

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

***CANDIDA* TÜRLERİNİN
RESTRİKSİYON ENZİM ANALİZİ
İLE İDENTİFİKASYONU**

REYHAN YİŞ

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2007

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

***CANDIDA* TÜRLERİNİN
RESTRIKSİYON ENZİM ANALİZİ
İLE İDENTİFİKASYONU**

UZMANLIK TEZİ

REYHAN YİŞ

Danışman Öğretim Üyesi

PROF. DR. MİNE YÜCESOY

TEŞEKKÜR

Asistanlığım boyunca ve tezimin tamamlanması için geçen süreçte bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini ve çabasını benimle paylaşan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mine YÜCESOY'a, eğitimime katkılarından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız hocam Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU'na ve tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Tezimle ilgili olarak her ihtiyaç duyduğumda bana zaman ayıran hocam Yard. Doç. Dr. Mehmet Ali ÖKTEM'e, ayrıca yardımını benden hiç esirgemeyen arkadaşım Dr. Lerzan MANASTIR'a, Uzman Dr. Cem ERGON'a teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim arkadaşlarım, paylaşımları için sevgili eşim ve benim için çok değerli olan aileme sabır ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER LİSTESİ

İÇİNDEKİLER LİSTESİ	i
RESİM LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
KISALTMALAR	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	4
3. GİRİŞ VE AMAÇ	6
4. GENEL BİLGİLER.....	8
4.1. Tarihçe	8
4.2. Genel Özellikler.....	8
4.3. Hücre ve Hücre Duvar Yapısı	10
4.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri	11
4.4.1. Yapışma (Aderans).....	12
4.4.2. Biyofilm Yapımı	13
4.4.3. Enzimler ve Doku İnvazyonu	13
4.4.3.1. Proteinazlar	13
4.4.3.2. Fosfolipazlar	14
4.4.3.3. Lipazlar	14
4.4.4. Morfolojik Değişim.....	15
4.4.5. Fenotip değişimi.....	16
4.4.6. Hücre Yüzey Hidrofobisitesi	16
4.4.7. Sideroforları Kullanabilme Yeteneği	16
4.5. <i>Candida</i> Türlerinin Neden Olduğu İnfeksiyonlar	16

4.5.1. Kutanöz ve Mukozal Kandidoz	17
4.5.1.1. Oral Kandidoz.....	17
4.5.1.2. Özefagus Kandidozu	17
4.5.1.3. Özefagus Dışı Gastrointestinal Kandidoz	18
4.5.1.4. Vulvovajinal Kandidoz.....	18
4.5.1.5. Deri Kandidozu	18
4.5.2. Kronik Mukokutanöz Kandidoz	18
4.5.3. Sistemik Kandidoz	19
4.5.3.1. Kateter Kaynaklı Kandidoz (Kandidemi).....	19
4.5.3.2. Akut Dissemine Kandidoz.....	20
4.5.3.2.1. İnfektif Endokardit.....	20
4.5.3.2.2. Vertebral Osteomyelit	20
4.5.3.2.3. Endoftalmit	20
4.5.3.3. Kronik Dissemine Kandidoz (Hepatosplenik Kandidoz).....	20
4.5.3.4. Derin Organ Kandidozu	21
4.6. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarının Tanısı.....	21
4.6.1. Direkt Bakı.....	22
4.6.2. Kültür.....	22
4.6.3. <i>Candida</i> Türlerinin İdentifikasyonu	23
4.6.3.1. Çimlenme Borusu Testi.....	23
4.6.3.2. Morfolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi.....	24
4.6.3.3. Peptit Nükleik Asit- Floresan In Situ Hibridizasyon Metodu (PNA-FISH)	25
4.6.3.4. Üreaz Testi.....	25
4.6.3.5. Hızlı Trehaloz Testi.....	25
4.6.3.6. Kromojenik Besiyerleri ile İdentifikasyon	26

4.6.3.7. Karbonhidrat Asimilasyon Testleri	27
4.6.3.8. Karbonhidrat Fermentasyon testleri	28
4.6.3.9. Hızlı İdentifikasyon Testleri	28
4.6.3.10. İdentifikasyonda Moleküler Yöntemler	29
4.6.3.10.1. Nükleik asit Amplifikasyon Yöntemleri	29
4.6.3.10.1.1. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT).....	30
4.6.3.10.1.1.1. Polimeraz Zincir Tepkimesi Temelli İdentifikasyon Yöntemleri	31
4.6.3.10.1.1.1.1. “Restriction Fragment Length Polymorphism”(RFLP-PZT).....	31
4.6.3.10.1.1.1.2. “Amplified Fragment Length Polymorphism”(AFLP).....	31
4.6.3.10.1.1.1.3. Multipleks PZT	32
4.6.3.10.1.1.1.4. “Nested” PZT	32
4.6.3.10.1.1.1.5. “Seminested” PZT	33
4.6.3.10.1.1.1.6. “Real Time” PZT	33
4.6.3.10.2. Sinyal Amplifikasyon Teknolojileri	34
4.6.3.10.2.1. “Southern-Blotting”	34
4.6.3.10.2.2. “Northern Blotting”	35
4.6.3.10.2.3. “In-Situ” Hibridizasyon.....	35
4.6.3.10.2.4. Diğer Yöntemler	35
4.6.3.10.2.4.1. “Single Strand Confirmation Polymorphism”(SSCP)...	35
4.6.3.10.2.4.2. DNA “microarray” Yöntemi.....	35
4.6.3.10.2.4.3. Sekanslama (Dizi Analizi).....	36
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	37
5.1. Suşlar	37
5.2. Rutin İdentifikasyon Yöntemleri.....	37

5.3. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT).....	37
5.3.1 DNA Eldesi (Ekstraksiyon)	37
5.3.2 Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) Uygulanması.....	38
5.3.2.1. PZT İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması	38
5.3.2.2. PZT Çalışmasında Kullanılan Öncüller	39
5.3.2.3. PZT Karışımı ve Isı Döngüsü	39
5.3.2.4. PZT Ürününün Görüntülenmesi	40
5.3.2.4.1. Görüntüleme İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması.....	40
5.3.2.4.2. PZT Ürününün Görüntülenmesi	41
5.4. Restriksiyon Enzim Analizi (REA)	41
5.4.1. Saflaştırma Çalışması	41
5.4.2. Restriksiyon Enzim Analizi (REA) İşleminin Uygulanması.....	42
5.4.3. REA Ürününün Görüntülenmesi.....	43
5.4.3.1. Görüntüleme İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması.....	43
5.4.3.2. Ürünün Görüntülenmesi	43
5.5. İstatistiksel Analiz	44
5.6. Dizi Analizi İçin PZT Yönteminin Uygulanması.....	44
5.6.1. Dizi Analizi İçin Yapılan PZT Uygulaması İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması.....	44
5.6.2. Dizi Analizi Amacıyla yapılan PZT Uygulaması İçin Karışım ve Isı Döngüsü.....	45
5.6.3. Dizi Analizi İçin PZT Ürününün Görüntülenmesi.....	46
5.6.3.1. Dizi Analizi-PZT Ürününün Görüntülenmesi	46
5.6.4. Dizi Analizi Çalışması.....	46
5.6.4.1. Dizi Analizi Sonuçlarının Yorumlanması	46
6. BULGULAR.....	47
6.1. Klasik Yöntemlerle Yapılan İdentifikasyon Sonuçları.....	47

6.2. REA Öncesi Uygulanan PZT Çalışması Sonuçları	55
6.3. REA Sonuçları.....	57
6.4. İstatistiksel Analiz Sonuçları.....	72
6.5. Dizi Analizi İçin Yapılan PZT Uygulaması Sonuçları.....	74
6.5.1. Dizi Analizi Çalışması Sonuçları.....	75
7. TARTIŞMA	85
8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	94
9. KAYNAKLAR	96

RESİM LİSTESİ

Resim 1a ve b. <i>C. albicans</i> 'in mısır unu tween 80 agar'daki görünümüleri	47
Resim 2a ve b. <i>C. parapsilosis</i> 'in mısır unu tween 80 agar'daki görünümüleri	48
Resim 3. <i>C. tropicalis</i> 'in mısır unu tween 80 agar'daki görünümü	48
Resim 4. <i>C. glabrata</i> 'nın mısır unu tween 80 agar'daki görünümü	49
Resim 5. <i>C. kefyr</i> 'in mısır unu tween 80 agar'daki görünümü	49
Resim 6. <i>C. krusei</i> 'nin mısır unu tween 80 agar'daki görünümü	50
Resim 7. <i>C. guilliermondii</i> 'nin mısır unu tween 80 agar'daki görünümü	50

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmaya alınan tüm suşların numaraları, soyutlandıkları örnek türü ve API 20C AUX sonuçları.....51

Tablo 2. *Candida* suşlarının türlere ve soyutlanan örnek türüne göre dağılımı.....55

Tablo 3. Çalışmaya alınan *Candida* türleri açısından *MwoI* ve *BsII* enzimleri ile yapılan REA yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri73

SEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Çalışmaya alınan <i>Candida</i> türlerinden birer örneğin PZT ürünlerinin jel görüntüleri.....	56
Şekil 2. Çalışmaya alınan <i>Candida</i> türlerinden birer suşun <i>MwoI</i> enzimi ile kesimi sonrası elde edilen jel görüntüsü.....	57
Şekil 3. <i>BsII</i> enzimi ile REA sonrasında çalışılan <i>Candida</i> türlerinden birer suşun oluşturduğu jel görüntüleri	58
Şekil 4. İlk on <i>C. albicans</i> suşunun <i>MwoI</i> enzimi ile kesim sonrası ürünlerin jel görüntüsü	59
Şekil 5. Çalışılan diğer <i>C. albicans</i> suşlarının <i>MwoI</i> enzimi ile kesimi sonucunda oluşan jel görüntüleri.....	60
Şekil 6. <i>MwoI</i> enzimi ile REA sonrası dört adet bant oluşturan <i>C. albicans</i> suşlarının REA ürünlerin jel görüntüsü.....	62
Şekil 7. <i>C. parapsilosis</i> suşlarının <i>MwoI</i> ve <i>BsII</i> enzimleri ile kesimi sonrası oluşan jel görüntüsü	64
Şekil 8. Çalışmaya alınan <i>C. tropicalis</i> suşlarının <i>MwoI</i> ve <i>BsII</i> enzimleri ile kesimi sonrası oluşan jel görüntüsü.....	66
Şekil 9. <i>BsII</i> enzimi ile uygulanan protokolde tam olarak kesilmeyen suşların PZT ürünlerinin ½ dilüsyonu sonucu oluşan REA ürünleri.....	66
Şekil 10. <i>C. glabrata</i> <i>MwoI</i> enzimi ile kesim sonrası jel görüntüleri.....	69
Şekil 11. <i>C. kefyr</i> suşlarının <i>MwoI</i> enzimi ile yapılan REA jel görüntüleri.....	69
Şekil 12. <i>C. krusei</i> suşlarının <i>MwoI</i> enzimi ile REA görüntüleri	70
Şekil 13. <i>C. guilliermondii</i> suşlarının <i>MwoI</i> enzimi ile oluşan ürünlerin jel görüntüleri.....	71
Şekil 14. <i>BsII</i> enzimi ile REA yapılan <i>C. guilliermondii</i> suşlarının REA ürünlerinin jel görüntüleri.....	71
Şekil 15. Dizi analizine alınan <i>C. albicans</i> suşlarının PZT ürünlerinin jel görüntüsü ...	74
Şekil 16. Dizi analizine alınan <i>C. guilliermondii</i> suşlarının PZT ürünlerinin %2'lik agaroz jelde yürütülmesi ile elde edilen görüntü	75

Şekil 17. Dizi analizi yapılan altı adet <i>C. albicans</i> suşunun ve Genbankasından indirilmiş <i>C. albicans</i> suşlarının değerlendirilmesi sonucunda saptanan nükleotid değişimleri	80
Şekil 18. Şekil 17'deki <i>C. albicans</i> suşlarının dizi analizi ile saptanan amino asit değişimi sonuçları	81
Şekil 19. Dizi analizi yapılan dört adet <i>C. guilliermondii</i> suşunun ve Genbankasından indirilmiş <i>C. guilliermondii</i> ve <i>C. membranifaciens</i> dizilerinin değerlendirilmesi sonucunda saptanan nükleotid değişimleri	83
Şekil 20. Şekil 19'daki <i>C. guilliermondii</i> ve <i>C. membranifaciens</i> suşlarının dizi analizi ile saptanan amino asit değişimi sonuçları	84

KISALTMALAR

- AFLP: ‘‘Amplified Fragment Length Polymorphism’’
- AIDS: Kazanılmış immun yetmezlik sendromlu
- ALS: ‘‘Agglutinin-Like Sequence’’
- BHI: beyin kalp infüzyon buyyon
- CDC: ‘‘Centers for Disease Control and Prevention’’
- CLSI: ‘‘Clinical and Laboratory Standarts Institute’’
- CR: Kompleman reseptörü
- IFN- γ : interferon γ
- ITS: ‘‘Internal Transcribed Spacer’’
- KMK: Kronik Mukokutanöz Kandidoz
- KOH: Potasyum Hidroksit
- KOÜ: Koloni Oluşturan Ünite
- NK: Doğal öldürücü hücreler
- NNIS: Ulusal Hastane İnfeksiyonları İzlem
- PAS: Periyodik Asit-Schiff
- PNA-FISH: Peptit Nükleik Asit- Floresan In Situ Hibridizasyon
- PZT: Polimeraz Zincir Tepkimesi
- rDNA: Ribozomal DNA
- RE: Restriksiyon Endonükleaz
- REA: Restriksiyon Enzim Analizi
- RFLP: ‘‘ Restriction Fragment Length Polymorphism’’
- RPS: ‘‘Repeats in the Repetitive Sequence’’
- SABHI: Sabouraud-BHI
- SAP: Salgısal Aspartik Proteinaz
- SDA: Sabouraud Dekstroz Agar

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SSCP: ‘‘Single Strand Confirmation Polymorphism’’

TNF- α : tümör nekroz faktör α

Öncül: Primer

YB: Yoğun Bakım

YPD: ‘‘Yeast extract peptone dextrose’’ agar

1. ÖZET

***Candida* Türlerinin Restriksiyon Enzim Analizi İle İdentifikasyonu**

İmmün baskılanmış hastalarda en sık rastlanan ve en önemli fungal patojenler mayalar olup; bunlar arasında da en sık *Candida* türlerinin izlendiği bildirilmektedir. Klinik örneklerden soyutlanan *Candida* türünün belirlenmesi, antifungal ilaçlara duyarlılık hakkında bilgi verdiği gibi ampirik sağaltım seçimine de ışık tutabilmektedir. Bu nedenle soyutlanan suşların hızlı, güvenilir ve doğru identifikasyonu büyük önem taşımaktadır. Çalışmamız, ciddi klinik tablolardan soyutlanan ve klasik yöntemler ile tanımlanmış olan *Candida albicans* ve non-*albicans Candida* türlerinin daha hızlı ve güvenilir identifikasyonu amacıyla restriksiyon enzim analizi yönteminin uygulanması ve sonuçların karşılaştırılması amacıyla planlanmıştır.

Araştırmamıza Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji laboratuvarına gönderilen sistemik örneklerden soyutlanan toplam 146 *Candida* suşu (40 *C. albicans*, 27 *C. parapsilosis*, 26 *C. tropicalis*, 25 *C. glabrata*, 11 *C. kefyr*, 10 *C. krusei*, 7 *C. guilliermondii*) ile birlikte *C. albicans* ATCC 14053, *C. parapsilosis* ATCC 90018 ve *C. krusei* ATCC 6258 numaralı kalite kontrol suşları dahil edilmiştir.

Çalışmaya alınan tüm *Candida* suşları %50 gliserol içeren beyin kalp infüzyon buyyonunda -80°C’de stoklanmıştır. Sabouraud dekstoz agar’a iki kez pasajlanan suşlar 37°C’de 24- 48 saat inkübe edilmiştir. Üreyen suşlar çimlenme borusu testi, mısır unu tween 80 agar, CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Fransa) besiyerlerindeki morfolojik özellikleri ve API 20C AUX (Biomérieux, Fransa) otomatik identifikasyon işlemi sonucuna göre tanımlanmıştır.

Tüm *Candida* suşlarının DNA eldesi “Nucleospin Tissue Kit” (Macherey-Nagel, Almanya) ile EDTA, litikaz ve sorbitol tampon kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Daha sonra uygulanan polimeraz zincir tepkimesi için ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgelerini hedef alan öncül1 ve öncül3 kullanılmıştır. Amplifikasyon ürünleri “GeneMark PCR Clean-Up Kit” kullanılarak saflaştırılmış ve takiben *MwoI* enzimi ile restriksiyon enzim analizi uygulanmıştır. İncelenen *C. albicans* suşlarının 36 tanesinde 141, 184 ve 261 bç ‘lik üç adet bant saptanırken, dört suşun 184 bç, 141 bç ve yaklaşık 165 bç, 95 bç’lik dört adet bant oluşturduğu gözlenmiştir. Çalışmaya alınan *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* suşları aynı enzim ile kesim sonucunda sırasıyla 336, 146, 88 bç’lik ve 325, 154, 97 bç’lik üçer adet bant oluşturmuştur. Bu iki türün birbirinden ayırt edilebilmesi için ek olarak *BsII* enzimi ile de kesim yapılmış ve *C. parapsilosis* suşları 413,

94, 63 bç'lik üç bant oluştururken, *C. tropicalis* suşları için 326, 187 ve 63 bç'lik bantlar izlenmiştir. Araştırmamıza alınan *C. glabrata* suşları *MwoI* enzimi ile kesim sonucunda 414, 174, 171, 86, 80 bç'lik bantlar oluştururken, *C. kefir* suşları için 370, 430 bç'lik iki adet bant ve *C. krusei* suşları için 289, 134, 83, 54 bç'lik dört adet bant elde edilmiştir. *MwoI* enzimi ile kesilen yedi adet *C. guilliermondii* suşunun beş tanesi 355 ve 302 bç'lik, kalan iki suş ise yaklaşık olarak 390 ve 300 bç'lik iki adet bant oluşturmuş; *BsII* enziminin kullanılmasıyla söz konusu iki suşun diğer beş suştan tamamen farklı bir kesim paterni gösterdiği saptanmıştır.

C. albicans suşlarında *MwoI* enzimi ile uygulanan yöntemin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %90, %100, %100, %96,4 olarak elde edilmiştir. Aynı yöntemin *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* türleri için bu değerler sırasıyla %100, %78,2- 81,5, %49,1- 50,9, %100 olarak saptanmış; *BsII* enziminin kullanılmasıyla ise tüm değerler %100'e yükselmiştir. *C. glabrata*, *C. kefir*, *C. krusei* ve *C. guilliermondii* türleri için *MwoI* enziminin kullanıldığı restriksiyon enzim analizi duyarlılıkları %100 iken, özgüllükleri %98,6- 100, pozitif prediktif değerleri %71,4- 100 ve negatif prediktif değerleri %100 olarak saptanmıştır.

Çalışmada yer alan *C. albicans* suşlarından *MwoI* enzimi ile diğerleriyle farklı bölgelerden kesilerek dört bant oluşturan dört ve aynı bölgelerden kesilerek üç bant oluşturan iki adet suş ile farklı ve aynı bölgelerden kesilen ikişer adet *C. guilliermondii* suşuna çift yönlü dizi analizi uygulanmış ve sonuçlar Bio-Edit version 7.0 programı ile değerlendirilmiştir. Dizi analizi sonuçları incelendiğinde, *MwoI* enzimi ile farklı kesim paterni gösteren *C. albicans* suşlarının üçünde adenin yerine guanin nükleotidinin geldiği nokta mutasyonu, bir tanesinde de insersiyon/delesyon tipi mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonlar sonucunda suşlarda *MwoI* enziminin kesim bölgesine uyan nükleotid dizilimi meydana geldiği ve böylelikle kesim sonucunda diğer suşlardan farklı olarak dört adet bant oluştuğu gözlenmiştir. *C. guilliermondii* suşlarına ait dizi analizi sonuçları değerlendirildiğinde, her iki enzimle de diğer suşlardan farklı bölgelerden kesilen iki adet suşun Gen bankasında DNA dizisi verilen *C. guilliermondii var guilliermondii* dizilerine göre (% 66,6) *C. guilliermondii var membranaefaciens* suşlarına gerek nükleotid dizilimi (% 91,2) gerekse aminoasit dizilimi açısından çok daha fazla benzerlik gösterdiği belirlenmiş ve bu suşlar *C. guilliermondii var membranaefaciens* olarak kabul edilmiştir.

Araştırmamızda, *Candida* türlerinin identifikasyonu için altın standart olarak kabul edilen klasik yöntemlerle tanımlamada sorun yaşanan *Candida* türlerinin identifikasyonunda veya hızlı tanımlama gerektiğinde *MwoI* ve *BsII* enzimleri ile uygulanan restriksiyon enzim

analizinin kullanabileceği, ancak bu yöntemde de bazı farklılıkların izlenebileceğinin göz önünde bulundurulması gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: *Candida* türleri, identifikasyon, restriksiyon enzim analizi

2. SUMMARY

Identification Of *Candida* Species By Restriction Enzyme Analysis

Yeasts are the most common and important pathogens in immunosuppressive patients and it has been reported that *Candida spp.* are the most commonly isolated ones among them. Identification of *Candida* species isolated from clinical specimens gives information about the antifungal susceptibility as well as sheds light to the choice of empirical treatment. Because of this reason, rapid, reliable and accurate identification of the isolates is very important. This study was planned to apply restriction enzyme analysis for more rapid and reliable identification of *Candida albicans* and non *Candida albicans* species isolated from serious clinical cases which had been previously identified by conventional methods and to compare the results.

In this study one hundred and fortysix *Candida* strains (40 *C. albicans*, 27 *C. parapsilosis*, 26 *C. tropicalis*, 25 *C. glabrata*, 11 *C. kefyr*, 10 *C. krusei*, and 7 *C. guilliermondii*) isolated from systemical specimens at Dokuz Eylul University Hospital Mycology Laboratory and *C. albicans* ATCC 14053, *C. parapsilosis* ATCC 90018 and *C. krusei* ATCC 6258 were included.

