

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AĞIZ YIKAMA ÇÖZELTİSİNDEKİ *CANDIDA* TÜRLERİNİN
BELİRLENMESİ İÇİN MULTİPLEX PCR TANI KİTLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Dt. Petek ÇÜRÜK

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet Macit İLKİT

ADANA - 2022

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**AĞIZ YIKAMA ÇÖZELTİSİNDEKİ *CANDIDA* TÜRLERİNİN
BELİRLENMESİ İÇİN MULTİPLEX PCR TANI KİTLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Dt. Petek ÇÜRÜK

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet Macit İLKİT**

**Bu tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TF2013D3
nolu proje ile desteklenmiştir.**

ADANA - 2022

KABUL ONAY



ETİK BEYANI



TEŞEKKÜR

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda eğitim aldığım süre içinde destek ve katkılarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatih KÖKSAL ve öğretim üyeleri Prof. Dr. Fügen YARKIN ile tez danışmanım Prof. Dr. M. Macit İLKİT'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışması için klinik örneklerin toplanmasına katkı sağlayan Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi dekan yardımcısı Doç. Dr. A. Şehnaz YILMAZ'a, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet Emre BENLİDAYI'ya, araştırma sonuçlarının istatistiki analizini yapan Halk Sağlığı Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ertan KARA'ya da ayrıca teşekkür ederim.

Candida türlerinin MALDI-TOF kütle spektrometresi ile analizi için ortam sağlayan Uz. Dr. Nevzat ÜNAL ile tezimin her aşamasında çok önemli katkılar sağlayan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi Dr. Ayşe Sultan KARAKOYUN'a içten teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince işlerin aksamadan yürütülmesine büyük özen gösteren Anabilim Dalı sekreteri Suna GÖKMEN'e ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora yapan Hazal KANDEMİR'e de teşekkür ederim.

Bu güne kadar hayatımın her aşamasında olduğu gibi doktora eğitimimde de çok büyük destek sağlayan babam Prof. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK ile üniversitemizden emekli öğretim görevlisi annem Sevgi ÇÜRÜK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dt. Petek ÇÜRÜK

İÇİNDEKİLER

Sayfa no:

TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Candida</i> Cinsi Mantarların Tarihçesi	3
2.2. <i>Candida</i> Cinsi Mantarların Yapısal Özellikleri	4
2.3. İnsan infeksiyonlarında sıklıkla yer alan <i>Candida</i> türleri	6
2.3.1. <i>Candida albicans</i>	6
2.3.2. <i>Candida glabrata</i>	6
2.3.3. <i>Candida tropicalis</i>	6
2.3.4. <i>Candida parapsilosis</i>	7
2.3.5. <i>Candida krusei</i>	7
2.3.6. <i>Candida guilliermondii</i>	7
2.3.7. <i>Candida dubliniensis</i>	8
2.3.8. <i>Candida lusitaniae</i>	8
2.3.9. <i>Candida kefyr</i>	8
2.3.10. <i>Candida auris</i>	9
2.3.11. <i>Candida haemulonii</i>	9
2.3.12. <i>Candida rugosa</i>	9
2.4. Kandidoz Epidemiyolojisi	10
2.4.1. Mukoza İnfeksiyonları	11
2.4.1.1. Oral kandidoz	11
2.4.1.2. <i>Candida</i> özefajiti	12
2.4.1.3. Özefagus dışı gastro-intestinal kandidoz	12

2.4.1.4. Vulvovagina kandidozu.....	12
2.4.2. Kütanöz Kandidoz Sendromları.....	12
2.4.2.1. Genel yayılım gösteren kütanöz kandidoz	12
2.4.2.2. Paroniki ve onikomikoz.....	12
2.4.2.3. Kronik mukokütanöz kandidoz	13
2.4.3. Hematojen Kandidoz	13
2.4.3.1. Kandidemi	13
2.4.3.2. Akut dissemine kandidoz	13
2.4.3.3. Kronik dissemine kandidoz	14
2.4.4. Derin Organ Tutulumu.....	14
2.4.4.1. Santral sinir sistemi kandidozu.....	14
2.4.4.2. Solunum yolu kandidozu.....	14
2.4.4.3. Kardiyak kandidoz	14
2.4.4.4. <i>Candida</i> endokarditi	14
2.4.4.5. Üriner sistem kandidozu.....	15
2.4.4.6. Kemik ve eklem infeksiyonları	15
2.4.4.7. Abdominal infeksiyonlar	15
2.4.4.8. Oküler kandidoz	15
2.5. Tanısal laboratuvar testleri	15
2.5.1. Direkt mikroskop incelemesi	16
2.5.2. Kültür	16
2.5.3. Mannan ve anti-mannan.....	16
2.5.4. 1,3-Beta-D-glukan.....	17
2.5.5. Germ-tüp testi	17
2.5.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	17
2.5.7. Real-time PCR	18
2.5.8. T2 Manyetik Rezonans	18
2.5.9. MALDI-TOF-MS.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Çalışma popülasyonu ve klinik örneklerin alınması	20
3.2. Klinik örneklerden maya mantarlarının izolasyonu	20
3.3. Maya mantarlarının tür düzeyinde identifikasyonu.....	20

3.3.1. CHROMAgar Candida (CAC) besiyeri	20
3.3.2 Mısır unlu-Tween 80 agarda mikromorfolojinin değerlendirilmesi	21
3.3.3. MALDI-TOF MS	21
3.3.4. Referans izolatlar	22
3.3.5. Mantar DNA'sının izolasyonu	22
3.3.6. PCR (Polymerase Chain Reaction)	24
3.3.7. Real-time PCR	26
4. BULGULAR	29
4.1. Anket Bulguları	29
4.2. Mikolojik bulgular	31
4.3. Moleküler bulgular	34
5. TARTIŞMA	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	50
7. KAYNAKLAR	52
EKLER	50
EK-1. Etik Kurul Kararı	58
ÖZGEÇMİŞ	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge no:</u>	<u>Sayfa no:</u>
Çizelge 2.1.	<i>Candida</i> türlerinin neden olduğu klinik durumlar4
Çizelge 2.2.	İnsanda fırsatçı infeksiyon oluşturan <i>Candida</i> türleri5
Çizelge 2.3.	<i>Candida</i> ’ların laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler16
Çizelge 3.1.	CAC besiyeri için üretici firmanın kullanım önerileri21
Çizelge 3.2.	Bruker Daltonik MALDI Biotyper için skor değerlerinin açıklanması.....22
Çizelge 3.3.	<i>Candida</i> türlerini RT-PCR ile belirlemek için kullanılan program26
Çizelge 3.4.	RT-PCR ile <i>Candida</i> türlerini belirlemek için kullanılan primerler.....27
Çizelge 3.5.	Melting curve analizi sonrası referans izolatların Tm değerleri27
Çizelge 4.1.	Ağız ve diş bakımı ile ağız çalkantı suyundaki maya mantarı varlığı arasındaki ilişki.....30
Çizelge 4.2.	CHROMAgar <i>Candida</i> besiyerinde izole edilen maya mantarlarının türlere göre dağılımı31
Çizelge 4.3.	Klinik izolatların tür tanımlamalarının CAC, RT-PCR ve MALDI-TOF MS yöntemleri ile karşılaştırılması.....33
Çizelge 4.4.	RT-PCR ile analizi yapılan referans izolatların Tm değerleri.....35
Çizelge 4.5.	İki farklı laboratuvar da RT-PCR ile analizi yapılan örneklerin Tm değerleri.....39
Çizelge 4.6.	Monofungal ve polifungal <i>Candida</i> türlerinin RT-PCR ile elde edilen Tm değerleri.....40
Çizelge 5.1.	Bu çalışma ile diğer kaynaklarda yer alan RT-PCR-MCA sonuçları birlikte gösterilmiştir.46
Çizelge 5.2.	Sunulan çalışmada bulunan RT-PCR MCA sonuçları ile iki farklı grubun ulaştığı HRMA sonuçları birlikte gösterilmiştir.48

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil no:</u>	<u>Sayfa no:</u>
Şekil 3.1. Mantar DNA'sı izolasyon kiti ve içeriği.....	23
Şekil 3.2. Polimeraz zincir reaksiyonunda ilk döngüler gösterilmiştir.....	25
Şekil 3.3. PCR ile <i>Candida</i> türlerini belirlemek için ITS1 ve ITS2 bölgeleri.....	25
Şekil 3.4. RT-PCR yapmak için kullanılan termal cykler	26
Şekil 3.5. RT-PCR sonrası Melting Curve eğrisi	28
Şekil 4.1. Katılımcıların cinsiyet ve maya mantarı varlığına göre dağılımları.....	29
Şekil 4.2. <i>Candida albicans</i> (açık yeşil-sağ) ve <i>C. dubliniensis</i> 'in (koyu yeşil-sol) CHROMAgar Candida besiyerinde 37°C'de 48 saat inkübasyon sonucu koloni görünüşleri.	32
Şekil 4.3. CHROMAgar Candida besiyerinde 37°C'de 48 saat inkübasyon sonucu referans suşların koloni renk ve şekilleri.....	33
Şekil 4.4. Referans izolatların melting pikleri (her tür için farklı renk kullanıldı).....	34
Şekil 4.5. Referans izolatların amplifikasyon grafikleri.....	35
Şekil 4.6. Referans izolatların melting curve eğrileri.....	36
Şekil 4.7. Referans ve klinik izolatların amplifikasyon eğrileri.....	37
Şekil 4.8. Referans ve klinik izolatların melting curve eğrileri.....	38
Şekil 4.9. Referans ve klinik izolatların melting pikleri.....	38

KISALTMALAR

<i>C</i>	: <i>Candida</i>
CAC	: CHROMAgar <i>Candida</i> besiyeri
dATP	: Deoksi Adenozin Trifosfat
dCTP	: Deoksi Sitidin Trifosfat
dGTP	: Deoksi Guanozin Trifosfat
dNTP	: Deoksi N�kleozit Trifofat
dTTP	: Deoksi Timidin Trifosfat
DMSO	: Dimetil S�lfoksit
DNA	: Deoksiribo N�kleik Asit
HRMA	: High Resolution Melting Analysis
ITS	: Internal Transcribed Spacer
KOH	: Potasyum Hidroksit
MALDI	: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MS	: Mass Spektrometer (k�tle spektrometresi)
MCA	: Melting Curve Analysis
NAC	: Non- <i>albicans Candida</i>
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: Ribo N�kleik Asit
RT-PCR	: Real-time PCR
TOF	: Time of Flight
T _m	: Erime noktası
UV	: Ultra Viyole

ÖZET

Ağız Yıkama Çözeltisindeki *Candida* Türlerinin Belirlenmesi için Multiplex PCR Tanı Kitlerinin Geliştirilmesi

Normal flora, konağın anatomisini, fizyolojisini, patojenlere duyarlılığını ve morbiditesini etkiler. Sağlıklı insanların ağız florasında maya mantarları da dahil olmak üzere birçok mikroorganizma bulunur. Bu denge halinin bozulması maya mantarlarının kolonizasyonuna veya ağız içi kandidoza sebep olabilir. Ağız boşluğunda sık görülen beş *Candida* türü (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* ve *Candida dubliniensis*) bilinmektedir. Sunulan çalışmada, tıbbi önemi olan *Candida* türlerinin belirlenmesi ve tanımlanması için yeni bir real-time PCR yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinden yaşları 19–36 arasında olan 200 öğrenci bu çalışmaya katıldı. Gönüllü öğrencilerin her birinden 15 ml distile su ile ağızlarını çalkalamaları istendi. Örnekler 3.000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Çökelti 200 µL steril distile su içinde karıştırılarak eküvyonlu çubuk ile CHROMAgar *Candida* besiyerine inoküle edildi. İzole edilen *Candida* türlerinin identifikasyonunda CHROMAgar *Candida* besiyeri, iki ayrı RT-PCR ve MALDI-TOF MS yöntemleri kullanıldı. Genomik DNA izolasyonu Fungal Mini prep kiti ile yapıldı. Gen amplifikasyonu için iki çift spesifik primer kullanıldı. Sunulan çalışmada, *Candida* türlerini belirlemek için real-time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve erime sıcaklığı analizi (MCA) ile çalışan yeni bir RT PCR-MCA yöntemi geliştirildi.

Toplam 52 (%26) klinik örnekten 68 maya mantarı izole edildi. Bu 68 maya mantarından 61'i (%89.7) *Candida* spp. olup izole edilen türler, sıklığa göre, 22 *C. albicans* (%36.1), 13 *C. parapsilosis* (%21.3), 9 *C. dubliniensis* (%14.7), 6 *C. lusitanae* (%9.8), 5 *C. kefir* (%8.2), 2 *C. lambica* (%3.3) ve 4 (%6.6) diğer *Candida* türleri [1 *C. krusei*, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. inconspicua* ve 1 *C. pararugosa*] idi. Toplam 61 *Candida* izolatına ilişkin MALDI-TOF MS verileri CAC ve iki ayrı RT-PCR sonuçları ile karşılaştırıldı. CAC besiyerinde 1 *C. tropicalis* kökeni yeşil koloni oluşturdu ve *C. albicans* olarak yanlış identifiye edildi. Çalışmada izole edilen *Candida* türlerinden *C. albicans*, *C. kefir* ve *C. lambica* dışındaki türler RT PCR-MCA yöntemi ile güvenilir olarak tanımlandı. Ancak, *C. albicans* ve *C. kefir*, Tm sıcaklığına göre birbirinden ayırt edilemedi. Ayrıca, MALDI-TOF MS ile *C. lambica* olarak belirlenen iki izolat RT-PCR ile amplifiye edilemedi. Ağız içerisinde maya mantarlarının varlığı: diş fırçalama alışkanlığı ($P > 0.1$), diş taşı varlığı ($P = 0.09$), gece plağı kullanımı ($P = 0.45$), hareketli dental protez kullanımı ($P = 0.55$), sigara kullanımı ($P = 0.24$) ve geçirilmiş COVID-19 enfeksiyonu ($P = 0.79$) ile ilişkili bulunmadı. Ancak, kullanılan diş macunu markasının mantar varlığını etkilediği ($P=0.02$) belirlendi.

Candida türlerinin geleneksel yöntemler ile belirlenmesi ve birbirinden ayırt edilmesi 2–3 gün sürebilmektedir. *Candida* türlerinin bir gün içerisinde real-time PCR'ı takiben erime sıcaklığı analizi (MCA) basit, ucuz ve çabuk bir yöntemdir. Ancak, sunulan çalışmada *Candida* türlerinin kesin tanısı için yeterli bir yöntem olmadığı görüldü.

Anahtar kelimeler: *Candida*, chromogenic agar, identifikasyon, MALDI-TOF MS, PCR, Real-time PCR.

ABSTRACT

The Development of Multiplex PCR Diagnostic Kits for the Detection of *Candida* Species in Oral Rinse Solutions

Normal flora influences the anatomy, physiology, susceptibility to pathogens and morbidity of the host. A variety of microorganisms are found in the oral cavities of healthy humans, including yeast fungi. Disruption of the balance among these microorganisms may cause excessive yeast colonisation, or oral candidosis. *Candida* species (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* and *Candida dubliniensis*) are the most frequent species found in oral microflora. In the present study, we aimed to describe a novel real-time PCR method for detecting medically important *Candida* species.

Two hundred students aged 19–36 years-old from Çukurova University Faculty of Dentistry participated in this study. The participants provided samples by rinsing their mouths with 15 ml of distilled water. The samples were centrifuged for 10 min at 3,000 rpm. The pellets were then suspended in 200 µL of sterile distilled water and inoculated into CHROMagar *Candida* (CAC) medium with a swab. CAC along with two different RT-PCR methods and MALDI-TOF MS were used to identify the *Candida* species. Genomic DNA isolation was performed using the Fungal DNA Mini Kit. Two different primers were used for gene amplification. In this study, a new method was developed to identify *Candida* species using RT-PCR and melting curve analysis (MCA).

A total of 68 yeasts were isolated from 52 (26%) clinical specimens. Of these yeasts, 61 (89.7%) were *Candida* species: 22 were *C. albicans* (36.1%), 13 were *C. parapsilosis* (21.3%), nine were *C. dubliniensis* (14.7%), six were *C. lusitaniae* (9.8%), five were *C. kefyr* (8.2%), two were *C. lambica* (3.3%) and four (6.6%) were other *Candida* species (one *C. krusei*, one *C. tropicalis*, one *C. inconspicua* and one *C. pararugosa*). MALDI-TOF MS data for a total of 61 *Candida* isolates were compared with CAC and two different RT-PCR assays. In the CAC medium, one strain of *C. tropicalis* produced a green colony and was incorrectly identified as *C. albicans*. Other than *C. albicans*, *C. kefyr* and *C. lambica*, the *Candida* species isolated in this study were reliably identified by the RT-PCR-MCA method. However, this method was not able to distinguish between *C. albicans* and *C. kefyr* based on their peak melting temperatures (T_m). RT-PCR was not able to amplify two isolates identified as *C. lambica* by MALDI-TOF MS. Oral colonisation of yeast fungi was not associated with tooth brushing habits ($P > 0.1$), the presence of dental calculus ($P = 0.09$), the use of occlusal splints ($P = 0.45$), the use of removable dental prosthetics ($P = 0.55$), smoking ($P = 0.24$) or previous COVID-19 infection ($P = 0.79$). However, the toothpaste brand used significantly affected the fungal population ($P = 0.02$).

It may take two to three days for *Candida* species to be identified and differentiated from each other using conventional methods. MCA of *Candida* species using RT-PCR, which can be accomplished in a single day, is a simple, inexpensive, and rapid method. However, this study showed that it was not reliably able to identify *Candida* species.

Key words: *Candida*, chromogenic agar, identification, MALDI-TOF MS, PCR, real-time PCR

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan mikrobiyomunun en baskın unsurlarından birisi de mantarlardır. Doğada 2.2–3.8 milyon mantar türünün var olduğu tahmin edilmekte birlikte, yalnızca 760 mantar türünün insan ve hayvanlarda hastalık oluşturabildiği gösterilmiştir (1,2). Bu mantarların: (i) bir kısmı yüzeysel (*Piedraia hortae* vb.), (ii) bir kısmı invazif (*Histoplasma capsulatum*) ve (iii) bir kısmı ise hem yüzeysel hem de invazif (*Candida albicans*) hastalık etkenidir. Yeryüzünde 1.7 milyar insanın yüzeysel mantar hastalıklarına maruz kaldığı bilinmektedir. Ayrıca, her yıl, en az 1.5 milyon insan invazif mantar hastalıkları sebebi ile hayatını kaybetmektedir (3). Üstelik mantar hastalıklarının insidansı her geçen gün artış gösterirken mantar enfeksiyonları sebebi ile görülen ölümlerde de önemli yükseliş izlenmektedir (4).

Son 20 yılda, *Candida* ve kandidozların bildirilmesinde önemli artış olduğu ilgili bilim çevrelerinin dikkatini çekmiştir. Bu artış sadece invazif kandidozlar ile ilgili olmayıp yüzeysel kandidozları (orofarengiyal, vulvo-vagina, intertrigo, onikomikoz, paroniki, kronik mukokütanoz) da kapsamaktadır. Bu durum, kuşkusuz bağışıklık sistemi baskılanmış popülasyonda artış (lösemi, lenfoma, HIV/AIDS, steroid kullanımı, diabetes mellitus vb.) ile açıklanabilir (5). Bununla birlikte, *Candida*'ların laboratuvar tanısında önemli ilerlemeler kaydedilmiş, polifazik taksonomik araştırmalar yanında yeni besiyerleri geliştirilmiş (kromojenik agarlar), yeni *Candida* türleri tanımlanmış (*Candida auris*) ve yeni moleküler temelli testler (PCR, RFLP, RT-PCR) uyulamaya girmiştir (6–9). Ayrıca, tıbbi mikoloji ve klinik mikoloji alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiş, konu üzerinde farkındalık artmış, hemen her ülkede referans laboratuvarlarının kurulmasına yönelik adımlar atılmıştır. Ulusal ve uluslararası ölçekte eğitim faaliyetleri önem kazanmıştır. Halen yeterli düzeyde olmasa da klinisyen-mikrobiyolog işbirliği desteklenmiş ve geliştirilmiştir. Sonuç olarak, mantar hastalıklarının tanı ve tedavisine ilişkin farkındalık yaratılmıştır. Mantar hastalıklarının 21. yüzyılda daha sık rapor edildiği bilinmektedir (10).

