAK: Subaraknoid Kanama, NBA: Nedeni Bilinmeyen Ateş, ÜSYE: Üst Solunum Yolu Enfeksiyonu, GÖRH: Gastro Özefagial Reflü Hastalığı
Göğ H: Göğüs Hastalıkları, G Ped: Genel Pediatri, Bey C: Beyin Cerrahisi, P Enf: Pediatrik Enfeksiyon, Dah: Dahiliye, KHD: Kadın Hastalıkları ve Doğum, YD: Yeni Doğan, ÇYB: Çocuk Yoğun Bakım, Kard: Kardiyoloji, KBB: Kulak Burun Boğaz, GCS: Genel Cerrahi Servisi, Enf: Enfeksiyon, Süt Ç: Süt Çocuğu, Nöro: Nöroloji

2. RİSK FAKTÖRLERİNİN DAĞILIMI

Çalışmaya alınan hastalar, *C. albicans* enfeksiyonu oluşumuna neden olabilecek risk faktörlerinin varlığı yönünden incelenmiştir. Bu amaçla hastalar; antibiyotik tedavisi, cerrahi girişimler, endotrakeal entübasyon, hemodiyaliz, kateter varlığı, total parenteral nutrisyon, sonda varlığı, trakeostomi ve yoğun bakımda kalması yönünden araştırılmıştır. Buna göre hastaların; 41'inde (%82) antibiyotik tedavisi, 8'ine (%16) cerrahi girişim, 8'ine (%16) endotrakeal entübasyon, 5'ine (%10) hemodiyaliz, 22'sine (%44) kateter, 40'ına (%80) total parenteral nutrisyon, 25'ine (%50) sonda, 1'ine (%2) trakeostomi ve 19'una (%38) yoğun bakım, uygulaması yapılmıştır.



Ant: Antibiyotik tedavisi, Cer: Cerrahi girişim, EE: Endotrakeal entübasyon, HD: Hemodiyaliz, Kat: Kateter, TPN: Total parenteral nutrisyon, Son: Sonda, Tra: Trakeostomi, YB: Yoğun bakım

Şekil 2. Enfeksiyon oluşumuna neden olabilecek risk faktörlerinin dağılımı

Çalışmaya alınan hastalardan bir tanesinde enfeksiyonu oluşumuna neden olabilecek risk faktörlerinden hiçbiri mevcut değilken, 6 hastada 1, 10 hastada 2, 10 hastada 3, 10 hastada 4, 8 hastada 5, 2 hastada 6, 3 hastada 7 farklı risk faktörü aynı anda belirlenmiştir. Hastalardan hiç birinde 8 ve 9 risk faktörü aynı anda tespit edilmemiştir.

Çalışmaya alınan hastalarda *C. albicans* enfeksiyonu oluşumuna neden olabilecek risk faktörleri toplu olarak Tablo 15'de verilmiştir.

Tablo 15. *C. albicans* enfeksiyonu oluşumuna neden olabilecek risk faktörleri

Hasta No	Ant	Cer	EE	HD	Kat	TPN	Son	Tra	YB
1	+					+	+		
2	+				+	+	+		+
3	+		+		+	+	+		+
4	+	+				+	+		
5	+	+			+	+	+		
6	+				+	+	+		
7	+				+	+	+		
8	+					+			+
9	+				+	+	+		+
10	+				+	+			
11	+					+			
12					+	+			
13	+		+	+	+	+	+		+
14	+				+		+		+
15	+					+	+		
16	+		+	+	+	+	+		+
17	+	+	+		+	+	+		+
18	+					+			
19	+				+	+	+		+
20	+					+			
21		+							
22	+		+			+	+		+
23	+								
24		+							
25					+	+			
26	+			+		+			
27		+			+				+
28	+					+	+		+
29	+			+	+	+	+		+
30	+		+			+	+		+
31	+					+			
32	+				+	+	+		+
33					+	+			
34	+								
35	+					+	+		
36	+					+	+		+
37	+	+				+			
38	+					+			
39	+				+	+	+		
40	+					+			
41		+							+
42	+				+	+			+
43				+					

Tablo 15. 'Devam' *C. albicans* enfeksiyonu oluşumuna neden olabilecek risk faktörleri

44	+		+			+			
45	+					+	+		+
46	+				+	+	+		
47	+		+			+	+	+	
48	+								
49	+				+	+			
50									

Ant: Antibiyotik, Cer: Cerrahi, HD: Hemodiyaliz, EE: Endotrakeal Entübasyon, Kat: Kateter, TPN: Total Parenteral Nutrisyon, Son: Sonda, Tra: Trakeostomi, YB: Yoğun Bakım

3. FENOTİPİK TANIMLAMA

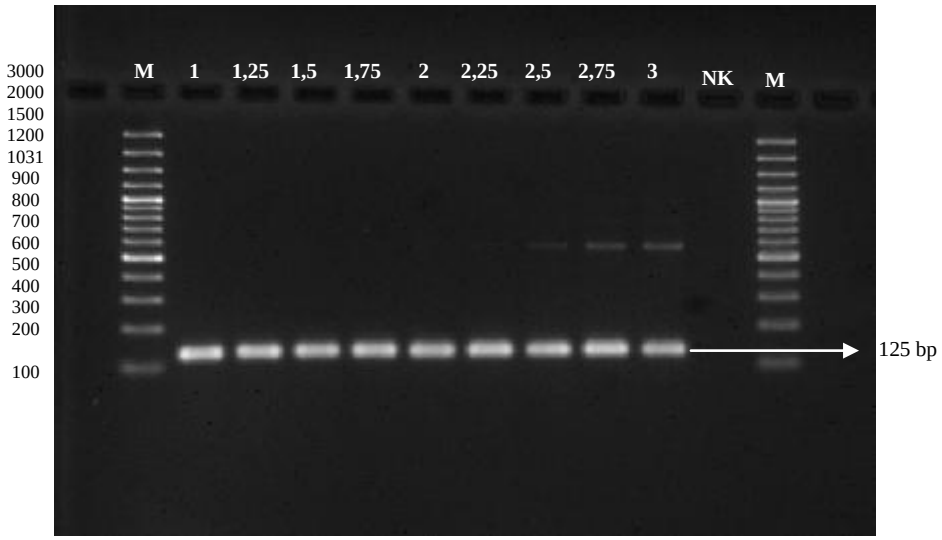
Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşları germ tüp testi, pirinç ekstresi-Tween 80 agar, kromojenik besiyeri ve ID 32 C maya identifikasyon sistemi kullanılarak tür tayini yapıldı ve bu yöntemlerle belirlenen 50 *C. albicans* suşu çalışmaya dahil edildi.

4. GENOTİPİK TANIMLAMA

4. 1. EO3 PZR Optimizasyon Sonuçları

4. 1. 1. EO3 PZR Magnezyum Klorür Optimizasyonu

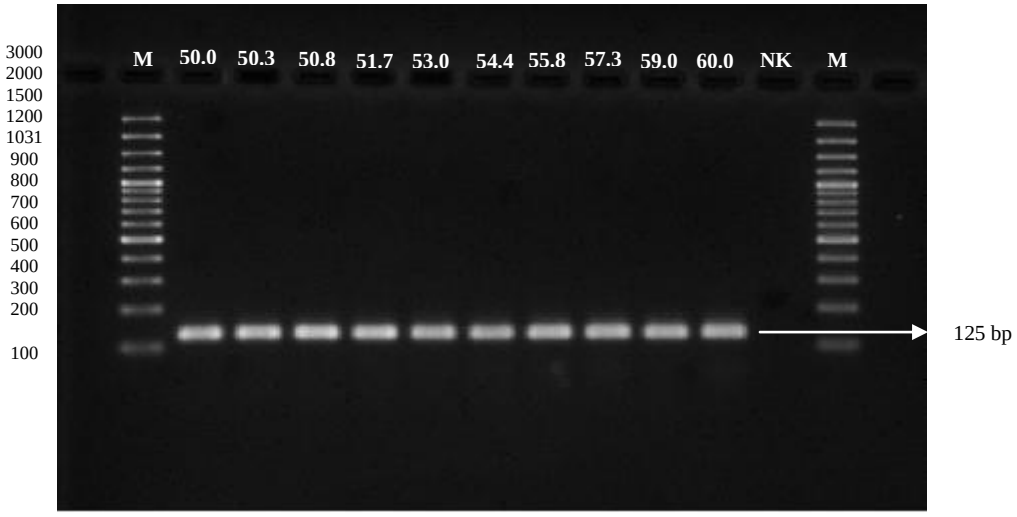
PZR amplifikasyonu için en ideal $MgCl_2$ miktarını tespit edebilmek amacıyla 2-6 µl konsantrasyon aralığı çalışıldı. En iyi bant profili veren 2,5 µl (1,25 mM) $MgCl_2$ çalışmalarda kullanıldı. Şekil 3'de $MgCl_2$ optimizasyonu bant profilleri gösterilmiştir.



Şekil 3. EO3 PZR magnezyum klorür optimizasyonu jel görüntüsü (M: Marker, NK: DNA içermeyen negatif kontrol) (Miktarlar mM olarak verilmiştir)

4. 1. 2. EO3 PZR Primer Bağlanma Isısı Optimizasyonu

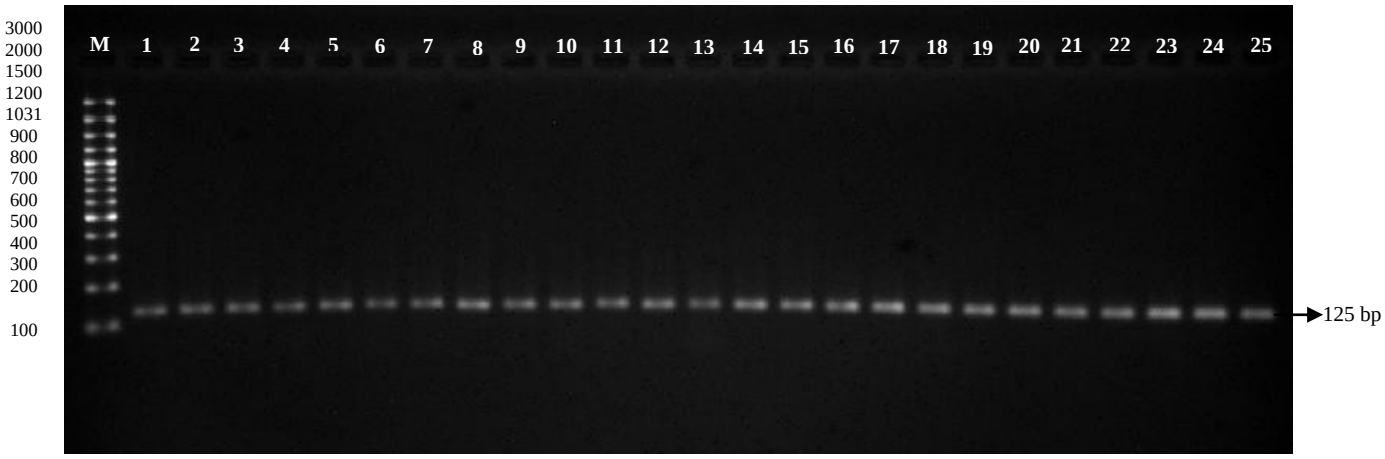
PZR amplifikasyonu için en ideal bağlanma ısı derecesini tespit edebilmek amacıyla, 50-60°C arasındaki ısı değerleri denendi. Farklı ısı değerleri arasında önemli bir fark görülmezken bağlanma ısısı 56°C olarak belirlendi. Belirli sıcaklık aralıklarında oluşan bant profili görüntüleri Şekil 4'de gösterilmiştir.



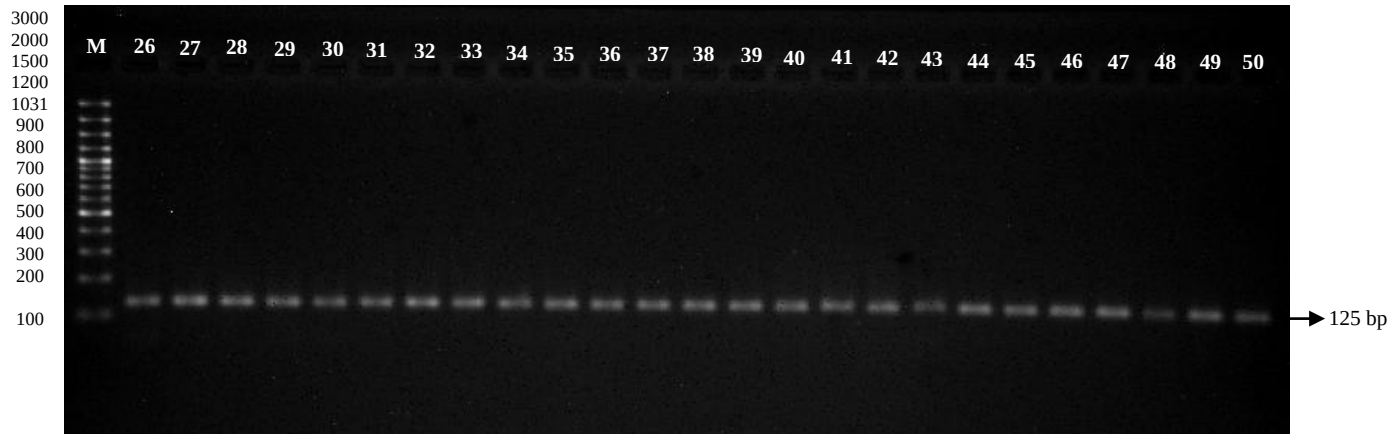
Şekil 4. EO3 PZR primer bağlanma ısısı optimizasyonu jel görüntüsü (M: Marker, NK: DNA içermeyen negatif kontrol)

4. 2. İzolatların EO3 PZR Sonuçları

Magnezyum klorür ve bağlanma ısısı optimizasyonu yapıldıktan sonra çalışmaya dahil edilen 50 adet *C. albicans* suşunda PZR yöntemi ile EO3 gen bölgesinin varlığı araştırıldı. Fenotipik yöntemlerle *C. albicans* olarak tiplendirilen suşlar genotipik yöntemlerle desteklenerek doğrulandı. PZR yöntemi ile belirlenen suşlardaki 125 bp'lik gen bölgeleri Şekil 5 ve 6'da verilmiştir.