All *Candida* isolates were kept at -80°C in 50% glycerol and brain heart infusion broth as stock cultures. The strains which were subcultured onto Sabouraud dextrose agar were incubated at 37°C for 24- 48 hours. The strains were identified according to germ tube test, morphology at cornmeal tween 80 agar and CHROMagar *Candida* (CHROMagar, France) and API 20C AUX (Biomérieux, France) automatized system.

DNA extraction of all *Candida* species was performed with “Nucleospin Tissue Kit” (Macherey-Nagel, Germany) using EDTA, lyticase and sorbitol buffer according to the manufacturer’s recommendations. For the polymerase chain reaction, primer1 and primer3 which targeted ITS1, 5.8S rDNA and ITS2 regions were used. The amplification products were purified with “GeneMark PCR Clean-Up Kit” and following this restriction enzyme analysis was performed with *MwoI* enzyme. Thirty six of the *C. albicans* strains produced a restriction enzyme analysis pattern with three 141, 184 and 261 bp bands while four of them produced four 184 bp, 141 bp and approximately 165 bp and 95 bp bands. The restriction of *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* strains with the same enzyme resulted in three 336, 146, 88 bp and 325, 154, 97 bp fragments, respectively. In order to distinguish these two species, further restriction was performed with *BsII* enzyme and the lengths of restriction enzyme analysis products were 413, 94 and 63 bp for *C. parapsilosis*, and 326, 187 and 63 bp for *C. tropicalis*. Restriction of *C. glabrata* isolates with *MwoI* enzyme resulted in five bands of 414, 174, 171, 86, 80 bp. Calculated lengths of

restriction enzyme analysis products were 370 and 430 for *C. kefir*; 289, 134, 83 and 54 bp for *C. krusei* isolates. Restriction of five *C. guilliermondii* isolates with *MwoI* enzyme showed two bands at 355 and 302 bp while the remaining two strains showed a restriction enzyme analysis pattern with two bands at 390 and 300 bp. Additional digestion with *BsII* enzyme established that these two strains showed totally different restriction patterns from the other five strains.

The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of restriction enzyme analysis performed by *MwoI* enzyme for *C. albicans* strains were 90%, 100%, 100%, 96.4, respectively. These values were detected as 100%, 78.2%-81.5%, 49.1%-50.9%, 100% respectively for *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* isolates. When *BsII* enzyme was used for restriction, all values for these two species increased to 100%. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of *MwoI* enzyme restriction for *C. glabrata*, *C. kefir*, *C. krusei* and *C. guilliermondii* strains were found to be 100%, 98.6%- 100%, 71.4%- 100%, 100%, respectively.

Sequence analysis of both strands of four *C. albicans* isolates which resulted in different restriction patterns and two *C. albicans* isolates which produced three bands with the same enzyme and two *C. guilliermondii* isolates showing a different restriction enzyme analysis pattern were performed. The evaluation of the sequence analysis results was done by Bio-Edit version 7.0 programme. Three *C. albicans* isolates which produced a different restriction pattern had point mutations (guanine instead of adenine); one isolate had insertion/deletion type mutation and these mutations were the reason of a different pattern. In addition, sequence analysis of two *C. guilliermondii* isolates showing various fragments with different lengths by two enzymes were 66.6% similar with GenBank *C. guilliermondii* var *guilliermondii* and 91.2% similar with *C. guilliermondii* var *membranaefaciens* (nucleotide sequence). Because of this high nucleotide sequence similarity, these isolates were accepted as *C. guilliermondii* var *membranaefaciens*.

As a result, we can conclude that restriction enzyme analysis with *MwoI* and *BsII* enzymes can be used for the identification of *Candida* species which need rapid identification or which are problematic with conventional methods that are still accepted as gold standard although some variations can be observed with this method.

Key Words: *Candida* species, identification, restriction enzyme analysis

3. GİRİŞ VE AMAC

Fırsatçı fungal infeksiyonların insidansı son yıllarda solit organ ve hematopoetik kök hücre alıcısı olan, AIDS'li, hematolojik maligniteli, yanıklı hastalarda ve düşük doğum ağırlıklı infantlarda oldukça artmıştır (1). Özellikle santral venöz kateter kullanılan, yoğun immunsupresif kemoterapi ve yaygın geniş spektrumlu antibiyotik alan hastalarda fırsatçı fungal infeksiyonlar önemli tehlike oluşturmakta ve temel mortalite ve morbidite nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır (2). Bu hastalar özellikle kandidoz, aspergilloz, kriptokokoz ve zigomikoz açısından yüksek risk taşımaktadır (1). İmmunsupresif hastalarda en sık rastlanan ve en önemli fungal patojenlerin mayalar olduğu; bunlar arasında da en sık *Candida*'lara rastlandığı bildirilmektedir (3). Yapılan çalışmalarda son on yılda hastane kökenli dolaşım sistemi infeksiyonları arasında kandidemi insidansının beş kat arttığı ve *Candida*'ların en sık saptanan dördüncü etken olduğu belirtilmektedir (4, 5). Son yıllarda etkin antifungal sağaltım seçeneklerinde artışa rağmen, hastane kökenli kandidemili hastalarda mortalite oranları halen % 33- 75 arasında değişmektedir (6).

Candida infeksiyonlarının en sık nedeni *C. albicans* olmasına karşın, flukonazol profilaksisi, özellikle immunsuprese hastalarda etken olan *Candida* türlerinde değişime yol açmıştır. *C. albicans* ve *C. tropicalis* sıklığında rölatif bir azalma gözlenirken, flukonazol dirençli *C. krusei* ve *C. glabrata* infeksiyonlarında artış saptandığı bildirilmiştir (7). Son yıllarda *Candida* infeksiyonlarında *C. albicans*'tan, sağaltımı daha sorunlu olan non-*albicans* *Candida* türlerine doğru belirgin bir kayma ortaya çıktığı, ancak yine de *C. albicans*'ın halen en sık soyutlanan tür olduğu saptanmıştır (8, 9).

Artış gösteren non-*albicans* *Candida* türleri içinde özellikle *C. glabrata* ve *C. tropicalis*'in triazollere karşı duyarlılıklarında azalma saptanması, *C. krusei*'nin flukonazole intrensek olarak dirençli olması ve bu türlerin virülans özelliklerinin *C. albicans*'tan farklılık göstermesi nedeniyle non- *albicans* *Candida* türleri önem kazanmaktadır. Ek olarak AIDS hastalarından soyutlanan *C. albicans* suşlarında da antifungal ajanlara karşı direnç bildirilmiştir. Daha da ileri olarak nadiren soyutlanan *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. pelliculosa* ve *C. rugosa* gibi türlerin hem azollere hem de amfoterisin B'ye dirençli olabildiği gözlenmiştir. Bu nedenlerden ötürü *Candida* türlerinin doğru identifikasyonunun yapılması büyük önem taşımaktadır (1, 10, 11, 12, 13).

Klinik *Candida* izolatlarının prognostik, epidemiyolojik ve terapötik nedenlerle erken, hızlı ve doğru identifikasyonu kritik öneme sahiptir. *Candida* türlerinin identifikasyonunda

kullanılan konvansiyonel işlemler; çimlenme borusu testi, mısırunu tween 80 agardaki morfolojileri ile karbonhidrat asimilasyon- fermentasyon testleridir (14). Çimlenme borusu testinin üç saatten uzun süren inkübasyonu, yoğun maya inokulumu kullanılması, antifungal sağaltım uygulanması gibi durumlarda yaklaşık olarak %5 oranında yalancı pozitifliği söz konusudur (14). Soyutlanan suşun *C. albicans* dışı bir tür olması durumunda veya yalancı negatiflik söz konusu olduğunda bir sonraki aşama olan mısır unu-tween80 agardaki morfolojinin incelenmesi gerekmektedir. Bu da 24 veya 48 saat gibi ek bir süreye neden olmaktadır. Bununla birlikte kesin tür düzeyinde identifikasyona yönelik kullanılan ticari karbonhidrat asimilasyon temeline dayalı sistemler, aynı türlerin farklı suşları arasında değişiklik gösterebilmekte, harcanan süre üç gün veya daha uzun süreyi kapsayabilmekte ve hatalı sonuçlara neden olabilmektedir (14).

Son yıllarda fungusların tanımlanmasının, türlerin DNA'larında varolan çok sayıdaki farklılıkları inceleme yoluyla dramatik değişiklikler gösterdiği belirtilmektedir. Fenotipik yöntemler genellikle ucuz, kolay uygulanabilen yöntemlerken, bunun tam tersi olarak genotipik yöntemlerin maliyeti yüksektir ve teknolojik deneyim gerektirirler. İdentifikasyonda kullanılan fenotipik yöntemlerin zaman alıcı olması ve bazı durumlarda güvenilir sonuçlar vermemesi nedenleriyle son yıllarda genotipik temelli yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır (15) .

Candida türlerinin identifikasyonu için son 10 yılda polimeraz zincir tepkimesi (PZT) amplifikasyon tekniklerinin kullanıldığı çok sayıda prosedür denenmiştir. PZT temelli sistemlerde amplikonun tanımlanması önemli bir basamaktır. Türe özgü DNA “probe” ları ile hibridizasyon, PZT ürününün direkt sekanslanması veya PZT ürün uzunluklarının doğru olarak belirlenmesi zaman alıcı olup, birçok tanısal laboratuvarında bulunmayan pahalı ekipmanları gerektirmektedir. PZT ürünlerinin restriksiyon enzim analizi (REA) yöntemi ile çalışılması hızlı, sadece standart temel ekipmanlara gereksinim gösteren, birçok tanısal laboratuvarında uygulanabilen ve kesin sonuçlar veren bir yöntemdir (16, 17, 129).

Araştırmamızın amacı özellikle ciddi klinik tablolardan soyutlanan ve klasik yöntemler ile tanımlanan *Candida albicans* ve non-*albicans Candida* türlerinin daha hızlı ve güvenilir identifikasyonu amacıyla REA yönteminin uygulanması ve sonuçların karşılaştırılmasıdır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Tarihçe

Ağızdaki pamukçuk lezyonları, M.Ö. dördüncü yüzyılda yaşayan Hippocrates ve Galen dönemlerinden beri bilinmektedir. 1771’de Rosen von Rosenstein ağızdaki pamukçuğun akciğerlerde invazif olarak yerleşebildiğini bildirmiş, 1839’da Almanya’da Bernhard Rudolph Conrad von Langenbeck, tifo nedeniyle ölmüş bir hastanın özefageal mukozasından soyutladığı organizmayı bir parazit olarak tanımlamış, bu etkenin tifo ile ilişkili olduğunu düşünmüştür (18, 19).

Emil Berg 1841’de, pamukçuğun mantara bağlı geliştiğini ortaya koymuştur. 1842’de Gruby, Langenbeck’in soyutladığı bu organizmanın *Sporotrichum* türü olduğu bildirmiştir. 1842’de Berg tarafından deneysel olarak oral aft modeli oluşturulup, bu konudaki ilk ve en önemli adım atılmıştır (18, 19).

Robin 1847’de mantarı *Oidium albicans* olarak sınıflandırmış, 1849’da Frank ve Wilkinson ağızdaki lezyonun genital organlarda da bulunabileceğini ortaya koymuştur. Hansen, bu mantarı 1888’de *Monilia* olarak sınıflamış ve Zopf 1890’da *Monilia albicans* adını vermiştir (18, 19).

Roth Berkhout 1923’te pamukçuk etkeni olan mikroorganizmanın bir *Monilia* türü olmadığını bildirmiş ve jenerik isim olarak *Candida*’yı önermiştir. Antibiyotiklerin kullanımının büyük oranda yaygınlaştığı 1940’lı yıllardan itibaren ise *Candida* infeksiyonlarının sıklığı ve konuyla ilgili çalışmalar artmıştır (18, 19).

4.2. Genel Özellikler

İnsan vücudunun normal flora elemanı olan ve doğada son derece sık rastlanan *Candida*’lar genellikle fırsatçı mikroorganizmalardır. Vücutta geçici olarak özellikle deri, muköz membranlar ve gastrointestinal sistemde kolonize olurlar. Uygun koşullar altında patojenite kazanarak akut-kronik infeksiyonlara yol açarlar (19, 20,21).

Candida türleri; çoğunlukla tek hücreli, tek çekirdekli, 4-6 µm büyüklüğünde, oval, kapsülsüz maya benzeri mantarlardır. Tomurcuklanarak çoğalırlar. Morfolojik olarak ana kök hücrenin bir bölümünün uzaması ile oluşan bu yapılar blastokonidya olarak adlandırılır. Tomurcuklanma esnasında hücre duvarının bir noktası lizise uğrar. Lizise uğrayan noktadan

dışarıya doğru balonlaşan kısım şişerek genişler. Ana hücrede mitoz yoluyla çoğalan kromozomlar ve diğer hücre elemanları yeni hücreye taşınır. İki hücre arasında septa gelişerek hücre çoğalması gerçekleşir. *Candida* türleri klinik örneklerde blastokonidya, yalancı hif veya hif formunda bulunabilirler (19,21, 22, 23).

Yalancı hif; blastokonidyaların ana hücreden kopmadan uzayarak oluşturdukları hücre zinciridir. Duvarları birbirine paralel olmayıp, hücreler arasında daralmalar nedeniyle boğumlu olarak görülen yapılardır. Yalancı hif maya hücresinin çoğalma sırasında oluşturduğu bir ara formdur. *C. glabrata* hariç, tümü uygun koşullar altında yalancı hif üretir. Gerçek hif boğumlanma göstermez, duvarları birbirine paraleldir ve septa oluşturur. *Candida* türleri arasında sadece *C. albicans* ve *C. dubliniensis*'in gerçek hif oluşturduğu bildirilmiştir (23, 24, 25).

Candida'lardan; eşeyli üreme göstermeyen türler *Deuteromycota* bölümünde *Blastomycetes* sınıfının *Cryptococcales* takımında *Cryptococcaceae* ailesi içinde yer alırken, eşeyli üreme gösteren türler *Ascomycotina* bölümü, *Ascomycetes* sınıfı, *Saccharomycetales* takımı içinde sınıflandırılmaktadır (24, 26).

Candida'ların 200 kadar türü bulunmaktadır. Bunların %65'inden fazlası 37°C'de üreyemediği için çok az bir kısmı insanlarda enfeksiyona neden olmaktadır. *C. albicans* en sık saptanan tür olmakla birlikte *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis* sıklıkla saptanan türlerdir. Nadiren soyutlananlar ise *C. famata*, *C. utilis*, *C. inconspicua*, *C. lipolytica*, *C. rugosa*, *C. viswanathii*, *C. haemulonii*, *C. norvegensis*, *C. catenulata*, *C. intermedia*, *C. lambica* ve *C. zeylanoides*'tir (25).

C. albicans 37°C'de in vitro olarak birkaç saat içinde çimlenme borusu üretimi ile maya formundan derin dokulara geçebilen agresif bir form olan hif fazına dönüşebilir (27). Çimlenme borusu; bir blastokonidyanın kenarından başlayarak büyüyen, blastokonidyaya bağlanan bölgelerinde boğumlanma görülmeyen, silindirik filamentöz yapılardır (28).

Candida türleri Sabouraud dekstrozu agar (SDA) gibi rutin besiyerlerinde oda ısısında veya 37°C'de 24 saat içinde genellikle kirli beyaz veya krem rengi, nemli, düzgün veya buruşuk kenarlı, düzgün yüzeyli veya göbekli; uzayan inkübasyonla birlikte kıvrımlı hale gelen, mat ya da parlak, maya kokulu yumuşak koloniler oluştururlar. *C. krusei*'nin ise pürüklü ve kuru kolonileri vardır (21, 29, 30).

4.3. Hücre ve Hücre Duvar Yapısı

Ökaryotik *Candida* hücreleri; hücre duvarı, sitoplazmik membran, sitoplazma, mitokondri, ribozom, endoplazmik retikulum, golgi cisimciği ve membran ile çevrili nukleustan oluşur (24).

Candida'lar plazma membranının dışına yerleşmiş olup, hücreyi ozmotik değişikliklere karşı koruyan, besin alımında rol oynayan ve konak hücreyle ilişkileri düzenleyen bir hücre duvarına sahiptir. Hücre duvarı mantar hücresinin biçimini, morfogenezini, virulansını, mantar-konak etkileşimini ve antifungallere duyarlılığını belirleyen dinamik ve kompleks çok tabakalı bir yapıdır. Mantar hücresinin maya, hif gibi büyüme formlarındaki tipik şekillerini korumasından sorumludur. Ayrıca mikroorganizma ile konak arasındaki etkileşimin başlangıç aşamasında aracılık eder. Maya veya hif şekilleri esasen kitin ve selüloz içeren sert yapılı bu dış tabakada büyüme formlarının çeşitli aşamalarında mantarın gereksinimlerine uygun bileşim ve oranlarda glukanlar, peptidomannanlar, polisakkaritler ve glikoproteinler bulundurulur (31).

Elektron mikroskopik çalışmalara göre *Candida*'ların hücre duvarı en az 5 katmanlıdır. Maya-hif dönüşümü sürecinde bu sayı ve kalınlık değişir. Ayrıca ortamda yüksek yoğunlukta şeker varlığında en dıştaki mannoprotein kalınlaşır ve fibriler oluşumlar artar (30).

Hücre duvarı %80-90 oranında karbonhidratlardan oluşur. Proteinler %6-25, lipidler %1-7 ve kitin %8.5-9 oranındadır. Hücre duvarında polisakkarit olarak mannan, glukan ve kitin bulunmakta olup, polisakkaritlerin %40-85'ini mannan oluşturur. Bunların göreceli miktarları morfolojiye göre değişir. Mannoz polimerleri, yapısal polimerler olan β -glukanlar ve kitinin içine gömüldüğü hücre duvarının amorf matriksini oluşturur (32, 33).

Candida hücre duvarında en büyük oranda bulunan bileşikler olan karbonhidratlar, β -glukan, mannan ve kitindir. β -glukan dallanmış β -1,3 ve β -1,6 glukoz polimerlerinden, kitin ise dallanmamış β -1,4 N-asetil glukozamin polimerlerinden oluşur. Hücre duvarının en önemli bileşeni mannoproteinler olup, proteinlerle kovalan bağlar yapan mannoz polimerlerinden meydana gelir. Mannan, hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık %30'unu oluşturmakta, hücre duvarının ana antijenik yapısı olarak serolojik testlerde sıklıkla kullanılmaktadır. β -1,6 glukan hücre duvar yapısının diğer bileşenleri için aracı rol oynarken, β -1,3 hücreye şeklini vererek rijiditeyi sağlar. Kitin ise hücre duvarının en az ancak önemli bir bileşenidir. Şekerler arasında yer alan hidrojen bağları ile bağlanmış uzunlamasına yapılı kitin molekülleri mikrofibrilleri oluşturur. Maya hücrelerinde kısa zincirler olarak görülen bu

mikrofibriller hif duvarlarında uzun karmaşık zincirler olarak yer alırlar . Glikolipidler hücre duvar sentezi, sinyal ileti yolları ve hücre antijenleri olarak önemli işlevlere sahiptir (32, 33, 34).

Hücre membranı, sterol olarak ergosterol ve zimosterol içermektedir. Bunlardan ergosterol diğer biyolojik membranlarda bulunmadığı için antifungal ilaçların bağlanabileceği iyi bir hedeftir. Ergosterol hücre membranının geçirgenliği, akışkanlığı, bütünlüğü için düzenleyici olarak işlev görmektedir (35).

4.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri

Candida türlerinin oluşturduğu infeksiyonların oluşumunda konağa ait faktörler ve mantara ait faktörler arasındaki denge önemlidir (30).

Candida türlerine karşı konağın direnç faktörleri; deri ve mukoza bütünlüğü, epidermal proliferasyon, fagositoz ve fagositik öldürme mekanizmaları, lizozim, laktoferrin, doğal öldürücü (NK) hücreler, kompleman sistemi, T hücre bağımlı immünite, sitokinler, sıvısal immünite iken, konağa ait predispozan faktörler; immunsupresif sağaltım, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, intravenöz kateter, mekanik ventilasyon, parenteral beslenme, AIDS, diyabet, ağır cerrahi girişimler, maligniteler, idrar sondası, endokrinolojik ve hematolojik hastalıklar ve yanık şeklinde sıralanabilir (30, 36).

Deri, infeksiyona karşı dirençte önemli olup, deri bütünlüğünün bozulması deriyi invazyona duyarlı hale getirmektedir. Dermisi invaze ederek sistemik dolaşıma katılan *Candida*'lar; ilk olarak blastokonidyalari öldürebilme ve yalancı hif formlarını hasara uğrattıp fagosite etme yeteneğine sahip olan nötrofiller ile ardından da monosit ve eozinofiller ile karşılaşılır (19, 27, 37). Özellikle myeloperoksidaz ve hidrojen peroksit gibi moleküller, nötrofillerin *Candida*'ları fagosite edebilmesi için gereklidir. Nötrofillerin azürofil granüllerinde bulunan *defensin* ve *katepsin G*'nin antifungal aktivitesi mevcuttur. Eozinofillerin de *Candida* üzerinde nötrofillere benzer etkileri söz konusudur. Monositlerin myeloperoksidaz bağımlı ya da bağımsız oksidatif mekanizmalarla *Candida*'ya karşı savunma işlevini yerine getirdiği bildirilmektedir. Lenfositlerin *Candida* infeksiyonlarındaki rolü tam olarak bilinmese de lenfokin benzeri maddelerin *Candida*'lar üzerine toksik etkili olduğu düşünülmektedir (38).

Candida'lar fagositik hücreler tarafından, mannoz reseptörü, kompleman reseptörü (CR) ve Fc reseptörü ile tanınmaktadır. Opsonizasyon, ısıya dayanıklı ve duyarlı serum opsoninleri, IgG ve kompleman sistemiyle gerçekleştirilmektedir (39).

Fagositik hücrelerin fungisidal aktiviteleri için interferon γ (IFN- γ) ve tümör nekroz faktör α (TNF- α) gibi sitokinlere gereksinim vardır. T lenfositler, *Candida* infeksiyonlarında IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 gibi sitokinleri salgılayarak etki ederler. Th1, IFN- γ ve TNF- α salgılayarak hücrel bağışık yanıtı aktive ederken; Th2, IL-4 ve IL-10 salgılayarak antifungal yanıtı inhibe eder. Bu nedenle *Candida* infeksiyonlarında, Th1 ile Th2 arasındaki denge önem kazanmaktadır (39).