Modern tıbbın 21. yüzyıldaki tüm imkanlarına karşılık mantar hastalıklarının tanı ve tedavisine ilişkin sorunlar devam etmektedir. Bir mantar enfeksiyonunun başarılı yönetimi çabuk ve güvenilir tanı yanında uygun antifungal tedaviye hemen başlanması ile mümkündür. Global Action for Fungal Infections (GAFFI) 2025 yılı itibari ile

mantar hastalıklarının %95'inin tanınmasını ve yine %95'inin tedavi edilebilmesini hedeflemiştir. Klinik ve mikolojik tanı etkenin tür düzeyinde tanısı ile geliştirilmeli ve doğrulanmalıdır. Ancak, az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde mikolojik tanı sorunu halen devam etmektedir. Tür düzeyinde tanı, bölgesel epidemiyolojik özelliklerin belirlenmesi yanında kişi odaklı tedavide de önemli adımların atılmasını sağlayacaktır (<https://gaffi.org/Global Action For Fungal Infections>).

Sunulan çalışmada, hem yüzeysel hem de invazif mikoz etkeni *Candida* cinsi maya mantarlarının çabuk ve doğru tanısı için bir algoritma oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla, RT-PCR testinin geliştirilmesi ve uygulanması, tür düzeyinde tanıda kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi ve elde edilen bulguların CHROMagar (CAC) besiyeri ve MALDI-TOF MS sonuçları ile karşılaştırılması ve literatür eşliğinde tartışmaya açılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Mantarlar, insan ve hayvan florasında bulunabilen mikroorganizmalardır. Son yıllarda, tarımsal alanlarda antibakteriyel ve antifungal ilaçların kullanımıyla ilaca dirençli türlerin baskın olduğu mantar infeksiyonlarının ortaya çıktığı görülmektedir. Bunlar genellikle fırsatçı infeksiyon etkeni olarak bilinip konağın bağışıklık durumuna göre hareket ederler. Bazı hastalıkların tedavisinde immün sistemi baskılayan ilaçların kullanılması sonucu invazif mantar hastalıklarının geliştiği bildirilmektedir (11).

Candida türü mantarlar toprak, bitki, hayvan, insan ve hastane ortamından besinlere kadar her yerden izole edilebilmektedir. Flora üyesi olarak da insan gastro-intestinal kanalının her yerinde, deride ve kadın genital organlarında bulunmaktadır. Normal flora da bulunan *Candida* türleri bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda dokuları istila ederek bir infeksiyona sebep olup insan yaşamını tehdit eden patolojilere sebep olabilir (12).

2.1. *Candida* Cinsi Mantarların Tarihçesi

Ağızda görülen pamukçuk hastalığı ilk kez Hipokrat (M.Ö. 460–370) tarafından milattan önce 4. yüzyılda bildirilmiştir. Ağız ve vaginada sıklıkla görülen, ancak infeksiyona sebep olmayan *C. albicans* antibiyotik kullanımı sonucu bağışıklık sistemindeki dengenin bozulması ile kandidoza sebep olur. *Candida albicans*, 19. yüzyılda tanımlanmış olup yüz yılı aşkın bir süre içinde çok çalışılmış ve üzerinde 20.000'den fazla makale yayınlanmış olup bilim adamları tarafından farklı organlardaki etkilerini gösteren bazı kaynaklar Çizelge 2.1'de gösterilmiştir (13).

Çizelge 2.1. *Candida* türlerinin neden olduğu klinik durumlar

Yıl	Lezyon	Referans
1825	Özefagus	Veron P
1849	Vagina	Wilkinson JS
1862	Sinir sistemi	Zenker FA
1869	Gastro-intestinal sistem	Parrot J
1890	Üriner sistem	Schmorl G
1904	Onikomikoz	Dubendorfer E
1907	Deri	Jacobi E
1912	Solunum yolu	Castellani A
1925	Paroniki	Kingery LB and Thienes CH
1928	Kemik	Connor CL
1940	Kalp (endokardit)	Joachim H and Polayes SH
1943	Göz (endofthalmit)	Miale JB
1953	Kornea (keratit)	Mendelblatt DL

Candida albicans sağlıklı popülasyonda çok sık görülen bir maya mantarıdır. Almanya’da yapılan bir çalışmada, 2–6 haftalık bebeklerde %54, bir yaşına kadar %46 ve 1–6 yaş arasında ise %39 oranında görülmüştür. II. Dünya savaşından sonra, klinik izolatlar mikroskop görüntüleri ve farklı kimyasalları oksijenli ve oksijensiz ortamda kullanmalarına göre sınıflandırılmıştır. Yani klinik izolatlarda *C. albicans*’ı, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* ve *Candida tropicalis*’den ayırt etmişlerdir. Ağız ve vaginada pamukçuğa sebep olan *Candida* türlerini belirlemek ve birbirinden ayırmak için hızlı ve güvenilir çok sayıda yöntem bulunmaktadır (10,13).

2.2. *Candida* Cinsi Mantarların Yapısal Özellikleri

Candida türü maya mantarları tek hücreli yapıya sahiptir. Bunlar ince duvarlı olup yumurtamsı şekilli hücreler (blastokonidyumlar) halindedir. *Candida albicans* eşeysiz üreme, multilateral tomurcuklanma yoluyla gerçek bir hif meydana getirebilirler. Hücre duvarında fosforile mannanlar, glukanlar ve az miktarda kitin bulunur. Polipeptidler hücre duvarındaki polisakkaritlere özel bir şekilde bağlanarak çeşitli fosfogliko-peptidlerden oluşan incelikli bir yapı ortaya çıkarır. Bu durum, *Candida* türlerinin antijenik yapı farklılıklarına sebep olur (14).

Yapısal olarak, *Candida glabrata* eliptik yapıda tomurcuklanma sergileyen tek hücreli yapılar halinde iken diğer *Candida* türleri (*C. albicans*, *C. krusei*, *C.*

parapsilosis ve *C. tropicalis*) daha iri, çok hücreli filamanlar şeklinde yalancı hifler de oluşturan önemli farklılıklar gösterir. Günümüzde en az 20 *Candida* türünün insanlarda hastalık oluşturduğu bilinmekte olup *C. albicans* tüm kandidoz şekillerinden en sık izole edilen türdür. Diğer *Candida* türleri ise non-*albicans Candida* (NAC) türleri olarak bilinmektedir (15). Çizelge 2.2’de yer alan *Candida* türlerinden sıklıkla karşılaşılan türler: *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* ve *C. kefyr*’dir. HIV-pozitif bireylerin ağız örneklerinden izole edilen *C. dubliniensis* ilk kez 1995’de tanımlanmıştır (11). *Candida albicans* ile fenotipik benzerliğinden dolayı laboratuvarında dikkat edilmesi gerekir. İlk kez Japonya ve Güney Kore’den bildirilen *C. auris* tanı güçlüğü ve ilaç direnci ile önem arz etmektedir (7).

Çizelge 2.2. İnsanda fırsatçı infeksiyon oluşturan *Candida* türleri

İnsan infeksiyonlarında sıklıkla yer alan major patojen
<i>Candida albicans</i>
İnsan infeksiyonlarında sıklıkla yer alan NAC türleri
<i>Candida glabrata</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida dubliniensis</i> <i>Candida lusitaniae</i> <i>Candida kefyr</i>
İnsan infeksiyonlarında daha az sıklıkla yer alan NAC türleri
<i>Candida albidus</i> <i>Candida catenulate</i> , <i>Candida chiropterorum</i> <i>Candida ciferrii</i> <i>Candida famata</i> <i>Candida haemulonii</i> <i>Candida humicola</i> <i>Candida inconspicua</i> <i>Candida lambica</i> <i>Candida lipolitica</i> <i>Candida norvegensis</i> <i>Candida pelliculosa</i> <i>Candida pintolopesii</i> <i>Candida pulcherrima</i> <i>Candida rugosa</i> <i>Candida utilis</i> <i>Candida zeylanoides</i>
İnsan infeksiyonlarında son zamanlarda önem kazanan NAC türü
<i>Candida auris</i>

2.3. İnsan infeksiyonlarında sıklıkla yer alan *Candida* türleri

2.3.1. *Candida albicans*

İnsan vücudunda en sık görülen *Candida* türüdür. Ağız, deri, vagina, sindirim sistemi gibi hemen her organın normal florasında bulunur. Bağışıklık sistemi zayıfladığında hızla üreyerek kandidoza sebep olur. Kültür yapıldığı zaman üç günde olgunlaşarak krem renginde, hamur kıvamında, düzgün yüzeyli olarak görülür. Kanlı besiyerinde koloni kenarında ayak olarak da isimlendirilen uzantılar gelişir. Ticari olarak temin edilen CHROMagar besiyerinde *C. albicans* kolonileri yeşildir. Mikroskop incelemesinde yuvarlaktan ovale değişen şekilde görülür. Mısır unlu-Tween 80 agarda (25°C’de 72 saat sonra) bölmelerin bulunduğu yerlerde blastokonidyum kümeleri ile birlikte yalancı hif ve biraz da gerçek hif oluşturur. *Candida albicans*’ın iri, kalın duvarlı ve genellikle de tekli terminal klamidosporeleri 30–37°C’de inhibe olur. *Candida albicans* germ tüp testinde *C. dubliniensis*’e benzer reaksiyon verir ve pozitifdir (16,17).

2.3.2. *Candida glabrata*

İnsanlarda genellikle kan dolaşımı ve idrar yolu infeksiyonuna neden olur. Basit kültür ortamında 2–3 günde koloniler olgunlaşır, diğer *Candida* türlerine göre biraz daha yavaş ürer. Üreme için kolesterole bağımlı olan izolatların varlığı da bildirilmiştir. Mac Conkey agar üzerinde küçük koloniler olarak görülebilir. Maya kolonileri; hamur kıvamında, düzgün yüzeyli, beyaz ila krem renkte görülebilir. Mikroskop morfolojisinde ise Mısır unlu-Tween 80 agarda, 25°C’de ve 72 saatte; yalnızca küçük (2–3×3–4 µm), oval maya hücreleri görülür, bunlar da tekli terminal tomurcuklanma yapar. Bu mantar trehaloz asimilasyon testi ile kolayca tanımlanabilir. *Candida glabrata* infeksiyonları ölüm oranı yüksek infeksiyonlar arasındadır (5,17).

2.3.3. *Candida tropicalis*

Lösemi ve diğer hematolojik maliniteleri olan nötropenik hastalarda görülür. Koloni morfolojisi kremi olup koloninin kenarında hafif bir miçelyal püskül olabilir. CHROMagarda metalik mavi renkte görülür. Rutin besiyerinde yuvarlaktan ovale (3.5–7×5.5–10 µm) değişim göstermektedir. *Candida tropicalis* Mısır unlu-Tween 80 agarda 25°C’de 72 saatte ince ve uzun yalancı hifler boyunca tek tek veya küçük gruplar

halinde blastokonidyumlar oluşturur. Gözyaşı damlası şeklinde birkaç klamidospor nadiren oluşabilir (17).

2.3.4. *Candida parapsilosis*

Mantarlara bağlı endokarditin *C. albicans*'tan sonra en sık görülen ikinci etkenidir. Yeni doğanlarda görülen invazif mantar infeksiyonlarından da sorumludur. Kültürde  günde üreme hızına sahiptir. Koloni morfolojisi kremsi, uzun dantel şeklinde bir görünüm oluşturur. Mikroskop morfolojisinde ise rutin primer besiyerinde maya hücreleri oval ($2.5-4 \times 3-8 \mu\text{m}$) olup Mısır unlu-Tween 80 agarda, 25°C'de ve 72 saatte, yalancı hif boyunca tek tek veya kümeler halinde blastokonidyumlar görülür. En tipik özellikleri, nispeten kısa olan yalancı hiflerin yamuk veya kavisli görünümü ve dev hücreler olarak adlandırılan iri hiflerin varlığıdır (17).

2.3.5. *Candida krusei*

Duyarlı kişilerde infeksiyon etkenidir. Bazı kaynaklarda *Pichia kudriavzevii* olarak yer alır. Koloni morfolojisi yassı, kuru görünümlü, mat, miçelyal bir püskül oluşturur. CHROMagar besiyerlerindeki koloniler pürtüklü, ortası pembe renkli, büyük ve yaygın koloniler yapar. Mısır unlu-Tween 80 agar'da 25°C'de ve 72 saatte çapraz kibrit çöplerine veya ağaca benzer dizilim gösteren blastokonidyumların bulunduğu yalancı hifler oluşturur. *Candida krusei* sikloheksimide duyarlı olup laktozu da asimile edebilir (17).

2.3.6. *Candida guilliermondii*

Endokardit, osteomiyelit, deri ve idrar yolu infeksiyonlarına neden olduğu bilinmektedir. *Candida guilliermondii*, *Candida fermentati* ve *Candida corpophila*'yı da içermekte olup fenotipik olarak ayırt edilemezler. Koloni morfolojisi düz, parlak, düzgün kenarlı ve genellikle krem renklidir. Ancak, zamanla koloniler ten renkli veya pembemsi olabilir. Rutin primer besiyerinde ovelden uzun şekillere kadar değişebilir ($2-5 \times 3-7 \mu\text{m}$). Mısır unlu-Tween 80 agar'da 25°C'de ve 72 saatte az sayıda kısa ve yalancı hiflerin yer aldığı maya hücre kümelerini oluşturur, yalancı hif bölmelerin olduğu yerlerde sıklıkla kk blastokonidyum grupları vardır (17).

2.3.7. *Candida dubliniensis*

HIV ile enfekte hastalardaki tekrarlayan eritemli oral kandidozla yakından ilgilidir. HIV-negatif olup bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda bazen kan akımı ve diğer infeksiyonlar da görülür. Bu organizma dünya genelinde yaygın görülmekte olup çeşitli klinik örneklerde infeksiyon kanıtı olmaksızın izole edilmektedir. Koloni morfolojisi krem renkli, hamur kıvamında düzgün yüzeyli kanlı agar gibi zenginleştirilmiş besiyerinde koloninin kenarında ayak olarak tanımlanan (*C. albicans*'da olduğu gibi) uzantılar oluşturur. CHROMagar'da *Candida* kolonileri yeşildir, ancak *C. albicans*'dan daha koyu yeşil olup ton farklılıkları sadece ilk izolasyonda fark edilebilir. Mikroskop incelemesinde ise *C. albicans*'a çok benzer. Mısır unlu-Tween 80 agar'da 25°C'de ve 72 saat sonra psödohiplerin yanısıra bölmelerin bulunduğu yerlerde yuvarlak blastokonidyum kümeleri ile birlikte bir miktar gerçek hif meydana getirir. Tipik iri ve kalın duvarlı terminal klamidosporeler, çiftler veya küçük kümeler halinde oluşur, germ-tüp testi pozitifdir. Ancak, *C. albicans* genellikle gerçek veya yalancı hiflerin ucunda tek tek klamidosporeler üretirken *C. dubliniensis* çok daha bol ve yalancı hifin ucundaki klamidospore salkımları şeklinde görülürler (17).

2.3.8. *Candida lusitanae*

Uygun besiyerlerinde üreme hızı 3 gündür. Koloni morfolojisinde krem renkli, düzgün yüzeyli, parlaktır. Mikroskop morfolojisinde ise maya hücreleri yuvarlaktan ovale kadar (2–6×3–10 µm) değişebilir. Mısır unlu-Tween 80 agarda, 25°C'de ve 72 saatte, yalancı hifler ince, dallanmış ve kavisli görünümde olup uzamış blastokonidyumlardan oluşan kısa zincirler vardır. *C. lusitanae* morfolojik olarak *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'e benzer, ancak sellobiyozu fermente etme ve ramnozu da asimile etme yeteneği ile ayırt edilir. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda fırsatçı bir patojendir. Amfoterisin B'ye karşı intrinsik direnç bildirilmiştir (17) .

2.3.9. *Candida kefyr*

Genellikle patojen olmadığı kabul edilir. Rutin primer besiyerinde, 25°C'de, üç günlük inkubasyon sonundaki kolonileri, diğer türlerinkine göre daha küçük (3–8×5–12 µm) olup düz, yumuşak, beyaz krem renktedir. Mısır unlu-Tween 80 agar'da yalancı

hifler ve bunun etrafında uzun, genellikle hiften ayrılıp birbirine paralel dizilim gösteren blastosporlar görülür. Bu görünüm ırmakta yüzen kütüklere benzetilebilir (17).

2.3.10. *Candida auris*

İlk olarak 2008'de Japonya'daki bir hastanede hastanın dış kulak kanalından izole edilmiştir. İnvazif kandidoza sebep olan ve çok sayıdaki ilaçlara dirençli bir patojendir. Biyofilm oluşturma ve hastane ortamında varlığını sürdürme eğilimindedir. Besiyerinde üç günde 25–37°C'de hızlı ürer ve üç günde olgunlaşır. CAC'daki kolonileri pembeden mora kadar değişen renklerde olabilir, inkübasyon süresi uzatılırsa kırmızı olabilir. Besleyici sıvı besiyerinde 2–3 ile 2.5–5 µm boyutlarında tomurcuklanan oval veya elipsoid mayalar görülür. Tomurcuklanan mayalar tekli, çiftli veya küçük kümeler halinde üreyebilir. Mısır unlu-Tween 80 agarda 30°C'de ve 72 saate sadece maya hücreleri görülebilir. *Candida auris*'i tanımlamak için yeteri kadar özgül herhangi bir morfolojik veya biyokimyasal özellik yoktur (7,17).

2.3.11. *Candida haemulonii*

Periton diyalizi ile ilgili peritonit dahil invazif kandidozun gittikçe artan sıklıkta görülen etkenidir. *Candida haemulonii* fenotipik olarak *Candida auris*'e benzer. Rutin besiyerinde hızlı ürer ve üç günde olgunlaşır. Koloniler beyazdan kremeye kadar değişen renklerde düzgün yüzeyli ve tüysüzdür. CAC'da 24 saatteki koloniler pembe, 72 saate ise koyu mor renge dönüşür. Bu özellik *C. glabrata*'nın 3–4 günlük inkübasyonunda da görülür. Rutin besiyerinde tomurcuklanan maya hücreleri yuvarlaktan ovale (3–5×3–6.5 µm) değişir (17,18).

2.3.12. *Candida rugosa*

Sığırlarda mastitin temel sebebi olarak bilinirken artık insanlarda da önem kazanmaya başladı. Yanık ve trauma merkezli venöz kateterle ilgili kandidemi ve üriner infeksiyonlarda önemlidir. Bu organizmanın neden olduğu infeksiyonların tedavisinin zor olduğu bilinmektedir. Duyarlılık profilleri bölgelere göre değişmektedir. Asya-Pasifik ve Latin Amerika ülkelerine ait izolatların Avrupa ve Kuzey Amerika'dakilerden daha dirençli olduğu bilinmektedir. Kültürde 3 günde olgunlaşır ve beyaz ila krem renkte kuru görünümlü miçelyal püsküller bulunur. CAC'da üretildiği

zaman kenarları beyaz mavi-yeşil koloniler oluşturması çok tipik özellikleridir. Rutin besiyerinde tomurcuklanıp oval ile neredeyse silindirik ($2.0\text{--}3.5\times 6\text{--}12\text{ }\mu\text{m}$) şeklindedir. Mısır unlu-Tween 80 agarda 25°C 'de ve 72 saatte zincirler halinde blastokonidyumlu yalancı hifler oluşturur (17).

2.4. Kandidoz Epidemiyolojisi

Candida türlerinin insanlarda ve hayvanlarda kolonizasyon yaptığı bilinmektedir. Başlıca kolonizasyon bölgeleri ağızdan rektuma kadar olan gastro-intestinal sistemdir (16). Sağlıklı kişilerin ağızda *Candida* taşıyıcılık oranı %25–50 civarında ve kökenlerinin ise %70–80 *C. albicans* olduğu bilinmektedir. *Candida*'lar arasında ilk sırada *C. albicans* olup bunu *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* izlemektedir (19). Ağızdaki taşıyıcılık oranı diş protezi kullanan kişilerde, diyabetlilerde, hastanede yatan, kemoterapi alan, antibiyotik kullanan ve HIV enfeksiyonu olan hastalarda önemli oranda artmaktadır (20,21).