Şekil 5. 1-25 no'lu suşların EO3 PZR jel görüntüsü (M: Marker)



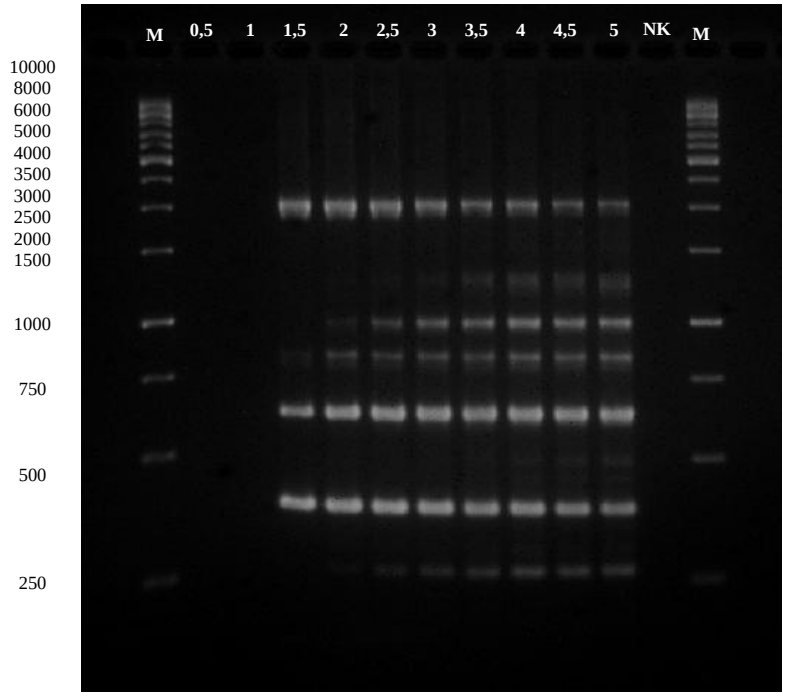
Şekil 6. 26-50 no'lu suşların EO3 PZR jel görüntüsü (M: Marker)

5. AP-PZR SONUÇLARI

5. 1. AP-PZR Optimizasyon Sonuçları

5. 1. 1. AP-PZR Magnezyum Klorür Optimizasyonu

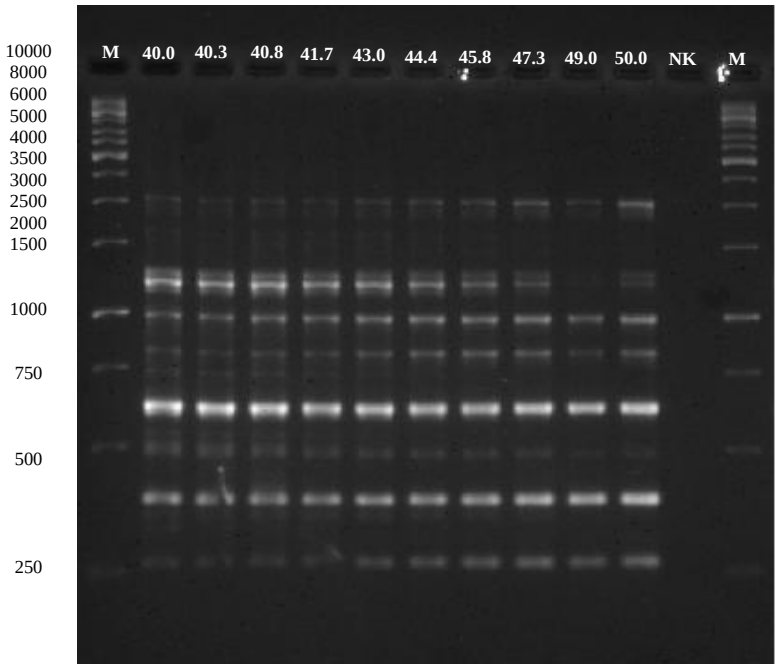
AP-PZR amplifikasyonu için en ideal $MgCl_2$ miktarını tespit edebilmek amacıyla 1-10 µl miktarları çalışıldı. En ideal konsantrasyon 7 µl (3,5 mM) olarak bulundu. Şekil 7'de magnezyum klorür konsantrasyonlarının farklı bant profilleri gösterilmiştir.



Şekil 7. AP-PZR magnezyum klorür optimizasyonu jel görüntüsü (M: Marker, NK: DNA içermeyen negatif kontrol) (Miktarlar mM olarak verilmiştir)

5. 1. 2. AP-PZR Primer Bağlanma Isısı Optimizasyonu

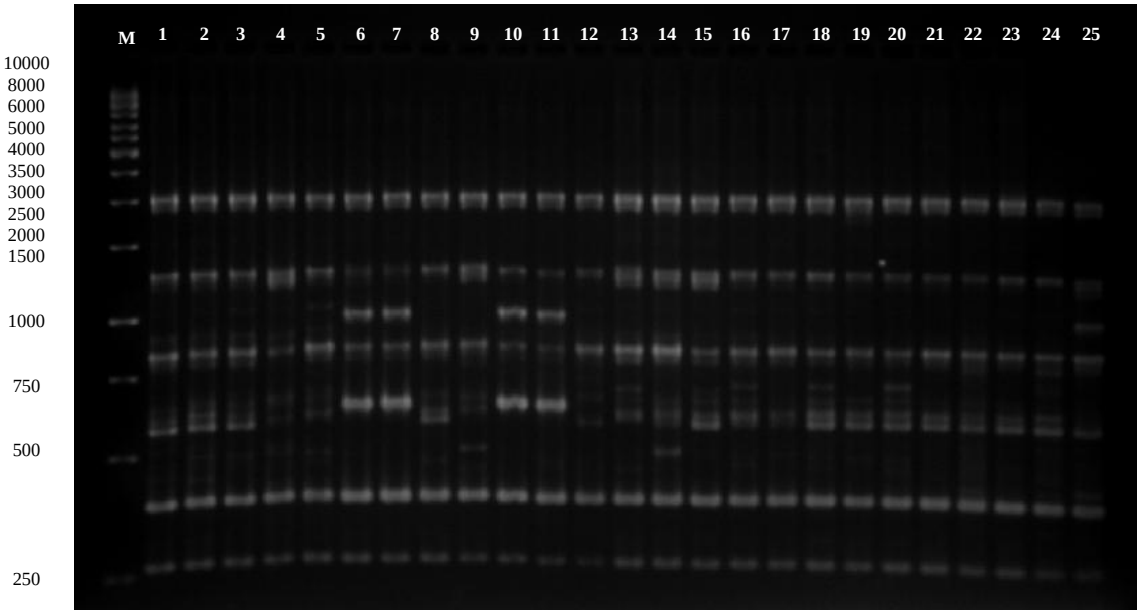
AP-PZR amplifikasyonu için en ideal bağlanma ısısını tespit edebilmek amacıyla 40-50°C arasındaki değerler çalışıldı ve bu ısı aralıklarında 50°C en uygun bağlanma ısısı olarak belirlendi. Belirli sıcaklık aralıklarında oluşan bant profili görüntüleri Şekil 8'da gösterilmiştir.



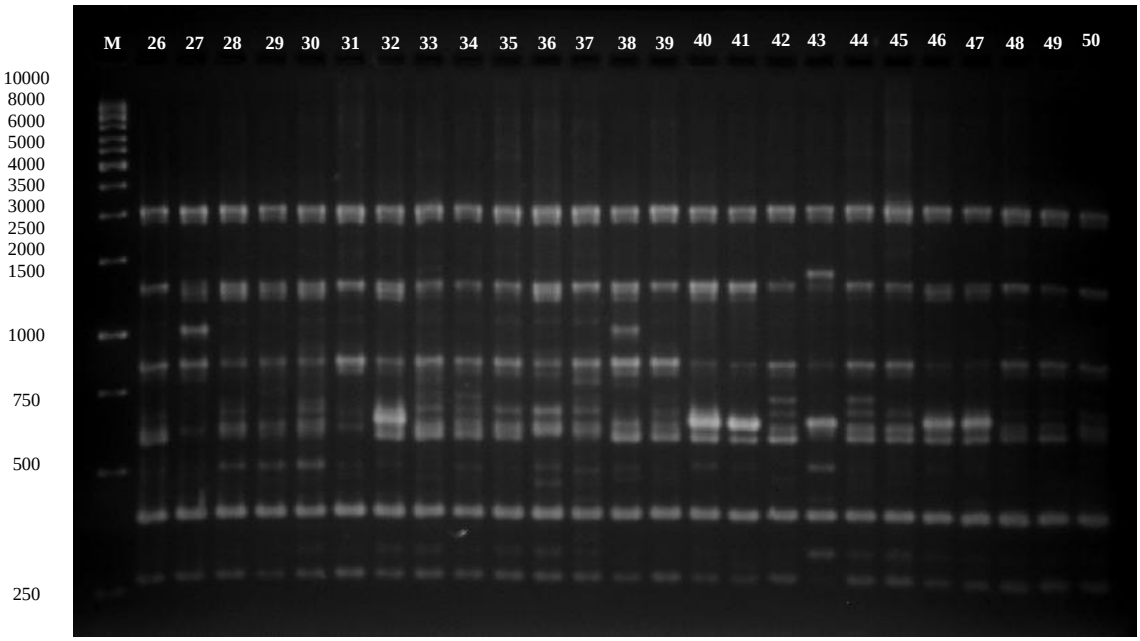
Şekil 8. AP-PZR primer bağlanma ısısı optimizasyonu jel görüntüsü (M: Marker, NK: DNA içermeyen negatif kontrol)

5. 2. İzolatların AP-PZR Sonuçları

Magnezyum klorür ve primer bağlanma ısısı optimizasyonu yapıldıktan sonra örneklerin AP-PZR yöntemi ile tiplendirme sonuçları Şekil 9 ve 10'da verilmiştir.

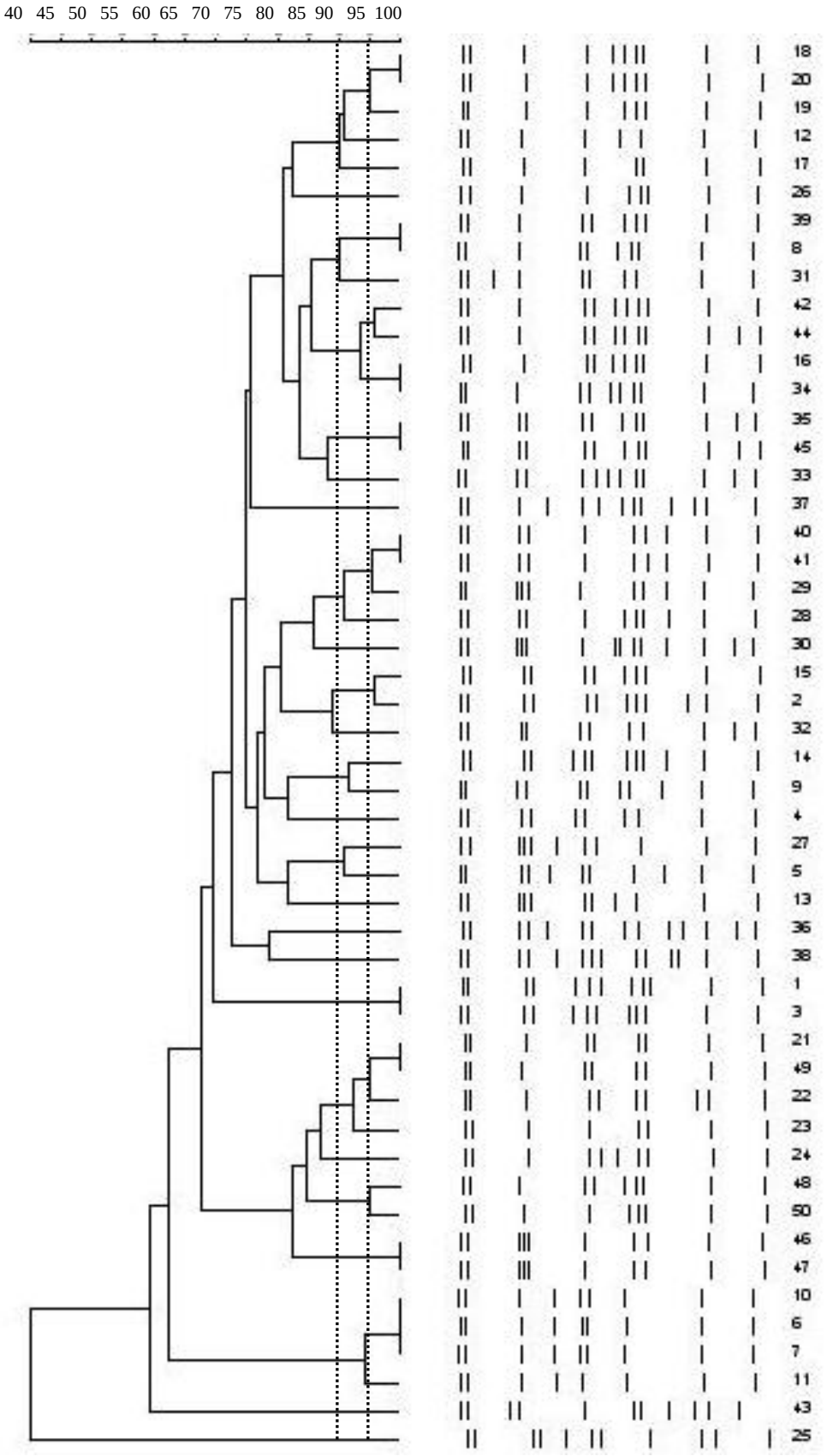


Şekil 9. 1-25 no'lu suşların AP-PZR jel görüntüsü (M: Marker)



Şekil 10. 26-50 no'lu suşların AP-PZR jel görüntüsü (M: Marker)

AP-PZR sonucu, bant profillerinin analiz edilmesi ile elde edilen dendogram Şekil 11'de verilmektedir.