Candida virulans faktörleri, adezyon, biyofilm yapımı, toksinler, proteinazlar, fosfolipazlar, morfolojik değişim, fenotip değişimi, hidrofobisite, moleküler benzeleme, hücre duvarı yapısı ve çeşitli sideroforları kullanma yeteneği şeklinde sıralanabilir (27, 30, 41).

4.4.1. Yapışma (Aderans)

Aderans, konak ile mikroorganizma arasında özgün etkileşimi sağlamakta ve infeksiyon ve kolonizasyon oluşum sürecinde ilk basamağı oluşturmaktadır (40). Özellikle kateterli hastalarda *Candida*'ların tıbbi cihaz ve biofilm yüzeyine aderansı ile kandidemi ve antifungal direnç oranının arttığı bildirilmiştir (41).

Candida türlerinin konak hücreye bağlanmasında esas rolü oynayan, hücre yüzeyinde bulunan adezinlerle konak hücre yüzeyinde bulunan reseptörlerin birbiriyle etkileşimidir. Oluşan infeksiyonun patogenezi ile *Candida*'nın aderans yeteneği arasında korelasyon izlenmiştir (22, 42)

Candida türlerinin epitel ve endotel hücrelerine aderansında C₃d, iC₃b, fibronektin ve östrojen reseptörleri, mannoprotein, salgısal aspartik proteinaz, faktör 6 (antijen 6), laminin reseptörü ve fibrinojen bağlayan proteinler gibi ligantların rolü bulunmaktadır (43). *C. albicans* adezinleri glikoprotein yapıda olup, aderans mikroorganizmanın yüzeyine eksprese edilen "Agglutinin-Like Sequence" (ALS) gen ailesi aracılığı ile gerçekleştirilir. ALS gen ailesi Ala 1 ("agglutinin-like adhesin") ve Hwp 1'i içermekte ve 8 gen ile kodlanmaktadır. ALS genleri, üreme durumlarına bağlı olarak farklı şekillerde eksprese edilmektedir (44, 45).

4.4.2. Biyofilm Yapımı

Sıklıkla vasküler ve üriner kateterler, eklem protezleri, protez kalp kapakları gibi tıbbi cihazların varlığında infeksiyon oluşturan *Candida* türleri bu aletlerin yüzeylerine yapışarak biyofilm üretimi ile kolonizasyon oluşturabilirler. Biofilm yapımı sonucu oluşan kolonizasyonun, antifungal direnç ve kandidemide artışa yol açtığı belirtilmiştir. *Candida* türlerinin biyofilm oluşturma yeteneği ile virulansın derecesi arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmektedir (41, 46).

Biofilm; mukopolisakkarit yapıda ekstrasellüler bir polimerdir. Kateter yüzeyinde oluşan biyofilmde hem mikroorganizmaya hem de konağa ait faktörler rol oynamaktadır. Bu yapışma ve kolonizasyon için mantarın “slime” faktörünün, konağın da fibrin ve fibronektinlerinin karşılıklı etkileşimin gerekli olduğu bildirilmektedir. Biyofilmlerdeki hücrelerin planktonik hücrelerden tamamen farklı fenotipik özellikler gösterdiği, klinikte kullanılan antifungallere de bu hücrelerden daha dirençli olduğu ve infeksiyon için bir kaynak oluşturdıkları belirtilmektedir (46, 47).

Candida türleri arasında “slime” üretimi en sık olarak *C. albicans*’ta görülmektedir. Kateter kaynaklı infeksiyonlarda yüksek oranda rol oynayan *C. parapsilosis* için “slime” üretiminin önemli bir virulans faktörü olduğu; ayrıca *C. glabrata* ve *C. kefyr*’in de “slime” ürettiği saptanmıştır (48, 49).

4.4.3. Enzimler ve Doku İnvazyonu

Candida türlerinin konak hücreye kolonizasyonunda rol oynayan hidrolitik enzimlerin fizyolojik rolü, deri ve mukozal bariyerlerin yıkımıdır. Bu şekilde *Candida*’ların konak hücreye daha güçlü aderansı sağlanmakta ve bu süreci besin sağlama amacıyla mikroorganizma tarafından konak proteinlerinin sindirimi izlemektedir. Bu şekilde konak savunma mekanizmalarında önemli rol oynayan immunglobulin ve sitokinler parçalanmakta ve böylelikle immün bariyer ortadan kalkmaktadır. *Candida* türleri tarafından üretilen ekstrasellüler hidrolitik enzimler arasında salgısal aspartik proteinaz (sap), fosfolipaz ve lipaz enzimleri önemli grupları oluşturmaktadır (41, 50).

4.4.3.1. Proteinazlar

Candida türleri tarafından en sık üretilen hidrolitik enzimler sap’lardır. Sap’lar konak hücre yüzey moleküllerinin parçalanmasına neden olmakta, hücre membranlarında hasar

oluşturarak *Candida*'ların dokulara invazyonunda doğrudan rol oynamaktadır. Aynı zamanda sap'lar konak immun sistem molekülleri ve hücreleri üzerine etki ederek antimikrobiyal aktiviteyi ortadan kaldırmaktadır (51).

Ekstrasellüler proteinazları en sık *C. albicans* salgılarken, bu enzimler *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae* tarafından da salgılanmaktadır. Sap'ları kodlayan 10 kadar SAP geni bulunmaktadır. Bu enzimleri kodlayan ilk sekiz gen (SAP 1-8) ekstrasellüler mesafeye salınırken, SAP 9 ve SAP 10 membrana bağlı olarak bulunmaktadır (51, 52, 53).

SAP gen ekspresyonu özellikle *C. albicans* için hif oluşumu, adezyon ve fenotip değişimi gibi diğer virülans faktörleri ile de yakın ilişki göstermektedir. SAP1, SAP2, SAP3 genleri yalnızca maya hücrelerinde; SAP4, SAP5, SAP6 ise hif yapılarında bulunmaktadır. SAP 1-3'ün yüzeyel, mukozal ve kutanöz infeksiyonlarda; SAP 4-6'nın ise sistemik infeksiyonlarda rol oynadığı gösterilmiştir (54, 55).

4.4.3.2. Fosfolipazlar

Fosfolipidler biyolojik membranların yapısal ve fonksiyonel en önemli komponenti olup, ekstrasellüler fosfolipazlar konak hücre membranındaki gliserofosfolipidlerin ester bağlarını hidrolize ederek konak hücre membranında hasara ve bunun sonucunda da invazyona yol açarlar. Fosfolipazlar konak hücreye penetrasyon, epitel hücrelerine tutunma, insan ağız epiteline invazyonda görevlidirler (51).

C. albicans suşlarında en sık olmak üzere diğer *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus* gibi patojen mantarlarda da fosfolipaz enzimi üretilmektedir. *C. albicans*'ta enzimin A, B, C, D, lizofosfolipaz ve lizofosfolipaz-transaçilaz formları tanımlanmıştır (Wwgb39). Çeşitli çalışmalarda *Candida*'daki in vitro fosfolipaz aktivitesi ile virülans arasında korelasyon saptanmıştır (56, 57, 58).

4.4.3.3. Lipazlar

Lipazlar mono-di-triaçilgliserol ve diğer fosfolipidlerin ester bağlarının hidrolizini katalize etme yeteneğine sahip olup, on üyeli bir gen ailesi tarafından kodlanırlar (LIP 1-10). *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* suşlarının lipaz aktivitesi gösterdiği ve bu genleri eksprese ettiği saptanmıştır. *C. albicans*'ın konak dokudaki virülans ve

persistansının, *LIP* genlerinin in vivo ve in vitro olarak lipolitik aktivite göstermesini yansıttığı düşünülmekte ve konu ile ilgili araştırmalar halen sürmektedir (51).

Son yıllarda iki yeni hidrolitik enzim olan ekstrasellüler serin ve metalloproteinaz aktiviteleri *C. albicans* ve *C. guilliermondii* suşlarını içeren sıvı kültürde belirlenmiştir. Ancak diğer hidrolitik enzimlerden farklı olarak bu enzimler ile *Candida*'ların virulansı arasında net bir ilişki tanımlanamamıştır (59, 60).

4.4.4. Morfolojik Değişim

Morfogenez, *Candida*'ların gelişimi sırasında geçirdiği değişimleri ifade eder ve sonuçta farklı koşullara bağlı olarak tek bir *Candida* hücresinin pleomorfik, değişken bir yapı sergilemesine neden olur. Morfolojik değişim *Candida*'ların yaşamını sürdürmesi için değil, farklı ortam koşullarına adapte olabilmesi ve üreyebilmesi için geliştirdiği bir mekanizmadır (61).

Candida türleri maya ve hif formları arasında geri dönüşümlü geçiş yeteneğine sahiptir. Çeşitli koşullara bağlı olarak maya, yalancı ve gerçek hif oluşturabilmektedir. Mayadan hife geçişte konağa ilişkin bazı faktörlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Mukozadaki koşullara benzerlik gösteren 37°C'nin altındaki sıcaklık, asit pH ve serumun olmadığı bir ortam maya şeklinde üremeyi indüklerken, 37°C sıcaklık, nötral pH ve serumun ortamda bulunmasının hif formunun gelişmesini indüklediği gösterilmiştir. Bu formlar arasındaki morfolojik geçişin, konakta *Candida*'ların üremesini uyarıp, konak hücreye invazyonu ile korelasyon gösterdiği düşünülmektedir. Çimlenme borusu ve hif formlarının aderanslarının maya formuna göre daha fazla olduğu, doku invazyonunda gerçek ve yalancı hiflerin önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir. Özellikle *C. albicans* için maya formundan hif formuna geçiş, doku invazyonu için gereklidir (61, 62).

Maya-hif dönüşümü sırasında maya hücrelerinin yüzeylerindeki reseptörler tarafından algılanan sinyaller (ısı, pH, aminoasitler gibi) hücre içine iletilerek hücre içinde cAMP, cGMP ve bazı iyonların miktarlarında değişiklikler oluşmasına neden olmaktadır. Oluşan iyon akımı sonucunda hif şeklinde uzama gerçekleşmekte olup, bu forma dönüşümün ilk basamağını çimlenme borusu oluşturmaktadır. (36).

4.4.5. Fenotip değişimi

Fenotip değişimi, geri dönüşümlü olan, *C. albicans* suşlarında spontan olarak sıklıkla gerçekleşen bir olaydır. *C. albicans* kolonileri 10^{-4} - 10^{-1} gibi yüksek sıklıkta düz, yıldız, noktalı, pürtüklü, düzensiz buruşuk ve tüylü gibi farklı fenotipler arasında değişim göstermektedir. Bununla birlikte fenotipik değişim ile *C. albicans*'ın virulansı arasındaki ilişki belirgin değildir. Yuvarlak-ovalimsi, beyaz ("white") faz hücrelerinin; geniş yüzeyli, yassı, yüzeyi pürtüklü, gri renkli koloniler oluşturan uzun, büyük opak ("opaque") faz hücrelerine dönüşümü "W-O" değişimi şeklinde değerlendirilmektedir. Opak faz hücrelerinin kutanöz kandidoz modelinde deriye kolonizasyon yeteneğinin beyaz faz hücrelerinden daha yüksek olduğu saptanmıştır. İlginç olarak sistemik hayvan modelinde ise opak faz hücrelerinin beyaz faz hücrelerinden daha az virlan olduğu saptanmıştır (41, 63, 64, 65).

Fenotipik değişimine uğramış izolatların antifungallere daha yüksek düzeyde direnç gösterdiği ve fenotipik değişimin; antijenik yapıyı, adezyonu, hif oluşumunu, nötrofillere ve oksidanlara duyarlılığı ve de antifungallere duyarlılığı etkilediği bildirilmektedir (66).

4.4.6. Hücre Yüzey Hidrofobisitesi

Mayaların, patogeneز esnasında hidrofobik proteinlerini hücre duvar yüzeyinde eksprese ettikleri ve konak hücresi ile hidrofobik ilişkiye girdikleri saptanmıştır (19, 61, 67).

4.4.7. Sideroforları Kullanabilme Yeteneği

Sideroforlar, demiri depolandığı dokudan veya transferrinden alan, düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerdir. *Candida*'lar, üremeleri için gerekli olan demiri, diğer *Candida*'lara ait sideroforlardan veya *Enterobacteriaceae* ailesinin sideroforlarından sağlayabilmektedir (68).

4.5. *Candida* Türlerinin Neden Olduğu İnfeksiyonlar

Candida türleri, mukozal kolonizasyondan çoklu organ tutulumuna kadar çeşitli infeksiyonlara yol açabilirler. *Candida* infeksiyonlarının klinik yansıması kutanöz/ mukokutanöz infeksiyonlar, kronik mukokutanöz kandidoz ve sistemik kandidoz olmak üzere e ayrılabilir. Mukokutanöz infeksiyonlar; oral kandidoz, özefagus kandidozu, özefagus dışı gastrointestinal kandidoz, vulvovajinal kandidoz ve kutanöz kandidoz tablolarını içerir.

Sistemik kandidoz ise kandidemi, akut yaygın kandidoz, kronik yaygın kandidoz ve çeşitli organ sistemlerinin tutulumunu içeren derin organ kandidozundan oluşmaktadır (37).

4.5.1. Kutanöz ve Mukozal Kandidoz

Kutanöz *Candida* infeksiyonları genellikle travma, diyabet, AIDS, gebelik, genç veya ilerlemiş yaş, doğum kontrol hapları, kortikosteroidler veya antibiyotiklerle sağaltım, kan glukoz düzeyinin yüksekliği, hücrel immün yetmezlik, endokrin dengesizlik ve derinin uzun süre nemli kalması gibi bazı koşullar nedeniyle ortaya çıkmaktadır (22).

4.5.1.1. Oral Kandidoz

Oral kandidoz tablosunda ağızda ağrı, dilde yanma ve disfaji en sık karşılaşılan semptomlardır. Ağız içinde lezyonları olan hastalar sıklıkla asemptomatiktir. Bulgular; dilde, yanaklarda, boğazda ve yüzeysel mukozada diffüz bir eritem ve bunun üzerinde birbirinden bağımsız, yama tarzında yerleşmiş beyaz, plaklardır. Plaklar zorlukla da olsa yerlerinden kaldırılabilen ve bunların altında eritemli ve bazen kanamalı alanlar gözlenmektedir. AIDS'li hastaların hemen hemen %100'ünde hastalığın bir döneminde oral kandidoz geçirilmekte olup, AIDS'i tanımlayıcı bir durum olarak kabul edilmektedir. Akut pseudomembranöz kandidoz, akut-kronik atrofik stomatit, "angular cheilitis", kronik hiperplastik kandidoz gibi klinik formları bulunmaktadır (22, 37, 69).

Ağız içinden alınan sürüntü örneğinin gram boyasıyla veya kazıntı örneğinin potasyum hidroksit veya kalkoflor beyazı boyasıyla değerlendirilmesinde hif ve yalancı hif görülmesi tanı koydurucudur (37).

4.5.1.2. Özefagus Kandidozu

Candida özefajiti en sık disfaji, odinofaji ve retrosternal ağrı semptomlarına yol açar. Bu tablo %60'ın üzerinde oral kandidoz ile birlikte seyreder. Kesin tanı endoskopi sırasında alınan biopsi materyalinde doku invazyonunun histolojik olarak saptanmasıyla konulmaktadır (22, 37).

4.5.1.3. Özefagus Dışı Gastrointestinal Kandidoz

Gastrointestinal sistemde mide tutulumu, özefagustan sonra ikinci sıklıktadır. *Candida* türleri, özellikle gastrik ülser gibi önceden varolan gastrik lezyonların bulunduğu bölgelere ve gastrik rezeksiyon yapılmış yerlere yerleşir ve infeksiyon yalancı membranlar şeklinde seyreder (22).

4.5.1.4. Vulvovajinal Kandidoz

Sağlıklı kadınların %10-20'sinde *Candida* türleri vajinada normal flora üyesi olarak bulunmaktadır. Gebelik, yüksek oranda östrojen içeren oral kontraseptiflerin kullanımı ve kontrolsüz diabet asemptomatik kolonizasyonu arttıran etkenlerken, kortikosteroit kullanımı, antimikrobiyal sağaltım ve intrauterin cihaz kullanımı predispozan faktörler arasında yer alır. *Candida* türleri perianal bölgeden vajinal bölgeye erişerek vajinadaki epitel hücrelerine adere olur. *C. albicans* bu hücrelere non-*albicans Candida* türlerinden daha anlamlı oranda aderans göstermektedir. Vulvovajinal kandidozların %80'ininden *C. albicans*'ın sorumlu olduğu, onu *C. glabrata* ve *C. tropicalis*'in izlediği bildirilmiştir (22, 37).

4.5.1.5. Deri Kandidozu

Kuru, sağlam deri fungal invazyon açısından potansiyel bir bariyer olup, nemlilik ve bütünlüğün bozulması epidermis direncini azaltmaktadır. *Candida* türleri derinin koltuk altı, kasık, meme altı gibi kat yerleri, el ve ayak parmak araları, perineal bölge gibi nemli ve sıcak bölgelerinde üreyerek infeksiyona neden olurlar. *C. albicans* ve *C. tropicalis* deri ve tırnak yüzeyel infeksiyonlarının en sık etkenleridir. *Candida* türleri, tırnak ve tırnakla birlikte çevresindeki yumuşak dokuyu da infekte ederek onikomikoz ve paroniki'ye neden olur (22, 27, 70).

4.5.2. Kronik Mukokutanöz Kandidoz

Kronik mukokutanöz kandidoz (KMK); lökosit fonksiyonu veya endokrin sistemle ilgili çok sayıda genetik kusur ile ilişkili deri ve mukoz membranlarda *Candida* türlerinin oluşturduğu kronik, dirençli, fırsatçı bir infeksiyondur. KMK genellikle T-hücre bozukluğu olan çocuklarda hayatın ilk 20 yılında başlar. Çok farklı klinik belirtiler gösteren bu tablo için, klinik belirtilerin birlikte görülmesine göre yedi grup tanımlanmıştır (22).

KMK ile ilgili en önemli immun defekt; T-lenfositlerin *Candida* antijenlerine karşı yeterli immun yanıt oluşturmamasıdır. Hastalarda buna bağlı olarak en yaygın anormallik *Candida* antijenlerine karşı gecikmiş tip kutanöz reaksiyonun negatif saptanmasıdır (22).

KMK ile ilişkili endokrinopatiler arasında hipoparatiroidizm, hipoadrenalizm, kronik lenfositik tiroidit, hipotiroidi, gonadal yetmezlik, pernisiyöz anemi ve diabetes mellitus yer almaktadır. Otoimmun antikorlar; adrenal, tiroid, gastrik dokularda ve melanin üreten hücrelerde bulunmaktadır (22).

4.5.3. Sistemik Kandidoz

Sistemik kandidoz; *Candida* türlerinin hematojen yayılımından kaynaklanmakta olup, kateter kaynaklı kandidoz, akut dissemine kandidoz, kronik dissemine kandidoz ve derin organ kandidozu olmak üzere dört ana grup altında toplanmaktadır (71).

4.5.3.1. Kateter Kaynaklı Kandidoz (Kandidemi)

Kandidemi, sistemik kandidozun en sık ortaya çıkış şekli olup, hastanede yatan hastalarda mortalite ve morbiditenin en önemli nedenidir (72). Kandidemi, kanıtlanmış organ tutulumu olmaksızın, infeksiyon belirti ve bulguları olan bir hastada en az bir yada daha fazla kan kültüründe *Candida* üremesi anlamına gelmektedir (30). Son yıllarda geniş spektrumlu antibiyotiklerin, santral venöz kateterlerin, yoğun bakım hastalarında hemodiyalizin, glukokortikoidler ve diğer immunmodülatörlerin kronik kullanımı, protezler ve neoplastik durumlar için kullanılan agresif kemoterapiler gibi tıbbi işlemlerin yaygınlaşması nedeniyle insidans artmıştır (74). ABD’de kan dolaşımı infeksiyon etkenleri arasında *Candida* türleri, dördüncü sırada yer almakta olup, mortalite oranları %40’ın üzerindedir (75).

Son yıllarda kandidemi etkeni olan türler arasında değişim söz konusu olsa da hala en sık olarak *C. albicans* soyutlanmaktadır. Non-*albicans Candida* türlerinin saptanma sıklığı ise göreceli olarak artmıştır. Bunlar arasında en sık olarak *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis* saptanmaktadır (73, 74).

4.5.3.2. Akut Dissemine Kandidoz

Akut dissemine kandidoz; hematolojik maligniteli, sitotoksik kemoterapi alan nötropenik hastalarda en yaygın olarak görülen formdur. Küçük damarlarda vaskülit oluşumuna bağlı olarak eritematöz veya hemorajik döküntülerle karakterize olan bir klinik tablodur (74).

4.5.3.2.1. İnfektif Endokardit

Candida türlerine bağlı olarak ortaya çıkan infektif endokardit, özellikle kronik intravenöz kateter veya büyük çaplı hemodiyaliz kateteri kullanılan hastalarda görülmektedir. *Candida* endokarditi için diğer risk faktörleri; protez veya normal olmayan kalp kapakçıkları, ventriküler septal defekt gibi doğumsal kardiyak anomaliler, eroin gibi ilaç enjeksiyonu öyküsü bulunmasıdır (74). En sık soyutlanan etkenler arasında *C. albicans* kadar *C. parapsilosis* oranı da yüksek olup, bu durumun *C. parapsilosis*'in protez endovasküler yüzeylere yöneliminden kaynaklandığı düşünülmektedir (76).

4.5.3.2.2. Vertebral Osteomyelit

Özellikle tanı konmamış veya sağaltım yapılmamış kandidemilerde vertebral osteomyelit gelişme sıklığı artmaktadır. Hastalarda kandidemi atağından birkaç hafta sonra, ilerleyici lokal sırt ağrısı, ateş ve kilo kaybı gibi semptomlar ortaya çıkmaktadır (77).

4.5.3.2.3. Endoftalmit

Sağaltılmamış kandidemi vakalarının %37'sinden fazlasında retinal lezyonlar saptanmakta olup, etkin sistemik antifungaller ile iki haftalık sağaltım bu oranı %1'in altına düşürmektedir. *Candida* endoftalmiti, sağaltım almamış vakalarda retinal nekroz ve körlüğe kadar ilerleyebilmektedir. Hastaların yaklaşık olarak %90'ında *C. albicans* etken olarak saptanmaktadır (74, 78).