Sağlık çalışanlarının derisinde yüksek oranda taşıyıcılık görülmesi durumu yoğun bakım ünitelerinde hastalara ve hastadan hastaya bulaşın da önemli bir sebebidir. Bu sebeple *Candida* enfeksiyonlarının hastane ortamından kazanıldığına dair önemli deliller bulunmaktadır. Çeşitli nedenlerle hastanede yatan hastalar risk altında olup başlıca; (i) prematüre süt bebekleri, (ii) 70 yaşın üzerindeki kişiler, (iii) hematolojik malignite ve (iv) gastro-intestinal sistem cerrahisi geçiren hastalardır. Bağışıklık sisteminin ciddi şekilde baskılanması, geniş spektrumlu antibiyotiklere maruz kalma, bilinçsiz antifungal ilaç kullanımı gibi nedenler *C. albicans* oranında yıllar içerisinde belirginleşen bir azalmaya sebep olurken *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* gibi non-*albicans* *Candida* oranlarının da artmasına sebep olmaktadır (4).

Candida'ya bağlı hastalıkların sıklığının gün geçtikçe artıyor olması, çok sayıdaki çeşitli kandidoz şekillerinin daha iyi tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Çok geniş bir spektrumda yer alan kandidozlar: mukoza, kütanöz, hematojen ve derin organ tutulumu başlığı altında kısaca açıklanmıştır (11).

Mukoza Enfeksiyonları

- ✓ Oral kandidoz
- ✓ *Candida* özefajiti

- ✓ Özefagus dışı gastro-intestinal kandidoz
- ✓ Vulvovagina kandidozu

Kütanöz Kandidoz Sendromları

- ✓ Genel yayılım gösteren kütanöz kandidoz
- ✓ Paroniki ve onikomikoz
- ✓ Kronik mukokütanoz kandidoz

Hematojen Kandidoz

- ✓ Kandidemi
- ✓ Akut yaygın kandidoz
- ✓ Kronik yaygın kandidoz

Derin Organ Tutulumu

- ✓ Santral sinir sistemi kandidozu
- ✓ Solunum yolu kandidozu
- ✓ Kardiyak kandidoz
- ✓ *Candida* endokarditi
- ✓ Üriner sistem kandidozu
- ✓ Kemik ve eklem infeksiyonları
- ✓ Abdominal infeksiyonlar
- ✓ Oküler kandidoz

2.4.1. Mukoza İnfeksiyonları

2.4.1.1. Oral kandidoz

Oral *Candida* enfeksiyonları esas olarak sistemik veya lokal bağışıklık baskılanması olan hastalarda görülür. Risk altında bulunan hastalar, yeni doğanlar, diyabetik hastalar, HIV enfeksiyonlular, kortikosteroid ve kemoterapi uygulanan hastalar, solid organ veya kemik iliği transplantasyonu yapılan hastalardır. Oral kandidoza en sık neden olan *C. albicans* olup toplam olguların %95'inden sorumludur. Genel nüfusun %80'i asemptomatik taşıyıcı olup bu durum enfeksiyona yol açmaz.

Candida albicans insan konağına iyi uyum göstermiş çok yönlü bir organizmadır. Bulunduğu yerde herhangi bir değişiklik ona bölgeyi işgal etme fırsatını verir (16,22).

2.4.1.2. *Candida* özefajiti

AIDS, hematopoetik veya lenfatik sistem malignitesi nedeniyle tedavi gören hastalarda görülür. Özefagus kandidozlu hastaların üçte birinde oral kandidoz görülmezken oral kandidozların üçte ikisinde *Candida* özefajiti bulunur (5).

2.4.1.3. Özefagus dışı gastro-intestinal kandidoz

Özefagustan sonra en çok tutulan organ mide olup mukoza ülserasyonu şeklinde kendini gösterir. İnce ve kalın barsak tutulumu özefagus ve mide tutulumundan daha az oranda görülür (23).

2.4.1.4. Vulvovagina kandidozu

Candida albicans başta olmak üzere diğer *Candida* türleri kandidoz oluşumunda önemli rol oynar. Vulvovagina kandidozunun gelişiminde önemli bir sebep bulunamasa bile ciddi seyreden olguların oral kontraseptif, kortikosteroid, antibiyotik kullanımı ya da diyabet ve gebelik ile ilişkili olabilir. Kadınların %75'i hayatlarında en az bir kez, %5'i ise altta yatan bir sebep olmaksızın tekrarlayıcı vulvovagina kandidozuna maruz kalır (24).

2.4.2. Kütanöz Kandidoz Sendromları

2.4.2.1. Genel yayılım gösteren kütanöz kandidoz

Hem çocuklar hem de erişkinlerin gövde, toraks ve ekstremiteleri üzerinde kendini gösterir. Nötropenik hastalarda başlangıçta tek tek ortaya çıkan lezyonlar, daha sonra birleşerek geniş bir alana, ya da tüm vücuda yayılır. Bu durumlar kütanöz kandidozun sık görülmeyen şeklidir (25).

2.4.2.2. Paroniki ve onikomikoz

Paronikinin en sık karşılaşılan etken *C. albicans* olup diğer türlerin de etken olduğu bilinmektedir. Tırnak çevresindeki yumuşak dokuda ortaya çıkan lezyon keskin

bir çizgi halinde inflamasyona bağlı olarak ısı artışı ile birlikte parlama ve gerginlik şeklinde görülür. Paroniki daha çok elleri suda iş gören kişilerde, bulaşıkçılar ve çamaşırhane çalışanları görülür. Sadece tırnakta görülen infeksiyonlar ise onikomikoz olarak tanımlanır.

2.4.2.3. Kronik mukokütanöz kandidoz

Deri, mukoza, saç ve tırnaklarda ortaya çıkan yeterli tedaviye rağmen uzun süren, ısrarlı bir seyir izleyen *Candida* infeksiyonlarını tanımlamak için kullanılır (26). *Candida* özefajiti oluşabilir, yıllar içerisinde özefagusta stenoza neden olur. Kronik mukokütanöz kandidoz şekillerinin çoğu küçük çocukluk döneminde ya da ilk yirmi yıl içerisinde ortaya çıkar. Karşılaşılan ilk tablo oral kandidoz olup bunu tırnak ve deri tutulumu izler.

2.4.3. Hematojen Kandidoz

2.4.3.1. Kandidemi

Kanda *Candida* türlerinin varlığını tanımlar. Nötropenik hastalarda kandidemi kanda sınırlı kalarak komplikasyonsuz seyredebileceği gibi akut yaygın kandidoz, kronik yaygın kandidoz veya tekli derin organ kandidozu şeklinde bir tabloya da sebep olabilir. Nötropenik olmayan hastalarda kandidemi iyi bir seyir izleyerek herhangi bir komplikasyona sebep olmayacağı gibi derin organların tutulumu ile komplikasyonlu bir seyir de izleyebilir. Kandidemi gelişimine neden olan risk faktörleri; endojen ve ekzojen faktörlerin bir sonucu olarak *Candida* türleri ile kononizasyonun artması, gastrointestinal sistem mukoza bütünlüğünün zarar görerek fungal translokasyonun artması veya bağışıklığın baskılanmasıdır (11).

2.4.3.2. Akut dissemine kandidoz

Yenidoğanlarda daha çok *C. albicans* etkindir. Nötropenik olmayan erişkin yoğun bakım hastalarında ve hematolojik malignite nedeniyle kemoterapi alan nötropenik hastalarda ortaya çıkar. Akut yaygın kandidoz, göz de dahil olmak üzere herhangi bir organda tutulumu sebep olabilir. Nötropenik hastalarda deri lezyonları %10–25 arasında görülürken, akciğer tutulumu da ortaya çıkabilir.

2.4.3.3. Kronik dissemine kandidoz

Akut yaygın kandidoz atağının ardından ortaya çıkabilir. Daha çok sitotoksik kemoterapi alan akut lösemili hastalarda görülür. Hepatomegali ve splenomegali hastaların yarısında görülür.

2.4.4. Derin Organ Tutulumu

Derin organlarda ortaya çıkan *Candida* infeksiyonlarının çoğu saptanamayan hematojen kandidozun bir sonucudur. Periton diyalizi sonrası ortaya çıkan *Candida* peritoniti buna bir örnektir (12,23,25).

2.4.4.1. Santral sinir sistemi kandidozu

Candida türleri tarafından oluşturulan santral sinir sistemi (SSS) infeksiyonları nadir olup meninjit ya da apse olarak ortaya çıkar. Ayrıca, SSS cerrahisi sonucu da kendini gösterebilir (27).

2.4.4.2. Solunum yolu kandidozu

Primer *Candida* pnömonisi genellikle aspirasyon sonucu meydana gelir. *Candida* ampiyemi nadir görülmekte, malignite gibi altta yatan ciddi hastalığı olanlarda görülür. *Candida* mediastinitisi hemen her zaman torasik cerrahi sonrasında ortaya çıkar (25).

2.4.4.3. Kardiyak kandidoz

Miyokardit her zaman hematojen kandidoz gelişen bağışıklığı baskılanmış hastalarda görülür. Perikardit oluşumu nadir görülmekle birlikte bağışıklığın baskılanması, torasik cerrahi, perikardiyektomi risk faktörleri arasında yer alır (25).

2.4.4.4. *Candida* endokarditi

Kandidemi gelişen prostetik kapak hastalarının %25'inde endokardit gelişmektedir. Risk faktörleri arasında büyük cerrahiler, önceden var olan bakteri endokarditi ya da kapak hastalığı ve uzun süreli venöz kateter varlığı sayılabilir (28).

2.4.4.5. Üriner sistem kandidozu

Candida'ya bağlı alt üriner sistem infeksiyonu genellikle üriner kateterli hastalarda özellikle antibiyotik tedavisinden sonra ortaya çıkar. Böbrek kandidozu ise hematojen kandidoza sekonder gelişir ve sıklıkla gastro-intestinal kanaldan kaynaklanır. Risk altındakiler diyabetikler dışındaki tümör veya AIDS için kemoterapi ile immün sistemi baskılanmış hastalardır (5).

2.4.4.6. Kemik ve eklem infeksiyonları

Candida'ya bağlı kemik ve eklem infeksiyonlarının çoğu hematojen kandidoza sekonder gelişir. Primer *Candida* osteomyeliti ve septik artrit daha sıklıkta gözlenir. Osteo-artiküler infeksiyon bir kandidemi atağı olarak meydana gelmeyebilir. Bu sebele vertebral osteomyelitli hastalarda tanı gecikebilir.

2.4.4.7. Abdominal infeksiyonlar

Candida türleri intra-abdominal örneklerden sıklıkla izole edilmektedir. Akut pankreatit sonrası *Candida* infeksiyonlarının rolünün arttığını gösteren çalışmalar vardır. Periton diyalizli hastalarda oluşan peritonitlerin %8'i mantarlara bağlı olup *C. albicans*'da infeksiyonların %75'inden sorumludur.

2.4.4.8. Oküler kandidoz

Keratit, koryoretinit ve endoftalmit oküler *Candida* infeksiyonları arasında bulunur. Bunlardan koryoretinit ve endoftalmit hematojen kandidoza sekonder gelişir. Enfeksiyonlar cerrahi operasyonlar sırasındaki bir trauma sonucu da oluşabilir. Bunlardan keratit lokal bir tramayla ilişkilidir.

2.5. Tanısal laboratuvar testleri

Mantar infeksiyonlarının tanısı geleneksel olarak direkt mikroskop ve kültür yöntemi ile gerçekleştirilir (Çizelge 2.3). Bu yöntemlerin yetersiz kaldığı, geç sonuç verdiği veya uygulanamadığı durumlar sık karşımıza çıkmaktadır. Yakın dönemde geliştirilen ve tanı kılavuzlarında önerilen seroloji ve moleküler temelli testler, konvansiyonel testler ile birlikte kullanıldıklarında bazı hasta gruplarında tanıya büyük katkı sağlamaktadır (12).

2.5.1. Direkt mikroskop incelemesi

Klinik örnekten hazırlanarak ıslak veya gram boyalı preparat incelenebilir. Kalkoflor beyazı ve %10–20’lik KOH’lik preparat hazırlanabilir. *Candida*’ya ilişkin tomurcuklanan maya hücreleri ve yalancı hiflerden (*C. glabrata* hariç) oluşan tipik görünümü çok hızlı ve kolay bir şekilde saptanır (10).

2.5.2. Kültür

Candida türleri standart bir besiyerinde (Sabouraud glikoz agar) iyi ürer. Bunun yanında kanlı agar, beyin-kalp infüzyon agar gibi besiyerlerinde de ürerler, ancak *Candida* türlerini hem izole hem de identifiye edebilen (koloni renk ve morfolojisine göre) kromojenik besiyerleri (CHROMagar *Candida* vb.) tür düzeyinde ön tanıya da yardımcı olur (29).

2.5.3. Mannan ve anti-mannan

Antikorların birlikte saptanması, serum örneklerinde *Candida* varlığının saptanmasına yönelik bir testtir. Mannan/anti-mannan olarak kombine edilmiş bir testin duyarlılığı ve özgüllüğü, sırası ile %83 ve %86 olup en iyi performansı *C. albicans*, *C. glabrata* veya *C. tropicalis* infeksiyonlarında gösterir. Bu testler infeksiyonun erken saptanmasına yardımcı olabilirler. Kan kültüründen altı gün önce pozitif sonuç verebilirler. Negatif öngörü değerinin yüksek olması sebebiyle infeksiyonu dışlamak amacı ile de kullanılabilir ve bu sebeple ayırıcı tanıda değerlidir (10).

Çizelge 2.3. *Candida*’ların laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler

Islak preparat	KOH veya DMSO solüsyonları eklenebilir.
Gram boyama	Blastospor ve hifler gram pozitif boyanır.
Kalkoflor beyazı	Floresan mikroskopta mantarı belirginleştirir. KOH ile birlikte kullanılır.
Direkt immünfloresan boyama	Bir mantara karşı geliştirilen işaretli monoklonal veya poliklonal antikorla tanı konur.
Mantar kültürü	SGA, Kromojenik agar, Kanlı agar ile üretilir.
Mannan ve anti-mannan	
1,3-Beta-D-glukan	İnvazif mikozlara ilişkin genel tanı testidir.
<i>C. albicans</i> germ-tüp antikor	
<i>Candida</i> PCR	<i>Candida</i> varlığını ve türünü gösterir.
Histokimyasal boyalar; Hematoksilen-eozin, PAS, Gomeri’nin metamin gümüşleme boyası	Dokuda <i>Candida</i> varlığını gösterir.

2.5.4. 1,3-Beta-D-glukan

Candida'ların tanımlanmasında yararlı olup birçok mantar türünde bulunması nedeni ile panfungal bir test olarak bilinir. Yapılan çalışmalarda testin duyarlılığı %80, özgüllüğü de %82 olarak bulunmuştur. Bu testin kullanımını sınırlayan en büyük faktör yalancı pozitifliklere yol açan bazı koşullardır (10,30).

2.5.5. Germ-tüp testi

Germ-tüp gerçek hiflerin başlangıcı olup ana hücreden köken aldıkları noktada boğumlanma göstermeyen filamanlar olarak görülürler. Eğer filamanlar köken aldıkları noktada boğumlanmış ve bölmeli yapıdaysalar bunlar germ tüp değil, yalancı hiflerdir. İnsan serumu, germ tüplerinin oluşumu için mükemmel bir besiyeri olup pastör pipetinin ucu ile yapılan inokülasyondan sonra 35–37 °C'de 2 saatlik (120 dakika) inkübasyondan sonra mikroskop altında incelenir (29).

2.5.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Mantarların moleküler tanımlanması için en başarılı gen hedefi ribozomal DNA kompleksidir. Ökaryotlarda bu gen kompleksi 18S (küçük alt üniteli rDNA) geni, bir 5.8 alt ünite ve 28S (büyük alt üniteli rDNA) genlerinden oluşur (31–34). Bu üç gen segmenti arasında yer alan ITS1 ve ITS2 genleri birbirinden ayıran bölgelerdir. Internal Transcribed Spacer olarak bilinen ITS1, 18S ve 5.8S genleri arasında ITS2 ise 5.8S ve 28S genleri arasında yer almakta olup türden türe dizi farklılıkları bulunmaktadır. PCR ile bu genlerin amplifikasyonunu takiben farklı kimyasal yöntemler (RT-PCR, Nested PCR, HRMA, FRED, TaqMan, Moleküler Beacons, Microarray, Repetitive Element PCR ve DNA dizi analizi gibi) kullanılarak *Candida*'ların tür tayini başarılı bir şekilde yapılmaktadır (9,17).

DNA molekülü içinde yer alan hedef bölgenin milyonlarca kopyası polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gerçekleştirilir. İstenilen fragmenti içine alacak şekilde bir çift primerle (oligonükleotid) hedef bölge tanımlanır. Amplifiye edilecek çift sarmal DNA dizisine komplementer olan biri forward diğeri ise reverse primer olarak isimlendirilir. Bu işlemi gerçekleştirmek için mikrogram düzeyinde genomik DNA kullanılır. Hedef DNA molekülünün *in vitro* replikasyonu olarak da bilinen bu işlem 20 µL gibi küçük hacimde, uygun pH değerindeki tamponla dATP, dCTP, dGTP ve dTTP

varlığında optimum Mg^{++} iyonu ile ideal çalışan DNA polimeraz enzimi ile 1–2 saat gibi kısa bir süre içinde gerçekleştirilir.

2.5.7. Real-time PCR

RT-PCR hedef DNA dizisinin eşzamanlı olarak çoğaltılması ve miktarının belirlenmesine olanak sağlar. Bu miktar belirleme işlemi amplifikasyon döngüleri sırasında yapıldığı için real-time PCR olarak isimlendirilmiştir. İşlem sonunda jel elektroforezine gereksinim yoktur. Bu yöntem ile hedef DNA dizisi var mı diye bakıldığı gibi farklı diziye sahip PCR ürünlerinin görülmesi ile tür tayini de yapılır (31-36).

2.5.8. T2 Manyetik Rezonans

Klinik örnekler cihaza yüklenerek hücrelerin parçalanmasını takiben PCR ile amplifiye edilen örnekler paramanyetik parçacıklar ile işaretlenmiş özgün probalar ile hibridize edilerek beş farklı *Candida* türü (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*) 4–5 saat gibi bir süre içinde kültüre dayalı yöntemler ile karşılaştırıldığında çok daha duyarlı ve özgün bir şekilde (%90–98) tanımlanır (11,17).

2.5.9. MALDI-TOF-MS

Mantardan elde edilen proteinler, kütle spektrofotometresi ile analiz edilmekte olup genetik bilgiye gereksinim yoktur. Bu yöntem mayaların tanımlanmasında altın standart bir yöntem haline gelmiştir. Örneklerin metal bir plaka üzerine konulduktan sonra organik bir matriks ile kaplanır. Matriks kurutulduğunda izolatdaki molekülleri kristalize eder. Lazer ışını ile buharlaştırılıp iyonize olan moleküller bir akış borusundan geçirilirken yüklü parçacıkları bir detektöre doğru hızlandıracak yüksek voltaj uygulanır. Yüklü iyonların detektöre ulaşması için geçen zaman (Time of Flight = TOF) molekülün kütle/yük oranına göre değişir. TOF değerleri sisteme kaydedilerek sistemdeki referans sonuçlar ile karşılaştırılıp tanı konur (37). Bu yöntem ile kültür yapmadan bir izolat içindeki *Candida* türleri on dakika gibi çok kısa bir süre içinde analiz edilir. Kütle spektrofotometresi pahalı bir yatırım olmasına karşılık, çok az sarf malzemesi ile kısa sürede doğru sonuç verdiği için emsalsizdir (38).