Şekil 11. AP-PZR sonucu bant profillerinden elde edilen dendogram

Tablo 16. AP-PZR yöntemi ile belirlenen genotipik olarak aynı yada benzer olan suşlar

İzolat No	Genotip	%96-100 uyum	%90-95 uyum
18	R8Aa	✓	✓
20	R8Ab	✓	✓
19	R8B		✓
12	R8C		✓
39	R6Aa	✓	✓
8	R6Ab	✓	✓
31	R6B		✓
42	R10A		✓
44	R10B		✓
16	R10Ca	✓	✓
34	R10Cb	✓	✓
35	R20Aa	✓	✓
45	R20Ab	✓	✓
40	R16Aa	✓	✓
41	R16Ab	✓	✓
29	R16B		✓
28	R16C		✓
15	R2A		✓
2	R2B		✓
14	R7A		✓
9	R7B		✓
27	R4A		✓
5	R4B		✓
1	R1Aa	✓	✓
3	R1Ab	✓	✓
21	R12Aa	✓	✓
49	R12Ab	✓	✓
22	R12B		✓
23	R12C		✓

Tablo 16. 'Devam' AP-PZR yöntemi ile genotipik olarak aynı yada benzer olan suşlar

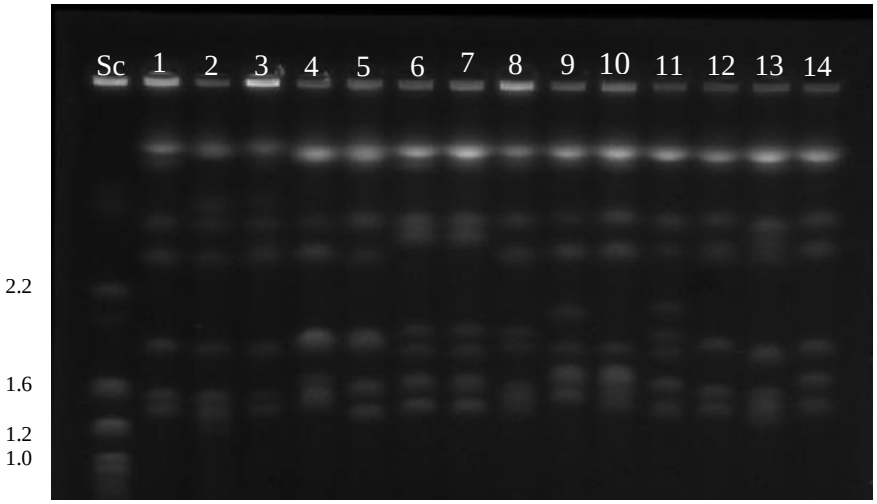
48	R26A		✓
50	R26B		✓
46	R25Aa	✓	✓
47	R25Ab	✓	✓
10	R5Aa	✓	✓
6	R5Ab	✓	✓
7	R5Ac	✓	✓
11	R5B		✓

Hastanemizde yatmış olan hastaların kan kültürlerinden izole edilen 50 *C. albicans* izolatı AP-PZR yöntemi ile 26 genotipe ayrılmıştır. Aynı genotipe sahip olan suşlar (benzerlik katsayısı %96-100 arası); 18=20 (genotip R8A), 39=8 (genotip R6A), 16=34 (genotip R10C), 35=45 (genotip R20A), 40=41 (genotip R16A), 1=3 (genotip R1A), 21=49 (genotip R12A), 46=47 (genotip R25A), 10=6=7 (genotip R5A) şeklindeydi. Benzer genotipe sahip olan suşlar (benzerlik katsayısı %90-95 arası); 18=20-19-12 (genotip R8), 39=8-31 (genotip R6), 42-44-16=34 (genotip R10), 40=41-29-28 (genotip R16), 15-2 (genotip R2), 14-9 (genotip R7), 27-5 (genotip R4), 21=49-22-23 (genotip R12), 48-50 (genotip R26), 10=6=7-11 (genotip R5) şeklindeydi.

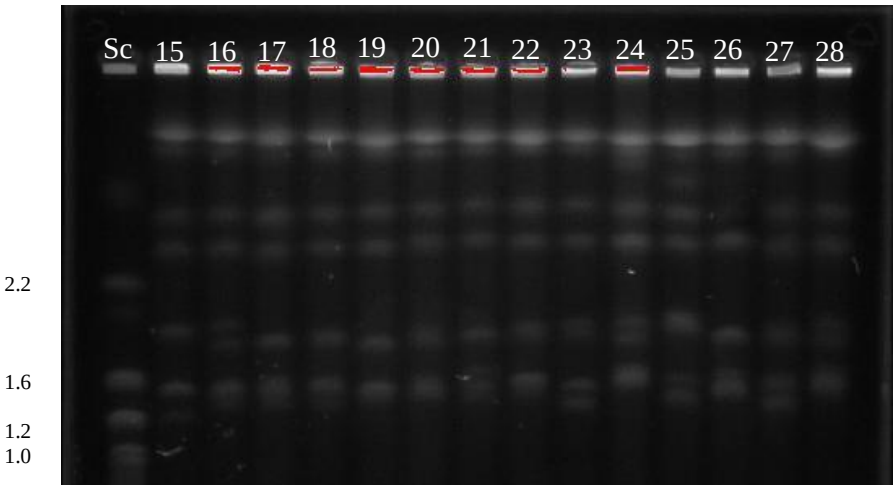
AP-PZR yönteminin ayırım gücü Hunter ve Gaston'un formülüne göre hesaplandığında DI=0.9673 olarak bulundu.

6. PFGE SONUÇLARI

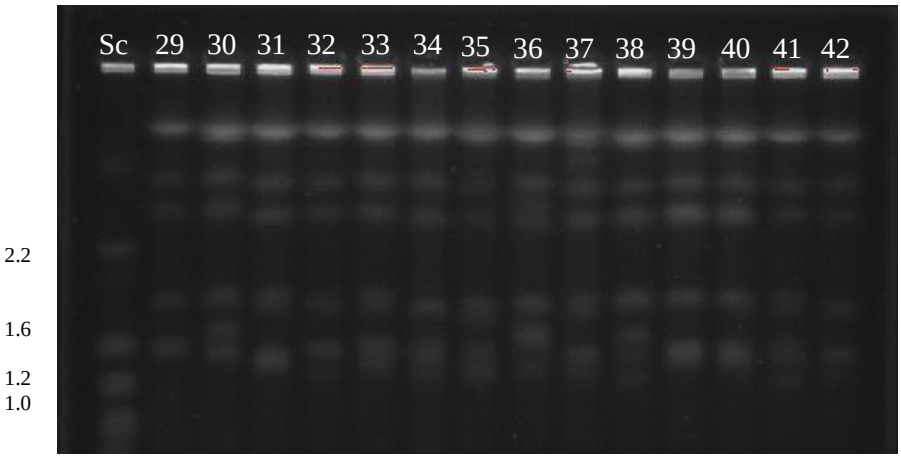
Elektroforez optimizasyonu için yapılan (volt, başlangıç ve bitiş zamanları, toplam süre ve agaroz konsantrasyonu gibi) farklı denemeler sonucunda en uygun şartlar belirlendi. Buna göre PFGE koşulları 4 V, 48 saat, 90-325 sn, %1 agaroz, 120°, 0.5X TBE buffer olarak uygulandı. Markır olarak *Saccharomyces cerevisiae* kullanıldı. Elektroforez sonrası jeller 0,5 µg/ml etidyum bromid içeren solüsyon ile 20 dakika boyandı ve görüntüleme cihazında incelendi. Tüm suşların PFGE görüntüleri Şekil 12, 13, 14 ve 15'de verilmektedir.



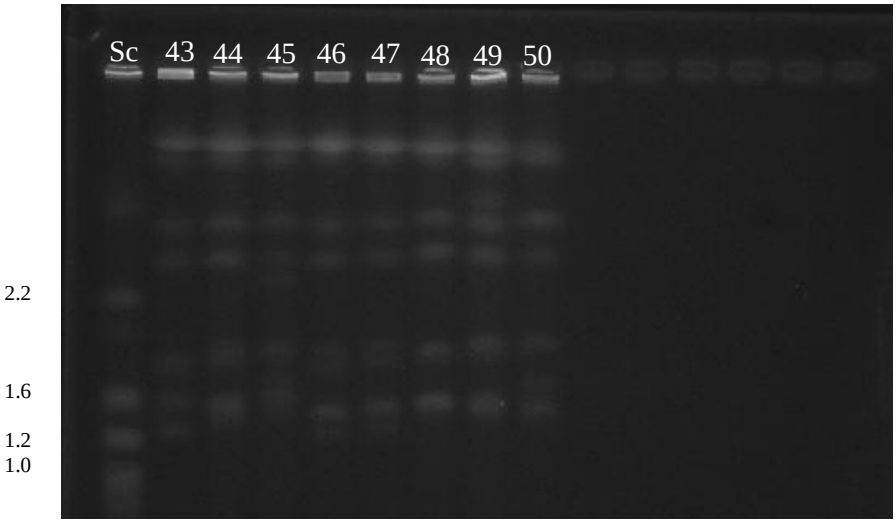
Şekil 12. 1-14 no'lu suşların PFGE jel görüntüsü (Sc: *Saccharomyces cerevisiae*)



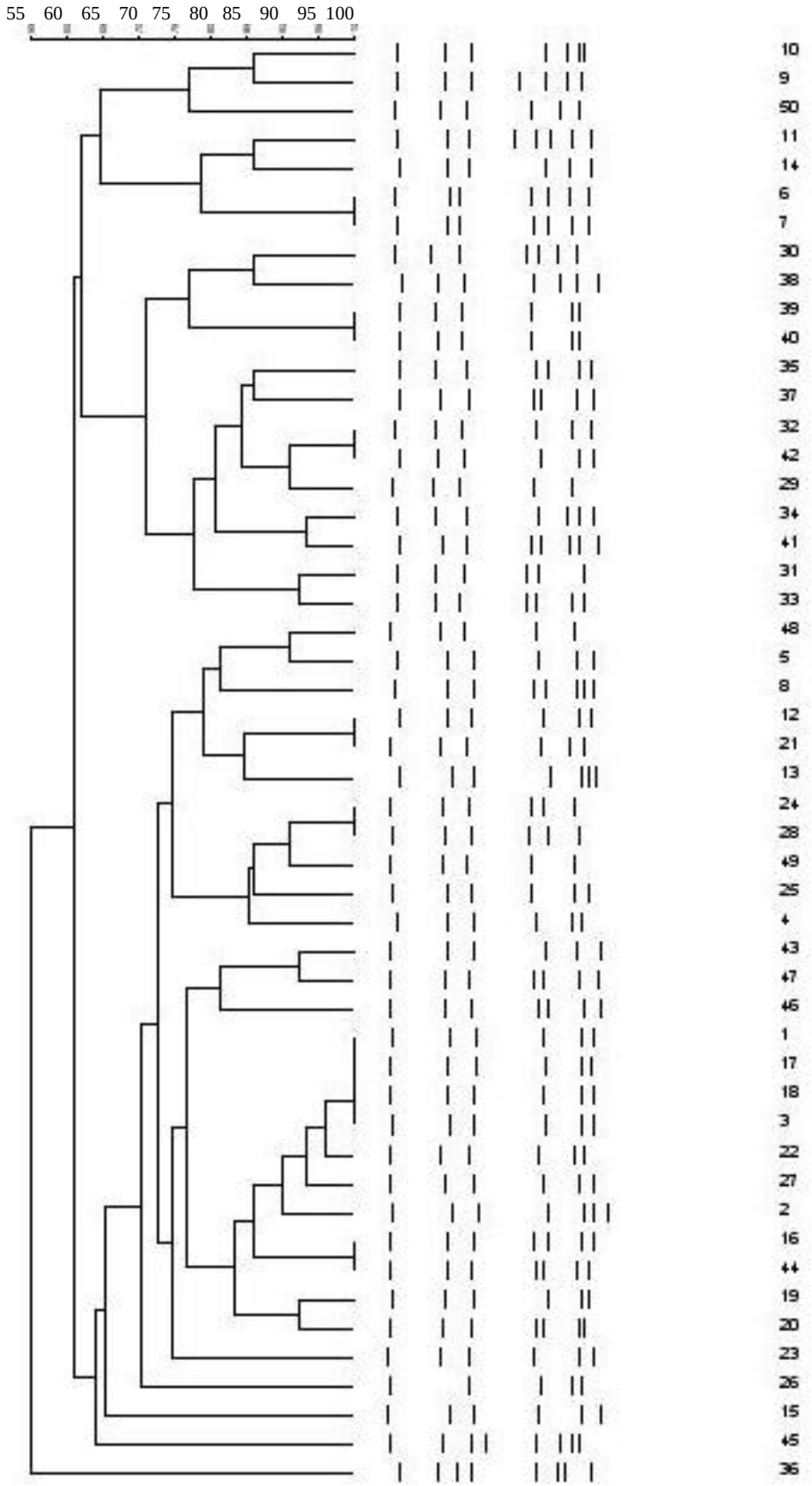
Şekil 13. 15-28 no'lu suşların PFGE jel görüntüsü (Sc: *Saccharomyces cerevisiae*)