4.5.3.3. Kronik Dissemine Kandidoz (Hepatosplenik Kandidoz)

Kandidemi sırasında nötropeni gelişmiş hastalarda ortaya çıkan dissemine kandidozun kronik formudur. Enfeksiyon akut lösemi, myelodisplastik sendrom ve aplastik anemi gibi

uzun süre nötropenik kalan hastalarda daha sık gelişir. Geniş spektrumlu antibakteriyel sağaltıma karşın ateşin en az iki hafta süreyle devam ettiği ya da nötropeni düzeldikten sonra ateşin başladığı hastalarda bu klinik tablo düşünülmelidir. Barsakta *Candida* kolonizasyonunu takiben gastrointestinal mukozanın bütünlüğü bozulmakta ve lamina propria invazyonu gelişmektedir. Submukozal kan damarlarının portal venöz sisteme drenajı ile karaciğer, dalak ve böbrekte fokal abseler ile karakterize tablo ortaya çıkmaktadır (22, 74).

4.5.3.4. Derin Organ Kandidozu

Kandidemili hastalarda sistemik invazyon olasılığı pozitif kan kültürü sayısı ile koreledir. Nötropenik hastalar visseral yayılım açısından yüksek risk altındadırlar. Yayılım sıklıkla kalp, meninksler, idrar yolu, deri, göz, karaciğer ve dalak gibi bölgelere olmakta ve *Candida* türleri perikardit, miyokardit, endokardit, menenjit, üretrit, sistit, septik artrit, tenosinovit, pnömoni gibi infeksiyonlara neden olmaktadır (22, 74)

Candida türleri hastanede yatan hastalarda da önemli infeksiyonlara neden olur. Hastane infeksiyonları arasında fungusların ve özellikle bunlardan *Candida* infeksiyonlarının ayrı bir önemi söz konusudur. Hastane kaynaklı tüm infeksiyonların yaklaşık %15'inde, tüm hastane kaynaklı fungal infeksiyonların %70'inde etken *Candida* türleridir (4). Hastane kökenli kandidoz etkeni olarak en sık görülen türün *C. albicans* olduğu, bunu non-*albicans* *Candida* türlerinden *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata*'nın izlediği bildirilmektedir (29).

4.6. *Candida* İnfeksiyonlarının Tanısı

Candida infeksiyonlarının tanısı için alınacak örnekler olarak kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), idrar, aspirat, solunum yolu örnekleri, doku biyopsi örnekleri, ağız ve vajen sürüntü örnekleri, saç-tırnak-deri kazıntı örnekleri sayılabilir (79).

Candida infeksiyonlarının standart laboratuvar tanısı için; etkenin klinik örnekten direk mikroskopik olarak saptanması, histopatolojik olarak dokuda belirlenmesi, kültürden izolasyonu ve identifikasyonu gerekmektedir (80, 81).

4.6.1. Direkt Bakı

Klinik örneklerle uygulanacak ilk işlem direkt bakıdır. Bu amaçla yaş preparat hazırlanabildiği gibi %10-20'lik KOH, Gram, metilen mavisi, Wright, Giemsa, kalkoflor beyazı, periyodik asit-schiff (PAS) ve methenamin gümüş boyası ile hazırlanan preparatlar kullanılabilir. *Candida* türleri dokuda en iyi PAS ve methenamin gümüş boyası ile gösterilmektedir. KOH, kalın mukoit ve saç, deri, tırnak gibi keratinize örneklerden *Candida* türlerinin ayrıştırılmasını sağlamaktadır. Hazırlanan KOH preparatında tomurcuklanan blastosporların yanında yalancı hiflerin görülmesi, tanıda kültürden daha değerlidir. Direkt incelemede KOH veya KOH ile birlikte *Candida* hücre duvarındaki kitine bağlanma özelliği gösteren kalkoflor beyazının kullanılması duyarlılığı arttırmaktadır (80, 82, 83, 84, 85).

Hazırlanan boyalı direkt preparatlarda tomurcuklanan maya hücreleri, yalancı ve gerçek hif yapıları aranır. Yalancı ve gerçek hif yapılarının görülmesi dokuya invazyonun yani enfeksiyonun göstergesi olarak kabul edilir (25, 29).

4.6.2. Kültür

Sistemik kandidozda tanı koydurucu temel yöntem kan kültürü ile *Candida*'nın izolasyonu ve türünün belirlenmesidir (86). Ancak, sağaltım sonucu kültürde üremenin inhibisyonu, organizmaların kana aralıklı olarak geçmesi gibi faktörlerin yanında rutin ya da fungal kan kültürlerinin güvenilir olmaması veya bu ortamlarda *Candida*'nın yavaş üremesi gibi sebeplerden dolayı olguların sadece %58'inde kan kültür pozitifliği saptanmaktadır (89, 121).

Candida türleri genel olarak mikolojik ve koyun kanlı, at kanlı bakteriyel besiyerlerinde kolaylıkla ürer. Klinik örneklerden *Candida* türlerinin soyutlanması için önerilen primer izolasyon besiyeri SDA olup, besiyerine ekilen örnekler 30°C'de inkübe edilmektedir. SDA dışında; koyun kanlı beyin kalp infüzyon agar, Sabouraud beyin kalp infüzyon (SABHI) agar, inhibitör mold agar gibi besiyerleri de kullanılabilir. Bu besiyerleri içine sikloheksimit gibi antimikotikler ilave edilerek kontaminant saprofit mantarların; kloramfenikol ve gentamisin gibi antibiyotikler ilave edilerek de bakterilerin üremesi engellenmektedir (81, 88). Üreme genellikle 24-72 saatte saptanmaktadır. Oda ısısında, 30°C'de veya 37°C'de oluşan kolonilerin görünümü kirli beyaz veya krem rengi, nemli, düzgün veya buruşuk kenarlı, düzgün yüzeyli veya göbekli; daha uzun süreli inkübasyonla kıvrımlı, mat ya da

parlak yapıda olup, maya kokulu ve yumuşaktır. 37°C’de üreyebilmeleri kontaminant saprofit mantarlardan ayırmda önemli bir özelliktir (29, 30, 85).

Candida türleri arasında, çoğu *C. albicans* suşu kanlı agar gibi zengin besiyerlerinde koloni sınırlarından periferde doğru gelişen ve ayaksı koloniler olarak adlandırılan kısa uzantılar oluşturmakta olup, geçmiş yıllarda bazı araştırmacılar tarafından bu özelliğin direkt olarak identifikasyonda kullanılması önerilmiştir. *C. tropicalis* ve *C. krusei* izolatlarının da ayaksı koloniler oluşturabilmesi nedeniyle, bunun saptanmasının, *C. albicans* identifikasyonunda kesin bir kanıt olmadığı, ancak ayaksı koloni oluşturmeyen *C. parapsilosis* ve *C. glabrata*’nın dışlanması bir ön bilgi olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (87).

4.6.3. *Candida* Türlerinin İdentifikasyonu

4.6.3.1. Çimlenme Borusu Testi

Kültürde üreyen maya kolonilerinin tanımlamasında uygulanacak ilk yöntem çimlenme borusu testidir. Bu test; klinik örneklerden soyutlanan mayaların yaklaşık olarak %75’ini oluşturan *C. albicans*’ın, diğer *Candida* türlerinden ayrılmasını sağlayan hızlı ve kolay bir testtir. Test için az bir miktar koloni ile 0.5 ml insan serumu veya tavşan plazması bir tüp içerisinde karıştırılıp, 35°C’de süreyi aşmamak üzere 3 saat inkübe edilir. Süre sonunda maya-serum süspansiyonundan lama bir damla damlatılır ve lamel ile kapatılıp, çimlenme borusu varlığı açısından mikroskopik olarak incelenir. Çimlenme borusu maya hücresinin genişliğinin yarısı, boyunun ise 3-4 katı kadar uzunluktadır. Maya hücresinden çıkan paralel uzantılar olarak gözlenir ve hücreden çıkış noktasında boğumlanma oluşturmaz. *C. tropicalis* çimlenme borusu ile karışabilecek hif başlangıcı benzeri yapılar üretebilir ancak hifin ana hücreden çıkış yerinde darlık mevcuttur ve blastokonidyalı *C. albicans*’inkilerden daha geniştir (35, 69, 89).

Çimlenme borusu saptanması etkenin *C. albicans* olduğunu, saptanmaması büyük olasılıkla *C. albicans* dışı *Candida* olduğu düşündürür. Ancak, *C. albicans*’ların yaklaşık %5’inde çimlenme borusu negatif olarak bulunmaktadır. Üç saatten uzun süren inkübasyon ve yoğun maya inokulumu kullanılması, antifungal sağaltım uygulanması gibi durumlarda *C. albicans* çimlenme borusu oluşturmayabilir (35, 69).

4.6.3.2. Morfolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi

Mısır unu-tween 80 agar, pirinç özütü tween 80 agar gibi besin açısından fakir ortamlar, lam kültürü yöntemi ile *Candida* türlerinin morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesini ve bu yolla da türlerin birbirinden ayırt edilmesini sağlar. Mısır unu-tween 80 agara ekim için yeni üremiş bir koloniden öze ile çok küçük bir miktar alınıp, öze 45°'lik açı ile tutularak besiyeri yüzeyine üç paralel çizgi çekilir. Agarın yüzeyine, inokülasyon çizgilerini örtecek şekilde steril bir lamel kapatılır. 30°C'de 24 ile 48 saat inkübe edilir ve mikroskopik olarak incelenir. Bu yöntemle mayaların oluşturdukları gerçek ve yalancı hifler, blastokonidyalılar, klamidosporların yapı ve yerleşimlerine göre tür düzeyinde tanımlamaya gidilir (29, 69).

Mısır unu-tween 80 agarda hiflerin uçlarından geniş, kalın duvarlı, genellikle tekli terminal klamidosporlar, gerçek ve yalancı hifler, yalancı hiflerin çevresinde kümeler oluşturmuş blastokonidyalılar görülmesi *C. albicans* olarak tanımlanır (29, 69, 90).

C. tropicalis uzun yalancı hifler boyunca, boğumlanma noktalarında tekli veya küçük düzensiz kümeler halinde az sayıda blastokonidya üretimi ve nadiren yalancı hiflerin uçlarında ince duvarlı, göz yaşı damlası şeklindeki hücreler oluşturur (29, 69, 90).

C. guilliermondii az sayıda, kısa yalancı hif ve bunların boğumları çevresinde küçük blastokonidya kümeleri oluşturur, gerçek hif üretmez (29, 90).

C. parapsilosis eğri görünümdeki kısa yalancı hifler boyunca tekli veya küçük kümeler halinde dizilmiş blastokonidyalılar ve nadiren dev hücreler olarak isimlendirilen büyük hifler üretir (29, 69).

C. krusei çapraz konulmuş kibrit çöpleri şeklinde, ağaç benzeri görünüm veren uzun blastokonidyalılar ile yalancı hifler oluşturur (29).

C. glabrata küçük, oval ve uçlarından tomurcuklanan maya hücreleri üretir, yalancı hif oluşturmaz (29).

C. kefyr tipik olarak bir derede yüzen kütükler görünümü veren belirgin şekilde dağınık, çapraz giden kümeler oluşturan dikdörtgen şeklinde uzamış blastokonidyalılar ile yalancı hifler oluşturur (29, 69, 90).

4.6.3.3. Peptit Nükleik Asit- Floresan In Situ Hibridizasyon Metodu (PNA-FISH)

C. albicans'ın pozitif kan kültüründen direkt olarak identifikasyonu amacıyla tanımlanan yöntemlerin sayısı kısıtlıdır. Bu metotların temeli FISH ve PZT gibi moleküler yöntemlere dayanır. FISH, moleküler patoloji laboratuvarlarında tanısal amaçlı kullanılan bir yöntem olup, histolojik kesitlerde mikroorganizmaların tanımlanması ve ayırt edilmesi için kullanılmaktadır. Bu teknoloji klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kültürden veya direkt örnekten uygulanabilmektedir. Pozitif kan kültürlerindeki bakterilerin, mayaların tanımlanması, hastane ortamından soyutlanan *Candida* türlerinin hızlı identifikasyonunda geleneksel FISH yöntemi kullanılmaktadır (91, 92).

PNA “probe”ları, DNA “probe”larına benzeyen, özgüllüğü yüksek, afinitesi güçlü ve kinetiği hızlı, rRNA gibi hedefleri hibridize edebilme özelliğine sahip “probe”lardır. rRNA’yı hedef alan PNA “probe”ları ile birlikte FISH yönteminin kullanıldığı PNA-FISH metodu yeni bir yöntemdir. *C. albicans*’a özgü PNA-FISH “probe”larının pozitif kan kültürlerinde *C. albicans* ile non *albicans Candida* türlerinin birbirinden ayrımında başarılı olduğu gösterilmiştir (92).

Çimlenme borusu testi negatif ve atipik *C. albicans* izolatları bu yöntem ile tanımlanabilmektedir. Gelecekte *C. albicans* için geliştirilmiş PNA-FISH “probe”larının *C. glabrata* ve *C. krusei* gibi diğer *Candida* türlerini de tanıyan PNA “probe”ları ile birleştirilmesi ile identifikasyon spektrumunun genişletilebileceği düşünülmektedir (91, 92).

4.6.3.4. Üreaz Testi

Üreaz testi, üreaz enzimi üretimini saptayan bir yöntemdir. Uygun substratların varlığında üreaz enzimi üreyi parçalayarak amonyak açığa çıkartır, bu da besiyeri pH' sını arttırarak fenol kırmızısı indikatörünün sarı renkten pembe renge değişimini sağlar. Hemen hemen tüm *Candida* türleri üreaz negatif olup, *C. lipolitica* ve *C. krusei*'nin bazı suşları pozitifdir. Üreaz testi diğer mayalar ile *Candida*'ların birbirinden ayrımında önemlidir (85, 89).

4.6.3.5. Hızlı Trehaloz Testi

Hızlı trehaloz testi flukonazole karşı azalmış duyarlılığı nedeniyle hızlı tanımlanmasının önem kazandığı *C. glabrata*'nın üç saat içinde olası identifikasyonuna olanak sağlayan bir yöntemdir. “Clinical and Laboratory Standarts Institute” (CLSI) M35-A’da *C. glabrata* identifikasyonu için hızlı trehaloz testi kabul edilmiştir. Trehaloz testinde yanlış pozitiflikler saptanabilse de *C. glabrata* çimlenme borusu oluşturmaması ve küçük hücre boyutu ile diğer

türlerden ayırt edilebilir. Son yıllarda hızlı trehaloz testinin çeşitli modifikasyonları kullanıma girmiştir. GLABRATA GTT (Fumouze Diagnostics, Levallois-Perret Cedex, France) trehaloz ve maltoz hidrolizini birlikte saptayan bir testtir. *C. glabrata* trehalozu çok hızlı bir şekilde hidroliz ederken, mayaların çoğunluğu tarafından hidroliz edilen maltozu hidroliz edemez. Test kabul edilebilir duyarlılık ve özgüllük sağlamakla birlikte seçilen üreme ortamı yanlış pozitifliklere neden olabilmektedir. Kanlı agar, *C. albicans* ve *C. tropicalis* için yüksek oranda yanlış pozitifliklere yol açabileceği için kullanılmamalıdır. En uygun ortam CHROMagar *Candida* ve Sabouraud Glukoz (%4'lük) agar olarak görülmektedir. Kromojenik agardaki koloni rengi ile birlikte GLABRATA GTT veya hızlı trehaloz testinin birlikte kullanılması özgüllüğün artışına olanak sağlayabilir. Hızlı trehaloz ve maltoz hidroliz testi modifiye edilerek batırılan şerit yöntemi şekline getirilmiştir. Bu test yeterli duyarlılık ve özgüllük sağlasa da bu parametreler test inokulumunun üremesi için kullanılan ortamdan etkilenebilmektedir (93, 94, 95, 96, 97).

4.6.3.6. Kromojenik Besiyerleri ile İdentifikasyon

Candida türlerini, kromojenik substratlar yardımı ile oluşan farklı renk ve morfolojileri ile hızlı ve basit bir şekilde tanımlayabilen çeşitli kromojenik besiyerleri kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan CHROMagar *Candida* (CHROMagar, BD Diagnostics), *Albicans* ID2 agar (AID; BioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), *Candida* ID (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), Candiselect medium (Sanofi Diagnostics, Marnes-La-Coquette, Fransa), BiGGY agar (Oxoid, Basingstoke, İngiltere), Fluoroplate *Candida* (Merck, Almanya), Fongiscreen 4H (Sanofi Diagnostics Pasteur), Murex *Candida albicans* (Murex Diagnostics, A.B.D.) gibi çok sayıda kromojenik besiyeri bulunmaktadır. Bu besiyerlerinde tanı, türe özgü ekzoenzim aktivitesi ile çeşitli kromojenik substratların parçalanması sonucu farklı kromojenik ayrışma ürünlerinin ortaya çıkmasına bağlı olarak farklı morfoloji ve değişik renkte koloni oluşumu temeline dayanmaktadır (35, 98).

CHROMagar *Candida* özellikle *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* türlerinin olası identifikasyonunda kullanılmaktadır. Bu besiyerinde 37°C'de 48 saat inkübasyon sonucunda *C. albicans* türleri açık yeşil, *C. tropicalis* türleri koyu mavi-lacivert, *C. krusei* türleri de pembe renkli pürüklü koloniler oluşturmaktadırlar. Kromojenik besiyerlerinin karşılaştırıldığı birçok çalışmada CHROMagar *Candida* besiyerinin duyarlılık ve özgüllüğü %100'e yakın oranlarda bildirilmektedir (99, 100, 101, 102).

Albicans ID2 ve *Candida* ID agar'ın başta *C. albicans* olmak üzere bazı non-*albicans* *Candida* türlerini tanımlayabilen, kolay değerlendirebilen besiyerleri oldukları rapor edilmiştir (100, 102). Bunun yanında Candiselect medium ve BiGGY agar gibi besiyerleriyle yapılan çalışmalarda identifikasyonda kısıtlılıklar göze çarpmaktadır (102, 103).

4.6.3.7. Karbonhidrat Asimilasyon Testleri

Karbonhidrat asimilasyon (glukoz, galaktoz, maltoz, süktroz, trehaloz, nişasta, D-ksiloz) testleri *Candida*'ların tür düzeyinde identifikasyonu amacıyla kullanılan temel testlerden olup, mayaların oksijen varlığında karbon kaynağı olarak, özel bir karbonhidratı kullanabilme özelliğini saptamaktadır (35, 85).

Karbonhidrat asimilasyonu ve/veya enzim saptama amacıyla Bacti-Card *Candida* (Remel Laboratories, Kanada), Murex *C. albicans*-50 (Murex Diagnostics, Norcross A.B.D.) ve *Albicans*-sure (Clinical Standards Laboratories, Rancho Dominguez, A.B.D.) API 20C AUX (BioMérieux -Vitek, Fransa), API *Candida* (BioMérieux, Fransa), Uni-Yeast-Tek kit (Remel Laboratories, Kanada) ve Microscan Yeast Identification Panel (Baxter-MicroScan, West Sacramento, A.B.D.) gibi ticari testler bulunmaktadır. Bunlar belirli bir kimyasal profil üretmek için farklı substratları içeren kuyucuklardaki turbidite artışını veya renk üretimini kullanırlar. Bu testler hızlı ve 24-72 saatte sonuç verebilir nitelikte olup, API 20C AUX en yaygın kullanılanıdır (85, 89, 98). API 20C AUX sonuçları mısır unu-tween 80 agarda morfolojik görünümle birlikte değerlendirilerek sistem tarafından verilebilecek birden fazla tür arasında ayırım yapılabilmektedir. Sistemin en sık karşılaşılan kısıtlılığı maya süspansiyonun uygun yoğunlukta hazırlanmamasının yanlış pozitif veya negatif sonuçlara yol açmasıdır. Yapılan çalışmalarda API 20C AUX sisteminin %95, Micro Drop sisteminin %84 ve Uni-Yeast Tek sisteminin %99 oranında geleneksel yöntemlerle benzerlik gösterdiği saptanmıştır (35, 69, 98).

Tür identifikasyonunda kullanılan diğer sistemler; ID 32Cstrip system (BioMeriux), Vitek Yeast Biochemical Card system (BioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.), Vitek 2 ID-YST card system (BioMérieux Vitek, Inc.), Quantum II (Abbott Laboratories,USA), Biolog YT MicroPlate system (Biolog, USA) ve RapidID Yeast Plus system gibi otomatize biyokimyasal sistemleri içermektedir (85, 89, 98).

“Vitek Yeast Biochemical Card system” sık saptanan türleri başarıyla identifiye edebilmekte iken nadir karşılaşılan türlerin identifikasyonundaki yetersizlik sistemin

kısıtlılığını oluşturmaktadır. API 20C AUX sisteminin referans yöntem olarak kabul edildiği bir çalışmada iki sistem arasında %96,8 oranında uyum saptanmıştır. Son yıllarda bu sistemin yerini tam otomatize “Vitek 2 ID-YST card system” almıştır. Bunun özellikle 18 saatlik inkübasyon sonrasında sonuç vermesi önemli bir avantajdır (104, 105).

4.6.3.8. Karbonhidrat Fermentasyon testleri

Karbonhidrat fermentasyon (glukoz, galaktoz, maltoz, sükroz) testleri mayaların CO₂ ve alkol üretimini araştıran testlerdir. Klinik örneklerden soyutlanan fermentatif mayalar CO₂ ve alkol ürettikleri için gaz üretimi fermentasyonun bir göstergesi olarak saptanır. Ancak ortam pH'sı değişmeyebilir. İdentifikasyon amaçlı olarak mısır unu-tween 80 agarda tipik morfolojinin değerlendirildiği laboratuvarlarda sık olarak soyutlanan türlerin identifikasyonunda fermentasyon testleri nadir olarak kullanılmaktadır. Bu testler *Candida*, *Cryptococcus* ve *Rhodotorula* gibi nonfermentatif mayaların birbirinden ayrımında yararlıdır. Endojen karbonhidratların *Candida* hücre duvarına bağlanması nedeniyle yalancı pozitifliklerin izlenebilmesi bu testlerin en önemli kısıtlılığını oluşturmaktadır (35, 85).