Sunulan tez çalışmasında, sağlıklı gönüllülerin ağız florasında yer alan *Candida* türlerinin CHROMAgar Candida besiyerinde izolasyonunu takiben RT-PCR temeline dayalı yöntemlerin identifikasyon performanslarının MALDI-TOF MS yöntemi ile karşılaştırılması hedeflendi. Bu amaçla, katılımcıların konsantre ağız çalkantı suyunun CHROMAgar besiyerine ekimleri yapıldı. İzole edilen maya mantarlarının CHROMAgar Candida ve iki ayrı RT-PCR ile tür tanımlama sonuçları MALDI-TOF MS yöntemi ile karşılaştırıldı.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma popülasyonu ve klinik örneklerin alınması

Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinde eğitim gören ve rastgele seçilen 200 öğrenci çalışmaya dahil edildi. Katılımcılara 10–15 ml steril distile su verilerek ağızlarını çalkamaları istendi. Ağız çalkantı suyu örnekleri steril kapaklı 15 ml’lik falkon tüplerine alınarak en çok 30 dakika içerisinde Tıbbi Mikoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Klinik örnekler, 5–6 Haziran 2022 tarihleri arasında toplandı. Çalışmaya katılmayı kabul eden öğrencilere kısa bir anket çalışması yapıldı ve katılımcılardan aydınlatılmış onam belgesi alındı.

3.2. Klinik örneklerden maya mantarlarının izolasyonu

Laboratuvara ulaşan klinik örnekler 3.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım uzaklaştırılarak pelletin üzerine 400 µL kadar steril distile su eklendi (39). Elde edilen konsantre ağız çalkantı suyu örneklerinden steril eküvyonlu çubuk ile alınan örnekler CHROMAgar Candida (CAC) besiyerine seyreltme/tek koloni ekim yöntemi uygulanarak ekildi. Ekim yapılan besiyerleri 36°C’de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresi sonunda besiyerleri üreme varlığı/yokluğu, koloni morfolojileri ve pigmentasyonu ile çoklu mantar üremesi yönünden değerlendirildi. Çoklu mantar üremesi tespit edilen kültürlerden saf koloni elde etmek amacıyla tekrar pasaj yapıldı.

3.3. Maya mantarlarının tür düzeyinde identifikasyonu

3.3.1. CHROMAgar Candida (CAC) besiyeri

CAC besiyeri kullanıma hazır petrilerde temin edildikten sonra ekim yapılmak üzere kullanılıncaya kadar 4°C’de ve karanlıkta saklandı ve son tüketim tarihi göz önüne alınarak kullanıldı. Üretici firmanın önerdiği koloni renk ve morfolojileri doğrultusunda (Çizelge 3.1) besiyerleri değerlendirildi ve tür ön tanımları kaydedildi.

Çizelge 3.1. CAC besiyeri için üretici firmanın kullanım önerileri

Mikroorganizma	Koloni görünümü
<i>Candida albicans</i>	Yeşil
<i>Candida tropicalis</i>	Metalik mavi
<i>Candida krusei</i>	Pembe, mat
<i>Candida glabrata</i> , <i>Candida kefyr</i>	Lila-kahverengi
Diğer türler	Beyaz-lila

3.3.2 Mısır unlu-Tween 80 agarda mikromorfolojinin değerlendirilmesi

Mısır unlu-Tween 80 agar (Corn-Meal Agar) hazırlanırken 1.000 ml distile su ile 17 gr Mısır unlu agar (Himedia; Mumbai, Hindistan) karıştırılıp, 121°C’de 15 dakika otoklavlandı. Ardından 10 ml Tween-80 eklendi. Tek kullanımlık steril petrilere dağıtıldı. Aktif üreyen bir maya kolonisi öze ile alındı, Dalmau yöntemi esas alınarak Mısır unlu-Tween 80 besiyerinin ortasına, plağı kesmeden veya hafifçe yırtarak, birbirine paralel dört çizgi şeklinde ekim yapıldı. Ekim yapılan alanın üzeri steril bir lamel ile kapatıldı ve 27°C’de 72 saat inkübasyona bırakıldı. 72 saat sonunda incelenecek plak, kapağı kaldırılarak mikroskop altına yerleştirildi. Işık mikroskopunda 40× büyütme objektif ile blastospor, hif, yalancı hif ve klamidospore varlığı ve yokluğu ile şekli ve dizimleri değerlendirildi (17).

3.3.3. MALDI-TOF MS

Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanı kütle spektrometre yöntemi ile tür tanımlaması günümüzde referans yöntem olarak kabul edilmektedir. Çalışmada, kromojenik besiyerinde üretilen maya kolonilerinin tanımlanması amacıyla referans olarak MALDI-TOF MS (Bruker Biotyper; Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) kullanıldı. Tür düzeyinde tanımlama için taze kültürler kullanıldı. Koloniden 1 µL alınıp 96’lık MALDI kaset kuyusuna konuldu ve oda ısısında kuruması beklendi. Sonrasında üzerine 1 µL %70’lik formik asit ve biyomarkerların tespiti için matriks solüsyonu (α -siyano-4-hidroksisinamik asit) eklendi ve tekrar oda ısısında kuruması için beklendi. Kuruyan kaset kuyularındaki örnekler cihaza yerleştirilip analiz işlemine başlandı. Cihaz ölçüm değerleri üreticinin talimatlarına göre (Çizelge 3.2) sınıflandırıldı (40).

Çizelge 3.2. Bruker Daltonik MALDI Biotyper için skor değerlerinin açıklanması

Skor	Açıklama
2.300–3.000	Yüksek olasılıklı tür tanımlaması
2.000–2.299	Güvenilir cins tanımlaması, olası tür tanımlaması
1.700–1.999	Olası cins tanımlaması
0.000–1.699	Güvenilir olmayan tanımlama

3.3.4. Referans izolatlar

Sunulan çalışmada, *C. krusei* ATCC 6258, *C. inconspicua* CBS 13938, *C. tropicalis* CBS 13933, *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. glabrata* ATCC 90030 ve *C. dubliniensis* MI 19941 olmak üzere yedi referans izolat incelendi. Referans izolatların CAC besiyerinde koloni morfolojileri değerlendirildi. Ayrıca, Mısır unlu-Tween 80 içeren agarda mikromorfoloji değerlendirmeleri, real-time PCR ve MALDI-TOF MS yöntemleri ile tür tanımlamaları doğrulandı.

3.3.5. Mantar DNA'sının izolasyonu

DNA izolasyonu için hazır kit (Katalog No: D6005) kullanıldı. Kutu içeriği (Zymo Research, Irvine, CA, ABD) Şekil 3.1'de verilmiştir. Reaktifler oda sıcaklığında stabil olup izolasyonda otomatik pipet (100–1000 µL) ve mini santrifüj (10.000 g) gereklidir.

- ZR BashingBead Lysis Tüpü 50 adet
- BashingBead Tamponu 40 ml
- Genomik Lysis Tamponu 100 ml
- DNA Pre-Wash Tamponu 15 ml
- g-DNA Wash Tamponu 50 ml
- DNA elüsyon tamponu 10 ml
- Zymo Spin III-F Filtre 50 adet
- Zymo Spin II- Kolon 50 adet
- Toplama Tüpü 150 adet



Şekil 3.1. Mantar DNA'sı izolasyon kiti ve içeriği

Mantardan DNA izolasyon işlemi

- Bir ependorf tüpüne 200 μ L saf su eklendikten sonra kapağı kapatılıp hassas terazide tartıldı.
- Kültür ortamında üretilmiş mantar kolonilerinden 2–3 öze dolusu tüpe alınıp karıştırıldı.
- Tüpler tekrar tartıldı. Ortalama 40–50 mg yaş doku bu tüp içerisinde süspanse edildi.
- Bu karışım ZR BashingBead Lysis Tüpüne otomatik pipet ile transfer edildi.
- Üzerine 750 μ L BashingBead Tamponu eklenip, alt üst edilerek 5-10 dakika karıştırıldı.
- Bu tüpler Mini santrifüjde 10.000 g de 1 dakika santrifüj edildi.
- Her örnek için bir toplama tüpü içine bir Zymo Spin III-F filtre yerleştirildi.

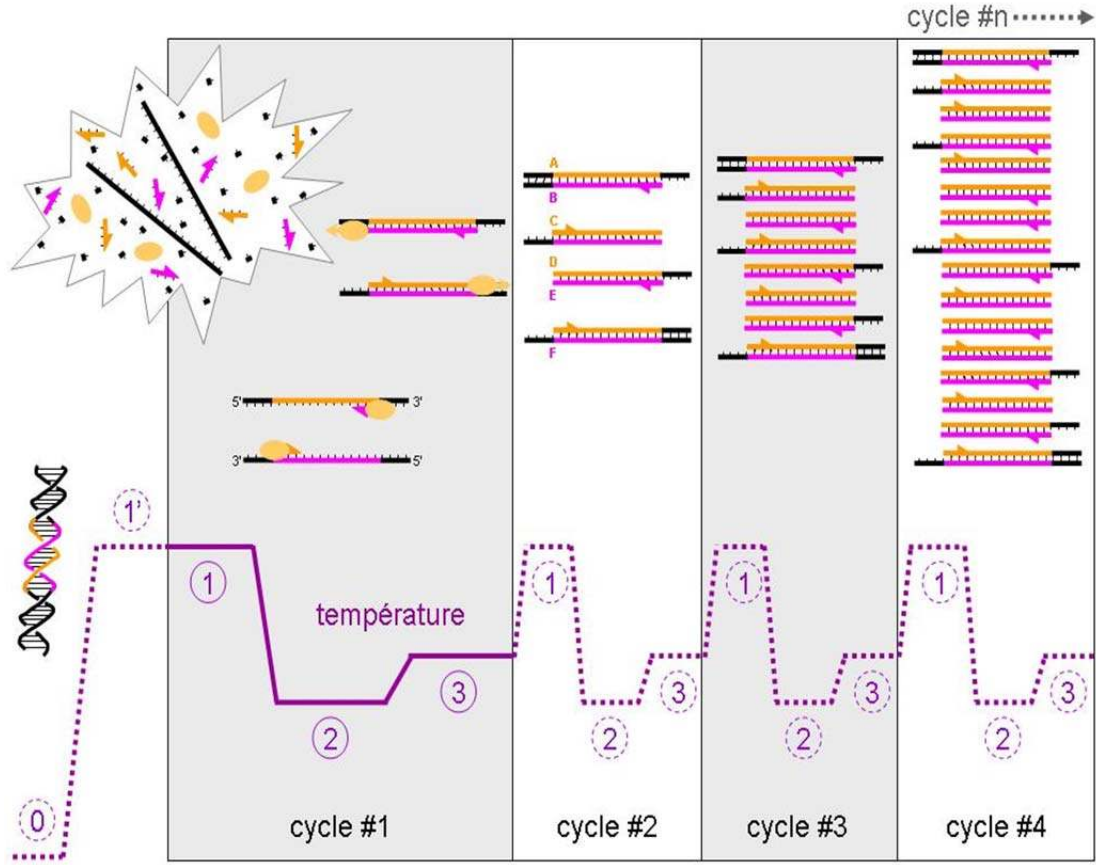
- Santrifüj edilen ZR BashingBead Lysis Tüpünün üst fazından 400 µL filtre üzerine alındı.
- Mini santrifüjde 8.000 g de 1 dakika santrifüj edildikten sonra filtre atıldı.
- Filtrat üzerine 1.200 µL Genomik Lysis Tamponu eklenip karıştırıldı.
- Yeni bir toplama tüpü içine Zymo Spin II- Kolon yerleştirilerek içine 800 µL karışım aktarıldı.
- Minisantrifüjde 10.000 g de 1 dakika santrifüj edilip kalan 800 µL de kolona aktarıldı.
- Minisantrifüjde 10.000 g de 1 dakika santrifüj edildikten sonra toplama tüpü atıldı.
- Yeni bir toplama tüpüne alınan kolon içine 200 µL DNA Pre-Wash Tamponu eklendi.
- 10.000g de 1 dakika santrifüj edildikten sonra, 500 µL g-DNA Wash Tamponu eklendi.
- 10.000g de 1 dakika santrifüj edildikten sonra kolon bir ependorf tüpü içine alındı.
- Kolon içine 100 µL DNA elüsyon tamponu ilave edilerek 10.000g de 30 saniye santrifüj edildi.
- Ependorf içine alınan DNA örneğinin konsantrasyonu ölçüldükten sonra - 20°C’de saklandı.

3.3.6. PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR işlemi Termal Cycler cihazı ile üç basamakta gerçekleştirilmektedir. Denatürasyon, primer bağlanması ve zincir uzamasını sağlayan sıcaklık ve zaman değerleri Şekil 3.2 de gösterilmiştir.

Gen amplifikasyonu için kalıp olarak kullanılan DNA molekülü çift zincir olup 95 dereceye kadar ısıtılınca iki zincir ortaya çıkar. Sıcaklık 50–60°C’ye düşürüldüğü zaman PCR işleminde kullanılmakta olan primerler kendisine komplementer olan tek iplikçik DNA bölgesine bağlanır. Sıcaklığın 72°C’ye yükseltilmesi ile Taq DNA polimeraz primerlerin 3’OH kısmına nükleosit trifosfatlar tarafından sağlanan bazları (A,C,G,T) ekleyerek sentezi başlatır. Denatürasyon (95°C), primer bağlanması (55–60°C) ve zincir uzamasından (72°C) meydana gelen sürece döngü (cycle) denir. Termal

cycler ile 30–40 kez tekrarlanan döngü ile gen amplifikasyonu gerçekleştirilmiş olur. İşlem sonucu beklenen gen parçası agaroz jel elektroforezini takiben etidyum bromür ile boyanarak görüntülenir.



Şekil 3.2. Polimeraz zincir reaksiyonunda ilk döngüler gösterilmiştir

Candida türlerini PCR temeline dayalı yöntemler ile belirlemek için çok kullanılan rDNA üzerinde yer alan ITS1 ve ITS2 bölgeleri Şekil 3.3’de gösterildi.



Şekil 3.3. PCR ile *Candida* türlerini belirlemek için ITS1 ve ITS2 bölgeleri

3.3.7. Real-time PCR

Candida türlerini belirlemek amacı ile ITS2 bölgesine spesifik primer çiftleri tercih edildi. Real-time PCR cihazı Şekil 3.4.'de, uygulanan program ise Çizelge 3.3.'de gösterildi. RT-PCR işleminde kullanılan primer dizileri Çizelge 3.4.'de verildi.



Şekil 3.4. RT-PCR yapmak için kullanılan termal cycler

Çizelge 3.3. *Candida* türlerini RT-PCR ile belirlemek için kullanılan program

Sıcaklık	İşlem	
95°C 10 dakika	Başlarken AmpliTaq Aktivasyonu	
95°C 15 saniye	Denatürasyon	40 döngü
55°C 20 saniye	Primer bağlanması	
72°C 45 saniye	Zincirin uzaması	
60–95°C (0.1°C/sn)	Melting curve analizi	

Çizelge 3.4. RT-PCR ile *Candida* türlerini belirlemek için kullanılan primerler

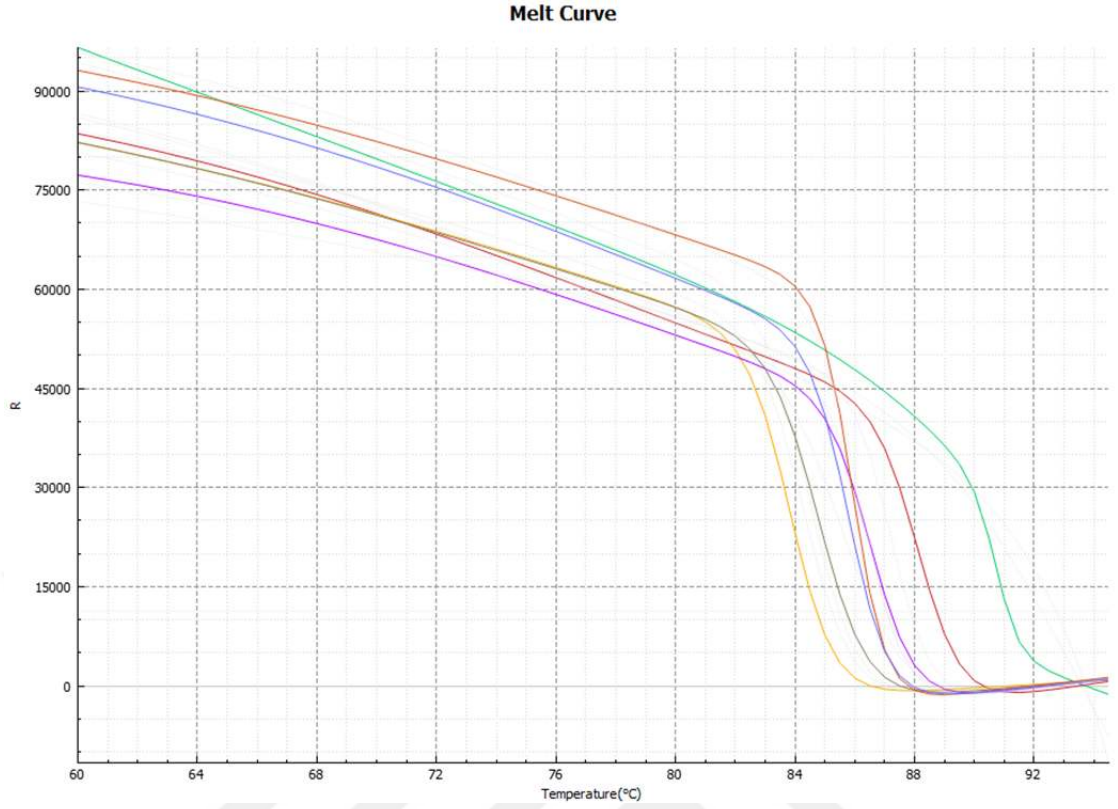
Primer kodu	Primer dizisi (5'→3')
5.8S-1 Forward	5'-CAACGGATCTCTTGGTTCTC-3'
28S-1Reverse	5'-CGGGTAGTCCTACCTGATTT-3'
UNF1 Forward	5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'
UNF2 Reverse	5'-TTG ATA TGC TTA AGT TCA GCG G-3'

Referans ve klinik izolatlardan elde edilen DNA örnekleri ile RT-PCR analizi iki ayrı laboratuvarda yapıldı. Şöyle ki; (1) İlk çalışma, Çukurova Üniversitesi Teknokent’de ITS2 bölgesine özgül 5.8S-1F ve 28S-1R primer çifti ile Şekil 3.4’de gösterilen cihaz (Mx3000P Real-time PCR System, Brookprinter PlacePoway, CA, ABD) ile yapıldı. RT-PCR için hazır 5×Master Mix (Solis BioDyne, Teaduspargi, Estonya) kullanıldı. PCR karışımı 20 µL hacim içinde hazırlandı. Konsantrasyonları 10 pmol/µL olan forward ve reverse primerlerden 0.5 µL eklendi (Çizelge 3.4). Her örnek için 1µL (10 ng/µL) genomik DNA kullanıldı. Ayrıca, çalışmalar UNF1 ve UNF2 primerleri ile tekrar edildi.

İkinci çalışma ise yine referans *Candida* suşları ve klinik izolatlardan elde edilen DNA örnekleri kullanıldı. UNF1 ve UNF2 nolu primerler (Çizelge 3.4) ile GEN PLAZA Biyoteknoloji Merkezi Laboratuvarında da (Ankara) RT-PCR (LongGene Q2000B, Hangzhou, Çin) ve SYBR green Master Mix (Hibrigen Biyoteknoloji Araştırma ve Geliştirme San. ve Tic. A.Ş. TÜBİTAK Gebze Yerleşkesi, Gebze, Kocaeli) ile amplifiye edilerek erime sıcaklıkları (T_m) Çizelge 3.5’de, melting curve eğrileri de Şekil 3.5’de gösterildi.