Şekil 14. 29-42 no'lu suşların PFGE jel görüntüsü (Sc: *Saccharomyces cerevisiae*)



Şekil 15. 43-50 no'lu suşların PFGE jel görüntüsü (Sc: *Saccharomyces cerevisiae*)



Şekil 16. PFGE sonucu bant profillerinden elde edilen dendogram

Tablo 17. PFGE yöntemi ile genotipik olarak aynı bulunan suşlar

İzolat No	Genotip
6, 7	P5
39, 40	P33
32, 42	P26
12, 21	P10
24, 28	P19
1, 17, 18, 3	P1
16, 44	P14

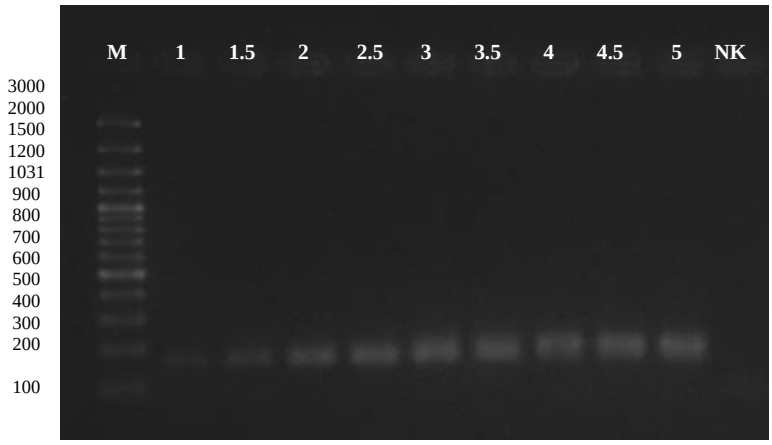
Hastanemizde yatmış olan hastaların kan kültürlerinden izole edilen 50 *C. albicans* izolatı PFGE-EK yöntemi ile 41 genotipe ayrılmıştır. Aynı genotipe sahip olan suşlar; 6=7 (genotip P5), 39=40 (genotip P33), 32=42 (genotip P26), 12=21 (genotip P10), 24=28 (genotip P19), 1=17=18=3 (genotip P1), 16=44 (genotip P14) şeklindeydi. PFGE-EK yönteminin ayırım gücü Hunter ve Gaston'un formülüne göre hesaplandığında DI=0,9902 olarak bulundu.

7. SAP4 PZR SONUÇLARI

7. 1. SAP4 PZR Optimizasyon Sonuçları

7. 1. 1. SAP4 PZR Magnezyum Klorür Optimizasyonu

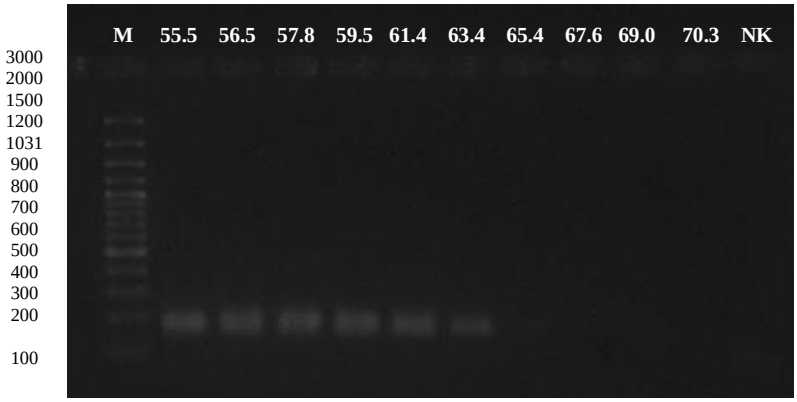
PZR amplifikasyonu için en ideal $MgCl_2$ miktarını tespit edebilmek amacıyla 1-5 µl konsantrasyon aralığı çalışıldı. En iyi bant profili veren 2 µl (2mM) $MgCl_2$ çalışmalarda kullanıldı. Şekil 17'de $MgCl_2$ miktarı optimizasyonu bant profilleri gösterilmiştir.



Şekil 17. SAP4 PZR magnezyum klorür optimizasyonu jel görüntüsü (M: Marker, NK: DNA içermeyen negatif kontrol) (Miktarlar mM olarak verilmiştir)

7. 1. 2. SAP4 PZR Primer Bağlanma Isısı Optimizasyonu

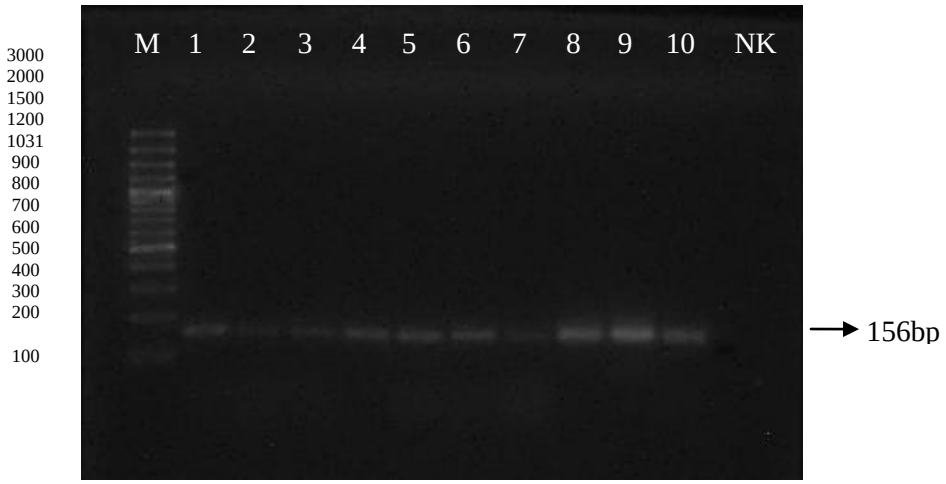
PZR amplifikasyonu için en ideal bağlanma ısı derecesini tespit edebilmek amacıyla, 55-70 ^{o}C arasındaki ısı değerleri denendi ve en uygun bağlanma ısısı 56 ^{o}C olarak belirlendi. Belirli sıcaklık aralıklarında oluşan bant profili görüntüleri Şekil 18'de gösterilmiştir.



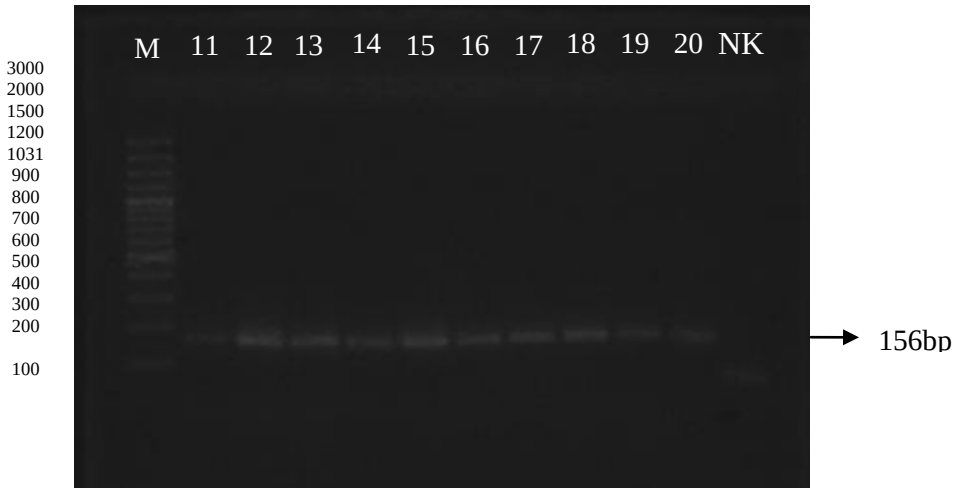
Şekil 18. SAP4 PZR primer bağlanma ısısı optimizasyonu jel görüntüsü (M: Marker, NK: DNA içermeyen negatif kontrol)

7. 2. İzolatların SAP4 PZR Sonuçları

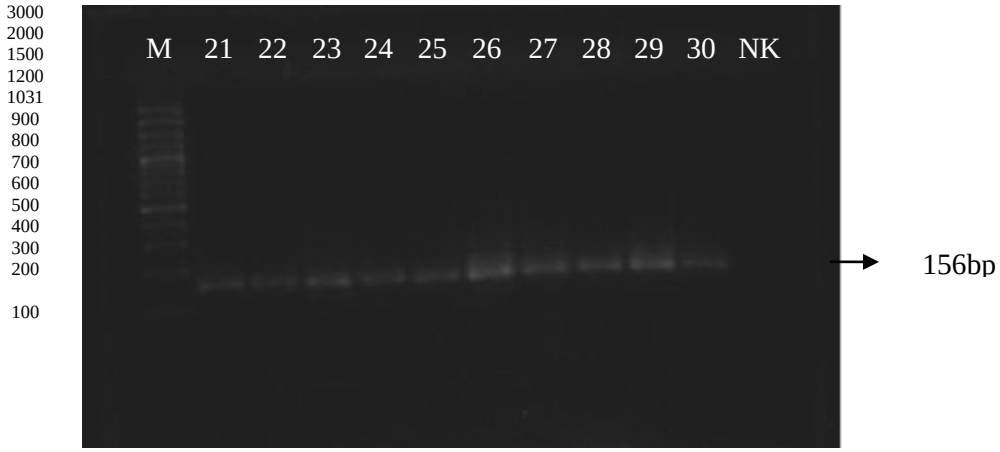
Magnezyum klorür ve primer bağlanma ısısının optimum değerleri belirlendikten sonra, 50 adet *C. albicans* suşunda PZR yöntemi ile SAP4 gen bölgesinin varlığı araştırıldı. Tüm suşlara ait SAP4 gen bölgesinin elektroforez sonuçları Şekil 19, 20, 21, 22 ve 23'de görülmektedir.



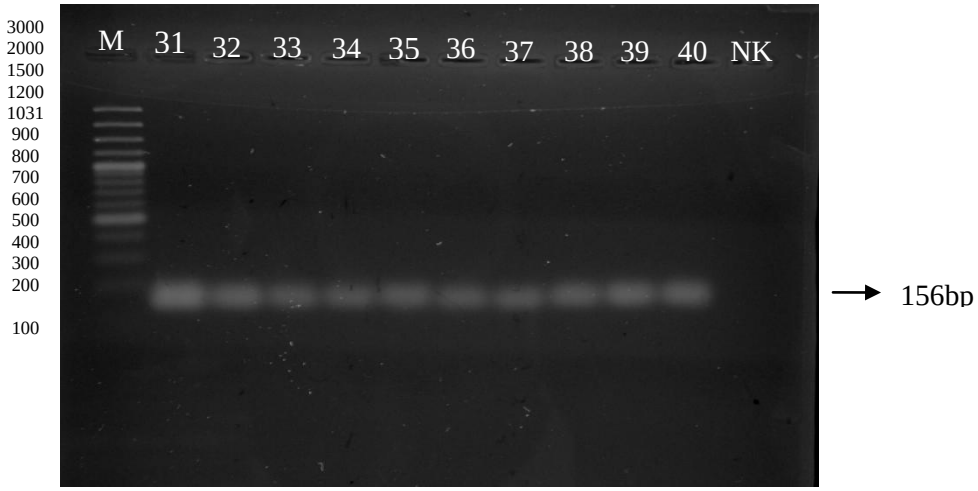
Şekil 19. 1-10 no'lu suşların SAP4 PZR jel görüntüsü



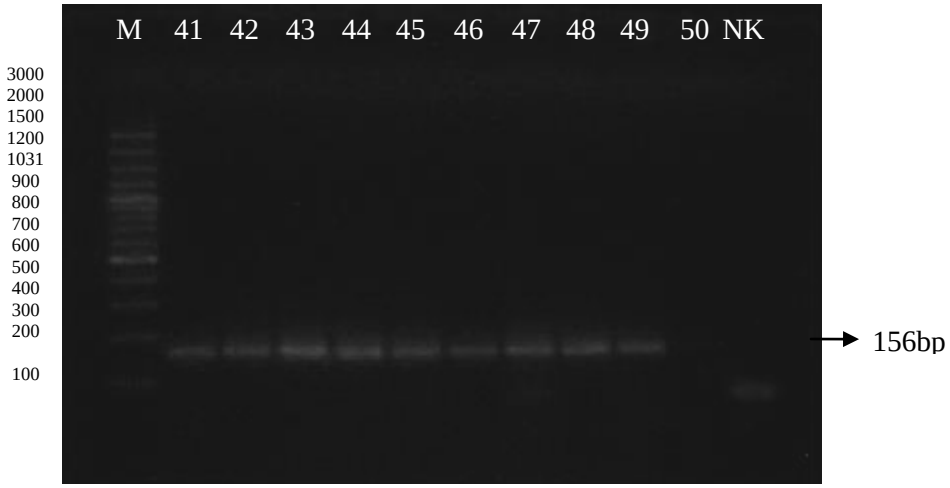
Şekil 20. 11-20 no'lu suşların SAP4 PZR jel görüntüsü