4.6.3.9. Hızlı İdentifikasyon Testleri

Hızlı identifikasyon testleri koloni oluşumunu takiben aynı gün içinde (<24 saat) sonuç veren yöntemlerdir. Enzim temelli testler laboratuvarlarda sık olarak üretilen maya türlerine özgü olup, özgün ekzoenzimlerin saptanması ile iki veya üç muhtemel tür arasındaki karışıklığın ortadan kaldırılmasında faydalı olabilmektedir. Bu amaçla özellikle *C. albicans*'ın saptanması için hızlı testler bulunmaktadır. Bu testlere gereksinim *C. albicans*'ın %5 oranında çimlenme borusu ile negatif sonuç vermesi ve aynı testte *C. tropicalis* ve *C. dubliniensis* ile pozitiflikler saptanmasından doğmuştur. Bu gruba *Candida albicans* screen (Carr-Scarborough Microbiologicals, Decatur Ga.), Albistrip (Lab M Ltd., Bury, United Kingdom) ve BactiCard Candida test kit (Remel, Lenexa, Kansas, USA) gibi *C. albicans* identifikasyonuna yönelik testler örnek olarak verilebilir. Her üç testte de sadece β galaktozaminidaz üretimi yerine prolin aminopeptidaz ve β galaktozaminidaz enzimlerinin üretimi değerlendirilmektedir. *C. albicans* her iki enzimi de üretirken diğer *Candida* türleri ya tek bir enzimi üretmekte veya her ikisini de üretmemektedir. Bu nedenle her iki enzimin üretiminin araştırılması ile testlerde elde edilecek yanlış sonuçlar engellenmiş olur. BactiCard Candida test kiti ile çimlenme borusu testinin karşılaştırıldığı bir çalışmada BactiCard

Candida testinin duyarlılığı %97,8 oranı ile çimlenme borusu testinden yüksek, özgüllüğü ise daha düşük olarak saptanmıştır. Hızlı identifikasyon testlerinin en önemli avantajı ise 5-30 dakikada sonuç vermeleridir (85, 106).

4.6.3.10. İdentifikasyonda Moleküler Yöntemler

Mikoloji laboratuvarında moleküler yöntemlerin kullanılmasının esas amacı, patojen fungusların klinik örnekte kültürü yapılmadan önce kısa sürede ve doğru olarak saptanması ve/veya klasik yöntemler ile kültürde üretilmiş olan fungusun hızlı tanımlanmasıdır. Cins düzeyinde tanımlama birçok küf mantarı için yeterli olabilirken, özellikle antifungal ajanlara dirençli olan bazı mantarların tür düzeyinde identifikasyonu önemli bir gereksinimdir. Bu nedenle *Candida* türlerinin doğru ve hızlı identifikasyonu, uygun antifungal sağaltıma erken dönemde başlanması açısından önem taşımaktadır (107, 108).

Moleküler yöntemler; tanı yanında *Candida*'ların cins veya tür düzeyinde tanımlanması, epidemiyolojik tiplendirme, virulans faktörlerinin belirlenmesi, antifungal direnç genlerinin araştırılması, mutasyon incelemeleri, sınıflandırma ve filogenetik analizlerde kullanılmaktadır (109).

Candida türlerinin hızlı identifikasyonu için halen çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmekte olup, yöntemlerin herbirinin avantaj ve dezavantajları mevcuttur (109).

Moleküler tanı yöntemleri; nükleik asit amplifikasyon yöntemleri ve hibridizasyon “probe”lerinin kullanıldığı sinyal amplifikasyon yöntemleri olmak üzere iki grupta toplanabilir (107).

4.6.3.10.1. Nükleik asit Amplifikasyon Yöntemleri

Nükleik asit amplifikasyon teknolojilerinde, *Candida* türlerinin saptanması ve identifikasyonu amacıyla hedef bölgenin PZT ile direkt çoğaltımı, hedef ile bağlanan komplementer oligonükleotidlerin (“probe”lar) çoğaltımı, hedef ile bağlanmış “probe”ların oluşturdukları sinyallerin çoğaltımı gibi yöntemler kullanılmaktadır (107).

4.6.3.10.1.1. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)

PZT, özgül bir gen bölgesinin, bu hedef bölgelerin uç kısımlarına bağlanan iki özgül oligonükleotit öncül ve termostabil *Taq* DNA polimeraz kullanılarak amplifikasyon işlemidir.

Candida türlerinin tanısında kullanılan hedef bölgeler iki gruba ayrılabilir. Bunlar ön amplifikasyon ve tür düzeyinde tanımlama için kullanılan hedef bölgelerdir. Ön amplifikasyon için genellikle genom içerisinde kopya sayısının çok olması nedeniyle ribozomal DNA (rDNA) (40-80 kopya) ve kopya sayısı rDNA genlerinden daha az olan mitokondriyal DNA (yaklaşık 30 kopya) genleri tercih edilir. Bu amaçla; tüm mantarlar için ortak, çok tekrarlı ve ileri derecede korunmuş 18S, 5.8S ve 28S rDNA alt üniteleri kullanılır. Korunmuş olan bu bölgeler türler arasında yeterince farklılık göstermemeleri nedeniyle identifikasyon için uygun değildirler. Bu sebeple *Candida*'ların tür düzeyinde tanımlanmasında; ribozomal alt birimleri kodlayan gen bölgelerinin arasına giren ve protein kodlamayan "internal transcribed spacer" (ITS1, ITS2) bölgeleri, sitokrom P-450 lanosterol-alfa-demetilaz, aspartik proteinaz, aktin, kitin sentetaz ve ısı şok proteini kodlayan gen bölgeleri hedef bölge olarak kullanılmaktadır. rRNA genleri bunun yanında içerdikleri korunmuş ve değişken bölgeleri ile filogenetik analizler için de uygun hedef bölgelerdir (129, 109, 110).

Teorik olarak PZT klinik örneklerle uygulanabilmekte, doku ya da kanda çok az miktarlardaki nükleik asitleri bile saptayabilmektedir. Ancak çevresel kontaminasyon veya pozitif örnekler arasında çapraz kontaminasyon nedeniyle oluşan yalancı pozitif sonuçlar PZT'nin özellikle acil tanı gerektiren durumlardaki uygunluğunun sorgulanmasına neden olmaktadır. Bunun yanında *Taq* DNA polimeraz inhibitörlerinin varlığı nedeniyle de yalancı negatif sonuçlar alınabilmektedir (111).

Özellikle risk grubunda bulunan hastalar için PZT yöntemi ile erken tanı konulup uygun sağaltıma başlanması çok önemlidir. Bu hasta grubunda PZT yöntemi klasik yöntemlere göre daha hızlı sonuç verdiği için avantajlı bir yöntemdir. Kültüre dayalı yöntemlerle örneklerin çoğunda *Candida* saptanması için 48 saat gerekirken, tür tanımlaması da ek olarak 48- 72 saat alabilmektedir. PZT ile 8 saat içerisinde sonuca ulaşılabilceği bildirilmiştir (112).

İnvazif infeksiyonu olan hastalarda PZT kullanımı ile saptama sınırının kanda 1 Koloni Oluşturan Ünite (KOÜ)\ml olduğu ve yöntemin duyarlılığının %100 olduğu belirtilmiştir (85).

PZT yönteminin hızlı sonuç vermesi ve duyarlılığının yüksek olmasına karşın kullanılan malzemenin pahalı, tekniklerin karmaşık oluşu, kullanımının deneyim gerektirmesi gibi nedenler ile halen, kültür ve serolojik yöntemler gibi klasik identifikasyon uygulamalarının yerini alamamıştır (109).

Günümüzde Real-time PZT, Light Cyclers (Roche Molecular Biochemicals, Roche Group, Indianapolis, Ind.) ve benzeri teknolojiler ile bir saatten kısa sürede sonuç alınabilmekte, amplifikasyon ve saptama kapalı bir sistemde gerçekleştirilmekte, böylelikle çapraz kontaminasyon riski ortadan kaldırılmaktadır (107).

4.6.3.10.1.1.1. Polimeraz Zincir Tepkimesi Temelli İdentifikasyon Yöntemleri

4.6.3.10.1.1.1.1. ''Restriction Fragment Length Polymorphism''(RFLP-PZT)

RFLP-PZT, rDNA amplifikasyonunu takiben tür tanımlaması için ileri amplifikasyon ürünlerinin elde edilmesini gerektiren yöntemlerden birisidir. Bu yöntem *Candida* türlerinin genotiplerinin araştırılması amacıyla ilk kullanılan yöntem olup, *Candida* infeksiyonlarında moleküler epidemiyolojik amaçlı çalışmalarda çok yaygın olarak kullanılmıştır. Uygulanması basit bu yöntem, pürifikasyon ve sonrasında total genomik DNA'nın özgül restriksiyon enzimleri ile kesilmesi esasına dayanır. Kesim sonrası oluşan DNA parçacıkları agaroz jelde elektroforez yöntemi ile ayrılıp, etidyum bromür ile boyanır ve ortaya çıkan bant paternleri görsel olarak karşılaştırılır. Bir çok durumda elde edilen restriksiyon paternleri çok kompleks olup, görsel olarak karşılaştırılması çok zordur (129, 109).

Fungal genomun karmaşık yapısından dolayı bant paternlerinin değerlendirilmesinin zor olması yöntemin en önemli kısıtlılığını oluşturmaktadır. Bunun yanında hızlı, kolay uygulanabilir ve ucuz bir yöntem olup, tıbbi açıdan önemli mayaların ekonomik identifikasyonu amacıyla rutin laboratuvarlarda kullanılabileceği bildirilmiştir (129).

4.6.3.10.1.1.1.2. ''Amplified Fragment Length Polymorphism''(AFLP)

AFLP, genomik DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan DNA parçalarının bir grubunun selektif amplifikasyonu esasına dayanan bir yöntemdir. DNA ekstraksiyonu ve pürifikasyon işleminden sonra DNA, iki restriksiyon enzimi ile kesilir. Restriksiyon sonrası oluşan ürünler her bir restriksiyon enzimi için hazırlanmış, hem enzimin kesimi için gerekli olan baz dizilimi hem de PZT öncülü için bağlanma bölgesi içeren adaptörler ile ligasyona sokulmaktadır. Bu adaptörler primerler için hedef görevini görmektedir. Daha sonra adaptöre uygun baz dizilimi içeren öncüller ile seçilen fragmanların

amplifikasyonu yapılır. Poliakrilamit jel elektroforezi sonrası sonuçlar bilgisayar programı ile değerlendirilebilen dalgalara dönüştürülebilir (114, 115).

Borst ve arkadaşları (115), AFLP yönteminin medikal açıdan önemli *Candida*'ların tür düzeyinde identifikasyonunda güvenilir bir yöntem olduğunu, sonuçların türler arasındaki farklılığı açıkça gösterdiğini belirtmişlerdir.

4.6.3.10.1.1.3. *Multipleks PZT*

Tek tüp içinde farklı hedef bölgeler için özgül olan öncüller kullanılarak, çok sayıda hedefin aynı anda çoğaltıldığı bir yöntemdir. Her bir öncüle özgü, farklı büyüklükteki amplifikasyon ürünlerinin agaroz jelde gözlenmesi ile klinik örnekte *Candida*'ların varlığı ve identifikasyonu aynı anda yapılabilmektedir. Pozitif kan kültüründen identifikasyon 1-3 gün alırken, multipleks PZT yöntemi ile 8 saat gibi kısa bir sürede aynı deney sürecinde birden fazla türün identifikasyonunu da yapmak mümkündür. Bunun yanında multipleks PZT ile kan kültüründe *C. albicans* için saptama sınırının 20 KOÜ/ml olduğu belirtilmektedir (116, 117, 118).

4.6.3.10.1.1.4. *“Nested” PZT*

“Nested” PZT klinik örnekte düşük kopya sayısı bulunan hedef ile ilişkili saptama sorunlarını çözebilmek için geliştirilmiş bir yöntemdir. İki aşamalı amplifikasyon yöntemi olup, ilk aşamada iki adet dış öncül kullanılarak uzun bir hedef bölge çoğaltılmakta, ardından çoğaltılan örnekteki DNA'nın daha kısa bir bölümü iç öncüller aracılığı ile amplifiye edilmektedir. İç öncüller, dış öncüllerin bağlanma bölgelerinin iç kısmında kalan kendilerine özgül yerlerine tutunmaktadırlar. Örnekte tek bir hedef DNA molekülünün bulunması durumunda bile iki aşamalı olarak yapılan amplifikasyonlarla çok sayıda DNA elde etmek mümkün olmaktadır. Sonuçta pozitif sonuç alma olasılığı ile birlikte testin duyarlılığı da arttırılmış olmaktadır. Yöntemin önemli bir dezavantajı, ilk amplifikasyon sonrası örneğin yeni bir tüpe aktarılırken oluşabilecek çevresel kontaminasyon nedeniyle yanlış pozitiflik verebileceği olasılığıdır (116, 119).

Yöntem klinik örnekten *Candida* türlerinin güvenilir olarak saptanması için yaklaşık olarak 6-7 saat gerektirmekte olup, duyarlılığı saptanan türe göre değişmekle birlikte özgüllük tüm *Candida* türleri için %100 olarak saptanmıştır (120, 113).

4.6.3.10.1.1.5. “Seminested” PZT

“Seminested” PZT’de ilk aşamada iki adet dış öncül kullanılarak uzun bir hedef bölge çoğaltılmakta, ikinci aşamada kullanılan öncüllerden biri içeriden, diğeri dış öncülle aynı yerden başlatılmaktadır. Bu yöntem kullanılarak *Candida* türlerinin tam kan ve serum örneklerindeki varlığının gösterilmesi ve tür belirlenmesi hızlı ve doğru olarak gerçekleştirilmiştir. “Seminested” PZT ile serumun 1 ml’sinde 1 hücre *Candida* saptanması mümkün olmaktadır. Özellikle genom içerisinde 50- 100 kopya bulunması nedeniyle hedef olarak rDNA’nın kullanılması yöntemin duyarlılığını arttırmaktadır (119, 121).

4.6.3.10.1.1.6. “Real Time” PZT

Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesiyle, kısa sürede, kantitatif sonuç veren PZT yöntemidir.

LightCycler (Roche) sisteminde, yalnızca çift iplikli DNA’ya bağlandığında floresan veren “Cyber green” boyası kullanılarak, amplifikasyona bağlı DNA artışı, oluşan floresan miktarı ile ölçülmektedir. Öncüllerin bağlanması ile birlikte gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA’nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA’ya bağlanan boya miktarı ve buna bağlı olarak da yayılan floresan miktarında artış gözlenmektedir. Aynı sistemde floresan boyalar ile işaretli “probe”lar da kullanılabilir. Klingspor ve arkadaşları (122) tarafından yapılan ve LightCycler sisteminin kullanıldığı bir çalışmada *Candida* türlerin tür düzeyinde identifikasyonu 5-6 saat almış ve yöntem kanda 2 KOÜ/ ml duyarlılıkta saptama yapabilmıştır (116, 119).

TaqMan sisteminde, 5' ve 3' uçlarından florokrom maddeler ile işaretli “probe”lar kullanılmaktadır. “Probe”un 5' ucunda raportör florokrom, 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunmaktadır. “Probe”, tek sarmal haline getirilen hedef molekül üzerinde, öncüllerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Hibridizasyon sırasında “probe”un 5' ucundaki raportör florokrom 3' ucundaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenir ve floresan sinyal alınmaz. Hibridizasyon bitince Taq DNA polimeraz enzimi “probe”u 5' ucundan başlayarak yıkıma uğratır. Serbest hale geçen raportör florokrom floresan sinyal verir. PZT sürecinde üretilen ampikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artar (116, 119).

“Real Time” PZT, mikolojide, identifikasyon, tiplendirme, ilaç direncine neden olan mutasyonların saptanmasında kullanılmaktadır. Yöntem, kısa sürede sonuç verebilen, kapalı bir sistem olduğu için kontaminasyon riski düşük, elektroforez basamağına gerek kalmadan

amplifikasyon aşamasında sonuç alınabilen, floresan veren “probe”lar kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonları saptayabilen bir yöntemdir (123).

4.6.3.10.2. Sinyal Amplifikasyon Teknolojileri

Hibridizasyon; etkene ait genetik yapının işaretli “probe”lar yardımı ile ortaya konmasını amaçlar. “Probe”lar; hedef nükleik asitlerin belirli bölgelerine komplementer, genellikle 50 bp’den küçük oligonükleotitlerdir. *Candida* identifikasyonu için Southern blot, Northern blot, dot blot ve in situ hibridizasyon teknikleri ile çalışılmıştır. Nükleik asit hibridizasyon “probe”larının kullanıldığı bu yöntemler kültür doğrulaması için mikoloji labotatuvarlarında sık kullanılmaktadır. Mantarların tanımlanması için hazırlanmış ticari genetik “probe”lar özellikle kültürde üremiş küflerin tanımlanmasında tanı değeri bulmaktadır. Ancak DNA üzerindeki hedef bölgelerin sınırlı sayıda olması nedeni ile direkt etkene özgün “probe” hibridizasyon testlerinin duyarlılığı düşüktür (109).

4.6.3.10.2.1. ‘‘Southern-Blotting’’

Ekstrakte edilen DNA, restriksiyon enzimleri ile kesilir ve kesimden elde edilen DNA parçaları elektriksel ortamda agaroz jel üzerinde uzunluklarına göre göç ettirilmektedir. Jeldeki DNA’lar nitroselüloz veya naylon membran üzerine aktararak işaretleme (blotting) işlemi gerçekleştirilmektedir. Son olarak özgül DNA dizilimlerinin yeri işaretli DNA veya RNA “probe”ları kullanılarak belirlenmektedir (124).

C. albicans için kullanılan ilk “probe”lar olan rDNA, mDNA “probe”ları ile az sayıda bant elde edildiğinden yeterli değerlendirme yapılamamaktadır. Günümüzde kullanılan 27A,Ca3 “probe”ları “repeats in the repetitive sequence” (RPS) adı verilen tekrarlayan elementler içermektedirler. Bu “probe”lar ile değişik yoğunluklarda 10-20 adet bant elde edilmektedir. *C. albicans*’a özgü CARE-2 “probe”ları ile oluşan bantlar aşırı değişken olduğundan birbirleriyle ilişkili izolatların analizinde yeterli olamamaktadır. Son yıllarda klinik açıdan önemli diğer *Candida* türlerini saptamaya yönelik “probe”lar geliştirilmiştir (109).

“Southern-Blotting” tekrarlanabilirliği, tiplendirebilirliği ve ayırım gücü yüksek bir teknik olsa da uygulaması zor ve zaman alıcıdır (109).

4.6.3.10.2.2. ‘‘Northern Blotting’’

RNA ekstraksiyonunu takiben, elde edilen RNA parçalarının elektroforezle jelde göç ettirilmesi, nitroselüloz veya naylon membran üzerine aktarılması ve ‘‘Southern-Blotting’’ yöntemindekine benzer şekilde hibridizasyon ve bu membrandaki özgül RNA dizilimlerinin belirlenmesini içeren bir yöntemdir. Özgül RNA dizilimlerinin belirlenmesi için farklı tiplerde ‘‘probe’’lar seçilebilir (124).

4.6.3.10.2.3. ‘‘In-Situ’’ Hibridizasyon

Doku, organ ve hücrelerdeki özgül nükleik asitlerin belirlenmesinde kullanılan bir hibridizasyon yöntemidir. Yöntem sürecinde kullanılan DNA veya PNA ‘‘probe’’ları direkt olarak raportör molekül ile işaretlenir. Yöntemin en önemli avantajı, hücre ve doku içindeki hedef nükleik asitin lokalizasyonunun belirlenmesine olanak sağlaması olup, histopatolojik incelemelerden sonra uygulanabilmesi de diğer bir avantajıdır (107, 109, 125).

4.6.3.10.2.4. Diğer Yöntemler

4.6.3.10.2.4.1. ‘‘Single Strand Confirmation Polymorphism’’(SSCP)

SSCP, iki farklı dizinin hibridize olması sonucu ortaya çıkan heterodupleks molekülde yer alan DNA konformasyonundaki farklılığın belirlenmesi esasına dayanır. Polimorfik DNA bölgeleri işaretli öncüller ile çoğaltılıp, ısı ile denatürasyonu takiben ayrılan sarmalların birleşmesini engellemek için buzda bekletilir. Elektroforez uygulaması sırasında bu yapılar kendi üzerlerine katlanarak yeni bir yapı kazanırlar ve elektroforetik mobiliteleri bu yapı tarafından belirlenir. Elektroforez paterni, öncüllerin işaretlendiği maddeye göre röntgen filminde veya otomatize sistemlerle belirlenir. Bu yöntem ile DNA’daki tek bir mutasyon bile gösterilebilmekte, kısa sürede çok sayıda örnek ile çalışılabilmektedir (114). Bu teknik DNA sekanslamasına alternatif bir yöntem olup, otomatize edilerek rutin kullanıma geçebilme potansiyeline sahiptir (126).

4.6.3.10.2.4.2. DNA ‘‘microarray’’ Yöntemi

Oligonükleotit ‘‘microarray’’, katı destek faz üzerinde yerleştirilmiş oligonükleotit gruplarını içeren minyatür araçlardır. Çözelti halindeki işaretli ürün katı bir substrat üzerinde immobilize edilmiş tamamlayıcı dizi ile hibridize olduktan sonra ‘‘array’’görüntüsü elde

edilmekte ve görüntüdeki her eleman için sayısal bir değer çıkarılıp bilgisayar programları ile değerlendirilmektedir (107).

4.6.3.10.2.4.3. Sekanslama (Dizi Analizi)

DNA dizi analizi, mantarların alternatif bir tanımlama yöntemidir. Kültürde üretilmiş veya klinik örneklerde etken olan mantarların tanınması amacıyla kullanımı gittikçe daha çok önem kazanmaktadır (107).

DNA dizi analizinde Taq DNA polimeraz, revers transkriptaz veya sekans enzimlerinden birisi kullanılarak DNA iplikçığının komplementeri sentezlenmektedir. Sentezlenen DNA iplikçığıne dNTP eklendiğinde uzama devam ederken, 3' ucunda OH grubu taşımayan ddNTP eklendiğinde zincir uzaması durmaktadır. Kalıp DNA'lar, öncüller, dNTP karışımı ve enzimin konulduğu dört reaksiyon tüpünün her birine bir ddNTP eklenmesinden sonra bağlanma ve uzama işlemleri uygulanmaktadır. Böylelikle reaksiyon tüplerinde farklı uzunluklarda DNA parçaları oluşmaktadır. Sonuçta ortaya çıkan farklı uzunluktaki DNA parçalarına poliakrilamit jel elektroforezi uygulanmaktadır. DNA dizi analizi sonucunu görünür hale getirmek için radyoaktif madde, kemilüminesans veya floresan veren boyalarla işaretleme yapılmaktadır. Dizi analizi yapıldıktan sonra elde edilen nükleik asit dizisi veri tabanından bilinen diziyle karşılaştırılır. Yöntem teknik olarak karmaşık olup, gelişmiş laboratuvar olanakları gerektiren, pahalı bir yöntemdir. Ancak gelecekte kullanımı artacak ümit verici bir teknik olarak güncelliğini korumaktadır (107).