Çizelge 3.5. Melting curve analizi sonrası referans izolatların T_m değerleri

Sıra No	Referans Suşlar	Referans numaraları	Türe özgü renkler	Erime noktası T _m °C
1	<i>C. krusei</i>	ATCC 6258	Açık yeşil	90.7
2	<i>C. inconspicua</i>	CBS 13938	Kırmızı	88.1
3	<i>C. tropicalis</i>	CBS 13933	Sarı	83.8
5	<i>C. albicans</i>	ATCC 10231	Mor	86.5
7	<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 90018	Yeşil	84.7
8	<i>C. glabrata</i>	ATCC 90030	Turuncu	85.3
10	<i>C. dubliniensis</i>	MI 19941	Mavi	85.8

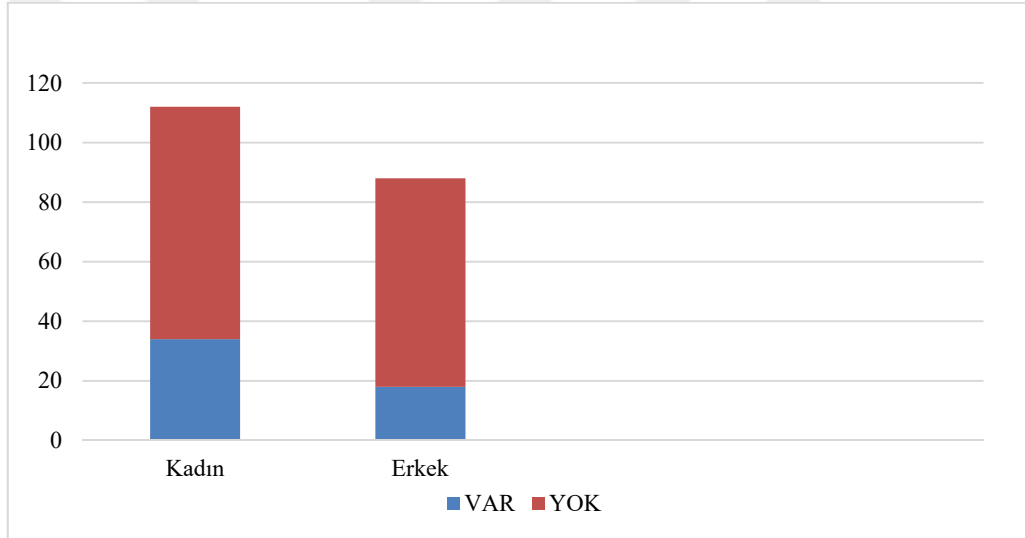


Şekil 3.5. RT-PCR sonrası Melting Curve eğrisi

Bu ön çalışma ile referans örneklerin birbirinden farklı erime sıcaklığına (T_m) sahip oldukları görüldü. Böylece RT-PCR ile erime sıcaklığı analizi (MTA) de yapılarak toplumda sık görülen *Candida* türlerinin gün içinde tanısı mümkün hale getirilmiş oldu.

4. BULGULAR

Bu araştırma, Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi öğrencisi olup bilinen bir hastalığı olmayan rastgele seçilen 200 gönüllü üzerinde yürütüldü. Katılımcıların 112'si kadın (%56) ve 88'si erkek (%44) olup yaş ortalaması 23 (yaş aralığı, 19–36) idi. Katılımcılardan alınan konsantre ağız çalkantı suyu örneklerinin mantar kültürlerinde 52 (%26) klinik örnekten 68 maya mantarı izole edildi. Katılımcıların cinsiyet ve maya kolonizasyonuna göre dağılımları Şekil 4.1'de verildi. Üreme olan 52 kişinin 34'ü (% 65.4) kadın ve 18'i (%34.6) erkek idi.



Şekil 4.1. Katılımcıların cinsiyet ve maya mantarı varlığına göre dağılımları

4.1. Anket Bulguları

Çalışmaya katılan gönüllülerde diş fırçalama alışkanlığı, diş macunu markası, diş taşı, gece plağı kullanımı, hareketli dental protez kullanımı, sigara tüketimi ile geçirilmiş COVID-19 enfeksiyonu varlığını sorgulayan kısa bir anket çalışması yapıldı. Anket sonuçları ile mantar kültürlerinde maya mantarı üreme varlığı arasında ilişki Çizelge 4.1'de verildi.

Kullanılan diş macunu markası açısından A grubu ticari marka diş macunu kullananlarda B grubu ticari marka diş macunu kullananlara göre maya mantarı üreme varlığı ve yokluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulundu. Sensodyn

(A grubu) harici diş macunu kullananlarda 3.06 kat ($P=0.02$) fazla üreme görüldü. Diş taşı olanlarda olmayanlar göre 2.28 kat ($P=0.09$) fazla üreme olduğu görüldü. Ağız içi mantar kolonizasyonu ile diş taşı varlığı, diş fırçalama alışkanlığı, gece plağı kullanımı, hareketli dental protez kullanımı, sigara kullanımı ve geçirilmiş COVID-19 enfeksiyonu arasında anlamlı derecede ilişki bulunmadı.

Çizelge 4.1. Ağız ve diş bakımı ile ağız çalkantı suyundaki maya mantarı varlığı arasındaki ilişki

	Üreme var n (%)	Üreme yok n (%)	P değeri
Diş fırçalama alışkanlığı			
Günde bir kez	11 (%21.2)	20 (%13.5)	>0.1
Günde iki kez	37 (%71.2)	112 (%75.%)	
Günde üç kez	4 (%7.7)	16 (%10.8)	
Kullanılan diş macunu markası			
Sensodyn	8 (%15.4)	47 (%31.8)	0.02
Diğer	44 (%84.6)	101 (%68.2)	
Diş taşı varlığı			
Var	17 (%32.7)	31 (%67.3)	0.09
Yok	35 (%20.9)	117 (%79.1)	
Gece plağı kullanımı			
Var	1 (%50.0)	1 (%50.0)	0.45
Yok	51 (%25.8)	147 (%74.2)	
Hareketli dental protez kullanımı			
Var	0 (%0.0)	2 (%100.0)	0.55
Yok	52 (%26.3)	146 (%73.7)	
Sigara tüketimi			
Var	21 (%31.3)	46 (%68.7)	0.24
Yok	31 (%23.3)	102 (%76.7)	
Geçirilmiş Covid-19 enfeksiyonu			
Var	42 (%26.4)	117 (%73,6)	0.79
Yok	10 (%24.4)	31 (%75.6)	

4.2. Mikolojik bulgular

Katılımcılardan alınan 200 konsantre ağız çalkantı suyu örneğinin mantar kültürleri yapıldı. Toplam 52 (%26) klinik örnekten 68 maya mantarı izole edildi. Kültür-pozitif 52 klinik örneğin, 41'inde (%78.8) monofungal ve 11'inde (%21.2) polifungal populasyon görüldü. Polifungal üremelerin 6'sında iki farklı maya türü, 5'inde ise üç farklı maya türü vardı. Bu 68 maya mantarından 61'i (%89.7) *Candida* spp. olup izole edilen türler, sıklığa göre, 22 *C. albicans* (%36.1), 13 *C. parapsilosis* (%21.3), 9 *C. dubliniensis* (%14.7), 6 *C. lusitaniae* (%9.8), 5 *C. kefyr* (%8.2), 2 *C. lambica* (%3.3) ve 4 (%6.6) diğer *Candida* türleri [1 *C. krusei*, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. inconspicua* ve 1 *C. pararugosa*] idi. Maya mantarlarının tür dağılımları Çizelge 4.2.'de ve Çizelge 4.3.'de verildi.

Çizelge 4.2. CHROMAğar *Candida* besiyerinde izole edilen maya mantarlarının türlere göre dağılımı

Monofungal izolasyon (41)	Pozitif (n)
<i>C. albicans</i>	17
<i>C. dubliniensis</i>	6
<i>C. parapsilosis</i>	8
<i>C. krusei</i>	-
<i>C. kefyr</i>	3
<i>C. tropicalis</i>	-
<i>C. lusitaniae</i>	2
<i>C. inconspicua</i>	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	1
Polifungal izolasyon (11)	Pozitif (n)
<i>C. albicans</i> + <i>C. pararugosa</i>	1
<i>C. tropicalis</i> + <i>C. lambica</i> + <i>Hanseniaspora opuntiae</i>	1
<i>C. krusei</i> + <i>C. lambica</i> + <i>Yarrowia lipolytica</i>	1
<i>C. albicans</i> + <i>C. kefyr</i>	1
<i>C. dubliniensis</i> + <i>C. parapsilosis</i>	1
<i>C. dubliniensis</i> + <i>C. kefyr</i>	1
<i>C. parapsilosis</i> + <i>C. lusitaniae</i>	1
<i>C. albicans</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
<i>C. albicans</i> + <i>C. lusitaniae</i> + <i>C. parapsilosis</i>	2
<i>C. dubliniensis</i> + <i>C. parapsilosis</i> + <i>C. lusitaniae</i>	1
Toplam	52

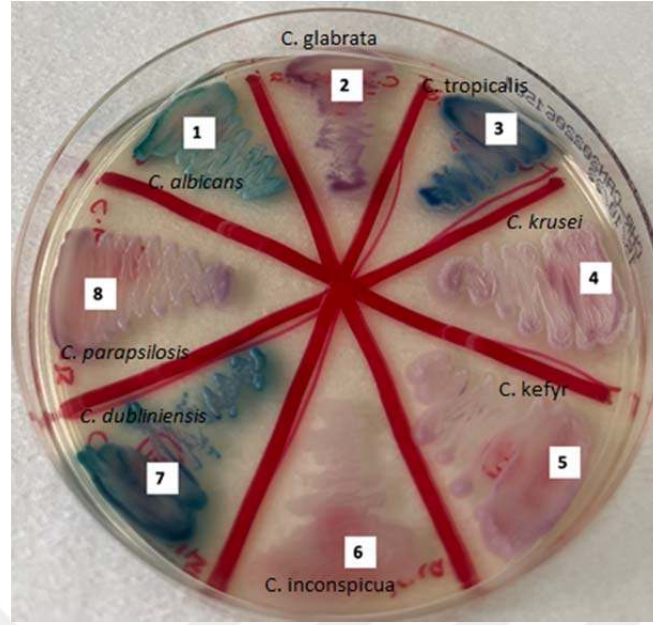
Klinik örneklerden elde edilen *C. albicans* ve *C. dubliniensis* izolatlarının CAC besiyerinde üretilmesi sonucu elde edilen kolonilerin farklı renklenmeleri Şekil 4.2.'de gösterildi.



Şekil 4.2. *Candida albicans* (açık yeşil-sağ) ve *C. dubliniensis*'in (koyu yeşil-sol) CHROMagar Candida besiyerinde 37°C'de 48 saat inkübasyon sonucu koloni morfolojileri.

Çalışmada kullanılan referans suşların CHROMagar Candida besiyerinde 37°C'de 48 saat inkübasyonu sonucunda renklenmeleri Şekil 4.3'te sunuldu. Referans suşların MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlanmaları tekrarlandığında *C. kefir* olarak kabul edilen suşun *Geotrichum capitatum* olarak tanımlanması üzerine kontamine olduğu değerlendirilip çalışma dışı bırakıldı. Ayrıca, CAC besiyerinde 1 *C. tropicalis* kökeni yeşil koloni oluşturdu ve yanlış olarak *C. albicans* olarak identifiye edildi.

Bu çalışmada, ağız çalkalama örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin ($n=61$) CAC ve her iki RT-PCR yöntemi yanında MALDI-TOF MS yönteminin tür tanımlamalarının karşılaştırılması yapıldı ve Çizelge 4.3'te sunuldu. MALDI-TOF MS, referans yöntem olarak kabul edildi.



Şekil 4.3. CHROMagar Candida besiyerinde 37°C’de 48 saat inkübasyon sonucu referans suşların koloni renk ve şekilleri

Çizelge 4.3.Klinik izolatların tür tanımlamalarının CAC, RT-PCR ve MALDI-TOF MS yöntemleri ile karşılaştırılması

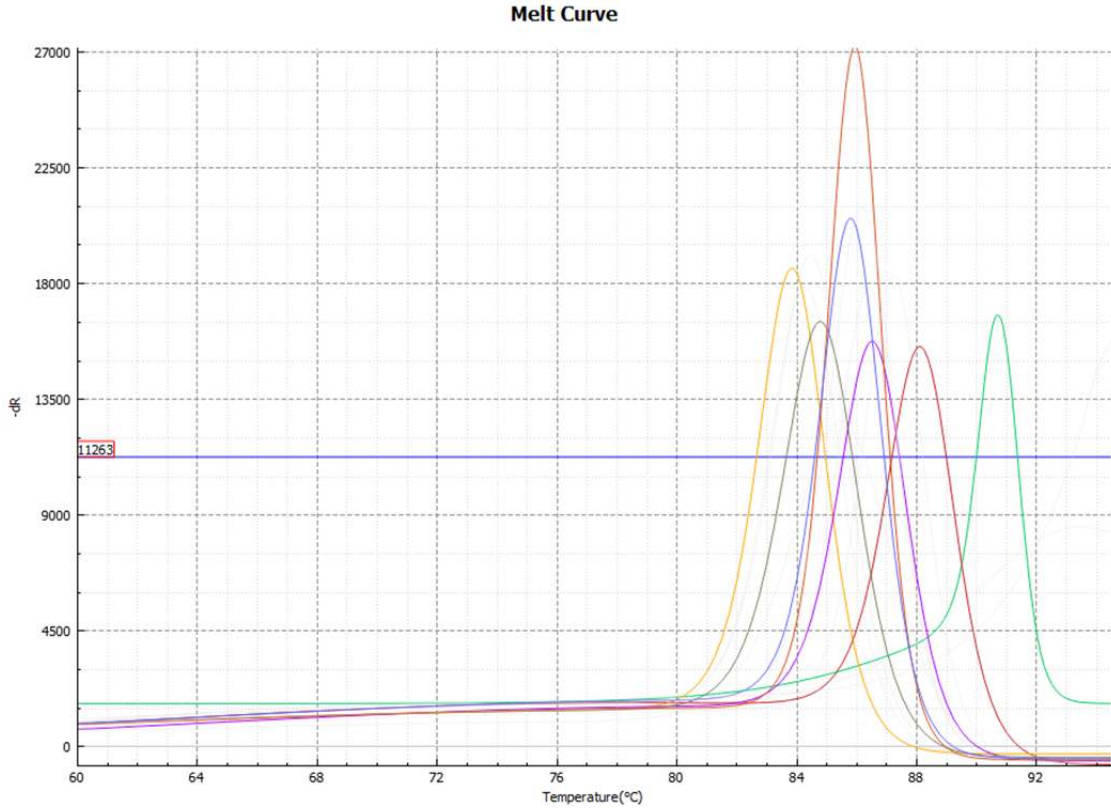
	CAC	RT-PCR ¹	RT-PCR ²	MALDI-TOF
<i>C. albicans</i>	23	22	22	22
<i>C. dubliniensis</i>	9	9	9	9
<i>C. krusei</i>	1	1	1	1
<i>C. kefyr</i>	-	5	5	5
<i>C. tropicalis</i>	-	1	1	1
<i>C. parapsilosis</i>	-	13	13	13
<i>C. inconspicua</i>	-	1	1	1
<i>C. lusitaniae</i>	-	6	6	6
<i>C. pararugosa</i>	-	1	1	1
<i>C. lambica</i>	-	-	-	2
<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	-	-	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	2
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	-	-	-	2
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-	-	-	2
Diğer mantar türleri (beyaz koloni)	35	9	9	-
Toplam	68	68	68	68

RT-PCR Gen Plaza¹ ve RT-PCR Teknokent² sonuçlarıdır.

4.3. Moleküler bulgular

Yedi referans suşdan DNA izole edildikten sonra RT-PCR ile iki farklı laboratuvarında amplifikasyon yapılarak Tm değerleri elde edildi. Bunlardan ¹Gen Plaza laboratuvarında referans örneklerle ait melting pikleri Şekil 4.4'te, amplifikasyon grafikleri Şekil 4.5'te, melting curve eğrileri ise Şekil 4.6'da gösterilmiştir.

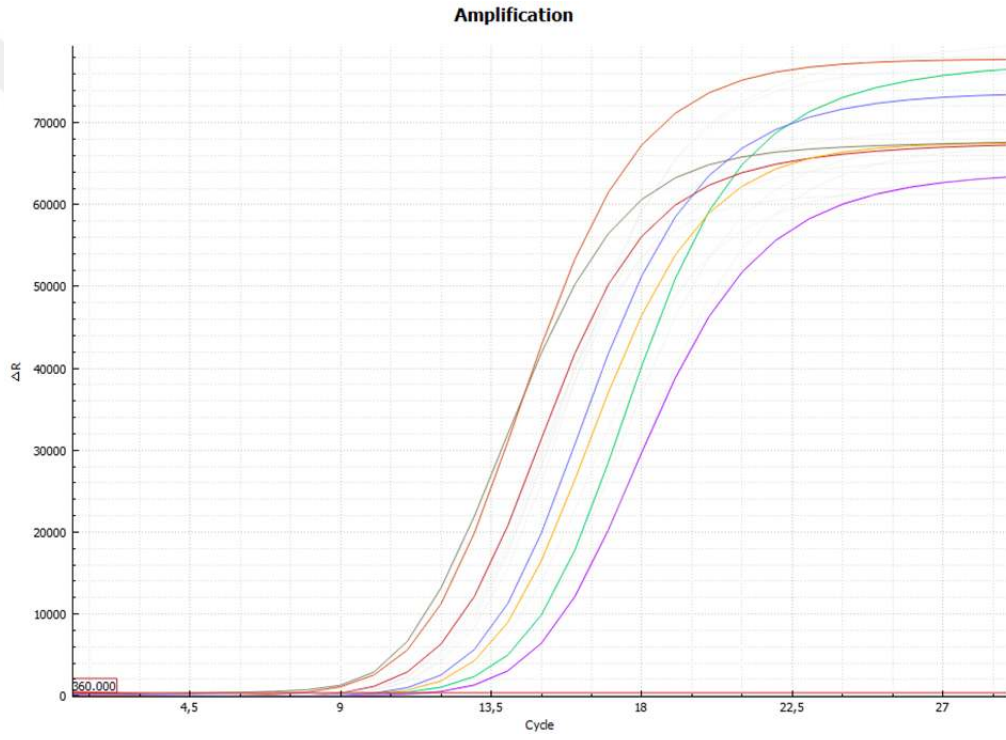
Aynı referans suşlardan izole edilen DNA örnekleri Çukurova Üniversitesi kampüsü içinde bulunan ²Teknokent'de (Kalıtım Sağlık Moleküler Tanı Laboratuvarı) analiz edildi. Her iki laboratuvarında elde edilen Tm değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir. Bu iki laboratuvarında kullanılan primerler ITS2 genini çoğaltmak üzere tasarlandı.



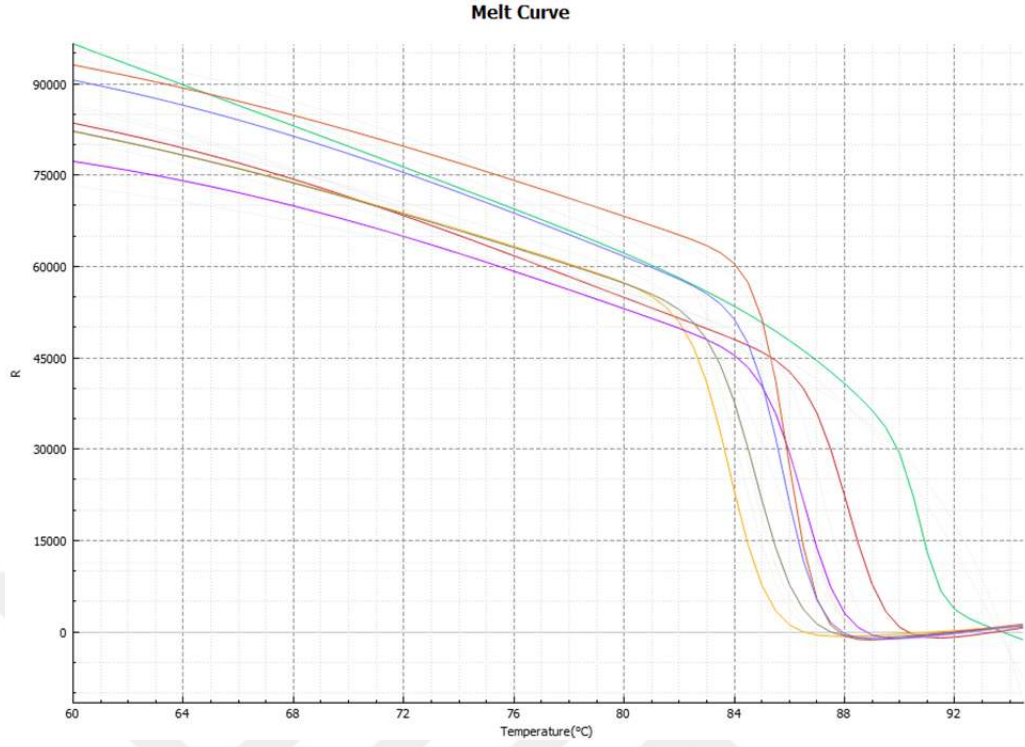
Şekil 4.4. Referans izolatların melting pikleri (her tür için farklı renk kullanıldı).