Şekil 21. 21-30 no'lu suşların SAP4 jel görüntüsü



Şekil 22. 31-40 no'lu suşların SAP4 jel görüntüsü



Şekil 23. 41-50 no'lu suşların SAP4 jel görüntüsü

Tablo 18. Servis, izolasyon tarihi, AP-PZR genotipi, PFGE genotipi ve SAP4 geni varlığının karşılaştırılması

Hasta No	Servis	İzolasyon Tarihi	AP-PZR	PFGE	SAP4
1	Göğ H	24.04.07	R1Aa	P1a	+
2	G Ped	02.05.07	R2B	P2	+
3	Bey C	10.05.07	R1Ab	P1b	+
4	Acil	02.08.07	R3	P3	+
5	P Enf	06.08.07	R4B	P4	+
6	Dah	10.08.07	R5Ab	P5a	+
7	Dah	15.08.07	R5Ac	P5b	+
8	KHD	20.08.07	R6Ab	P6	+
9	Bey C	24.08.07	R7B	P7	+
10	P Enf	27.08.07	R5Aa	P8	+
11	YD	27.08.07	R5B	P9	+
12	Bey C	10.09.07	R8C	P10a	+
13	Göğ H	17.09.07	R9	P11	+
14	ÇYB	17.09.07	R7A	P12	+
15	G Ped	05.10.07	R2A	P13	+
16	Kard	17.10.07	R10Ca	P14a	+
17	G Ped	25.10.07	R11	P1b	+
18	YD	30.10.07	R8Aa	P1c	+
19	Göğ H	14.11.07	R8B	P15	+
20	KBB	14.11.07	R8Ab	P16	+
21	GCS	16.11.07	R12Aa	P10b	+
22	G Ped	26.11.07	R12B	P17	+
23	Dah	03.12.07	R12C	P18	+
24	GCS	05.12.07	R13	P19a	+
25	KBB	17.12.07	R14	P20	+
26	Acil	19.12.07	R15	P21	+
27	Göğ H	24.12.07	R4A	P22	+

Tablo 18. 'Devam' Servis, izolasyon tarihi, AP-PZR genotipi, PFGE genotipi ve SAP4 geni varlığının karşılaştırılması

28	ÇYB	10.01.08	R16C	P19b	+
29	Enf	15.02.08	R16B	P23	+
30	Göğ H	11.03.08	R17	P24	+
31	Kard	14.04.08	R6B	P25	+
32	Göğ H	29.05.08	R18	P26a	+
33	Göğ H	04.06.08	R19	P27	+
34	YD	05.06.08	R10Cb	P28	+
35	Dah	09.06.08	R20Aa	P29	+
36	G Ped	14.07.08	R21	P30	+
37	Bey C	22.07.08	R22	P31	+
38	Dah	30.07.08	R23	P32	+
39	YD	31.07.08	R6Aa	P33a	+
40	Süt Ç	04.08.08	R16Aa	P33b	+
41	Kard	08.08.08	R16Ab	P34	+
42	Süt Ç	11.08.08	R10A	P26b	+
43	GCS	11.08.08	R24	P35	+
44	YD	11.08.08	R10B	P14b	+
45	Göğ H	22.08.08	R20Ab	P36	+
46	P Enf	22.08.08	R25Aa	P37	+
47	Bey C	26.08.08	R25Ab	P38	+
48	G Ped	29.08.08	R26A	P39	+
49	Dah	01.09.08	R12Ab	P40	+
50	Nöro	22.09.08	R26B	P41	-

TARTIŞMA

Candida türleri doğada yaygın olarak bulunan ve önemli enfeksiyonlara yol açabilen mikroorganizmalardır. Tıbbi önemi bulunan çok sayıda *Candida* türü bulunmakla beraber enfeksiyonlara en sık neden olan tür *C. albicans*'tır (Tümbay, 1999; Tünger ve ark., 2005; Tümbay, 2009). Dünyada ve ülkemizde yapılan değişik çalışmalarda gerek yoğun bakım ünitelerinde gerekse servislerde *C. albicans* oranları, *albicans* dışı *Candida* türlerine göre daha fazla olarak belirlenmiştir (Pappas ve ark., 2003; Pasqualotto ve ark., 2005; Yapar ve ark., 2005; Yücesoy ve ark., 2006).

Candida'lar çeşitli vücut bölgelerinde bulunabilen fırsatçı patojen mikroorganizmalardır ve birtakım nedenlerle bağışıklık savunması bozuk hastalarda yüksek mortalite oranı gösteren enfeksiyonlara neden olabilirler (Erbakan, 1989; Acar ve ark., 2008; Tümbay, 2009).

Candida'ya bağlı enfeksiyonların gelişimine yol açan hazırlayıcı faktörler; yoğun bakım ünitesinde yatış, malignite, cerrahi müdehale, üriner kateter, santral venöz kateter, mekanik ventilasyon total parenteral nütrisyon ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı şeklinde sıralanabilir (Pappas ve ark., 2003; Pasqualotto ve ark., 2005; Yapar ve ark., 2005).

Pappas ve arkadaşlarının Amerika Birleşik Devletlerinde yaptıkları çok merkezli bir çalışmada kandidemili hastaların epidemiyolojisi hakkında geniş kapsamlı veriler ortaya koymuşlardır. Bu çalışmada kadın ve erkek oranı sırasıyla %45, %55 şeklindeydi. Çalışmada araştırılan risk faktörlerinin bazılarının oranları; %90 antibiyotik tedavisi, %36 cerrahi girişim, %50 endotrakeal entübasyon, %12 hemodiyaliz, %95 kateter, %53 total parenteral nutrisyon, %60 sonda uygulaması şeklinde sıralanabilir (Pappas ve ark., 2003).

Bu konuda ülkemizde yapılan çalışmalardan Yapar ve arkadaşları 4 yıllık periyotta 104 kandidemili hastayı değerlendirmeye almışlardır. Çalışmada kadın ve erkek oranı sırasıyla %40.4, %59.6 şeklindeydi. Çalışmada araştırılan risk faktörlerinin bazılarının oranları; %76.9 antibiyotik tedavisi, %51.9 cerrahi girişim, %11.5 hemodiyaliz, %71.2 kateter, %55.8 total parenteral nutrisyon, %73.1 sonda ve %44.2 yoğun bakım uygulaması şeklindedir (Yapar ve ark., 2005).

Bizim çalışmamıza alınan hastaların 22'si (%44) kadın, 28'i (%56) erkektir. Bu hastalar *C. albicans* enfeksiyonu oluşumuna neden olabilecek risk faktörlerinin varlığı yönünden incelendiğinde; 41'inde (%82) antibiyotik tedavisi, 8'ine (%16) cerrahi girişim, 8'ine (%16) endotrakeal entübasyon, 5'ine (%10) hemodiyaliz, 22'sine (%44) kateter, 40'ına (%80) total parenteral nutrisyon, 25'ine (%50) sonda, 1'ine (%2) trakeostomi ve 19'una (%38) yoğun bakım, uygulaması yapıldığı belirlenmiştir. İnvazif kandidiyaz hastalara bakıldığında hemen hemen hepsinde bir veya daha fazla risk faktörünün olabileceği bilinmektedir (Akalın, 2008). Çalışmaya dahil ettiğimiz hastalardan yalnızca bir tanesinde hiçbir risk faktörüne rastlanmazken, diğer hastalarda ise en az bir ve en fazla yedi olmak üzere çeşitli risk faktörleri tespit edilmiştir.

Candida enfeksiyonu görülen hastaların hastaneye yatış nedenlerinin de değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur (Boo ve ark., 2005; Yapar ve ark., 2005; Acar ve ark., 2008). Acar ve arkadaşlarının yoğun bakım ünitelerinde saptanan *Candida* enfeksiyonlarının epidemiyolojik özelliklerinin araştırıldığı çalışmada, hastaların hastaneye yatış nedenlerini; %39.6'sı enfeksiyon, %14.6'sı malignite, %10.4 beyin damar hastalıkları, %8.3 kardiyovasküler hastalıklar, %10.4 enfeksiyon dışı akciğer hastalıkları, %8.3 renal hastalıklar ve %8.3 yanık olarak gruplandırmışlardır (Acar ve ark., 2008).

Çalışmaya dahil ettiğimiz hastaların hastaneye yatış nedenleri incelendiğinde; 7'si (%14) enfeksiyon, 16'sı (%32) malignite, 2'si (%4) beyin damar hastalıkları, 2'si (%4) kardiyovasküler hastalıklar, 2'si (%4) enfeksiyon dışı akciğer hastalıkları, 2'si (%4) renal hastalıklar, 2'si (%4) karaciğer hastalıkları, 2'si (%4) hematolojik hastalıklar, 3'ü (%6) travma, 5'i (%10) gastro intestinal sistem hastalıkları, 2'si (%4) konjenital malformasyon ve 5'i (%10) diğer hastalıklar, olarak gruplandırılmıştır. Hastaneye yatış nedenleri içinde malignite %32 ile ilk sırada yer alırken %14 ile enfeksiyon ikinci, %10 ile gastro intestinal sistem hastalıklar üçüncü sırada yer almıştır. Malignite diğer hastalıklardan istatistiki olarak anlamlı şekilde fazla bulundu. Bu durum bize immün sistemi baskıladığı bilinen malignitenin *C. albicans* enfeksiyonları açısından önemli bir risk faktörü olabileceğini göstermektedir.

Tüm nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonu etkenlerinin %8-10'unu oluşturan *Candida* türleri mortaliteyi ve hastanede kalış süresini önemli şekilde artırmaktadır. *C.*

albicans, klinik örneklerden en sık izole edilen mayadır ve kandidemilerin %50-70'inden sorumludur (Senger ve Arslan, 2009).

Mikoloji laboratuvarlarında moleküler yöntemlerin kullanılmasının esas amacı, patojen mantarın klinik örnekte kültürü yapılmadan önce saptanması ve/veya geleneksel yöntemlerle kültürde üretilmiş olan mantarın hızlı tanımlanmasıdır (Sarıbaş ve Arıkan, 2006).

Susever ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada; 50 klinik örnek, eş zamanlı olarak moleküler (PZR) ve konvansiyonel (direkt mikroskopi ve kültür) yöntemleriyle incelenerek değerlendirilmiştir. PZR yöntemi, mantarların ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, 5.8S rDNA ve 28S rDNA bölgelerinden seçilen genel ve türe özgü primerler kullanılarak uygulanmıştır. Çalışmada sonuç olarak, konvansiyonel yöntemler göz ardı edilmeksizin, invazif mantar enfeksiyonlarının tanısında duyarlılığı yüksek bulunan PZR temelli testlerin kullanılmasının uygun olacağı yorumu yapılmıştır (Susever ve Yeğenoğlu, 2011).

Bizim çalışmamızda, konvansiyonel yöntemlerle *C. albicans* olarak tanımlanan suşların PZR yöntemiyle doğrulanması için Miyakawa ve arkadaşlarının *C. albicans*'ın EO3 gen bölgesinden seçtikleri 125 bp'lık tür-spesifik bölgeyi çoğaltan primerler tercih edilmiştir (Miyakawa ve ark., 1993). Ekstraksiyon için Otlu'nun tanımlamış olduğu protokol kullanılırken, PZR karışımı modifiye edilerek çalışıldı (Otlu, 2004). Sonuç olarak hem fenotipik hem de genotipik yöntemlerle *C. albicans* olarak tanımlanan suşlar çalışmaya dahil edildi.

Candida ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının en sık etkeni olan *C. albicans* genellikle endojen patojen olarak düşünülse de ekzojen bulaş olabileceğide bildirilmektedir (Akalın, 2008; Senger ve Arslan, 2009). Enfeksiyon etkeni suşlar ister endojen ister ekzojen olsun kaynağının ve olası geçiş yollarının belirlenmesi, enfeksiyonla mücadelenin en önemli basamağını oluşturmaktadır. Bu nedenle etken suşların fenotipik ya da moleküler yöntemler kullanılarak tiplendirilmesi gerekmektedir (Ener, 1999; Köksal, 1999). Bununla birlikte genotipik yada moleküler tiplendirme metodları, fenotipik yöntemlerin yerini almıştır (Forbes ve ark., 2007).

Tiplendirmede kullanılacak moleküler yöntemler seçilirken; mümkün olduğunca geniş mikroorganizma grubuna uygulanabilir olması, yüksek ayrım gücü ve tekrarlanabilir özelliklere sahip olması, sonuçları kolayca yorumlanabilir olması, kolay

uygulanabilir olması, maliyetinin düşük olması, yer ve zaman bağımlılığı olmaksızın her çalışmada aynı sonuçları üretmesi, gibi özellikler dikkate alımalıdır (Köksal, 1999; Durmaz, 2001).

Günümüzde mikrobiyoloji laboratuarlarında en çok kullanılan moleküler tiplendirme metodları; PZR-RFLP, REP-PZR, RAPD, AFLP, dizi analizi, PFGE, southern hibridizasyon yöntemi ve ribotipleme (rDNA-RFLP) şeklinde sıralanabilir (Köksal, 1999; Durmaz, 2001).