Dizi analizi verileri ile mantarların tanımlanması ve diğer mantarlarla olan filogenetik ilişkisi belirlenebilmektedir. Bu yöntem ile mayaların identifikasyonu için geçen süre 24-36 saattir (127).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Suşlar

Çalışmaya; Kasım 2004-Kasım 2006 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji laboratuvarına gönderilen kan, kateter örneği, steril vücut sıvıları (BOS, plevra sıvısı, periton sıvısı, eklem sıvısı), yara (aspirasyon, doku, biyopsi) örnekleri, idrar gibi sistemik örneklerden soyutlanan toplam 146 *Candida* suşu alındı. Suşların türlere göre dağılımı 40 *C. albicans*, 27 *C. parapsilosis*, 26 *C. tropicalis*, 25 *C. glabrata*, 11 *C. kefyr*, 10 *C. krusei*, 7 *C. guilliermondii* şeklindeydi. Bunların dışında *C. albicans* ATCC 14053, *C. parapsilosis* ATCC 90018 ve *C. krusei* ATCC 6258 kontrol suşları olarak çalışmaya dahil edildi. Tüm suşlar %50 gliserol içeren beyin kalp infüzyon (BHI) buyyonunda -80°C’de stoklandı.

Stok besiyerlerinden SDA’ya iki kez pasajlanan suşlar 37°C’de 24- 48 saat inkübe edilerek üretildi. Suşlara rutin identifikasyon yöntemleri yanında PZT sonrası REA uygulanarak tanımlama işlemi yapıldı.

5.2. Rutin İdentifikasyon Yöntemleri

Üreyen kolonilere öncelikle çimlenme borusu testi uygulandı. Daha sonra suşların mısır unu tween 80 agar ve CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Fransa) besiyerlerindeki morfolojileri değerlendirildi ve API 20C AUX (Biomérieux, Fransa) otomatik identifikasyon işlemi uygulandı.

5.3. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT)

5.3.1 DNA Eldesi (Ekstraksiyon)

“Yeast extract peptone dextrose” (YPD) agar’da (Difco, Franklin Lakes, A.B.D.) 37°C’de 48 saat inkübasyon sonucu üretilen suşlardan alınan bir koloni, 5ml’lik YPD buyyon (Difco, Franklin Lakes, A.B.D.) içeren tüplere aktararak 37°C’de 24 saat inkübe edildi (128). YPD buyyon içinde inkübe edilmiş olan suşlar Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Almanya) kullanılarak, üretici firma önerileri doğrultusunda ekstraksiyona alındı. Ekstraksiyon uygulamasından önce kitin önerisi doğrultusunda bazı çözeltiler hazırlandı. Bunlar:

10 mM EDTA (pH: 8.0) (Applichem A 5097,0250)

Litikaz (Sigma L 2524)

Sorbitol tampon: 1.2M sorbitol, 10mM CaCl₂, 0.1M Tris/Cl, ayrı ayrı hazırlanıp otoklavlandıktan sonra eşit hacimlerde alınıp, 35mM β-merkaptoetanol ile karıştırılarak hazırlandı.

5 ml'lik YPD buyyonda inkübe edilmiş suşlar 5,000×g'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatantları atıldı. Çökelti 10 mM EDTA'nın 1000 µl'si ile karıştırılıp, 5,000×g'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen çökelti ön-lizis işlemine alındı. Ön-lizis işleminde 600 µl sorbitol tampon ve 50Ü (5.8 µl) litikaz ile süspanse edilen çökelti 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alındı. Elde edilen karışım 30°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra 2,000×g'de 10 dakika santrifüjlenip, süpernatant atıldı. Elde edilen çökeltiye 180 µl kit içeriğinde bulunan T1 tampon ve 25 µl proteinaz K solüsyonu ilave edilip, vortekslendi. Örnekler, 56°C'de su banyosunda 2 saat inkübe edildi. Bu basamaktan sonra lizis işlemine geçildi. Lizis işleminde su banyosundan çıkarılan örnekler vortekslendikten sonra 200 µl B3 tampon eklenerek vorteks işlemi tekrar edildi. Daha sonra 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. Bu şekilde lizis işlemi tamamlandıktan sonra örnekler 210 µl %96-100'lük etanol eklendi ve vortekslendi. Örnekler 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilmiş olan Nucleospin Tissue kolonlara alındı ve 11,000×g'de 1 dakika santrifüjlendi. Sıvının toplandığı toplama tüpleri atıldı ve kolonlar yeni toplama tüpleri içine yerleştirildi. Bu işlem ile DNA'nın silika membrana bağlanması sağlandı. Silika membranın yıkanması amacıyla 500 µl BW tampon eklendi ve 11,000×g'de 1 dakika santrifüjlendi. Sıvının toplandığı toplama tüpleri atıldı ve kolonlar yeni toplama tüpleri içine alındı. Kolonlara 600 µl B5 tampon eklendi, 11,000×g'de 1 dakika santrifüjlendi ve yine sıvının toplandığı toplama tüpleri atılarak kolonlar yeni toplama tüpleri içine yerleştirildi. Silika membranın kurutulması için 11,000×g'de 1 dakika santrifüj uygulandı. Bu işlem ile artakalan etanol kalıntılarının uzaklaştırılması sağlandı. Kolonlar 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. DNA eldesi için silika membran üzerine önceden 70°C'ye ısıtılmış 100 µl elüsyon tampon BE eklendi, oda ısısında 1 dakika inkübe edildi ve 11,000×g'de 1 dakika santrifüjlendi. Böylece DNA eldesi 100 µl hacimde tamamlandı.

5.3.2 Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) Uygulanması

5.3.2.1. PZT İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması

Tamponlar

“Taq” DNA polimeraz enzimi (MBI Fermentas EPO 402) (5U/µl)

10x “*Taq*” tampon (MBI Fermentas EPO 402)

25 mM MgCl₂ (MBI Fermentas EPO 402)

dNTP karışımı (Intron Biotechnology 32111): Her biri 10 mM olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP’den eşit oranlarda alınarak 100 µl’lik PZT için son konsantrasyonu 50µM olacak miktarda kullanıldı.

TE tamponu (pH: 8.0): 2.5 ml 1 M Trizma “base” (Sigma T 6066) (pH: 8.0), 0.5 ml 0.5 M Na₂EDTA (Sigma E 5134) (pH: 8.0) karıştırılıp, hacim 250 ml’ye tamamlandı. Karışım otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

TE tamponu için Tris ve Na₂EDTA çözeltisi hazırlanması:

1M Tris çözeltisi: 121.14 gr. tris (hidroksimetil) aminometan, 800 ml suda eritildi. 42 ml HCl ilave edilerek pH’sı 8.0’e ayarlandı ve hacim, su ile 1 litreye tamamlanarak oda ısısında saklandı.

0.5 M Na₂EDTA çözeltisi: 186.1 gr disodyum etilen diamin tetra asetat- 2H₂O, 800 ml suda eritildi. NaOH pelletleri kullanılarak pH’sı 8.0’e ayarlandı ve hacim, su ile 1 litreye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

Öncüller, 1ml TE çözeltisi ile sulandırıldı ve elde edilen ana dilüsyondan distile su ile 20pmol/µl’lik alikotlar hazırlanarak -20°C’de saklandı.

5.3.2.2. PZT Çalışmasında Kullanılan Öncüller

Öncül1 (Alpha DNA 191336)

5' GTC AAA CTT GGT CAT TTA 3'

T_m 48.0 ° C

Öncül3 (Alpha DNA 191337)

5' TTC TTT TCC TCC GCT TAT TGA 3'

T_m 58.0 ° C

5.3.2.3. PZT Karışımı ve Isı Döngüsü

PZT döngüsü, Trost ve arkadaşlarının (129) önerdiği şekilde 100 µl’lik total hacimde optimize edildi. PZT karışımı aşağıdaki şekilde uygulandı.

	Tepkime Hacmi	Son Konsantrasyon
Nükleaz içermeyen steril distile su	69.8 ml	-
10x'' <i>Taq</i> ''DNA tampon	10 µl	1x
25 mM MgCl ₂	6 µl	1.5 mM
dNTP karışımı	2 µl	0.2 mM
Öncül1	1 µl	20 pmol
Öncül3	1 µl	20 pmol
'' <i>Taq</i> ''DNA polimeraz	0.2 µl	5 U/µl
DNA	10 µl	-
Toplam hacim	100 µl	-

Tepkime ısı döngüsü

94°C'de 3 dakika ön denatürasyon

94°C'de 30 saniye denatürasyon	} 34 döngü
50°C'de 30 saniye birleşme	
72°C'de 1 dakika uzama	

72°C'de 10 dakika son uzama

+4°C'de elektroforez uygulamasına kadar saklandı.

5.3.2.4. PZT Ürününün Görüntülenmesi

5.3.2.4.1. Görüntüleme İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması

10X TBE: 108 gr Trizma "base" (Sigma T 6066), 55 gr borik asit (AppliChem A2940,0500) 900 ml suda çözüldü. 40 ml 0.5 M Na₂EDTA (Sigma E 5134) (pH: 8.0) eklendi ve hacim, su ile 1 litreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

Agaroz: (Sigma A 5093)

Etidyum bromür: (Applichem A 1152,0100) (%1'lik solusyon)

DNA ağırlık belirleyicisi: PZT ile elde edilen DNA ürününün tanımlanması için (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas SM0371), üretici firma tarafından önerilen şekilde hazırlanarak kullanıldı.

Jel yükleme tamponu (6X): Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas SM0371

5.3.2.4.2. PZT Ürününün Görüntülenmesi

TBE tamponu ile %2'lik agaroz jel hazırlanarak %5 oranında etidyum bromür solüsyonu eklendi ve karışım jel kalıbına döküldü. 10 µl PZT ürünü, 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak 3µl DNA ağırlık belirleyicisi ve ürünlerin 10 µl'si jel kuyucuklarına yüklendi. Elektroforez tankı 1X TBE tamponu ile doldurularak, jele bu tank içinde 120 V'da 40 dakika elektroforez uygulandı.

Sonuçlar ultraviyole aydınlatıcıda incelenerek görüntüleme cihazında (Syngene GeneSnap, Synoptics Ltd., A.B.D.) görüntülendi.

5.4. Restriksiyon Enzim Analizi (REA)

PZT uygulanan 146 suşun tümü saflaştırma (pürifikasyon) işlemi sonrasında REA çalışmasına alındı.

5.4.1. Saflaştırma İşlemi

PZT çalışmasına alınan suşlara saflaştırma işlemi üretici firma (GeneMark PCR Clean-Up Kit DP04) önerisi doğrultusunda uygulandı. İlk olarak kitin önerdiği şekilde yıkama solüsyonuna kullanım öncesi 64 ml etanol ilave edildi. İşleme başlarken PZT ürünü 1,5 ml'lik ependorf tüpüne alınarak üzerine 500 µl "binding solution" eklendi ve hızlıca vortekslendi. Örnek 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş olan "PCR Clean-Up Kit" kolonuna alındı ve 12,000×g'de "spin" sonrası filtratın toplandığı toplama tüpü atıldı. Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek 700 µl yıkama solüsyonu eklendi. 12,000×g'de 1 dakika santrifüjlendi. Sıvının toplandığı toplama tüpü atıldı ve kolon yeni bir toplama tüpü içine alındı. Aynı basamak bir kez daha tekrar edilip filtrat atıldıktan sonra, toplama tüpü içine yerleştirilmiş kolon 12,000×g'de 3-5 dakika santrifüjlendi. Bu işlem ile artakalan etanol kalıntılarının uzaklaştırılması sağlandı. Kolon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Silika membran üzerine önceden ısıtılmış (70°C) 60 µl "elution solution" eklendi, oda ısısında 1-2 dakika inkübe edildi ve 12,000×g'de 1 dakika santrifüjlendi. Böylece PZT ürünleri saflaştırılmış oldu. Elde edilen 60 µl'lik ürünler mikrosantrifüj tüpleri içinde -20°C'de saklandı.

5.4.2. Restriksiyon Enzim Analizi (REA) İşleminin Uygulanması

Tüm suşlara uygulanan REA için *MwoI* enzimi (Fermentas ER1731 /300Ü) ve *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* suşlarına kullanılan *BsII* enziminin izoşizomeri olan *BseLI* (*BsiYI*) enzimi (Fermentas ER1202 /2500Ü) 10x tampon ile birlikte kullanılarak 20µl toplam hacim içerisinde tepkime gerçekleştirildi (129).

MwoI (*HpyF10VI*) enzimi

5'...G C N N N N N↓N N G C...3'

3'...C G N N↑N N N N N C G...5'

BsII [*BseLI* (*BsiYI*)] enzimi

5'...C C N N N N N↓N N G G...3'

3'...G G N N↑N N N N N C C...5'

MwoI (*HpyF10VI*) Enzimi ile REA için Tepkime Hacmi

Nükleaz içermeyen steril distile su	5 µl
10x tampon	2 µl
<i>MwoI</i> (<i>HpyF10VI</i>) enzimi	1 µl
DNA	12 µl
Toplam hacim	20 µl

Tepkime karışımı 37°C'de 2 saat süreyle ısı bloğunda tutuldu (129). Ardından 80°C'de 20 dakika ısı ile inaktivasyon uygulandı. Elde edilen ürünler %2'lik agaroz jelde etidyum bromür ile boyanıp, 120 V'da 40 dakika elektroforez uygulanarak görüntülendi.

BsII [*BseLI* (*BsiYI*)] Enzimi ile REA için Tepkime Hacmi

Nükleaz içermeyen steril distile su	5 µl
10x tampon	2 µl
<i>BsII</i> enzimi	1 µl

DNA	12 µl
Toplam hacim	20 µl

Reaksiyon karışımı *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* suşları çalışıldığında 55°C’de 45 dakika, *C. guilliermondii* suşları çalışıldığında ise 55°C’de iki saat süreyle ısı bloğunda tutuldu (129). Bu ısı ve süre sonunda kesilmeyen *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* suşları için PZT ürünleri ½ dilüe edilerek enzim aynı ısı ve sürede tutularak REA tekrarlandı.

5.4.3. REA Ürününün Görüntülenmesi

5.4.3.1. Görüntüleme İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması

10X TBE: 108 gr Trizma “base” (Sigma T 6066), 55 gr borik asit (AppliChem A2940,0500) 900 ml suda çözüldü. Üzerine 40 ml 0.5 M Na₂EDTA (Sigma E 5134) (pH: 8.0) eklendi ve hacim, su ile 1 litreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

Agaroz: (Sigma A 5093)

Etidyum bromür: (Applichem A 1152,0100) (%1’lik solüsyon)

DNA ağırlık belirleyicisi (DNA “ladder”): PZT ile elde edilen DNA ürününün tanımlanması için (O’RangeRuler 50 bp DNA Ladder, MBI Fermentas SM0613), üretici firma tarafından önerilen şekilde hazırlanarak kullanıldı.

Jel yükleme tamponu (6X): (O’RangeRuler 50 bp DNA Ladder, MBI Fermentas SM0613)

5.4.3.2. Ürünün Görüntülenmesi

TBE tamponu ile %2’lik agaroz jel hazırlanarak %5 oranında etidyum bromür solüsyonu eklendi ve karışım jel kalıbına döküldü. 15 µl REA sonucu elde edilen kesim ürünü, 3 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak 3µl DNA ağırlık belirleyicisi ve ürünlerin 15 µl’si jel kuyucuklarına yüklendi. Elektroforez tankı 1X TBE tamponu ile doldurularak, jele bu tank içinde 120 V’da 40 dakika elektroforez uygulandı.

Sonuçlar ultraviyole aydınlatıcıda incelenerek görüntüleme cihazında (Syngene GeneSnap, Synoptics Ltd., A.B.D.) görüntülendi.

5.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmaya alınan 146 *Candida* suşu için klasik tanımlama yöntemleri olan çimlenme borusu testi, mısır unu tween 80 agar'daki morfolojileri ve API 20 C AUX (BioMerieux, Fransa) sonuçları altın standart olarak kabul edildi. Suşların PZT-REA ile identifikasyonu sonucunda elde ettiğimiz bant paternleri, Trost ve arkadaşlarının (129) yöntemi ile karşılaştırılarak değerlendirildi ve REA yönteminin *Candida* türlerinin identifikasyonu açısından duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri, güven aralıkları ile birlikte Epi Info versiyon 6.04 (<http://www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/ei6.htm>) bilgisayar programı kullanılarak belirlendi.

5.6. Dizi Analizi İçin PZT Yönteminin Uygulanması

Dizi analizi uygulanması amacıyla yapılan PZT çalışması için hedef bölge olarak ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgeleri seçilerek, Trost ve arkadaşlarının (129) yöntemi kullanıldı.

Çalışmaya 40 *C. albicans* suşu içerisinde *MwoI* enzimi ile kesilerek üç bant oluşturan (261 bç, 184 bç, 141 bç) 36 suştan ikisi ile farklı bölgelerden kesilerek dört bant oluşturan (184 bç, 141 bç ve yaklaşık 165 bç, 95 bç) dört adet suş ve pozitif kontrol olarak kullandığımız *C. albicans* ATCC 14053 numaralı suş; bunun yanında yedi *C. guilliermondii* suşu içerisinde *MwoI* enzimi ile bir bölgeden kesilerek yaklaşık 380 ve 300 bç'lik iki bant oluşturan iki adet ve 355 ve 305 bç'lik iki bant oluşturan iki adet olmak üzere toplam 11 suş alındı.

REA için uygulanan yöntem ile aynı şekilde DNA eldesi sağlandıktan sonra uygun tamponlar, öncüller, AmpliTaqGold DNA polimeraz enzimi (Applied Biosystems, Foster City, Kanada) kullanılarak dizi analizi PZT çalışması gerçekleştirildi.

5.6.1. Dizi Analizi Amacıyla Yapılan PZT Uygulaması İçin Gereken Malzemelerin Hazırlanması

Tamponlar

AmpliTaQGold DNA polimeraz enzimi (Applied Biosystems, FosterCity, Kanada) (5U/μl)

10x TaqGold tampon ve 25 mM MgCl₂II (Applied Biosystems, FosterCity, Kanada)

dNTP karışımı (Intron Biotechnology 32111): Her biri 10 mM olan dATP, dGTP, dCTP ve dTTP'den eşit oranlarda alınarak 100 µl'lik PZT için son konsantrasyonu 50µM olacak miktarda kullanıldı.

TE tamponu (pH:8.0): 2.5 ml 1 M Trizma "base" (Sigma T 6066) (pH: 8.0), 0.5 ml 0.5 M Na₂EDTA (Sigma E 5134) (pH: 8.0) karıştırılıp, hacim 250 ml'ye tamamlandı. Karışım otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

TE tamponu için Tris ve Na₂EDTA çözeltisi hazırlanması:

1M Tris çözeltisi: 121.14 gr. tris (hidroksimetil) aminometan, 800 ml suda eritildi. 42 ml HCl ilave edilerek pH'sı 8.0'e ayarlandı ve hacim, su ile 1 litreye tamamlanarak oda ısısında saklandı.

0.5 M Na₂EDTA çözeltisi: 186.1 gr disodyum etilen diamin tetra asetat- 2H₂O, 800 ml suda eritildi. NaOH pelletleri kullanılarak pH'sı 8.0'e ayarlandı ve hacim, su ile 1 litreye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

Bu deney için daha önce kullanılan aynı öncüller kullanıldı.

5.6.2. Dizi Analizi Amacıyla Yapılan PZT Uygulaması İçin Karışım ve Isı Döngüsü

PZT döngüsü 50 µl'lik total hacimde aşağıdaki miktarlar kullanılarak optimize edildi.

	Tepkime Hacmi	Son Konsantrasyon
Nükleaz içermeyen steril distile su	32.2 ml	-
10x AmpliTaqGold tampon	5 µl	1x
25 mM MgCl ₂ II	2.5 µl	1.5 mM
dNTP karışımı	1 µl	0.2 mM
Öncül1	2 µl	20 pmol
Öncül3	2 µl	20 pmol
AmpliTaqqGold DNA polimeraz	0.3 µl	2.5 U/50µl
DNA	5 µl	-
Toplam hacim	50 µl	

Tepkime ısı döngüsü

94°C’de 5 dakika ön denatürasyon

94°C’de 30 saniye denatürasyon

54°C’de 30 saniye birleşme

72°C’de 1 dakika uzama

72°C’de 10 dakika son uzama

} 30 döngü

+4°C’de elektroforez uygulamasına kadar saklandı.

5.6.3. Dizi Analizi Öncesi PZT Ürününün Görüntülenmesi

Bu amaçla daha önce kullanılan aynı malzemeler hazırlandı. Sadece DNA ağırlık belirleyicisi olarak (O’RangeRuler 50 bp DNA Ladder, MBI Fermentas SM0613) kullanıldı.

5.6.3.1. Dizi Analizi-PZT Ürününün Görüntülenmesi

Daha önce belirtilen işlem aynen tekrarlandı.

5.6.4. Dizi Analizi Çalışması

PZT çalışması sonunda amplifiye edilen bölgenin tamamına, DNA dizi analizi çift yönlü olarak “DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham)” kullanılarak ve “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer” ile İontek Firması tarafından uygulandı.