Çizelge 4.4. RT-PCR ile analizi yapılan referans izolatların T_m değerleri

No	Referans suşlar	Eğrideki renkler	¹ Gen Plaza (T _m) °C	² Teknokent (T _m) °C
1	<i>C. krusei</i>	Açık yeşil	90.7	91.0
2	<i>C. inconspicua</i>	Kırmızı	88.1	88.8
3	<i>C. tropicalis</i>	Sarı	83.7	84.8
5	<i>C. albicans</i>	Mor	86.5	87.1
7	<i>C. parapsilosis</i>	Gri	84.7	85.4
8	<i>C. glabrata</i>	Turuncu	85.9	85.9
10	<i>C. dubliniensis</i>	Mavi	85.7	86.1

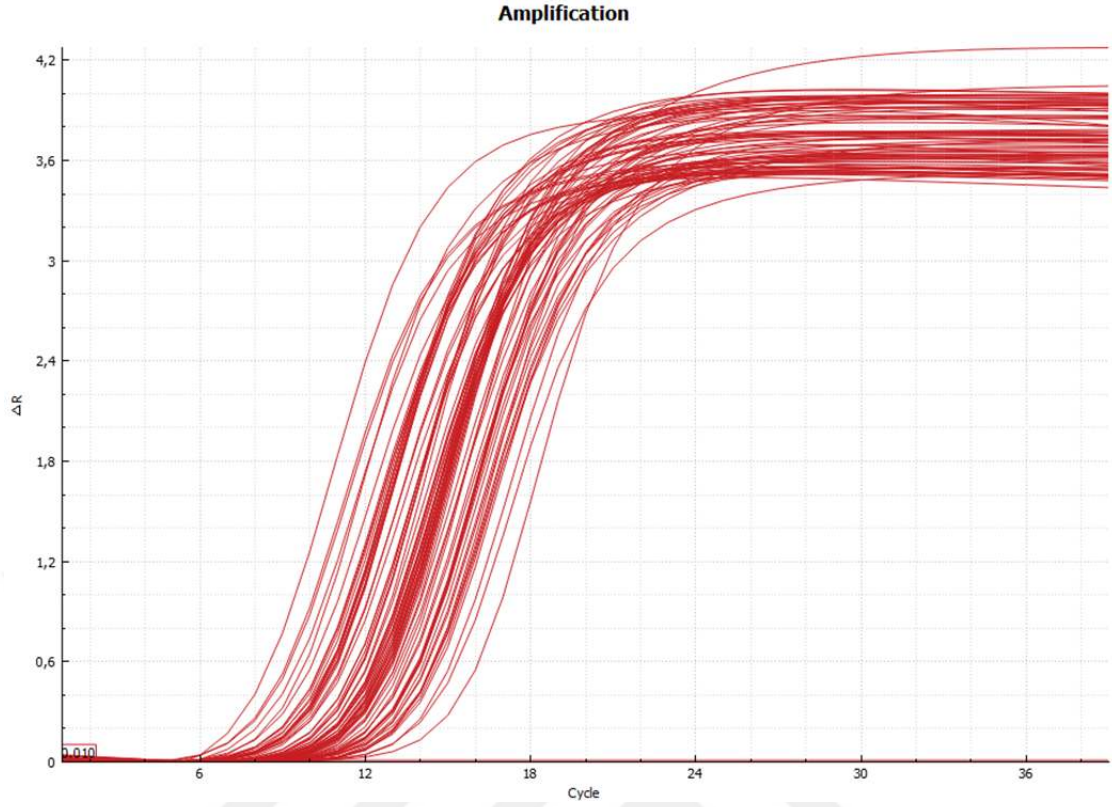


Şekil 4.5. Referans izolatların amplifikasyon grafikleri



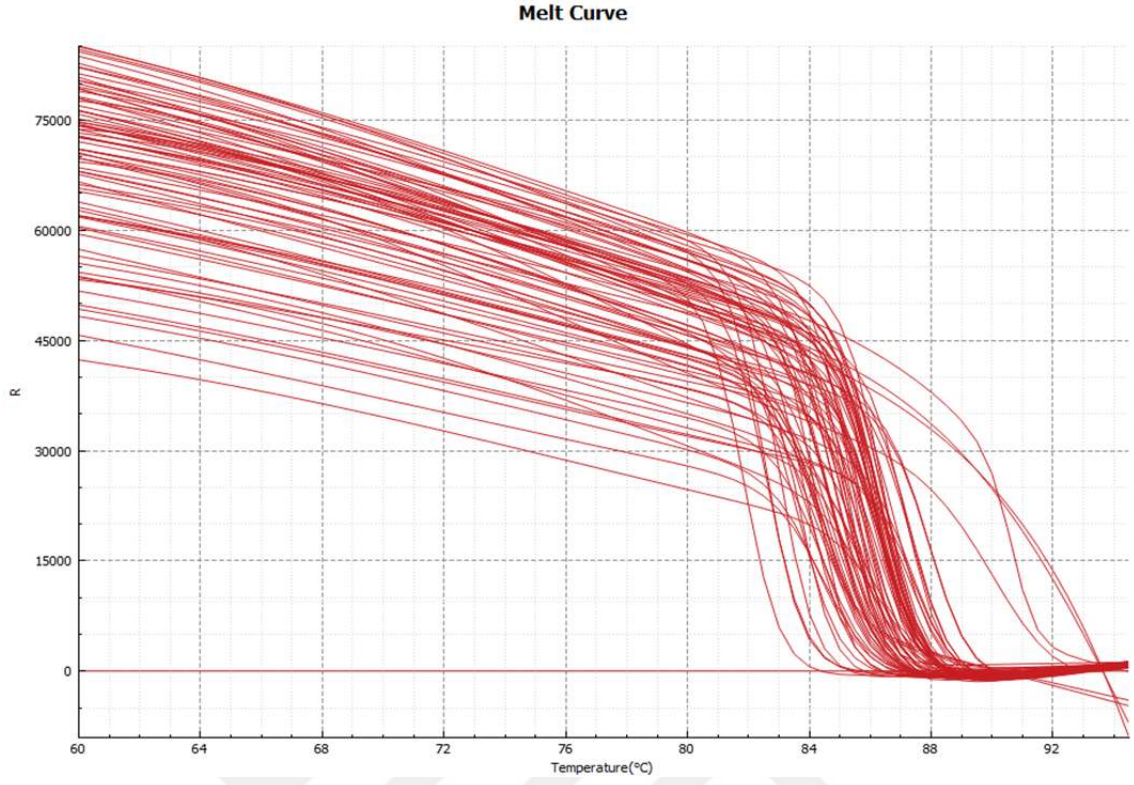
Şekil 4.6. Referans izolatların melting curve eğrileri

DNA izole edildikten sonra referans suşlar ve klinik izolatlar aynı zamanda ve tek seferde analiz edilmiş olup amplifikasyon grafikleri Şekil 4.7’de, melting curve eğrileri Şekil 4.8’de ve melting pikleri Şekil 4.9’da birlikte gösterilmiştir.

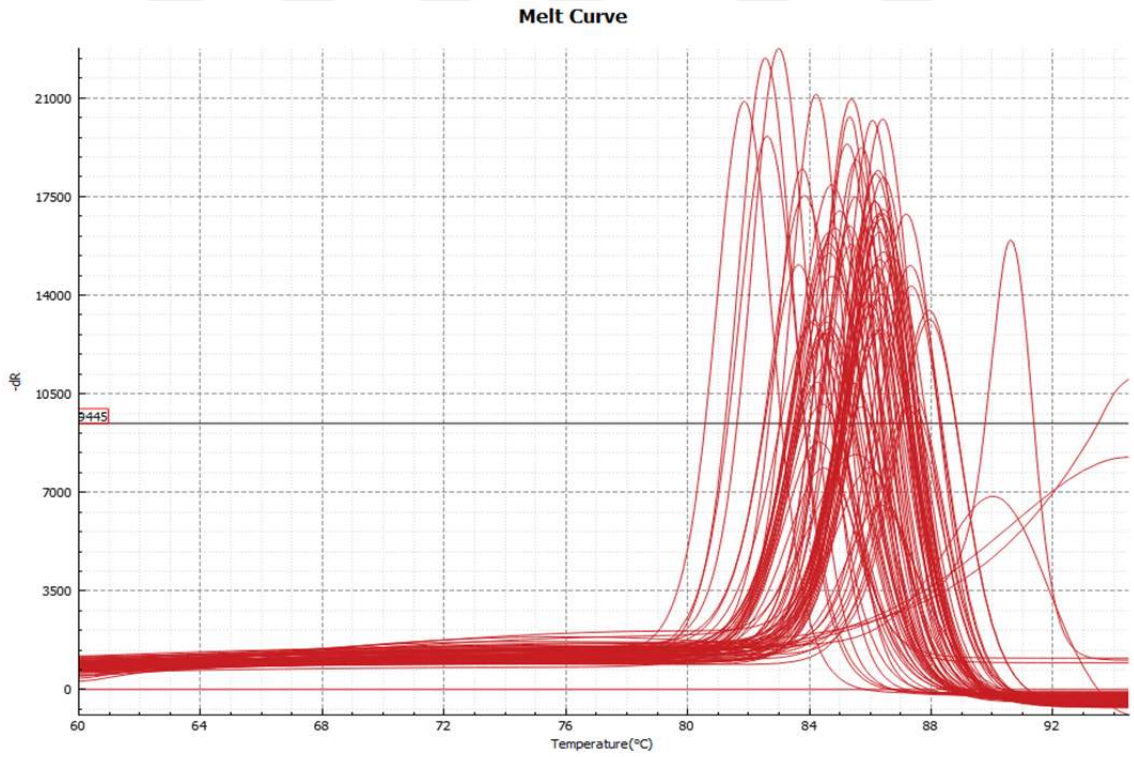


Şekil 4.7. Referans ve klinik izolatların amplifikasyon eğrileri

Referans ve monofungal izolatların iki farklı laboratuvarında (Gen Plaza ve Teknokent) RT-PCR ile analizi edildikten sonra elde edilen T_m değerleri Çizelge 4.5’de birlikte gösterilmiştir. Monofungal ve polifungal *Candida* türleri T_m değerlerine göre gruplandırılıp Çizelge 4.6’de özetlendi. Ancak, *C. lambica* olarak identifiye edilen iki izolat (127 ve 132) ise RT-PCR ile amplifiye olmadığı için Çizelge 4.6’de yer verilmedi.



Şekil 4.8. Referans ve klinik izolatların melting curve eğrileri



Şekil 4.9. Referans ve klinik izolatların melting pikleri

Çizelge 4.5. İki farklı laboratuvarıda RT-PCR ile analizi yapılan örneklerin Tm değerleri

Sıra No	DNA No	GEN PLAZA Tm (°C)	TEKNOKENT Tm (°C)
1	1	90.7	91.0
2	2	88.1	88.8
3	3	83.7	84.8
4	5	86.5	87.1
5	7	84.7	85.4
6	8	85.9	85.9
7	10	85.7	86.1
8	11	85.5	86.1
9	22	85.5	86.2
10	25	86.2	87.1
11	32	86.2	87.0
12	43	85.2	86.2
13	44	85.4	86.2
14	48	86.4	87.1
15	59	86.3	87.1
16	63	86.1	87.0
17	65	86.1	87.1
18	72	86.2	87.1
19	73	87.2	88.0
20	77	86.2	87.1
21	78	85.7	86.4
22	82	86.2	87.0
23	94	86.4	87.0
24	103	85.8	86.2
25	105	86.2	87.1
26	109	86.4	87.2
27	113	86.7	87.1
28	120	87.2	87.9
29	128	86.4	86.9
30	130	86.4	87.0
31	134	86.0	87.1
32	142	84.1	85.5
33	147	84.5	85.5
34	148	84.7	85.5
35	149	84.6	85.6
36	152	84.4	85.6
37	158	84.2	85.6
38	163	84.7	85.6
39	171	86.3	87.0
40	176	86.3	87.1
41	187	86.4	87.2
42	197	84.6	85.5

Çizelge 4.6. Monofungal ve polifungal *Candida* türlerinin RT-PCR ile elde edilen T_m değerleri

DNA No	<i>C. albicans</i> T _m (°C)	<i>C. dubliniensis</i> T _m (°C)	<i>C. inconspicua</i> T _m (°C)	<i>C. kefyr</i> T _m (°C)	<i>C. krusei</i> T _m (°C)	<i>C. lusitaniae</i> T _m (°C)	<i>C. parapsilosis</i> T _m (°C)	<i>C. pararugosa</i> T _m (°C)	<i>C. tropicalis</i> T _m (°C)
11		85.50							
22		85.50							
23			87.90						
25	86.29								
32	86.20								
33	86.29			86.20					
43		85.20							
44		85.40							
48	86.40								
59	86.29								
63	86.09								
65	86.09								
72	86.20								
73						87.20			
77	86.20								
78		85.70							
82	86.29								
87	86.40								
94				86.40					
103		85.79							
105	86.20								
107	86.20							81.79	
109	86.40								
113	86.70								
120						87.29			
127									83.79 L
128	86.40								
130	86.40								
132					90.59 L				
134				86.00					
142							84.09		
147							84.79 84.50		
148							84.70 84.59		
149							84.59		
152							84.40		
158							84.70 84.20		
163							84.70		
169		85.79					84.70		
171	86.29								
175						87.29	84.29		
176				86.29					
181		85.79		86.40					
186	86.40					87.29	84.59		
187	86.40								
189		85.50				87.20	84.20		
190	86.70					87.20	84.40		
195	86.20								
197							84.59		

5. TARTIŞMA

Sunulan çalışmada, sağlıklı gönüllülerin ağız boşluğunda yer alan *Candida* ve diğer maya mantarlarının belirlenmesi yanında *Candida*'ların tür düzeyinde identifikasyon yöntemlerinin; CAC, iki ayrı Real-time PCR ve MALDI-TOF MS yöntemleri kullanılarak karşılaştırılması amaçlandı. Çalışmamızda sağlıklı gönüllülerin konsantre ağız çalkantı suyu örneklerinde maya mantarlarının kolonizasyon oranları %26 (52/200) olup bunların %20.5'i (41/200) monofungal, %5.5'i ise (11/200) polifungal popülasyon idi. Bu kolonizasyon oranları, literatür verilerine kıyasla (%39–%58.6) daha düşük bulundu (41–45). Buna karşılık, Yang ve ark. 323 sağlık bölümü öğrencileri ve personelleri ile yaptıkları çalışmada, sonuçlarımıza kıyasla daha düşük (%15.3) oranda maya kolonizasyonu bildirmişlerdir (46).

Katılımcıların Diş Hekimliği Fakültesi öğrencileri olması sebebi ile ağız ve diş temizliği konusundaki hassasiyet ve alışkanlıkları daha düşük izolasyon oranına sebep olmuş olabilir. Aynı zamanda, literatürde ağızda maya kolonizasyonunu belirlemek için ağız çalkantı suyu (42,43), konsantre ağız çalkantı suyu (45), tükürük (41) ve steril sürüntü çubukları (44,46) ile örneklerin alındığını bildiren çalışmalar mevcuttur. Klinik örnek alma yöntemlerinin izolasyon oranlarını etkileyebileceği de belirtilmiştir (47).

Ağız florası; sigara kullanımı, diş fırçalama sıklığı gibi hijyen alışkanlıkları ve ağız içi aparat kullanımı gibi birçok değişkenden etkilenmektedir. Özellikle sigara kullanımının ağız içi *Candida* kolonizasyonu üzerine etkileri tartışma konusu olmuştur. Sigara kullanımının ağızda nötrofil aktivitesini ve antimikrobiyal etkinlik gösteren tükürük miktarını azaltmasının ağız içi *Candida* kolonizasyonunu artırdığı düşünülmektedir (47). Mun ve ark sigara içenlerde ağız içi *Candida* kolonizasyonunun içmeyenlere kıyasla yedi kat fazla olduğu bildirmişlerdir ($P = 0.034$) (43). Ağız içi *Candida* kolonizasyonu ile sigara tüketimi arasında anlamlı ilişki sunan çalışmalara karşılık (43,44), çalışmamıza benzer olarak istatistiksel farklılık görülmeyen çalışmalar da bildirilmiştir (41,42,45). Ağız içi hijyen alışkanlıkları (diş fırçalama sıklığı, diş macunu seçimi, aparat kullanımı gibi) mikroorganizma yükünü ve virülansına etki ederek ağız sağlığının korunmasına katkı sağlar (47). Çalışmamızda diş fırçalama alışkanlığı, diş taşı varlığı ve gece plağı kullanımı gibi değişkenlerin kolonizasyon üzerine anlamlı bir etkisi belirlenmemesine karşılık, diş macunu seçiminin anlamlı bir fark oluşturduğu

görüldü ($P=0.02$). Bu durumun sebebi farklı markaların farklı aktif bileşen ve konsantrasyonları olabilir (48).

Sağlıklı insanların ağız florasında maya mantarları da dahil olmak üzere birçok mikroorganizma denge ve uyum içindedir. Bu denge halinin (i) immunsupresyon, (ii) antibiyotik kullanımı ve (iii) farklı beslenme alışkanlıkları gibi durumlarda bozulması maya mantarlarının kolonizasyonuna veya ağız içi kandidoza sebep olabilir (47). *Candida albicans* ağız boşluğundan ve diğer mukozal yüzeylerinden en sık izole edilen *Candida* türüdür (47,49). Çalışmamızda izole edilen mantar türlerinden %32.4'ü (22/68) *C. albicans* idi. Benzer çalışmalarda, bizim sonuçlara kıyasla daha yüksek (%48–89) *C. albicans* oranları bildirilmiştir (41–45). Söz konusu çalışmalarda identifikasyon amacıyla yalnızca fenotipik yöntemlerin kullanılması *albicans*-dışı *Candida* türlerinin yanlışlıkla *C. albicans* olarak tanımlanmasına sebep olmuş olabilir.

Örnek olarak, *C. dubliniensis*'in bazı fenotipik özellikleri (Mısır unlu-Tween 80 agarda klamidiospor oluşturması ve germ-tüp testinin pozitif olması gibi) *C. albicans*'a benzer ve esasen taksonomik olarak yakın ilişkili bir başka türdür. İlk olarak AIDS hastalarında oral kandidoz ile ilişkili olarak bildirilmiştir. Kromojenik besiyerinde de *C. albicans*'a kıyasla daha koyu yeşil renkte koloniler oluşturur (50). Rivera ve ark. 96 sağlıklı gönüllünün konsantre ağız çalkantı suyunda maya kolonizasyonunu inceledikleri çalışmalarında izole edilen maya kolonilerini 28S rRNA sekans analizi ile tanımladıklarında en sık izole edilen üç türü, sırası ile *C. albicans* (%52.0), *C. parapsilosis* (%17.9) ve *C. dubliniensis* (%7.5) olarak bildirmişlerdir (45). Bu sonuçlar, çalışmamızda elde edilen %13.2'si (9/68) *C. dubliniensis* izolasyon oranı ile uyumludur. Ancak, ağızda maya kolonizasyonunu irdeleyen başka çalışmalarda ise *C. dubliniensis* bildirilmemiştir (41,42,44). Bu durum, söz konusu çalışmalarda tür tanımlamalarının yalnızca fenotipik yöntemlerle yapılması ile de açıklanabilir.