DNA fingerprint için popüler bir metod olan, rasgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (random amplified polymorphic DNA) (RAPD) yöntemi düşük sıcaklıktaki ortamda genomik DNA'yı amplifiye etmek için tek, kısa, rasgele seçilmiş bir primer kullanılarak yapılır (Arı, 2004; Dolapçı, 2006; Mahlen, 2007). Primerler genel olarak 10 nükleotid uzunluğunda olacak şekilde dizayn edilir (Yağcı, 2001; Mahlen, 2007; Saraçlı, 2008; Akbaş, 2009). Çeşitli çalışmalarda *C. albicasn*'ların RAPD ile moleküler tiplendirilmesinde kullanılmış çok sayıda primer mevcuttur (Marol ve Yücesoy, 2007; Kuzucu ve ark. 2008; Saran ve ark., 2008; Bacelo ve ark., 2009; Gültekin ve ark., 2011; Yüksekkaya ve ark., 2011).

Saran ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada 109 *C. albicans* klinik izolatlatının RAPD yöntemiyle genotiplendirilmesinde kullanılan 10 farklı primerin ayırım gücü karşılaştırılmıştır. İzolatlar kullanılan primerlere göre 1-16 arasında bant oluşturmuşlar ve 41-80 arasında genotipe ayrılmışlardır. RAPD yönteminin ayırım gücü, tüm primerler için güvenilir değer olarak kabul edilen ≥ 0.90 (0.90-0.99 arasında) olarak bulunmuştur. Ancak yöntemin tekrarlanabilirliği zayıf olarak değerlendirilmiştir ve yöntemin, az sayıda izolatın değerlendirildiği küçük salgınları araştırmada daha uygun olacağı yorumunu yapmışlardır (Saran ve ark., 2008).

Kuzucu ve arkadaşları, medikal bir merkezin yenidoğan ve pediatrik yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı, antifungal duyarlılık ve klonal ilişkisini araştırmışlardır. Bir yıllık takip sonunda 15 *C. albicans* olmak üzere 28 *Candida* elde etmişler ve bu izolatların klonal yakınlıklarının tespitinde elektroforetik karyotipleme ve AP-PZR kullanmışlardır. AP-PZR'de kullandıkları M13 primer sayesinde her izolatın tiplendirilebilmesi için yeterli sayıda (>=10) bant elde etmişlerdir. Çalışmaya dahil ettikleri 15 *C. albicans* izolatından 11 genotip tanımlamışlardır (Kuzucu ve ark., 2008).

Bizim çalışmamızda birçok çalışmada kullanılan M13 primeri tercih edilmiştir (Berenguer ve ark., 1996; Guerra ve ark., 1997; Diez ve ark., 1997; Xu ve ark., 1999; Otlu, 2004; Kuzucu ve ark., 2008). M13 kullananarak yapılan AP-PZR'da, çalışmaya alınan izolatların 8-14 bantlık profiller oluşturduğu görülmüştür ve bunun genotiplendirme için yeterli olduğu düşünülmektedir.

Yüksekkaya ve arkadaşları hastanelerindeki yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole ettikleri *C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis* suşlarının, RAPD ile moleküler epidemiyolojik analizini yapmışlardır. Araştırıcılar çalışmada, *C. albicans* suşları arasında iki yaygın klon ve varyantları belirlemişlerdir. Bundan dolayı *C. albicans*'ın iki klondan ekzojen yayılım gösterdiği düşünülmekle birlikte diğer moleküler tiplendirme yöntemleri ile doğrulanması gerekliliğine de dikkat çekmişlerdir (Yüksekkaya ve ark., 2011).

Marol ve arkadaşları, yoğun bakım ünitelerindeki nozokomiyal *Candida* enfeksiyonlarının sıklığını ve genetik çeşitliliğini inceledikleri çalışmada 42'si *C. albicans* olmak üzere toplam 70 izolat dahil etmişlerdir. Suşları RAPD yöntemiyle OPE-03, OPE-18, RP4-2 ve AP50-1 primerleri kullanılarak tiplendirmişlerdir. 3 *C. albicans* izolatı dışında birçok suş farklı RAPD paterni sergilediği araştırmacılar tarafından görülmüştür. Bu sonuçlara göre hastanelerindeki yoğun bakım ünitesindeki *Candida* enfeksiyonlarının önemli bir kısmına endojen suşların neden olduğu sonucu çıkarmışlardır (Marolve Yücesoy, 2007).

Gültekin ve arkadaşları, beş senelik bir periyotta kan kültürlerinden izole edilen 17'si *C. albicans* olmak üzere 46 *Candida* izolatının klonal ilişkilerini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, RAPD'de kullandıkları 5 farklı primer ile farklı sonuçlar elde etmişler ve baskın bir patern ile karşılaşmamışlardır. Bu sonuç, *C. albicans*'ın daha ziyade endojen kaynaklı enfeksiyonlar oluşturma özelliği ile uyumlu olarak yorumlanmıştır (Gültekin ve ark., 2011).

Bizim çalışmamızda AP-PZR yönteminin ayırım gücü Hunter ve Gaston'un formülüne göre hesaplandığında DI=0.9673 olarak bulundu ve M13 primerinin epidemiyolojik çalışmalarda kullanmak için yeterli ayırım gücü sağladığı tespit edildi (Saran ve ark., 2008).

Çalışmamıza dahil ettiğimiz, hastanemize yatmış olan hastaların kan kültürlerinden izole edilen 50 *C. albicans* izolatı AP-PZR yöntemi ile 26 genotipe

ayrılmıştır. Bu genotipler içinde en büyük grubu oluşturan dörder mikroorganizma ile R8, R10, R16, R12, R5'dir. R8 genotipinin (18=20-19-12) birbirinden farklı servislerden izole edilmekle beraber kısmen birbirlerine yakın tarihler içinde izole edildikleri dikkati çekmektedir. R10 genotipini (42-44-16=34) oluşturan dört izolatın üçü pediatrik hastaların bulunduğu süt çocuğu ve yeni doğan servislerinden izole edilirken bir tanesi bunlarla hiçbir ilgisi bulunmayan kardiyoloji servisinden elde edilmiştir. R16 genotipindeki (40=41-29-28) izolatların ikisi pediatrik hastaların bulunduğu süt çocuğu ve çocuk yoğun bakım servislerindeki hastalardan, diğer ikisi enfeksiyon ve kardiyoloji servislerinde yatan hastalardan izole edilmiştir. R12 genotipi (21=49-22-23) izolatlarından iki tanesi dahiliye servisinde yatan hastalardan izole edilmiştir. R5 genotipini (10=6=7-11) oluşturan dört izolat birbirlerine yakın tarihler içinde izole edilmiş olup iki tanesi dahiliye servisinde yatan hastalardan, iki tanesi de pediatrik hastaların bulunduğu pediatri infeksiyon ve yeni doğan servislerinde yatan hastalardan izole edilmişlerdir.

Üç mikroorganizmalı tek grup ise R6 genotipi (39=8-31) olarak bulundu. Bu genotipi oluşturan mikroorganizmaların farklı servisler ve farklı zamanlarda yatan hastalardan izole edildiği tespit edildi.

İki mikroorganizmadan oluşan genotipler R20, R2, R7, R4, R1, R26 ve R25'di. Bu gruplar içinde R2 genotipi (15-2) genel pediyatri servisinde yatan hastalardan izole edilirken, R20 (35=45), R7 (14-9), R4 (27-5), R1 (1=3), R26 (48-50) ve R25 (46=47) genotiplerini oluşturan mikroorganizmaların izole edildikleri hastaların servislerinin birbirinden tamamen farklı olduğu belirlendi.

Bu durumda hastanemizin çeşitli servislerinde yatan hastaların kan örneklerinden izole edilen *C. albicans* izolatları, bazı küçük gruplar oluşturmakla birlikte yoğun bir kümelenme görülmemektedir. Bu durum bize, AP-PZR sonuçlarına göre, hastanemizdeki hematojen *C. albicans* enfeksiyonlarının genellikle endojen kaynaklı nadiren de ekzejen kaynaklı olabileceğini göstermektedir.

PFGE mikroorganizmaların genotiplendirilmesinde ayırım gücü yüksek olan ve geleneksel elektroforezle ayrılamayacak büyüklükteki kromozomları veya DNA parçalarını ayırabilen bir yöntemdir. Bu yöntemde agaroz plak içinde gerçekleştirilen ekstraksiyon sonunda DNA fragmentleri periyodik olarak değişen yönlerde elektrik

alanına tabi tutularak birbirlerinde ayrılmaları sağlanır (Durmaz ve Durmaz, 2001; Tümbay, 2009; Wu ve Della-Latta, 2010).

Çeşitli çalışmalarda *Candida* spp.'nin PFGE genotiplendirilmesinin, restriksiyon enzim kesimli veya elektroforetik karyotipleme şeklinde uygulanabileceği gösterilmektedir (Mata-Essayag ve ark., 1997; Chen ve ark., 2005; Shin ve ark., 2005; Wu ve Della-Latta, 2010).

Candida türlerinin kromozomal DNA'sının restriksiyon enzimleri ile belirli noktalardan kesilebilmesi için kullanılabilecek çeşitli enzimler bulunmakla birlikte *Bss*HII, *Not*I ve *Sfi*I çalışmalarda sık kullanılırlar (Mata-Essayag ve ark., 1997; Chen ve ark., 2005; Shin ve ark., 2005; Wu ve Della-Latta, 2010).

PFGE elektroforetik karyotipleme tekniği ile agaroz jelde kromozomal DNA'ların büyüklüklerine göre ayrışması sağlanır (Doi ve ark., 1992). Enzim kesimi olmadan yapılan elektroforetik karyotip analiz, epidemiyolojik araştırmalar için yeterli ayrıştırmayı sağlayabilmektedir (Wu ve Della-Latta, 2010).

PFGE'de jeldeki DNA'ların göçünü voltaj, switch aralığı, koşu süresi, jeldeki agaroz konsantrasyonu, koşu sıcaklığı, koşu bufferi ve değişen elektrik alanının açısı gibi birçok faktörün etkilediği bilinmektedir. Optimum koşulların bulunması için daha önce yapılmış çalışmalar mevcuttur (Doi ve ark., 1992; Hong ve Leung, 1998).

Biz çalışmamızda volt, toplam süre, başlangıç ve bitiş zamanları, agaroz konsantrasyonu gibi değişkenleri değiştirerek optimum değerleri bulmaya çalışılmıştır. Bizim sonuçlarımıza göre: voltaj; 4 V/cm, başlangıç ve bitiş zamanı; 90-325 saniye, toplam süre; 48 saat, agaroz konsantrasyonu %1 optimum değerler olarak tespit edilmiş ve en net bant görüntüsü ve ayırımı bu değerlerle sağlanmıştır.

Daha önce yapılmış çeşitli çalışmalarda elektroforetik karyotipleme ile *C. albicans* için 5-8 arası bant elde edildiği ortaya konmuştur (Mehta ve ark., 1999; Chen ve ark., 2004; Giammanco ve ark., 2005; Abdeljelil ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda da izolatlardan elektroforetik karyotipleme sonucu 5-8 bant elde edilmiştir. Oldukça değişken bir bant olarak görülebilen, rDNA genlerini içeren R kromozomu, değişik elektroforetik mobilite göstermekle beraber genellikle 1. kromozomla eşit veya daha hızlı (genellikle 1-2. kromozom arası), nadiren de 1. kromozomdan daha yavaş hareket eder. Diğer çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da R kromozomunun

oluşturduğu bant değerlendirme dışı bırakarak sonuçlar yorumlanmıştır (Wickes ve ark., 1991; Mata-Essayag ve ark., 1997; Chen ve ark., 2005; Saraçlı ve ark., 2005).

Hastalardan izole edilen tekrarlayan *C. albicans* izolatlarının kolonizasyon mu, reinfeksiyon mu veya reaktivasyon mu olduğunun bilinmesi enfeksiyonla mücadelede önemli bir basamaktır. Bunun için klonal seviyede sonuç verebilen tiplendirme yöntemlerine gereksinim vardır (Köksal, 1999). Saraçlı ve arkadaşları, *C. albicans* menenjiti ve pankreatik psödokist (PP) tanısı olan iki hastadan izole edilen üçer suşun genetik ilişkilerinin PFGE yöntemiyle araştırmışlardır. Araştırmacılar PP'li hastanın kan, abse ve drenaj sıvı kültürlerinden izole edilen üç *C. albicans* suşu aynı genotipi gösterirlerken, menenjiti olan hastanın nazofaringeal süründü, serebrospinal sıvı, ve dışkı kültürlerinden izole edilen suşları yakın ilişkili bulunmuşlardır. Buna göre, PFGE yöntemi bu iki invaziv kandida enfeksiyonlarında olduğu gibi etkenin muhtemel yayılım yolu hakkında değerli bilgi sağlayacağı sonucuna varmışlardır (Saraçlı ve ark., 2004).

Endojen veya ekzojen enfeksiyonların önlem yolları birbirinden oldukça farklıdır. Bu nedenle, invaziv *C. albicans* enfeksiyonlarını etkin olarak önleyebilmede ilk basamak, geçiş yollarının bilinmesidir (Ener, 1999).

Saraçlı ve arkadaşları, 2000-2003 yıllarını kapsayan dönemde nozokomiyal fungemi etkeni olarak izole edilmiş 42 *C. albicans* suşu PFGE tekniği ile genotiplendirmişlerdir. Sonuç olarak 31 farklı karyotip tespit etmişler ve izole edilen *C. albicans* suşlarının klonal yayılım göstermedikleri ve endojen kaynaklı olma olasılıklarının yüksek olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar ayrıca PFGE tekniğinin oldukça tekrarlanabilir sonuçlar üretmesine karşın, gereken durumlarda ayırım gücünü yükseltmek için ikinci bir yöntemle birlikte kullanılmasının faydalı olacağını vurgulamışlardır (Saraçlı ve ark., 2005).