5.6.4.1. Dizi Analizi Sonuçlarının Yorumlanması

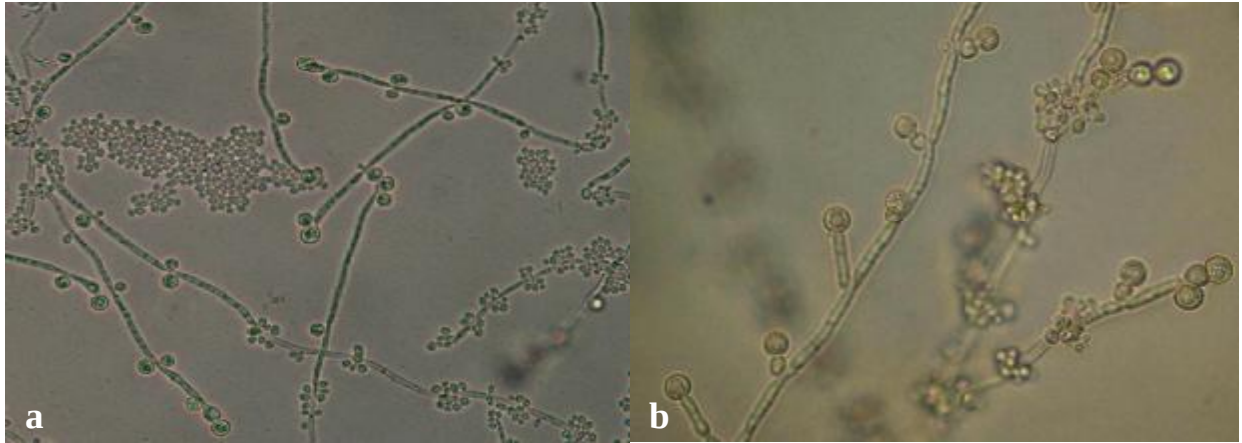
Dizi analizi sonuçları, Bio-Edit versiyon 7.0 programı kullanılarak değerlendirildi.

6. BULGULAR

6.1. Klasik Yöntemlerle Yapılan İdentifikasyon Sonuçları

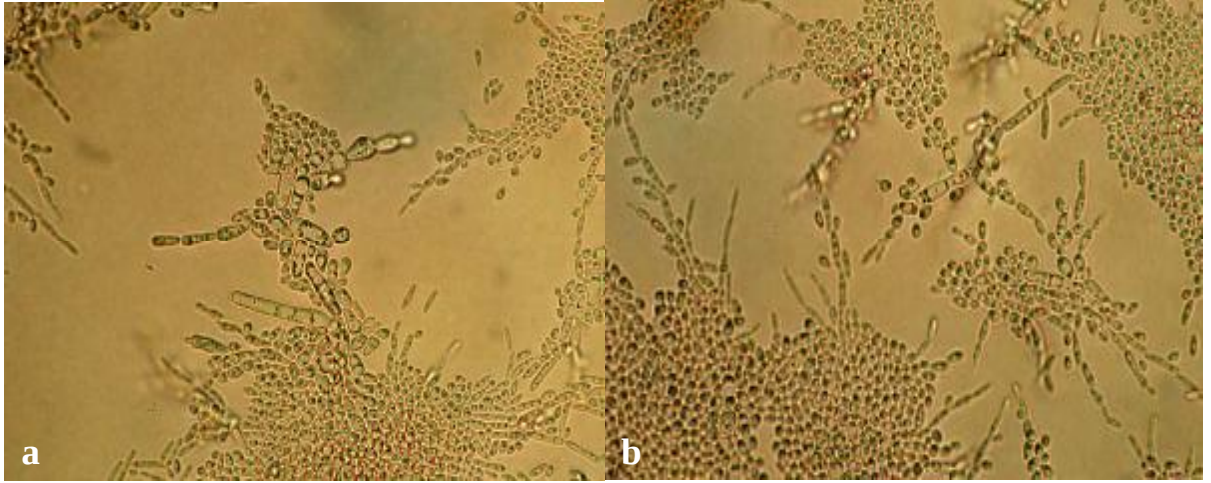
Çalışmaya alınan sistemik örneklerden soyutlanan toplam 146 *Candida* suşuna uygulanan çimlenme borusu testi, mısır unu tween 80 agar ile CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Fransa) besiyerlerindeki morfolojileri ve API 20C AUX (Biomérieux, Fransa) otomatik identifikasyon sonuçları değerlendirildi.

Kırk *C. albicans* suşunun tümünün çimlenme borusu testi pozitif saptanmış olup, CHROMagar *Candida* besiyerinde açık nil yeşili, S tipi, parlak koloniler oluşturdıkları belirlendi. Tüm *C. albicans* suşlarının mısır unu tween 80 agar'daki morfolojileri aynı olup, terminal klamidospore ve yalancı hif boyunca dağılmış yoğun kümeler halinde düzenlenmiş blastokonidyalar oluşturdıkları gözlemlendi (Resim 1a ve b). Suşlar API 20C AUX sistemi ile %93,7-99,6 olasılıkla *C. albicans* olarak belirlendi (Tablo 1).



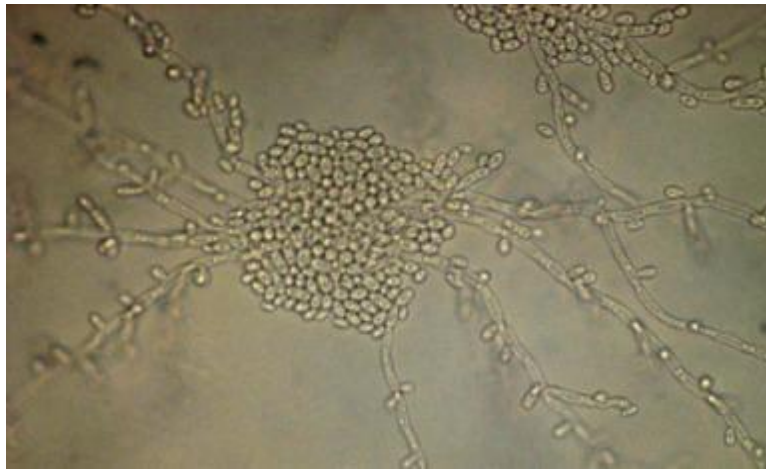
Resim 1a ve b. *C. albicans* suşlarının mısır unu tween 80 agar'daki görünüşleri

Çalışmaya alınan 27 *C. parapsilosis* suşunun çimlenme borusu testi negatif olup, CHROMagar *Candida* besiyerinde 14 suş beyaz, S tipi, parlak; 13 suş ise uçuk pembe-beyaz, S tipi, parlak koloniler oluşturdu. Tüm *C. parapsilosis* suşlarının mısır unu tween 80 agar'daki morfolojileri benzer özellikler gösterdi ve kısa yalancı hifler boyunca tekli veya küçük kümeler şeklinde dizilmiş blastokonidyalar oluşturdıkları izlendi. Bunun yanında 484, 601 ve 645 numaralı suşların dev hücre oluşturdıkları belirlendi (Resim 2a ve 2b). Suşlar API 20C AUX sistemi ile %86,3 ile %99,9 arasında değişen oranlarla *C. parapsilosis* olarak tanımlanarak belirlendi (Tablo 1).



Resim 2a ve b. *C. parapsilosis* suşlarının mısır unu tween 80 agar'daki görünüşleri

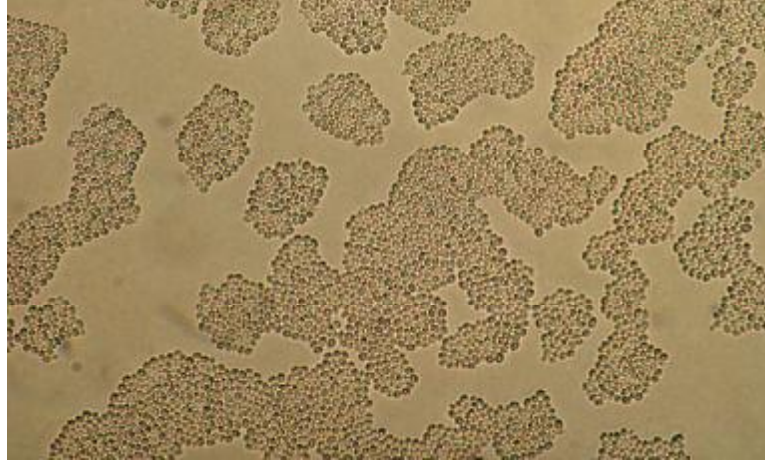
Çalışmaya dahil edilen 26 *C. tropicalis* suşunun çimlenme borusu testi negatif olarak saptandı. Suşların CHROMagar *Candida* besiyerinde mavi mor, S tipi koloniler oluşturdıkları ve kolonilerinin etrafında hale varlığı izlendi. Tüm *C. tropicalis* suşlarının mısır unu tween 80 agar'daki morfolojileri aynı olup, uzun yalancı hifler boyunca, az sayıda blastokonidya ve yalancı hiflerin uçlarında ince duvarlı, gözyaşı damlası şeklinde hücreler oluşturdıkları gözlemlendi (Resim 3). Suşların tümü API 20C AUX ile %85,9-%96,3 oranlarında *C. tropicalis* olarak tanımlandı (Tablo 1).



Resim 3. *C. tropicalis*'in mısır unu tween 80 agar'daki görünümü

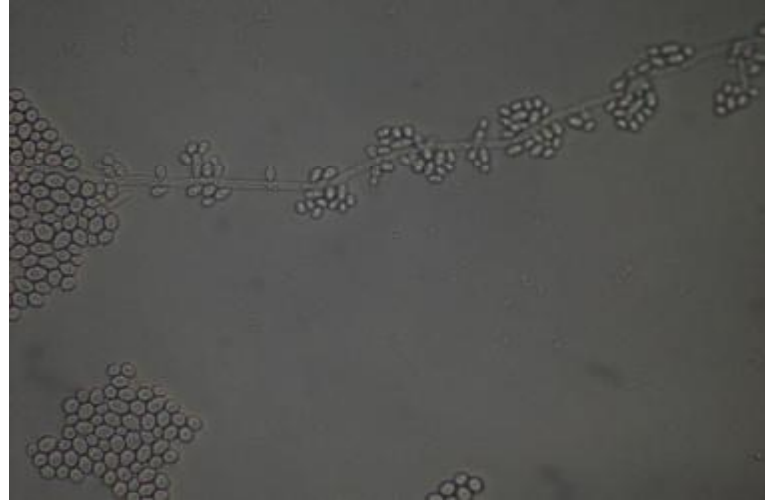
Yirmibeş *C. glabrata* suşunun tümünün çimlenme borusu testinin negatif olduğu saptandı. Suşların 17 tanesinin CHROMagar *Candida* besiyerinde S tipi, etrafında beyaz zon bulunan, sekiz tanesinin ise yine S tipi, ancak etrafında beyaz zon bulunmayan, parlak, koyu pembe koloniler oluşturdıkları gözlemlenmiş olup, suşların mısır unu tween 80 agar'da küçük, oval ve uçlarından tomurcuklanan maya hücreleri oluşturdıkları, hiç yalancı hif yapmadıkları

izlendi (Resim 4). Suşlar API 20C AUX sistemi ile %99,3 oranında *C. glabrata* olarak belirlendi (Tablo 1).



Resim 4. *C. glabrata*'nın mısır unu tween 80 agar'daki görünümü

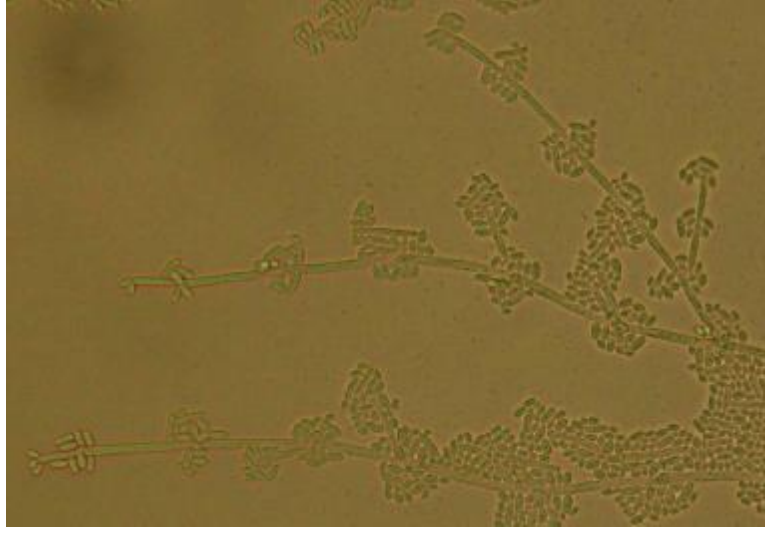
Tüm *C. kefir* suşları çimlenme borusu testi ile negatif sonuç vermiş olup, CHROMagar *Candida* besiyerinde krem-somon rengi, S tipi, parlak koloniler oluşturdu. Onbir *C. kefir* suşunun tümü mısır unu tween 80 agar'da benzer morfolojik özellikler göstererek, çapraz giden kümeler oluşturan dikdörtgen şeklinde uzamış blastokonidyalar oluşturdıkları gözlemlendi (Resim 5). API 20C AUX sistemi ile suşlar %99 ile %99,9 arasında değişen oranlarda *C. kefir* olarak identifiye edildi (Tablo 1).



Resim 5. *C. kefir*'in mısır unu tween 80 agar'daki görünümü

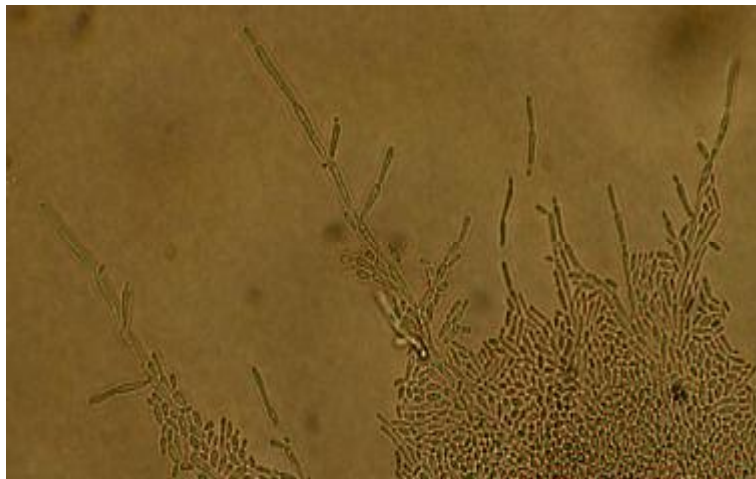
Çalışmaya aldığımız on *C. krusei* suşunun çimlenme borusu testi negatif olarak bulundu. Suşların CHROMagar *Candida* besiyerinde R tipi, pembe, pürüklü koloniler oluşturdıkları saptandı. Tüm *C. krusei* suşları mısır unu tween 80 agar'da ağaç benzeri

görünüm veren uzun blastokonidyalar ile yalancı hifler oluşturdu (Resim 6). Suşların tümü API 20C AUX ile %96,2-%99,5 oranlarında *C. krusei* olarak tanımlandı (Tablo 1).



Resim 6. *C. krusei*'nin mısır unu tween 80 agar'daki görünümü

Yedi adet *C. guilliermondii* suşunun tümünün çimlenme borusu testi negatif olarak belirlendi. Suşlar CHROMagar *Candida* besiyerinde S tipi, açık pembe, bazı bölgeler koyu pembe, parlak koloniler oluşturdu. Tüm *C. guilliermondii* suşları mısır unu tween 80 agar'da benzer morfoloji göstermiş olup, az sayıda, kısa yalancı hif ve bunların boğumları çevresinde küçük blastokonidya kümeleri şeklinde gözlemlendi (Resim 7). Suşlar API 20C AUX ile %92,1 ile %99,7 arasında değişen oranlarda *C. guilliermondii* olarak identifiye edildi (Tablo 1).



Resim 7. *C. guilliermondii*'nin mısır unu tween 80 agar'daki görünümü

Tablo 1. Çalışmaya alınan tüm suşların numaraları, soyutlandıkları örnek türü ve API 20C AUX sonuçları

Suş No	Örneğin Gönderildiği Klinik	Örnek Türü	API Sonucundaki Olasılık Oranı (%)
<i>C. albicans</i>			
59	Dahiliye	kan	97,3
115	Dahiliye YB	kan	99,6
144	Dahiliye YB	kan	97,3
166	Koroner YB	kan	99,6
188	Özel Hasta Servisi	periton sıvısı	96,8
211	Çocuk Hastalıkları	beyin omurilik sıvısı	97,3
220	Genel Cerrahi	kan	99,2
238	Dahiliye	kan	93,7
273	Dahiliye	aspirasyon	97,3
298	Hematoloji	kan	97,3
307	Dahiliye	kan	99,3
332	Nöroşirürji	beyin omurilik sıvısı	96,1
377	Hematoloji	kan	97,3
420	Göğüs Kalp Damar Cerrahi YB	kan	98,6
439	Göğüs Kalp Damar Cerrahi YB	kan	97,3
440	Özel Hasta Servisi	kan	99,2
462	Göğüs Kalp Damar Cerrahi YB	kan	99,6
491	Acil Servis	kan	96,4
506	Nöroloji	beyin omurilik sıvısı	97,3
555	Göğüs Hastalıkları	kan	99,6
568	Anestezi YB	kan	94,5
581	Anestezi YB	kan	97,3
594	Çocuk Hastalıkları	kan	97,3
600	Hematoloji	kan	97,3
607	Genel Cerrahi	kan	97,3
608	Nöroşirürji	kan	99,6
609	Prematüre YB	kan	99,2
611	Hematoloji	kan	97,3
614	Nöroloji	kan	96,4
655	Dahiliye YB	kateter	97,3
672	Anestezi YB	kan	99,6
698	Genel Cerrahi	kan	99,6
700	Göğüs Kalp Damar Cerrahi YB	kan	99,6

732	Üroloji	kan	99,2
738	Çocuk Hastalıkları	kan	97,3
740	Nöroşirürji	kan	97,3
741	Göğüs Kalp Damar Cerrahi YB	kan	97,3
746	Hemodiyaliz	kan	99,2
749	Göğüs Hastalıkları	kan	97,3
757	Gastroenteroloji	kan	99,6
C. parapsilosis			
48	Dahiliye YB	kan	99,9
178	Nöroloji	kan	99,9
289	Gastroenteroloji	kan	99,9
320	Çocuk Hastalıkları	kan	97,0
351	Anestezi YB	kan	99,9
366	Anestezi YB	kan	97,9
432	Nefroloji	kan	99,0
456	Anestezi YB	kan	99,9
484	Genel Cerrahi	kan	99,7
579	Genel Cerrahi	kan	99,9
582	Gastroenteroloji	kan	99,9
601	Nöroşirürji	kan	99,7
616	Nöroşirürji	kan	99,9
645	Genel Cerrahi	kan	99,3
696	Enfeksiyon Hastalıkları	kan	99,9
699	Genel Cerrahi	kan	99,9
706	Çocuk Hastalıkları	kan	98,4
726	Çocuk Hastalıkları	kan	98,4
730	Hematoloji	kan	99,9
733	Hematoloji	kan	99,9
739	Çocuk Hastalıkları	kan	99,9
742	Anestezi YB	kan	99,9
744	Hematoloji	kan	99,5
745	Çocuk Hastalıkları	kan	99,9
747	Anestezi YB	kan	86,3
755	Plastik Cerrahi	kan	99,5
769	Anestezi YB	kan	99,9
C. tropicalis			
2	Göğüs Kalp Damar Cerrahi YB	kan	95,8
4	Göğüs Kalp Damar Cerrahi YB	kan	95,8

71	Enfeksiyon Hastalıkları	kan	92,8
97	Dahiliye	yara	95,8
301	Hematoloji	kan	95,8
309	Plastik Cerrahi	doku	89,3
334	Onkoloji	kan	95,8
379	Göğüs Hastalıkları	kan	95,8
381	Göğüs Hastalıkları	plevra sıvısı	95,8
422	Gündüz Hastanesi	doku	95,8
516	Hematoloji	kan	90,4
540	Anestezi YB	idrar	95,8
544	Romatoloji	kan	95,8
564	Üroloji	kan	95,8
599	Endokrin Poliklinik	idrar	95,8
622	Göğüs Hastalıkları	idrar	95,8
627	Üroloji	idrar	95,8
632	Göğüs Kalp Damar Cerrahi YB	kateter	96,3
689	Göğüs Hastalıkları	kan	95,8
727	Göğüs Kalp Damar Cerrahi YB	kan	92,8
735	Anestezi YB	kan	95,8
754	Hematoloji	kan	93,4
759	Anestezi YB	kan	95,8
771	Anestezi YB	kan	85,9
780	Dahiliye	kateter	95,8
787	Anestezi YB	kan	95,8
C. glabrata			
38	Göğüs Kalp Damar Cerrahi YB	yara	99,3
174	Acil Servis	idrar	99,3
226	Hemodiyaliz	idrar	99,3
253	Anestezi YB	idrar	99,3
296	Göğüs Hastalıkları	idrar	99,3
400	Prematüre YB	kan	99,3
434	Özel Hasta Servisi	kan	99,3
443	Özel Hasta Servisi	kan	99,3
457	Nöroloji	idrar	99,3
467	Anestezi YB	idrar	99,3
598	Plastik Cerrahi	idrar	99,3
613	Nefroloji	idrar	99,3
643	Genel Cerrahi	kan	99,3
647	Nefroloji	kan	99,3

664	Acil Servis	idrar	99,3
666	Genel Cerrahi	yara	99,3
683	Dahiliye	idrar	99,3
684	Göğüs Kalp Damar Cerrahi YB	idrar	99,3
703	Anestezi YB	kan	99,3
711	Anestezi YB	kan	99,3
725	Kök Transplantasyon Ünitesi	kan	99,3
760	Prematüre YB	kan	99,3
763	Onkoloji	kan	99,3
764	Onkoloji	kan	99,3
772	Kök Transplantasyon Ünitesi	kan	99,3
C. kefyi			
154	Dahiliye	idrar	99,9
335	Üroloji	idrar	99,8
344	Enfeksiyon Hastalıkları	idrar	99,9
474	Koroner YB	idrar	99,8
507	Koroner YB	idrar	99,8
631	Enfeksiyon Hastalıkları	idrar	99,9
707	Anestezi YB	kan	99,9
737	Anestezi YB	kan	99,8
751	Onkoloji	kan	99,8
752	Dahiliye	kan	99,9
756	Ağrı Servisi	kan	99,0
C. krusei			
82	Dahiliye	kan	98,9
222	Göğüs Kalp Damar Cerrahi YB	kan	98,9
245	Genel Cerrahi	periton sıvısı	96,3
246	Dahiliye	idrar	96,3
405	Genel Cerrahi	kan	98,9
493	Göğüs Kalp Damar Cerrahi YB	idrar	99,5
762	Enfeksiyon Hastalıkları	kan	96,0
768	Anestezi YB		96,2
781	Ortopedi	idrar	98,9
783	Dahiliye	kan	96,2
C. guilliermondii			
99	Genel Cerrahi	kan	92,1
139	Anestezi YB	eklem sıvısı	92,1

408	Genel Cerrahi	kan	99,7
409	Anestezi YB	kan	99,7
782	Prematüre YB	kan	99,7
784	Prematüre YB	kateter	99,7
785	Prematüre YB	kan	99,7

YB: Yoğun Bakım

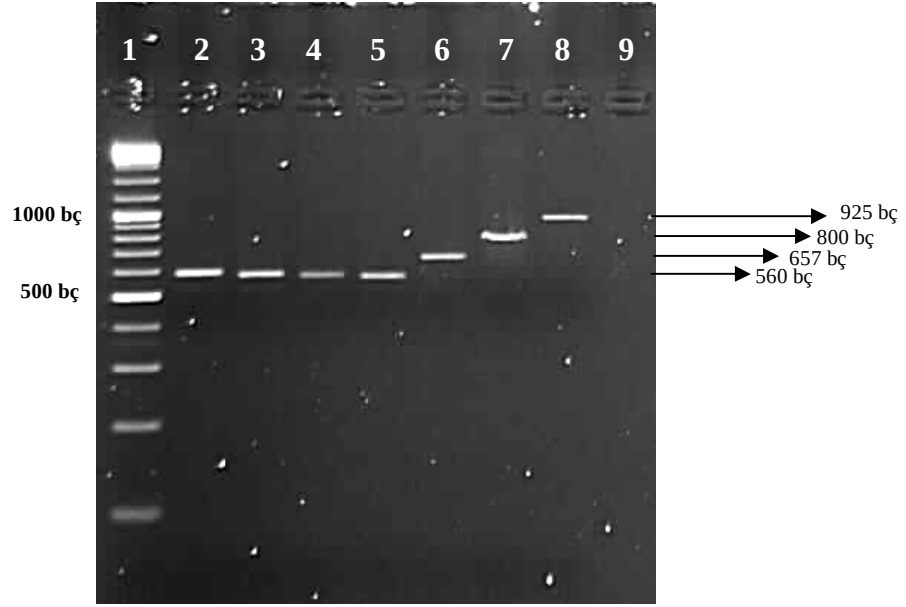
Tablo 2. *Candida* suşlarının türlere ve soyutlandıkları örnek türüne göre dağılımı

Örnek Türü	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. guilliermondii</i>	TOPLAM
Kan	34	27	16	12	5	6	5	105
BOS	3	-	-	-	-	-	-	3
Kateter Örneği	1	-	2	-	-	-	1	4
Periton/ Plevra Sıvısı	1	-	1	-	-	1	-	3
Eklm Sıvısı	-	-	-	-	-	-	1	1
Yara Örneği	1	-	3	2	-	-	-	6
İdrar	-	-	4	11	6	3	-	24
TOPLAM	40	27	26	25	11	10	7	146

6.2. REA Öncesi Uygulanan PZT Çalışması Sonuçları

İncelenen suşların, REA öncesi uygulanan PZT sonucunda oluşan amplifikasyon ürünlerinin büyüklükleri DNA ağırlık belirleyicisi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder MBI Fermentas) ile karşılaştırılarak saptandı. PZT çalışması sonucunda *C. albicans* 586 baz çift (bç), *C. parapsilosis* 570 bç, *C. tropicalis* 576 bç, *C. glabrata* 925 bç, *C. kefyr* 800 bç, *C. krusei* 560 bç, *C. guilliermondii* 657 bç'lik ürünler oluşturdu.