Klinik örneklerden izole edilen *albicans*-dışı *Candida* türlerinden biri de *C. parapsilosis* olup özellikle kandidemilerde en sık rastlanan ikinci *Candida* türü olarak bildirilmektedir (49,51,52). Özellikle, flukonazol dirençli *C. parapsilosis* ülkemiz için giderek büyüyen bir sorundur (52). Çalışmamızda, *C. albicans*'ı takiben en sık izole edilen tür *C. parapsilosis* (%19.1, 13/68) idi. *Candida parapsilosis* deride flora üyesi olup sağlık çalışanlarının elleri aracılığı ile (horizontal bulaş) yayıldığı ve hastane infeksiyonlarına sebep olduğu düşünülmektedir. Biyofilm oluşturma gibi bazı virülans

özelliklerinin katkısıyla parenteral beslenenlerde kateter ve benzeri yüzeylerde önce kolonize olup daha sonra enfeksiyona sebep olduğu bilinmektedir (51,53). Virülans özellikleri ayrıntılı olarak tanımlanan *C. parapsilosis*'in son yıllarda Y132F mutasyonu bulunan izolatlarında artış görülmesi flukonazol direnci ve mortalite artışı ile ilişkili olduğu gösterildiğinden klinik örneklerden yüksek oranda izole edilmesi endişe vericidir (52,53).

Çalışmamızda 11 (%5.5) katılımcıda polifungal populasyon belirlendi. Rivera ve ark. 96 sağlıklı katılımcıda polifungal populasyon oranını da (en çok *C. albicans* + *C. parapsilosis*) %21.8 olarak bildirmişlerdir (45). Bu oran, benzer bazı çalışmalarda ise %7.1–11.2 olarak bildirilmiştir (41–43). Çalışmamızda baskın birliktelik olarak tarif edebileceğimiz bir tür dağılımı dikkati çekmedi, ancak önceki verilere kıyasla polifungal populasyon oranı daha düşük idi. Ayrıca, *C. albicans* ve *C. glabrata*'nın birlikte kolonizasyonunun ağız epiteline invazyonu ve doku hasarını artırdığı önceki çalışmalarda bildirilmiştir (47,54). Bununla birlikte, diğer mantar türlerinin bir arada bulunmasının virülans özelliğine katkısı üzerine daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Rivera ve ark. aynı kişide birden fazla sayıda mantar kolonizasyonunun ağız içi aparat kullanımı ($p=0.016$) ve kötü ağız hijyeni (O'Leary index, $p=0.012$) ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (45).

Çalışmamızın sonuçlarımıza benzer olarak Yang ve arkadaşları polifungal populasyon oranını %6.1 olarak bildirmişlerdir (46). Bu durumun, seçilen örneklem grubunun ağız ve diş bakımı konusunda görece bilinçli bir populasyon olması ile açıklanabileceği düşünülmüştür. Wang ve ark. ağız içi kandidozu şüphesi olmayan sağlıklı ve hastanede yatan toplam 1.799 kişiden steril pamuklu çubukla ağız sürüntü örnekleri aldıkları çalışmada katılımcıların 415'inde (%23.1) maya kolonizasyonunu rapor etmişlerdir. ITS gen analizi sonucunda en sık izole edilen türler *C. albicans* (%42), *C. tropicalis* (%20), *C. glabrata* (%5.5) ve *C. parapsilosis* (%4.1) olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda tanımlanan maya türlerinin dağılımına yaş, doğum yeri, ikametgâh yeri ve mevcut sağlık durumu gibi faktörlerin katkıda bulunduğu, ancak cinsiyet ve etnik kökenin etki etmediğini bildirmişlerdir (55). Sonuç olarak, izole edilen türlerin dağılımı, çalışma populasyonlarına ve kullanılan tür tanımlama yöntemlerine göre farklılık gösterebilir.

CAC besiyeri tek plakta izolasyona ek olarak koloni renk ve şekillerinin değerlendirilmesiyle bazı maya mantarlarının (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata*) hızlı identifikasyonuna olanak sağlar. Aynı zamanda bu besiyerinin kullanımı farklı türden kolonilerin bir arada olduğu klinik örneklerde polifungal populasyonları tanımlama kolaylığı sunar (56,57). CAC besiyerinin performansı, farklı klinik örnekler ve inkübasyon süreleri ile ilgili literatürde çalışmasında değerlendirilmiştir (24,58). Her ne kadar CAC besiyerinin kılavuzunda *C. dubliniensis* için renk tanımlaması yer almasa da özellikle ilk izolasyonda ve taze pasajlarda koyu yeşil renk oluşumu ile bildirilmiştir (50,57). Özellikle fenotipik olarak benzer bu iki yakın ilişkili türün ayırımında CAC besiyerinin kullanımı ve dikkatli değerlendirilmesi ile *C. dubliniensis*'in olası tanımlanamama sorunu giderilecektir. Ayrıca, *C. parapsilosis*'in klinik örneklerden izole edilen en sık türlerden biri olmasına karşılık, CAC besiyerinde özgül renk oluşturmaması bu besiyerinin kullanımını sınırlayıcı bir özelliktir. Ayrıca, kültürlerin değerlendirilmesi sırasında farklı morfolojilerde göz önünde bulundurulmalı ve değerlendirilmelidir.

Klinik öneme sahip maya mantarlarının hızlı ve doğru tanımlanması erken tanı ve tedaviye olanak sağlar. Bu sebeple tür tanımlamasında tercih edilmesi gereken yöntemin güvenilir olması süregelen bir ihtiyaçtır. Son yıllarda tür tanımlamasında kolay ve hızlı uygulanabilir, tekrarlanabilir ve yüksek doğruluk değerine sahip olan MALDI-TOF MS yönteminin kullanımı yaygınlaşmaktadır (59,60). MALDI-TOF MS, özellikle maya mantarlarının tür düzeyinde tanısında başarılı bir yöntem olup tanımlama için log-skor değerlerinin 1.7'ye dek düşürülebileceği bildirilmiştir (60,61). Sow ve arkadaşları 218 maya izolatının identifikasyonunda konvansiyonel yöntemler (germ-tüp testi, Mısır unlu-Tween 80 agarda yapısal özelliklerin değerlendirilmesi ve API 20C kiti) ile MALDI-TOF MS yönteminin tür düzeyinde tanımlamalarını karşılaştırmışlardır. Konvansiyonel yöntemlerle 208 (%95.4) izolatı, MALDI-TOF MS yöntemi ile de 214 (%98.1) izolatı doğru tanımlanmışlardır. Ayrıca, konvansiyonel yöntemlerle tür düzeyinde tanımlamaya (24–48 saat) kıyasla MALDI-TOF MS yönteminin daha kısa sürede sonuç vermesi (1 saat) ve izolat başına maliyetinin daha ucuz olması vurgulanmıştır (61,62). MALDI-TOF MS yönteminin, maya mantarlarının identifikasyonunda %90'ın üzerinde özgüllüğe sahip olduğu bildirilmiştir (63). Ancak,

Aspergillus ve *Mucorales* gibi küf mantarlarının identifikasyonunda bu yöntemin tanı değeri sınırlı olup güvenilir değildir (59,64).

Arastehfar ve ark. referans yöntem olarak D1/D2 rDNA dizi analizini kullanarak MALDI-TOF MS yöntemi ile tanımlamaya kıyasla API 20C AUX ve 21-plex PCR yöntemlerinin doğruluk ve kolay uygulanabilirliklerini karşılaştırdıkları çalışmalarında, MALDI-TOF MS yönteminin 301 maya izolatının %98.3'ünü, en sık görülen beş *Candida* türünün (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*) ise tamamını (%100) doğru tanımladığını göstermişlerdir. Bu oranlar API 20C AUX için %83.7 ve %97.2, 21-plex PCR için %87.3 ve %100 şeklinde bildirilmiştir. Yöntemlerin izolat başına tanımlama maliyetlerinin karşılaştırılmasında ise MALDI-TOF MS yöntemi (0.3 Euro'dan az) en ucuz olup diğer yöntemler sırası ile 21-plex PCR 3 Euro ve API 20C AUX 5.9 Euro olarak bulunmuştur.

MALDI-TOF MS yöntemi yüksek doğruluk oranına sahip maliyet-etkinlik yönünden uygun bir yöntemdir. Ayrıca, 21-plex PCR yöntemi de hızlı sonuç vermesine ek olarak doğruluk değerleri kabul edilebilir olduğundan güvenilir bir tanımlama yöntemi olabilir (65).

Candida türlerinin moleküler tanısı PCR-RFLP yöntemi ile yıllar önce başlamıştı. Bu yöntemde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edilen hedef genlerin (ITS1 veya ITS2) restriksiyon enzimleri ile inkübasyonunu takiben agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılıp etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole alanda görüntüsü alınır. PCR-RFLP ile bazı türlerin ayırt edilmesi için restriksiyon enzimlerinin sınırlı olması yanında jel hazırlanması ve boyanması gibi çok basamaklı işlemler bulunmaktadır (66,67). Bu yöntemin ayırıcı tanıda yetersizliği yanında zaman alıcı ve maliyeti sebebiyle hastanelerin rutin laboratuvarında tercih edilmez.

PCR temelli yöntemler ile birden fazla *Candida* türüne özgü primerlerin kullanılması sonucunda multipleks PCR testi geliştirilmiştir. İlk aşamada geniş özgüllüğü olan primer çifti ile mantarın ITS bölgesi çoğaltılır. Daha sonra PCR ürünü türe özgül primerler ile tekrar reaksiyona sokulup, amplikonların agaroz jel üzerinde farklı bantlar oluşturması izlenir. Mantar ve diğer mikroorganizmalara bağlı yalancı pozitifliği ortadan kaldıran bu yöntem ile aynı gün içerisinde birden fazla mantarın tür düzeyinde tanısı doğru ve güvenilir bir şekilde yapılmaktadır (32–34).

Real-time PCR cihazları amplifiye olan DNA miktarını işlem sırasında floresan işaretli problemlerle hibridizasyon sonucu tespit edebildiği gibi DNA molekülüne bağlanan SYBR® Green gibi boyalar ile de yapabilmektedir (68). Boya problemlerden çok daha ucuz olmasına rağmen çift zincir DNA molekülüne non-spesifik bağlanması gibi sakıncaları da vardır (69). RT-PCR sonrası melting curve analizi (MCA) yapılarak bu sorunun üstesinden gelinebilmektedir. Günümüzde RT-PCR için hazırlanmış hidroliz ve hibridizasyon problemleri içeren tanı kitleri *Candida*'ların rutin analizi için kullanılmaktadır (70). Son yıllarda, MCA ile *Candida* türlerinin belirlenmesi daha çok tercih edilmektedir. RT-PCR cihazı ile amplifikasyondan sonra sıcaklık yükseltilerek ampliconların erime noktası (T_m) belirlenebilir. T_m değeri, PCR sonucu elde edilen çift zincir DNA moleküllerinin yarısını tek zincir DNA moleküllerine dönüştürdüğü ısı değeridir (71). MCA yöntemi ile analizini yaptığımız 9 *Candida* türünün T_m değerleri Çizelge 5.1'de gösterilmiştir. Bu çizelgede üç farklı grubun yaptığı çalışmada elde edilen T_m değerleri ile bizim sonuçlar karşılaştırıldığında MCA'nın doğru bir seçim olduğu sonucuna varılabilir (35,36,71). RT-PCR'dan sonra erime sıcaklığı analizi (MTA= melting temperature analysis) ile Decat ve arkadaşları ITS2 bölgesine özgü primerler kullanarak RT-PCR MTA ile kültürü yapılmış 16 *Candida* türünü aynı gün içerisinde birbirinden ayırt etmeyi başarmıştır (72).

Çizelge 5.1. Bu çalışma ile diğer kaynaklarda yer alan RT-PCR-MCA sonuçları birlikte gösterilmiştir.

Sıra No	<i>Candida</i> türleri	MCA Gen Plaza T _m	MCA Teknokent T _m	MCA Somogyvari (36) T _m	MCA Gutzmer (35) T _m	MCA Horvath (71) T _m
1	<i>C. krusei</i>	90.7	91.0	90.8	91.5	89,8
2	<i>C. inconspicua</i>	88.1	88.8	88.0	-	
3	<i>C. lusitaniae</i>	87.2	87.2	86.1	-	
4	<i>C. albicans</i>	86.5	87.1	87.1	87.5	87.1
5	<i>C. kefyr</i>	86.4	86.4	-		
6	<i>C. glabrata</i>	85.9	85.9	84.9	86.3	
7	<i>C. dubliniensis</i>	85.7	86.1	85.5		85.5
8	<i>C. parapsilosis</i>	84.7	85.4	85.4	84.9	85.4
9	<i>C. tropicalis</i>	83.7	84.8	84.5	84.7	84.5

Son yıllarda HRMA (High Resolution Melting Analysis) yöntemi Mikrobiyoloji disipliniinde sıklıkla kullanılmaktadır (73). PCR ile elde edilen amplicondaki G-C

miktarı (%) arttıkça erime sıcaklığı (T_m) da yükselmekte olup amplikondaki tek baz değişimi dahi HRMA yöntemi ile belirlenmektedir. Bu yöntemde yüksek konsantrasyonda DNA polimerazı (Taq Polymerase) inhibe etme özelliği olmayan, çift zincir DNA molekülüne çok iyi bağlanabilen özel boyalar (LCGreen® ve EvaGreen® gibi) kullanılır. HRMA ile ampikon boyunu da hesaba katan geliştirilmiş software ile erime sıcaklığı belirlenir. RT-PCR-HRMA özellikle nokta mutasyonlarının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle kısa ampikonlarda (50–300 bp) güvenilir sonuçlar alınırken uzun PCR ürünlerinde çoklu melting pikleri elde edilmekte olup kesin tanıyı güçleştirmektedir (73,74).

Günümüzde bazı araştırmacılar *Candida* türlerini belirlemek için RT-PCR HRMA yöntemini tercih etmektedir (36,75–78). Nemcova ve ark. RT-PCR HRMA yöntemi ile bir çift primer kullanarak 25 mantar türünü analiz etmiş ve bunlardan 9 *Candida* türü için aldığı sonuçlar Çizelge 5.2.'de gösterilmiştir (76). Her *Candida* türünün T_m değeri bizim RT-PCR MCA ile bulduğumuz T_m değerlerinden yaklaşık 4 derece daha düşük olup, bu durum yöntem farkından kaynaklanmaktadır. Ancak, Somogyvari ve ark. HRMA yöntemini kullanarak 8 mantar türü için elde ettiği T_m değerleri de Çizelge 5.2.'de verildi ve diğer HRMA sonuçlarından 2°C kadar farklı olduğu açıkça görüldü (36). Bu farkın kullanılan PCR master mix ve değerlendirmeyi yapan programdan (software) kaynaklandığı bilinmektedir. Çok geliştirilmiş bir program (software) ile sonuçların değerlendirildiği HRMA yönteminde her türün T_m derecesi MCA yönteminden daha düşük hesaplanarak 90°C üzerindeki T_m değerlerine sahip *Aspergillus* türlerinden kolayca ayrılabilmesi ise büyük bir avantaj sağlamaktadır (8,368).

Çizelge 5.2. Sunulan çalışmada bulunan RT-PCR MCA sonuçları ile iki farklı grubun ulaştığı HRMA sonuçları birlikte gösterilmiştir.

Sıra No	Candida türleri	Somogyvari ve ark.(35) HRMA	Nemcova ve ark.(76) HRMA			Bu çalışma MCA	
			Tm	PCR (b.ç.)	GC%	Tm farkı	Tm
1	<i>C. krusei</i>	88.6	86.6	336	55	4.1	90.7
2	<i>C. inconspicua</i>	86.4	84.6	295	52	4.1	88.1
3	<i>C. lusitaniae</i>	85.4	83.6	244	50	3.6	87.2
4	<i>C. albicans</i>	84.5	82.9	326	47	3.6	86.5
5	<i>C. kefyr</i>	—	82.6	422	46	3.8	86.4
6	<i>C. glabrata</i>	83.2	81.7	408	46	4.2	85.9
7	<i>C. dubliniensis</i>	83.5	82.0	331	46	3.8	85.7
8	<i>C. parapsilosis</i>	82.6	81.5	300	43	3.2	84.7
9	<i>C. tropicalis</i>	81.8	79.4	317	40	4.4	83.7

Bu çalışmada, MALDI-TOF MS ile 10 farklı *Candida* türü belirlendi, ancak *C. lambica* olarak tanımlanan iki klinik örneğin DNA'sı RT-PCR ile amplifiye edilemedi. Nemcova ve arkadaşları da aynı primer çifti ile RT-PCR HRMA yöntemiyle *C. lambica*'nın amplifiye olmadığını bildirmiştir (76). Yazarlar, *C. lambica* referans izolatını HRMA ile tanımlamış, ancak üç klinik izolatın amplifiye edilememesini primer bağlanma yöresindeki dizi değişikliğine bağlamıştır (76,79).

Sunulan çalışmada, literatürde de olduğu gibi, HRMA ve MCA yöntemi ile Tm değerlerinin çok yakın olduğu türlerin ayrımı yapılamadı. Şöyle ki; *C. albicans* ve *C. kefyr* aynı Tm derecelerine (°C) sahip olduğu için CAC besiyerinde farklı renkte koloni oluşturmaları sebebi ile tanı konuldu ve sonuç MALDI-TOF MS ile doğrulandı. Bu iki yöntemin reaktifleri ucuz, her RT-PCR cihazına uygun ve kısa sürede sonuç vermesi sebebi ile son yıllarda pek çok rutin analizlerde tercih edilmektedir (36,80,81).

Bu tez çalışmasında referans izolatlardan faydalanarak reaksiyon koşulları (PCR) optimize edildikten sonra klinik örneklerin önce CAC ile hem mantar kültürü yapıldı hem de üç *Candida* türü (*C. albicans*, *C. dubliniensis* ve *C. krusei*) ön tanı düzeyinde belirlendi. Kolonilerden izole edilen DNA ile *C. lambica* hariç tüm izolatların Tm değerleri belirlendi ve tür analizleri yapıldı. Ayrıca, *C. albicans* ve *C. kefyr*, Tm değerlerine göre ayırt edilemedi. MALDI-TOF MS sonuçları ile karşılaştırıldığında RT-PCR yönteminin *C. albicans*, *C. kefyr* ve *C. lambica* tanısı için

güvenilir olmayacağı anlaşıldı. Bu sebeple *Candida* cinsi maya mantarlarını laboratuvar tanısında polifazik ayrımın önemi anlaşıldı ve özenle vurgulanmasına ihtiyaç duyuldu.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Sunulan çalışmada, *Candida* izolatlarının identifikasyonunda referans olarak MALDI-TOF MS yöntemi kullanıldı ve sonuçları CAC besiyeri ve iki ayrı RT-PCR yöntemi ile karşılaştırıldı. *Candida*-dışı maya mantarlarının RT-PCR ile identifikasyonu hedeflenmedi ve çalışılmadı.
2. Katılımcılardan alınan 200 konsantre ağız çalkantı suyu örneğinin mantar kültürleri yapıldı. Çalışmada, 52 (%26) klinik örnekten toplam 68 maya mantarı izole edildi.
3. Ağız içerisinde maya mantarlarının varlığını kullanılan diş macunu markasının etkilediği ($P=0.02$) belirlendi.
4. Kültür-pozitif 52 klinik örneğin, 41'inde (%78.8) monofungal ve 11'inde (%21.2) polifungal populasyon görüldü. Polifungal üremelerin 6'sında iki farklı maya türü ve 5'inde ise üç farklı maya türü vardı.
5. Bu 68 maya mantarından 61'i (%89.7) *Candida* spp. olup izole edilen türler, sıklığa göre, 22 *C. albicans* (%36.1), 13 *C. parapsilosis* (%21.3), 9 *C. dubliniensis* (%14.7), 6 *C. lusitaniae* (%9.8), 5 *C. kefyr* (%8.2), 2 *C. lambica* (%3.3) ve 4 (%6.6) diğer *Candida* türleri [1 *C. krusei*, 1 *C. tropicalis*, 1 *C. inconspicua* ve 1 *C. pararugosa*] idi.
6. Çalışmada MALDI-TOF MS ile identifiye edilen *Candida*-dışı diğer maya mantarları ise *Yarrowia lipolytica* ($n=1$), *Saccharomyces cerevisiae* ($n=2$), *Hanseniaspora opuntiae* ($n=2$) ve *Wickerhamomyces anomalus* ($n=2$) idi.
7. CAC besiyerinde bir *C. tropicalis* kökeni yeşil koloni oluşturdu ve yanlış olarak *C. albicans* olarak identifiye edildi.
8. Referans suşlardan hazırlanan DNA örnekleri her PCR çalışmasında kontrol amacı ile mutlaka kullanılmalıdır.
9. Öncelikle, real-time PCR yöntemleri optimize edildi ve (kendi aralarında karşılaştırması yapıldıktan sonra) MALDI-TOF MS sonuçları ile karşılaştırıldı. Real-time PCR'ın *C. albicans*, *C. kefyr* ve *C. lambica* dışındaki türler için doğru ve sonuçlarının uyumlu olduğu görüldü.