Hamal ve arkadaşları yoğun bakım ünitesinde yatan 28 yetişkin hastanın çeşitli materyallerinden izole edilen 48 *C. albicans* ve 18 *C. glabrata* suşunun hastadan hastaya geçişini araştırmışlardır. Çalışmada 24 *C. albicans* ve 17 *C. glabrata* karyotipi tanımlanarak, bu yoğun bakım ünitesinde hastadan hastaya bulaşın *Candida* enfeksiyonu oluşumundaki rolünün az olduğu sonucunu çıkarmışlardır (Hamal ve ark., 2001).

C. albicans genellikle endojen patojen olduğu düşünülse de hastadan hastaya veya sağlık çalışanlarının elleriyle ekzojen bulaş olabileceği de çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Abdeljelil ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada yenidoğanlarda görülen sistemik *C. albicans* enfeksiyonlarının sağlık çalışanlarıyla (hemşireler) ilişkisini, elektroforetik karyotipleme ile ortaya koymayı amaçlamışlardır. Çalışmaya hastalardan ve hemşirelerden izole ettikleri 38 *C. albicans* suşunu dahil etmişlerdir. Sonuç olarak 38 izolatın 3 ana grupta toplandığını ve birinci grup içinde hem hastalardan hem de hemşirelerden izole edile izolatların bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu sayede nozokomiyal infeksiyonda hastane çalışnalarının önemine dikkati çekmişlerdir (Abdeljelil ve ark., 2008).

Bizim çalışmamızda PFGE-EK yönteminin ayırım gücü Hunter ve Gaston'un formülüne göre hesaplandığında DI=0.9902 olarak bulundu ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanmak için yeterli ayırım gücü sağlandığı görüldü (Saran ve ark., 2008).

Çalışmamıza dahil ettiğimiz, hastanemize yatmış olan hastaların kan kültürlerinden izole edilen 50 *C. albicans* izolatı PFGE-EK yöntemi ile 41 genotipe ayrılmıştır. Bu genotipler içinde en kalabalık olan dört mikroorganizma ile P1'dir. Genotip P1 (1=17=18=3)'i oluşturan dört izolat birbirinden farklı servislerden izole edilmekle beraber; 1 ile 3, 17 ile 18 nolu suşların birbirlerine yakın tarihler içinde izole edildikleri dikkati çekmektedir

İki mikroorganizmadan oluşan genotipler P5, P33, P26, P10, P19 ve P14 şeklindeydi. Genotip P5 (6=7) birbirlerine yakın zamanlarda dahiliye servisinde yatan hastalardan izole edilmişlerdir. Genotip P33 (39=40) pediatrik hastaların bulunabileceği yeni doğan ve süt çocuğu servislerinde yatan hastalardan yakın sayılabilecek aralıklarla izole edilmişlerdir. Genotip P26 (32=42), P10 (12=21), P19 (24=28), P14 (16=44) gruplarını oluşturan mikroorganizmaların izole edildikleri hastaların servislerinin birbirinden tamamen farklı olduğu görüldü.

Çalışmamızın karyotipleme sonuçlarına göre; hastanemizin çeşitli servislerinde yatan hastaların kan örneklerinden izole edilen *C. albicans* izolatları az sayıda küçük gruplar oluşturmakta ve yoğun bir kümelenme göstermemektedir. Buda, PFGE sonuçlarına göre, hastanemizden çalışmaya dahil ettiğimiz hastalardaki *C. albicans*

enfeksiyonlarının genellikle endojen kaynaklı nadiren de ekzejen kaynaklı olabileceğini göstermektedir.

Çalışmada kullandığımız her iki epidemiyolojik tiplendirme yöntemide, çalışmaya dahil ettiğimiz izolatlarda çok sayıda mikroorganizmanın bulunduğu baskın epidemiyolojik gruplar saptanamamıştır. Her iki yöntem de 6, 7; 1, 3; 16, 44 numaralı izolatları aynı genotip içinde gösterirken, diğer suşlar yöntemler karşılaştırıldığında farklı genotipler içinde yer almışlardır.

Candida türleri genellikle kişilerin normal mikrofloralarında kommensal bir organizma olarak bulunur. Bununla birlikte, eğer normal floranın dengesi bozulur veya immün süpresyon gelişirse *Candida* türleri sıklıkla patojen hale geçerler. Kommensalden patojene bu dönüşüm özellikle geniş virülans faktörlerine sahip olan *C. albicans*'ın potansiyel patojenitesine dikkatleri çekmektedir (Naglik ve ark., 2003; Abacı ve Haliki, 2004). Salgısal aspartik proteazlar *C. albicans*'da, konak direnç mekanizmalarından kaçınma ve adhezyon, invazyon, sırasında konak bariyerlerinin degradasyonunu sağlayan önemli bir virülans faktörünü oluşturur. Ayrıca fagositik saldırıya direnç geliştirerek *C. albicans*'ın virülansını artırdığı da bilinmektedir (Abacı ve Haliki, 2004).

10 SAP geninden oluşan bir gen ailesi tarafından kodlanan salgısal aspartik proteazlardan, SAP4-6 genlerinin sistemik enfeksiyonlarda etki gösterir (Abacı ve Haliki, 2004; Kalkancı ve ark., 2005; Lian ve Liu, 2007). Kalkancı ve arkadaşları farklı *C. albicans* izolatlarında SAP dağılımını araştırmışlardır. Çalışmada kan kültüründen izole edilen suşlarda SAP4 40 izolatın 38'inde (%95) bulunurken vajinal kültürlerden izole edilen suşlarda 40 izolatın 3'ünde (%7.5) tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar SAP4'ün sistemik enfeksiyonlarla ilişkili olduğu yorumunu yapmışlardır (Kalkancı ve ark., 2005).

Bizim çalışmamıza dahil ettiğimiz kan kültüründen izole edilen 50 *C. albicans* izolatının 49'unda (%98) SAP4 gen bölgesinin bulunduğu tespit edilmiştir. İzolatlar içinde SAP4 gen bölgesi tespit edilemeyen 50 numaralı suş RAPD ile tiplendirildiğinde R26 genotipine dahil edilmiş ve 48 nolu izolatla %94.7'lik ilişki ile benzer suş olarak tanımlanmıştır. PFGE ile genotip P41 dahil edilen 50 numaralı izolatın diğer hiçbir izolatla aynı genotipte olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak; hastanemizin çeşitli servislerinde yatmakta olan hastaların kan kültürlerinden izole edilen *C. albicans* izolatlarının genel olarak endojen kaynaklı olduğu, nadiren ekzojen bulaş görülebileceği yapılan her iki moleküler tiplendirme yönteminde de görülmüştür. Bu bağlamda, hastanemizde görülen hematojen *C. albicans* enfeksiyonlarının en aza indirilebilmesi için çevresel önlemler göz ardı edilmeden hastanın kendi şartlarından kaynaklanan, enfeksiyon oluşumuna neden olabilecek faktörlerin giderilmeye çalışılması gerekmektedir.

SAP4 geninin, biri hariç tüm izolatlarımızda tespit edilmesi bu gen bölgesinin patojenitedeki önemine dikkat çekmektedir. Özellikle gastro intestinal sistemin normal florasında kommensal bulunan *C. albicans*'ın endojen kaynaklı enfeksiyonlarında, SAP4 geninin fonksiyonu ile ilgili olarak daha detaylı çalışmalar, ileriki dönemlerde bu enfeksiyonların önlenmesine katkı sağlayabilecektir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Yaş gruplarına yapılan istatistiki analizde 0-9 yaş grubu diğerlerine göre daha riskli bulunmuştur. Bu grup içinde bulunan 18 hastanın 14 tanesinin <=2 olması, özellikle 2 yaş altının önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir.
2. Malignite diğer altta yatan hastalıklara göre ön plana çıkmaktadır ve diğer yatış nedenlerine göre istatistiki olarak anlamlı olduğu görülmektedir.
3. *C. albicans*'ın identifikasyonunda fenotipik yöntemler önemini korumakla beraber genotipik yöntemlere ihtiyaç duyulduğunda uygulayabilme kabiliyetine sahip olunması gerekmektedir.
4. Çalışmamızın moleküler tiplendirme bölümünde kullandığımız her iki yönteminde yeterli ayırım göcüne sahip olduğu görülmüştür. Bununla birlikte epidemiyolojik çalışmalarda en az iki yöntemin kullanılmasının sonuçların doğru yorumlanabilmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir.
5. 50 *C. albicans* izolatı AP-PZR yöntemi ile 26 genotipe ayrılmıştır. Aynı genotipli küçük gruplar tespit edilmekle beraber, çok sayıda suş içeren baskın guruplar tespit edilememiştir.
6. 50 *C. albicans* izolatı PFGE-EK yöntemi ile 41 genotipe ayrılmıştır. AP-PZR yönteminde olduğu gibi çok sayıda suş içeren baskın guruplar tespit edilememiştir.
7. AP-PZR ve PFGE sonuçlarına göre hastanemizde kandaki *C. albicans* enfeksiyonlarının az bir kısmının ekzojen kaynaklı olduğu, önemli bir kısmının endojen kaynaklı olduğu düşünülmektedir.
8. Hastanemizde sistemik enfeksiyonlara neden olan *C. albicans*'larda SAP4 gen bölgesi büyük oranda (%98) bulunmaktadır.
9. Özellikle hastanemizde nozokomiyal enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların virülans faktörleri, hastanemizdeki yayılımları ve geçiş yollarının bilinmesi enfeksiyonların önlenmesinde en önemli basamakları teşkil etmektedir.

KAYNAKLAR

Abacı Ö, Haliki A. *Candida albicans*'ın virulans faktörleri. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi. 2004;2:1-8.

Abdeljelil JB, Saida NB, Saghrauni F, Fathallah A, Boukadida J, Sboui H, Said MB. Systemic neonatal candidosis: the karyotyping of *Candida albicans* strains isolated from neonates and health-workers. Mycoses. 2008;53:72-77.

Acar A, Öncül O, Küçükardalı Y, Özyurt M, Haznedaroğlu T, Çavuşlu Ş. Yoğun bakım ünitelerinde saptanan *Candida* enfeksiyonlarının epidemiyolojik özellikleri ve mortaliteye etki eden risk faktörleri. Mikrobiyol Bul. 2008;42:451-461.

Akalın H. Nozokomiyal Fungal Enfeksiyonlar. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Editörler, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 3. Baskı, İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri. 2008; 616-624.

Akbaş E. Mikroorganizmaların Epidemiyolojik Analizi İçin Laboratuvar Yöntemleri. Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldıran ŞT, Tanyüksel M. Editörler, Klinik Mikrobiyoloji (çeviri)'de, 9. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık. 2009; 129-151.

Arı Ş. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. Temizkan G, Arda N. Editörler, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, 2. baskı, İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri. 2004; 101-120.

Arıkan S. Antifungal Ajanlar. Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldıran ŞT, Tanyüksel M. Editörler, Klinik Mikrobiyoloji (çeviri)'de, 9. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık. 2009; 1949-1960.

Arıkan S. Mantar Enfeksiyonlarında Tanı Yöntemleri. Günalp A, Yılmaz YA, Pınar A. Editörler, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı, Hacettepe Üniversitesi Yayınları. 2003; 140-164.

Bacelo KL, Costa KRC, Ferreira JC, Candido RC. Biotype stability of *Candida albicans* isolates after culture storage determined by randomly amplified polymorphic DNA and phenotypical methods. Mycoses. 2009;53:468–474.

Beşirbellioğlu B. Enfeksiyon Kontrol Epidemiyolojisi ve Klinik Mikrobiyoloji. Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldıran ŞT, Tanyüksel M. Editörler, Klinik Mikrobiyoloji (çeviri)'de, 9. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık. 2009; 118- 128.

Berenguer J, Guerra TMD, Diez BR, Carlos J, Quiros BD, Tudela JLR, Suarez JVM. Genetic dissimilarity of two fluconazole-resistant Candida albicans strains causing meningitis and oral candidiasis in the same AIDS patient. J Clin Microbiol. 1996;34:1542-1545.

Boo TW, O'Reilly B, O'Leary J, Cryan B. Candidaemia in an Irish tertiary referral hospital: epidemiology and prognostic factors. Mycoses. 2005;48:251-259.

Bouza E, Munoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. Int J Antimicrob Agents. 2008;32:87-91.

Chen KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. J Med Microbiol. 2005;54:249-258.

Costa CR, Jesuino RSA, Lemos JA, Fernandes OFL, Souza LKH, Passos XS, Silva MRR. Effects of Antifungal Agents in Sap Activity of *Candida albicans* Isolates. Mycopathologia. 2009;169:91-98.

Çerikçioğlu N. Candida Türleri. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Editörler, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 3. Baskı, İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri. 2008; 2411-2426.

Çerikçioğlu N. Mantar infeksiyonlarında seroloji ve deri testleri. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaşelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Editörler, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara; Güneş Kitabevi. 1999; 1145-1153.

Diez BR, Martinez V, Alvarez MA, Tudela JLR, Suarez JVM. Molecular tracking of *Candida albicans* in a neonatal intensive care unit: long-term colonization versus catheter-related infections. J Clin Microbiol. 1997;35:3032-3036.

Doi M, Homma M, Chindamporn A, Tanak K. Estimation of chromosome number and size by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida* species. J Gen Microbiol. 1992;138:2243-2251.

Dolapçı İ. In Vitro Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri. Tekeli A, Ustaçelebi Ş. Editörler, Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar (çeviri)'de, Ankara; Palme Yayıncılık. 2006; 43-69.

Durmaz B, Durmaz R. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Durmaz R. Editör, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2. baskı, Ankara; Nobel Tıp Kitabevleri. 2001; 161-168.

Durmaz R, Ayan M. Acinetobacter baumannii izolatlarının moleküler epidemiyolojisinde "Arbitrarily Primed" PZR ve "Pulsed-Field Gel" elektroforezi. Durmaz R. Editör, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2. baskı, Ankara; Nobel Tıp Kitabevleri. 2001; 219-228.

Durmaz R. Moleküler Epidemiyolojinin Prensipleri. Durmaz R. Editör, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2. baskı, Ankara; Nobel Tıp Kitabevleri. 2001; 139-147.

Durmaz R. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Tipleri. Durmaz R. Editör, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2. baskı, Ankara; Nobel Tıp Kitabevleri. 2001; 35-43.

Ener B. Hastane infeksiyonu etkeni olarak mantarlar. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaşelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Editörler, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara; Güneş Kitabevi. 1999; 1123-1128.

Erbakan N. Derinin Mantar Hastalıkları. 1. baskı, Ankara, Türkiye klinikleri yayınevi. 1989; 173-216.

Erdem B. Hastane infeksiyonlarına yol açan bakteriler. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaşelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Editörler, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara; Güneş Kitabevi. 1999; 733-738.

Espinel-Ingroff A, Vazquez JA, Boikov D, Pfaller MA. Evaluation of DNA-based typing procedures for strain categorization of *Candida* spp. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999;33:231-239.

Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12 Ed., Missouri, Mosby Elsevier. 2007; 629-716.

Fothergill AW. Medically Significant Fungi. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G, editors. Textbook of Diagnostic Microbiology. 3 st Ed., Missouri, Elsevier. 2007; 718-759.

Giammanco GM, Lopes MM, Coimbra RS, Pignato S, Grimont PAD, Grimont F, Freitas G, Giammanco G. Value of morphotyping for the characterization of *Candida albicans* clinical isolates. Mem Ints Oswaldo Cruz. 2005;100:483-490.

Guerra TMD, Suarez JVM, Laguna F, Tudela JLR. Comparison of four molecular typing methods for evaluating genetic diversity among *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive patients with oral candidiasis. J Clin Microbiol. 1997;35:856-861.

Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y, Kırdar S, Aydın N. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarında antifungal duyarlılığın ve bazı virülans faktörlerinin araştırılması ve RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2011;45:306-317.

Hamal P, Kappe R, Rimek D. Rate of transmission and endogenous origin of *Candida albicans* and *Candida glabrata* on adult intensive care units studied by pulsed field gel electrophoresis. J Hosp Infect. 2001;49:37–42.

Hong E, Leung P. Optimisation of *Candida albicans* typing by pulsed-field gel electrophoresis. Br J Biomed Sci. 1998;55:231-237.

Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol. 1988;26:2465-2466.

Iwaguchi S, Homma M, Tanaka K. Variation in the electrophoretic karyotype analysed by the assignment of DNA probes in *Candida albicans*. J Gen Microbiol. 1990;136:2433-2442.

Iwen PC. Mycotic Diseases. In: McPherson RA, Pincus MR, editors. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 21st Ed., Philadelphia, Elsevier. 2007 1087-1118.

Kalkancı A, Bozdayı G, Biri A, Kuştimur S. Distributionof secreted aspartyl proteinases using a polymerase chain reaction assay with SAP specific primers in *Candida albicans* isolates. Folia Microbiol. 2005;50:409-413.

Kılıç A. Mikroorganizmaların Moleküler Yöntemlerle Tespit Edilmesi ve Tanımlanması. Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldıran ŞT, Tanyüksel M. Editörler, Klinik Mikrobiyoloji (çeviri)'de, 9. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık. 2009; 1762-1788.

Köksal F. Moleküler biyolojik tiplendirme yöntemlerinin hastane infeksiyonlarında kullanımı. Hastane İnfeksiyonları Dergisi. 1999;3:189-195.

Köksal F. Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. Durmaz R. Editör, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2. baskı, Ankara; Nobel Tıp Kitabevleri. 2001; 15-34.

Kuzucu Ç, Durmaz R, Otlu B, Aktas E, Gulcan H, Cizmeci Z. Species distribution, antifungal susceptibility and clonal relatedness of *Candida* isolates from patients in neonatal and pediatric intensive care units at a medical center in Turkey. New Microbiol. 2008;31:401-408.

Lian CH, Liu WD. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase in human vulvovaginal candidiasis. Mycoses. 2007;50:383-390.

Mahlen SD. Applications of Molecular Diagnostics. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G, editors. Textbook of Diagnostic Microbiology. 3 st Ed., Missouri, Elsevier. 2007; 272-301.

Marol S, Yücesoy M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. Mycoses. 2007;51:40–49.

Mata-Essayag S, Burnie JP, Bailey G, Mandal B. Genotyping fuluconazole resistant *Candida albicans* from human immunodeficiency virus positive patients. Opportunistic Pathogens. 1997;9:27-37.

Mehta SK, Stevens DA, Mishra SK, Feroze F, Pierson DL. Distribution of *Candida albicans* genotypes among family members. Mycology. 1999;34:19-25.

Metin DY. Antifungal İlaçlar. Başustaoğlu AC, Yıldıran ŞT, Tanyüksel M, Yapar M. Editörler, Tıbbi Mikrobiyoloji (çeviri)'de, 6. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık. 2010; 701-713.

Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A One-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. Jpn. J. Med. Mycol. 2006;47:225-229.

Miyakawa Y, Mabuchi T, Fukazawa Y. New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1993;31:3344-3347.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev. 2003;67:400-428.

Otlu B. Enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Candida albicans* suşları ile koloniz asuşlar arasındaki genotipik farklılıkların pulsed field gel electrophoresis ve arbitrarily primed PCR yöntemiyle araştırılması.Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Doktora Tezi, 2004; 5-84.

Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, Kauffman CA, Hyslop N, Mangino JE, Chapman S, Horowitz HW, Edwards JE, Dismukes WE. A Prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. Clin Infect Dis. 2003;37:634–643.

Pasqualotto AC, Nedel WL, Machado TS, Severo LC. A 9-year study comparing risk factors and the outcome of paediatrics and adults with nosocomial candidaemia. Mycopathologia. 2005;160:111–116.

Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR. Microbiology Concepts and Applications. Mc Graw Hill, Copyrigh. 1993; 590-613.

Saraçlı MA, Yıldıran ST, Gönlüm A, Doğancı L. Nozokomiyal fungemili hastalardan izole edilen *Candida albicans* suşlarının "Pulsed-Field" jel elektroforezi ile genotiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2005;39:191-198.

Saraçlı MA, Yıldıran ŞT, Yağcı G, Özdağ F, Doğancı L. İnvaziv iki kandidoz olgusunun karyotipik olarak incelenmesi. Mikrobiyol Bul. 2004;38: 449-453.

Saraçlı MA. Hastane Salgınları ve Moleküler Yöntemler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Editörler, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 3. Baskı, İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri. 2008; 557-564.

Saraçlı MA. Mantar Hastalıklarının Patogenezi. Başustaoğlu AC, Yıldıran ŞT, Tanyüksel M, Yapar M. Editörler, Tıbbi Mikrobiyoloji (çeviri)'de, 6. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık. 2010; 679-688.

Saran B, Karahan ZC, Ağırbaşlı H, Tekeli A, Aksoy AM. *Candida albicans* klinik izolatlarının "Randomly Amplified Polymorphic DNA" yöntemiyle genotiplendirmesinde kullanılan farklı primerlerin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul. 2008;42:645-654.

Sarıbaş Z, Arıkan S. Patojen Mantarların Moleküler Yöntemlerle Saptanması ve Tanımlanması. Tekeli A, Ustaçelebi Ş. Editörler, Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar (çeviri)'de, Ankara; Palme Yayıncılık. 2006; 551-559.

Sarıkaya AT. DNA'nın İzolasyonu ve Analizi. Temizkan G, Arda N. Editörler, Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, 2. baskı, İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri. 2004; 55-80.

Senger SS, Arslan H. Dirençli Kandida İnfeksiyonları. Arman D, Ünal S. Editörler, Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar, Ankara; Bilimsel Tıp Yayınevi. 2009; 357-369.

Shin JH, Og YG, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Molecular epidemiological analysis of bloodstream isolates of *Candida albicans* from a üniversity hospital over a five-year period. J Microbiol. 2005;43:546-554.

Shin JH, Park MR, Song JW, Shin DH, Jung SI, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Microevolution of *Candida albicans* strains during catheter-related candidemia. J Clin Microbiol. 2004;42:4025–4031.

Susever S, Yeğenoğlu Y. İnvazif mantar enfeksiyonlarının tanımlanmasında moleküler yöntemlerin öneminin konvansiyonel yöntemler ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2011;45:325-335.

Şardan YÇ. Hastane Enfeksiyonları: Tanımlar, Sürveyans, Epidemilere Yaklaşım. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Editörler, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, 3. Baskı, İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri. 2008; 545-557.

Taylor DL, Manuselis G. The Laboratory Role in Infection Control. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G, editors. Textbook of Diagnostic Microbiology. 3 st Ed., Missouri, Elsevier. 2007; 58-71.

Tekeli A. PCR Amplifikasyon Temelli Mikrobiyal Tiplendirme. Tekeli A, Ustaçelebi Ş. Editörler, Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar (çeviri)'de, Ankara; Palme Yayıncılık. 2006; 197-221.

Tekeli A. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Tekeli A, Ustaçelebi Ş. Editörler, Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar (çeviri)'de, Ankara; Palme Yayıncılık. 2006; 185-196.

Tümbay E. *Candida* türleri. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaşelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Editörler, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara; Güneş Kitabevi. 1999; 1081-1086.

Tümbay E. *Candida*, *Cryptococcus* ve Tıbbi Önemi Olan Diğer Mantarlar. Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldıran ŞT, Tanyüksel M. Editörler, Klinik Mikrobiyoloji (çeviri)'de, 9. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık. 2009; 1762-1788.

Tümbay E. Fırsatçı Mikozlar. Başustaoğlu AC, Yıldıran ŞT, Tanyüksel M, Yapar M. Editörler, Tıbbi Mikrobiyoloji (çeviri)'de, 6. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık. 2010; 751-774.

Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Asya Mikrobiyoloji. 1. baskı, İzmir, Asya Tıp Kitabevi. 2005; 458-465.

Uzun M. *Candida albicans*. Ağaçfidan A, Badur S, Türkoğlu S. Editörler, İnfeksiyon Hastalıklarının Laboratuar Tanısında Moleküler Yöntemler, İstanbul; Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti. 2002; 182-184.

Viudes A, Peman J, Canton E, Ubeda P, Lopez-Ribot JL., Gobernado M. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002;21:767-774.

Wickes B, Staudinger J, Magee BB, Chung KJK, Magee PT, Scherer S. Physical and genetic mapping of *Candida albicans*: several genes previously assigned to chromosome 1 map to chromosome R, the rDNA-containing linkage group. Infect Immun. 1991;59:2480-2484.

Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6 Ed., Washington, Lippincott Williams & Wilkins. 2006; 133-165.

Wu F, Della-Latta P. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In: Tang Y, Stratton CW, editors. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. Springer. 2010; 43-157.

Yağcı A. Restriction Fragment Length Polymorphism ve Polimeraz Zincir Reaksiyon Bazlı Tipleme Yöntemleri. Durmaz R. Editör, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2. baskı, Ankara; Nobel Tıp Kitabevleri. 2001; 149-160.

Yapar N, Uysal U, Yucesoy M, Cakir N, Yuce A. Nosocomial bloodstream infections associated with *Candida* species in a Turkish University hospital. Mycoses. 2005;49:134-138.

Yıldıran ŞT. Fungal hastane infeksiyonları: Tanı. Hastane İnfeksiyonları Dergisi. 2004;8:168-171.

Yıldıran ŞT. Mantar Hastalıklarının Laboratuvar Tanısı. Başustaoğlu AC, Yıldıran ŞT, Tanyüksel M, Yapar M. Editörler, Tıbbi Mikrobiyoloji (çeviri)'de, 6. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık. 2010; 689-699.

Yıldıran ŞT. Mantar infeksiyonlarında laboratuar tanı. Mutlu G, İmir T, Cengiz AT, Ustaşelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Editörler, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara; Güneş Kitabevi. 1999; 1129-1144.

Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida*'ların patojenlik belirtgenleri. Cerrahpaşa Tıp Dergisi. 2000;31:172-186.

Yücesoy M, Yiş R, Ergon MC. Hastanemiz yoğun bakımları ile diğer szervislerinde yatan hastalardan izole edilen maya türlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul. 2006;40:141-143.

Yüksekkaya Ş, Fındık D, Arslan U. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların idrarlarından izole edilen *Candida* türlerinin moleküler epidemiyolojisi ve antifungal duyarlılıkları. Mikrobiyol Bul. 2011;45:137-149.

Xu J, Boyd CM, Livingston E, Meyer W, Madden JF, Mitchell TG. Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. J Clin Microbiol. 1999;37:3835-3843.

ÖZGEÇMİŞ

04/06/1978 tarihinde Samsun'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Samsun'da tamamadım. 1997 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım. 2001 yılında "Biyolog" ünvanı ile mezun oldum. 2001'de Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D.'da yüksek lisans programına kabul edildim. Bir yıl İngilizce bir yıl da bilim hazırlık okuduktan sonra yüksek lisans eğitimime başladım. Yüksek lisans tezimi 2005 yılında tamamladım ve aynı yıl aynı bölümde doktora eğitimime başladım.