10. Şöyle ki; RT-PCR yöntemi ile çalışmada izole edilen dokuz *Candida* türünden altısı Melting Curve Analizi (MCA) yöntemi ile tür düzeyinde tanımlandı, ancak iki tür, *C. albicans* ve *C. kefyr*, melting curve analizine göre (T_m) birbirlerinden ayırt edilemedi.
11. Ayrıca, *C. lambica* izolatlarının primer bağlanma bölgelerindeki baz değişikliği sebebi ile hem MCA hem de HRMA ile tanımlanması mümkün olmadı.
12. Klinik izolatlardan *Candida* identifikasyonu için öncelikle kromojenik bir besiyeri ile kültür yapılmalı, RT-PCR MCA sonuçları kültür sonuçları ve mümkünse MALDI-TOF MS ile birlikte değerlendirilmelidir.
13. *Candida* cinsi maya mantarlarının tür tanısında polifazik yöntemler önerilmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. **Caceres DH, Mohd Tap R, Alastruey-Izquierdo A, Hagen F.** Detection and Control of Fungal Outbreaks. *Mycopathologia*. **2020**;185(5):741-745. doi: 10.1007/s11046-020-00494-1.
2. **Hawksworth DL, Lücking R.** Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr*. **2017**;5(4). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016.
3. **Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW.** Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. *J Fungi* **2017**;3.5. doi: 10.3390/jof3040057.
4. **Hilmioglu-Polat S, Seyedmousavi S, Ilkit M, Hedayati MT, Inci R, Tumbay E, et al.** Estimated burden of serious human fungal diseases in Turkey. *Mycoses* **2019**;62:22-31. doi: 10.1111/myc.12842.
5. **Uçak SC, Satana D.** *Candida glabrata*: Laboratory diagnosis and microbiological characteristics, epidemiology, virulence factors and clinical diseases. *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi* **2021**; 4(1): 31-39. doi:10.26650/JARHS2021-795999.
6. **Dendis M, Horváth R, Michálek J, Růžicka F, Grijalva M, Bartos M, Benedík J.** PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clin Microbiol Infect*. **2003**;9(12):1191-202. doi: 10.1111/j.1469-0691.2003.00719.x.
7. **Ayhancı T, Altındış M.** Hızla yayılan çoklu ilaca dirençli maya mantarı: *Candida auris*. *Türk Hij Den Biyol Derg*, **2020**; 77(1): 123-136. doi:10.5505/TurkHijyen.2019.26879.
8. **Zhang J, Hung G-C, Nagamine K, Li B, Tsai S and Lo S-C.** Development of *Candida*-Specific Real-Time PCR Assays for the Detection and Identification of Eight Medically Important *Candida* Species. *Microbiology Insights* **2016**;9; 21-28. doi:10.4137/MBI.S38517.
9. **Consortium Opathy, Gabaldon T.** Recent trends in molecular diagnostics of yeast infections: from PCR to NGS. *FEMS Microbiology Rev*. **2019**;1;43(5) 517-547. doi: 10.1093/femsre/fuz015.
10. **Gülmez D, Alp S.** Classical Methods and New Developments in Laboratory Diagnosis of Fungal Infections. *Flora* **2021**;26(1):34-49. doi: 10.5578/flora.20219904.
11. **Yıldıran ŞT.** Kandidoz. Ed. Tumbay E. Tıbbi Mikoloji, Tıbbi Mikoloji Derneği Yayını No:2, İzmir **2021**.
12. **Kullberg BJ, Arendrup MC.** Invasive Candidiasis. *N Engl J Med*. **2015**;8;373(15):1445-56. doi: 10.1056/NEJMr1315399.
13. **Barnett JA.** A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*. *Yeast*. **2008**;25(6):385-417. doi: 10.1002/yea.1595.
14. **Yücel A, Kantarcıoğlu S.** Some important changes in taxonomy of *Candida albicans*. *Cerrahpaşa J Med*. **1999**; 30 (3): 236-246.
15. **Deorukhkar SC, Roushani S.** Identification of *Candida* Species: Conventional Methods in the Era of Molecular Diagnosis. *Ann Microbiol Immunol*. **2018**; 1(1): 1002.
16. **Odds FC.** *Candida* infections: an overview. *Crit Rev Microbiol*. **1987**;15(1):1-5. doi: 10.3109/10408418709104444.
17. **Yıldırım ŞT ve Gümral R:** Larone'un Tıbbi önemi olan mantarlar. Walsh TH, Hayden RT and Larone DH: Larone's Medically Important Fungi. Hipokrat Yayınevi Ankara, **2020**.

18. **Kathuria S, Singh PK, Sharma C, Prakash A, Masih A, Kumar A, Meis JF, Chowdhary A.** Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: characterization by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method. *J Clin Microbiol* **2015**;53:1823-1830. doi:10.1128/JCM.00367-15.
19. **Millsop JW, Fazel N.** Oral Candidiasis, *Clin Dermatol.* **2016**;34(4):487-94. doi: 10.1016/j.clindermatol.2016.02.022.
20. **Liguori G, Lucariello A, Colella G, De Luca A, Marinelli P.** Rapid identification of *Candida* species in oral rinse solutions by PCR. *J Clin Pathol.* **2007**;60(9):1035-9. doi: 10.1136/jcp.2006.040782.
21. **Liguori G, Di Onofrio V, Lucariello A, Gallé F, Signoriello G, Colella G, D'Amora M, Rossano F.** Oral candidiasis: a comparison between conventional methods and multiplex polymerase chain reaction for species identification. *Oral Microbiol Immunol.* **2009**;24(1):76-8. doi: 10.1111/j.1399-302X.2008.00447.x.
22. **Bulut G, Sorguç Y.** Oral *Candida* Sıklığı ve Türlerinin Şiddetli Erken Çocukluk Çağı Çürüğü ile İlişkisi: Mikrobiyolojik İn-Vivo Çalışma. *İzmir Dr. Behçet Uz Çocuk Hast. Dergisi* **2020**;10(3):219-24. doi:10.5222/buchd.2020.09475.
23. **Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ.** Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers.* **2018**;11;4:18026. doi: 10.1038/nrdp.2018.26.
24. **Chaabaawi A, Sucu M, Sultan Karakoyun A, Ünal N, Kara E, İlkit M.** Gebelerde *Candida* vajinitinin epidemiyolojisi. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg.* **2022**;52(2):109-118. doi:10.54453/TMCD.2022.82621.
25. **Gülaşi S, Çelik Ü.** Yenidoğanda Fungal Enfeksiyonlar. *J Pediatr Inf* **2016**;10:143-50). doi: 10.5152/ced.2016.2293.
26. **Rowen JL.** Mucocutaneous candidiasis. *Semin Perinatol.* **2003**;27(5):406-13. doi: 10.1016/s0146-0005(03)00066-1.
27. **Cohen-Wolkowicz M, Smith PB, Mangum B, Steinbach WJ, Alexander BD, Cotten CM, Clark RH, Walsh TJ, Benjamin DK Jr.** Neonatal *Candida* meningitis: significance of cerebrospinal fluid parameters and blood cultures. *J Perinatol.* **2007**;27(2):97-100. doi: 10.1038/sj.jp.7211628.
28. **Baddley JW, Benjamin DK Jr, Patel M, Miró J, Athan E, Barsic B, Bouza E, Clara L, Elliott T, Kanafani Z, Klein J, Lerakis S, Levine D, Spelman D, Rubinstein E, Tornos P, Morris AJ, Pappas P, Fowler VG Jr, Chu VH, Cabell C;** *Candida* infective endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2008**;27(7):519-29. doi: 10.1007/s10096-008-0466-x
29. **Evren E, Göçmen JS, İstar EH, Yavuzdemir Ş, Tekeli FA, Yavuz Y, Karahan ZC.** Medically important *Candida* spp. identification: an era beyond traditional methods, *Türk J Med Sci* **2022**;52: 834-840. <https://doi.org/10.55730/1300-0144.5380>
30. **Clancy CJ, Nguyen MH.** Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis.* **2013**;56(9):1284-92. doi: 10.1093/cid/cit006.
31. **Abacı Ö, Haliki A.** Fungal Tanıda Polimeraz Zincir Reaksiyonu. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **2005**; 03;10,1-9. www.mikrobiyoloji.org/pdf/702051001.pdf
32. **Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T.** Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains. *J Clin Microbiol.* **2001**;39:3617-22

33. **Tarini NMA, Wahid MH, Ibrahim F, Yasmon A, Djauzi S.** Development of multiplex-PCR assay for rapid detection of *Candida* spp. *Med J Indones* **2010**;19:83-7.
34. **Luo G, Mitchell TG.** Rapid identification of Pathogenic Fungi Directly from Cultures by Using Multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* **2002**;40:2860-65
35. **Gutzmer R, Mommert S, Küttler U, Werfel T, Kapp A.** Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. *J Med Microbiol.* **2004**;53:1207-1214. doi: 10.1099/jmm.0.45779-0.
36. **Somogyvari F, Horvath A, Serly J, Majoros H, Vagvolgyi C, Peto Z.** Detection of invasive fungal pathogens by real-time PCR and high-resolution melting analysis. *In Vivo.* **2012**;26(6):979-83. PMID: 23160681.
37. **Yaman G, Akyar I, Can S.** Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2012**;73(1):65-7. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.01.013.
38. **Kal Çakmakhoğulları E, Aşgın N, Değerli K.** *Candida* tür tayininde rutinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerle yeni kullanılmaya başlayan MALDI TOF-MS ve moleküler yöntemlerin sonuç verme süreleri, maliyetleri ve güvenilirliklerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul.* **2019**;53(2):204-212.
39. **Takagi Y, Fukano H, Shimozaoto K, Tanaka R, Horii T, Kawamoto F, Kanbe T.** Genotypes of *Candida albicans* isolated from healthy individuals and their distribution in patients with oral candidiasis. *J Infect Chemother.* **2013**;19(6):1072-9. doi: 10.1007/s10156-013-0626-5.
40. **Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl HG.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol.* **2009**;47(9):2912-7. doi: 10.1128/JCM.00389-09.
41. **Gerós-Mesquita Â, Carvalho-Pereira J, Franco-Duarte R, Alves A, Gerós H, Pais C, Sampaio P.** Oral *Candida albicans* colonization in healthy individuals: prevalence, genotypic diversity, stability along time and transmissibility. *J Oral Microbiol.* **2020** 14;12(1):1820292. doi: 10.1080/20002297.2020.1820292.
42. **Genc GE, Ozel S, Erturan Z.** Sağlıklı kişilerde oral candida kolonizasyonu sıklığının araştırılması. *ANKEM Derg* **2014**; 28: 26-31.
43. **Mun M, Yap T, Alnuaimi AD, Adams GG, McCullough, M.J.** Oral candidal carriage in asymptomatic patients. *Aust. Dent. J.* **2016**; 61; 190–195.
44. **Moalic E, Gestalin A, Quino D, Gest PE, Zerili A, Le Flohic AM.** The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationship with dental caries, *Caries Res* **2001**;35(2):149-55. doi.org/10.1159/000047447
45. **Rivera RE, Zuluaga A, Arango K, et al.** Characterization of oral yeasts isolated from healthy individuals attended in different Colombian dental clinics. *J Biomed Res.* **2019**;33(5):333–342.
46. **Yang YL, Leaw SN, Wang AH, Chen HT, Cheng WT, Lo HJ.** Characterization of yeasts colonizing in healthy individuals. *Med Mycol.* **2011**;49(1):103-6. doi: 10.3109/13693786.2010.487076.
47. **Patel, M.** Oral Cavity and *Candida albicans*: Colonisation to the Development of Infection. *Pathogens* **2022**,11,335. doi.org/ 10.3390/pathogens11030335

48. **Yigit, N., E. Aktas, and A. Ayyildiz.** Antifungal activity of toothpastes against oral *Candida* isolates. *Journal de mycologie medicale* 18.3 **2008**: 141-146.
49. **Seyedmojtaba Seyedmousavi, Macit İlkit, Murat Durdu, Çağrı Ergin, Süleyha Hilmioğlu Polat, Willem Melchers, Paul Verweij.** *Candida* and Candidosis: Updates on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, Antifungal Drug Resistance, and Host Genetic Susceptibility. **2015**; 45(1): 1-11. doi:10.5222/TMCD.2015.001
50. **Gutiérrez J, Morales P, González MA and Quindós G.** *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J. Basic Microbiol.* **2002**; 42: 207-227.
51. **Trofa D, Gacser A, Nosanchuki JC.** *Candida parapsilosis*: an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* **2008**; 21(4): 606-25
52. **Arastehfar A, Hilmioğlu-Polat S, Daneshnia F et al** Clonal candidemia outbreak by *Candida parapsilosis* carrying Y132Fin Turkey: evolution of a persisting challenge. *Front Cell Infect Microbiol.* **2021**;11:676177
53. **Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD, Turner SA, Butler G, Vágvolgyi C, Gácsér A.** *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. *Clin Microbiol Rev.* **2019**;27;32(2):e00111-18. doi: 10.1128/CMR.00111-18.
54. **Silva S, Henriques M, Hayes A, Oliveira R, Azeredo J, Williams DW.** *Candida glabrata* and *Candida albicans* co-infection of an in vitro oral epithelium. *J Oral Pathol Med.* **2011**;40(5):421-7. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00981.x.
55. **Wang H, Xu J, Guo H, Wu J, Yi G, Pei H, Niu L, Li Y.** Patterns of human oral yeast species distribution on Hainan Island in China. *Mycopathologia.* **2013**;176(5-6):359-68. doi: 10.1007/s11046-013-9703-7.
56. **Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, Campanha NH.** Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis.* **2014**;20(4):329-44. doi: 10.1111/odi.12123.
57. **Freydiere AM, Guinet R, Boiron P.** Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol.* **2001**;39(1):9-33. doi: 10.1080/mmy.39.1.9.33.
58. **Scharmann U, Kirchhoff L, Chapot VLS, Dziobaka J, Verhasselt HL, Stauf R, Buer J, Steinmann J, Rath PM.** Comparison of four commercially available chromogenic media to identify *Candida albicans* and other medically relevant *Candida* species. *Mycoses.* **2020**;63(8):823-831. doi: 10.1111/myc.13119.
59. **Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T.** Current status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical diagnostic microbiology. *Molecules.* **2020**;25(20): 4775.
60. **Quintilla R, Kolecka A, Casaregola S, et al.** MALDI-TOF MS as a tool to identify foodborne yeasts and yeast-like fungi. *Int J Food Microbiol.* **2018**;266:109-118.
61. **Hosbul T, Sahiner F, Gumral R, Kaya S, Bektore B, Tekin K, et. al.** MALDI-TOF MS analysis of long-term stored stock *Candida* strains identified by molecular and conventional methods. *J Ist Faculty Med* **2021**;84(1):113-9. doi: 10.26650/IUITFD.2020.0009
62. **Sow D, Fall B, Ndiaye M. et al.** Usefulness of MALDI-TOF Mass Spectrometry for Routine Identification of *Candida* Species in a Resource-Poor Setting. *Mycopathologia* **2015**;180, 173–179.

63. **Pereira LC, Correia AF, da Silva ZDL, et al.** Vulvovaginal candidiasis and current perspectives: new risk factors and laboratory diagnosis by using MALDI-TOF for identifying species in primary infection and recurrence. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **2021**;40(8):1681-93.
64. **Li Y, Wang H, Zhao YP, Xu YC, Hsueh PR.** Evaluation of the Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry System for Identification of *Aspergillus* Species Directly from Growth on Solid Agar Media. *Front Microbiol.* **2017**;8:1209. doi: 10.3389/fmicb.2017.01209.
65. **Arastehfar A, Daneshnia F, Kord M, Roudbary M, Zarrinfar H, Fang W, Hashemi SJ, Najafzadeh MJ, Khodavaissy S, Pan W, Liao W, Badali H, Rezaie S, Zomorodian K, Hagen F, Boekhout T.** Comparison of 21-Plex PCR and API 20C AUX, MALDI-TOF MS, and rDNA Sequencing for a Wide Range of Clinically Isolated Yeast Species: Improved Identification by Combining 21-Plex PCR and API 20C AUX as an Alternative Strategy for Developing Countries *Front Cell Infect Microbiol.* **2019**;15:9:21. doi: 10.3389/fcimb.2019.00021.
66. **Velegraki A, Kambouris ME, Skiniotis G, Savala M, Mitroussia-Ziouva A, Legakis NJ.** Identification of medically significant fungal genera by polymerase chain reaction followed by restriction enzyme analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **1999**;23(4):303-12. doi: 10.1111/j.1574-695X.1999.tb01252.x.
67. **Taira CL, Okay TS, Delgado AF, Ceccon ME, de Almeida MT, Del Negro GM.** A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. *BMC Infect Dis.* **2014**;21;14:406. doi: 10.1186/1471-2334-14-406
68. **Arya M, Shergill IS, Williamson M et al.** Basic principles of realtime quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* **2005**;5:209–19.
69. **Navarro E, Serrano-Heras G, Castano MJ et al.** Real-time PCR detection chemistry. *Clin Chim Acta* **2015**;439:231–50.
70. **Wang K, Peng H, Wang B.** Recent advances in thiol and sulfide reactive probes. *J Cell Biochem* **2014**;115:1007–22.
71. **Horváth Á, Pető Z, Urbán E, Vágvölgyi C, Somogyvári F.** A novel, multiplex, real-time PCR-based approach for the detection of the commonly occurring pathogenic fungi and bacteria. *BMC Microbiol.* **2013** Dec 23;13:300. doi: 10.1186/1471-2180-13-300
72. **Decat E, Van Mechelen E, Saerens B et al.** Rapid and accurate identification of isolates of *Candida* species by melting peak and melting curve analysis of the internally transcribed spacer region 2 fragment (ITS2-MCA). *Res Microbiol* **2013**;164:110–7.
73. **Tong SYC, Giffard PM.** Microbiological applications of high resolution melting analysis. *J Clin Microbiol* **2012**;50:3418–21
74. **Wittwer CT.** High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LC Green. *Clin Chem* **2003**;49:853–60.
75. **Arancia S, Sandini S, De Bernardis F, Fortini D.** Rapid, simple, and low-cost identification of *Candida* species using high-resolution melting analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2011**;69(3):283-5. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.10.003.
76. **Nemcova E, Cernochova M, Ruzicka F, Malisova B, Freiburger T, Nemec P.** Rapid identification of medically important *Candida* isolates using high resolution melting analysis. *PLoS One.* **2015**;17;10(2):e0116940. doi: 10.1371/journal.pone.0116940.
77. **Nawar NN, Behiry IK, Yousef RHA, Emara MA:** Application of High-Resolution Melting PCR to Detect the Genomic Fungal ITS 2 Region *Laboratory Medicine* **2019**;XX:1–8

78. **Eghtedar Nejad E, Ghasemi Nejad Almani P, Mohammadi MA, Salari S.** Molecular identification of *Candida* isolates by Real-time PCR-high-resolution melting analysis and investigation of the genetic diversity of *Candida* species. *J Clin Lab Anal.* **2020**;34:e23444. <https://doi.org/10.1002/jcla.23444>
79. **Borman AM, Linton CJ, Oliver D, Palmer MD, Szekely A, Johnson EM.** Rapid molecular identification of pathogenic yeasts by pyrosequencing analysis of 35 nucleotides of internal transcribed spacer 2. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3648-53. doi: 10.1128/JCM.01071-10.
80. **Somogyvari F, Doczi I, Serly J, Ahmad S, Nagy E.** Rapid discrimination between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by using real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2007**;58(3):367-9. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.01.015.
81. **Zhang B, Izadjoo M.** Differential Diagnosis of *Candida* Species with Real-Time Polymerase Chain Reaction and Melting Temperature Analyses (RTPCR-MTA). *Mil Med.* **2015**;180(6):652-9. doi: 10.7205/MILMED-D-14-00294.



EKLER

EK-1. Etik Kurul Kararı



ÖZGEÇMİŞ