Çalışmaya dahil ettiğimiz yedi *Candida* türü için seçtiğimiz birer tane örnek suşun PZT sonucunda elde edilen bantlarının jel görüntüleri Şekil 1'de izlenmektedir.

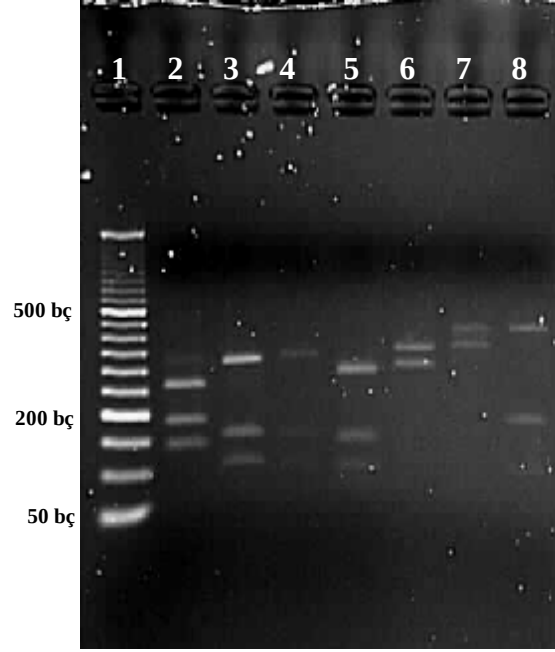


Şekil 1. Çalışmaya alınan *Candida* türlerinden birer örneğin PZT ürünlerinin jel görüntüleri

1. DNA ağırlık belirleyicisi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder), 2. *C. albicans* ATCC 14053, 3. *C. tropicalis* (301 numaralı klinik izolat), 4. *C. parapsilosis* ATCC 90018, 5. *C. krusei* ATCC 6258, 6. *C. guilliermondii* (409 numaralı klinik izolat), 7. *C. kefyr* (707 numaralı klinik izolat), 8. *C. glabrata* (711 numaralı klinik izolat), 9. Negatif kontrol (NK).

6.3. REA Sonuçları

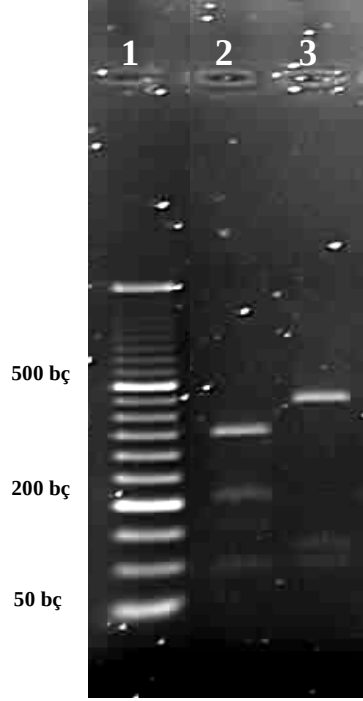
Çalışmaya, PZT ürünlerinin saflaştırılmasından sonra *MwoI* restriksiyon enziminin kullanıldığı REA ile devam edildi ve söz konusu 146 suş bu enzimle kesildi. Çalışmaya alınan *Candida* türlerini temsilen seçilen birer adet suşun *MwoI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bantların %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 2'de görülmektedir.



Şekil 2. Çalışmaya alınan *Candida* türlerinden birer suşun *MwoI* enzimi ile kesimi sonrası elde edilen jel görüntüsü

1. DNA ağırlık belirleyicisi (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder), 2. *C. albicans* ATCC 14053, 3. *C. tropicalis* (301 numaralı klinik izolat), 4. *C. parapsilosis* ATCC 90018, 5. *C. krusei* ATCC 6258, 6. *C. guilliermondii* (409 numaralı klinik izolat), 7. *C. kefyr* (707 numaralı klinik izolat), 8. *C. glabrata* (711 numaralı klinik izolat)

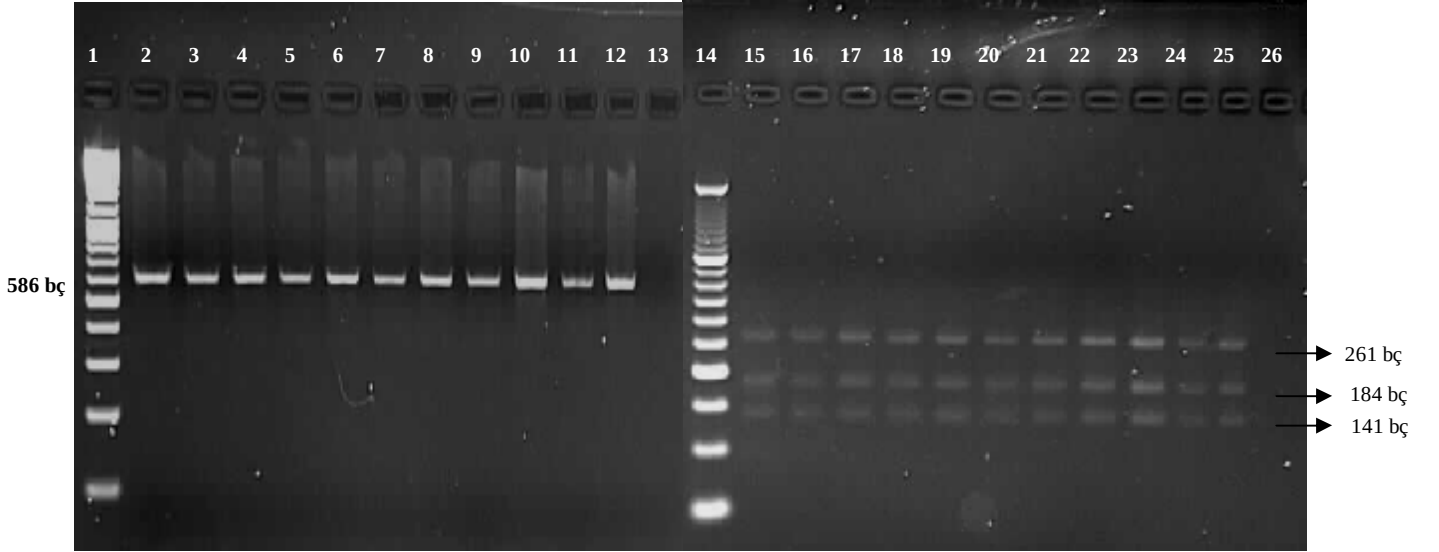
C. tropicalis ile *C. parapsilosis* türlerinin birbirinden ayrımında kullanılan *BsII* enzimi ile bu türlerden birer örnek suşun kesimi sonucu oluşan görüntü Şekil 3'te izlenmektedir.



Şekil 3. Birer adet *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* suşunun *Bs*II enzimi ile REA sonrasında oluşturduğu jel görüntüleri

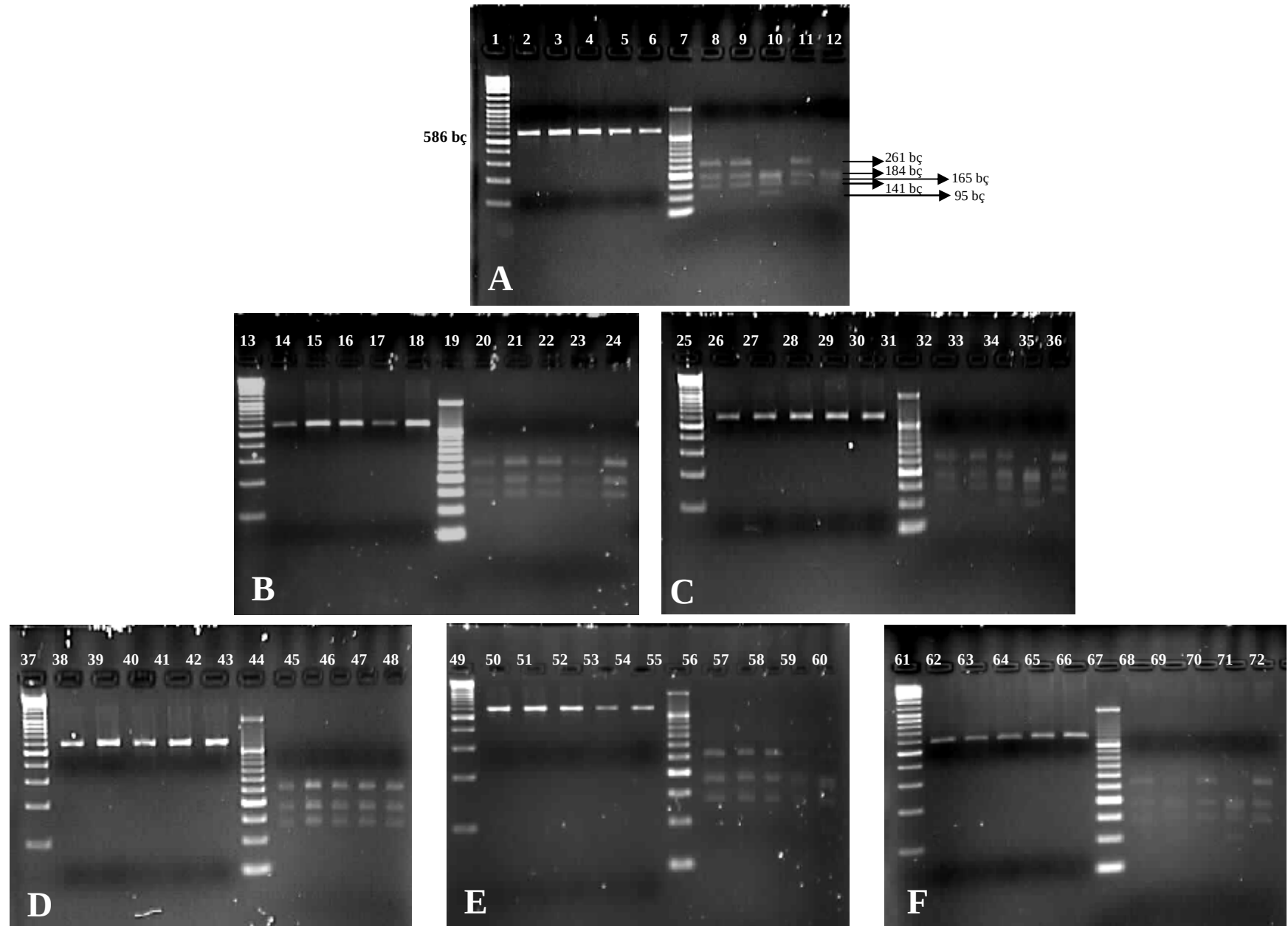
1. DNA ağırlık belirleyicisi (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder), 2. *C. tropicalis* (301 numaralı klinik izolat), 3. *C. parapsilosis* ATCC 90018

PZT sonucu 586 bç'lik bant oluşturan 40 *C. albicans* suşunun *Mwo*I enzimi ile kesimi sonucunda 36 tanesinde 261, 184, 141 bç'lik üç adet bant elde edilirken, dört adet suşun farklı bölgelerden kesilerek 184, 141 ve de yaklaşık 165 ve 95 bç'lik bantlar oluşturduğu gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4 ve 5'te görülmektedir.



Şekil 4. İlk on *C. albicans* suşunun *MwoI* enzimi ile kesim sonrası ürünlerin jel görüntüsü

1. DNA ağırlık belirleyicisi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder), 2-12. *C. albicans* suşlarının (59, 115, 144, 166, 188, 211, 220, 238, 273, 298 numaralı suşlar) PZT ürünü, 13. NK, 14. DNA ağırlık belirleyicisi (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder), 15-25. 59, 115, 144, 166, 188, 211, 220, 238, 273, 298 numaralı suşların *MwoI* enzimi ile kesim sonucu, 26. NK.



Şekil 5. Çalışılan diğer *C. albicans* suşlarının *Mwo*I enzimi ile kesimi sonucunda oluşan jel görüntüleri

1, 13, 25, 37, 49, 61 numaralı kolonlar DNA ağırlık belirleyicisi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder); 7, 19, 31, 43, 55, 67 numaralı kolonlar DNA ağırlık belirleyicisi (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder);

A) Sırasıyla 307, 332, 377, 420, 439 numaralı suşların PZT (2-6 numaralı kolonlar) ve *MwoI* (8-12. kolonlar) enzimi ile kesim sonucu;

B) 440, 462, 491, 506, 555 numaralı suşların PZT (14-18 numaralı kolonlar) ve *MwoI* (20-24 numaralı kolonlar) enzimi ile kesim sonucu;

C) 568, 581, 594, 600, 607 numaralı suşların PZT (26-30 numaralı kolonlar) ve *MwoI* (32-36 numaralı kolonlar) enzimi ile REA sonucu;

D) 608, 609, 611, 614, 655 numaralı suşların PZT (38-42 numaralı kolonlar) ve kesim sonucu (44-48 numaralı kolonlar);

E) 672, 698, 700, 732, 738 numaralı suşların PZT (50-54 numaralı kolonlar) ve REA sonucu (56-60 numaralı kolonlar);

F) 740, 741, 746, 749, 757 numaralı suşların PZT (62-66 numaralı kolonlar) ve REA sonucu (68-72 numaralı kolonlar)

MwoI enzimi ile kesim sonrasında üç adet bant oluşturan 36 suştan farklı bölgelerden kesilerek, dört adet bant oluşturan dört *C. albicans* suşunun %4'lük "metaphore agarose" (Cambrex, BioScience Rocland, ME USA)'da yürütülmesi ile oluşan 184, 141 ve de yaklaşık 165 ve 95 bç'lik bantların görüntüsü Şekil 6'da izlenmektedir.



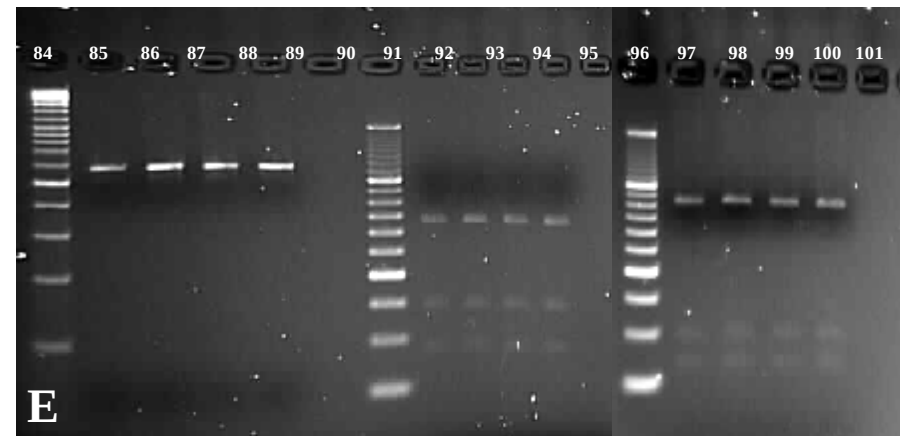
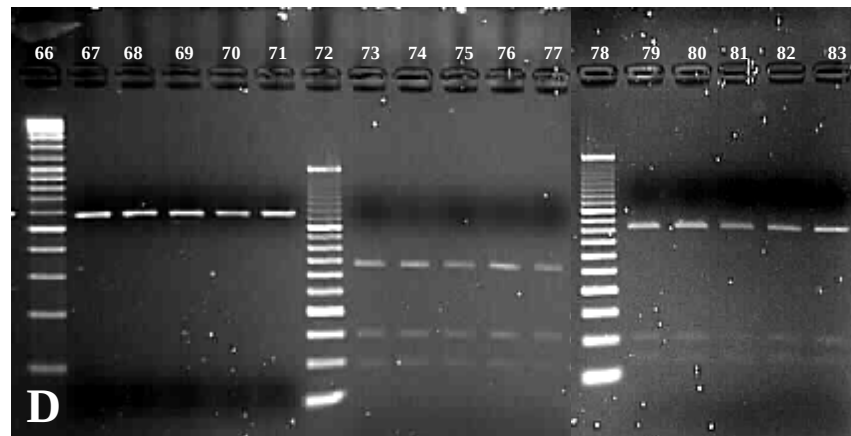
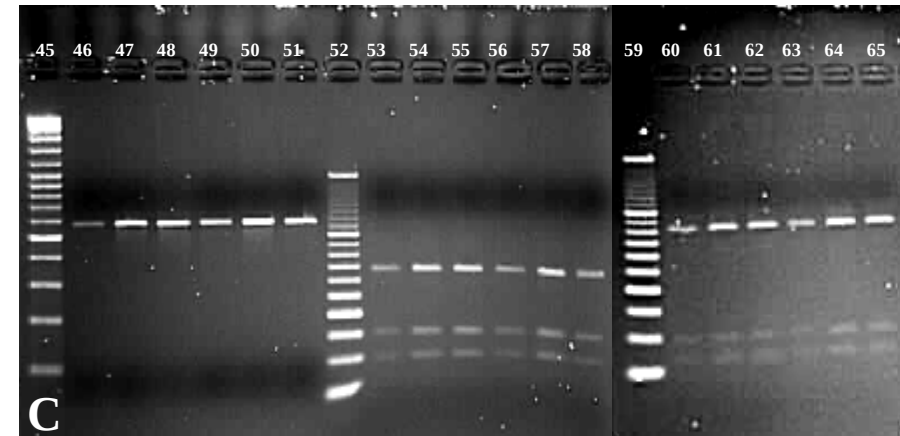
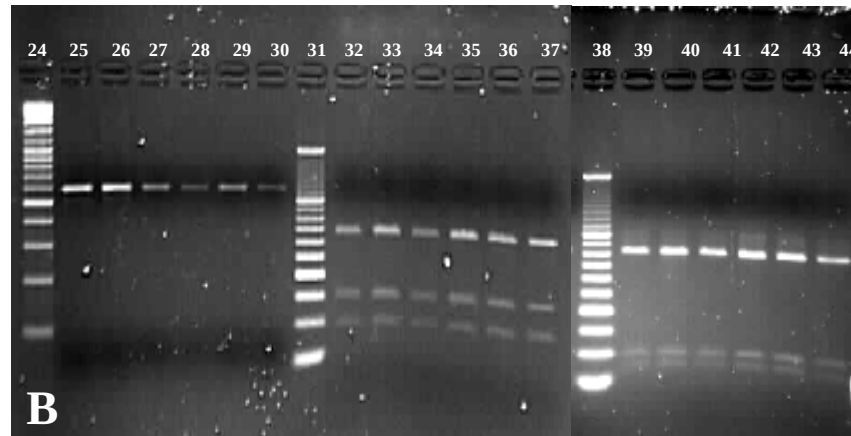
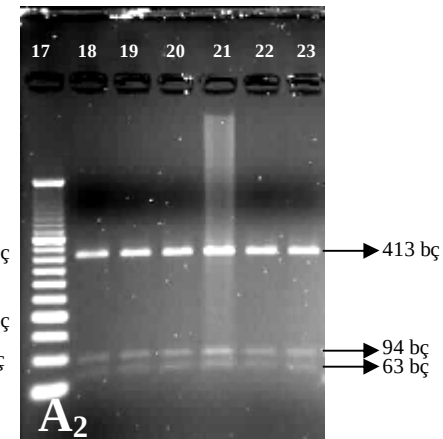
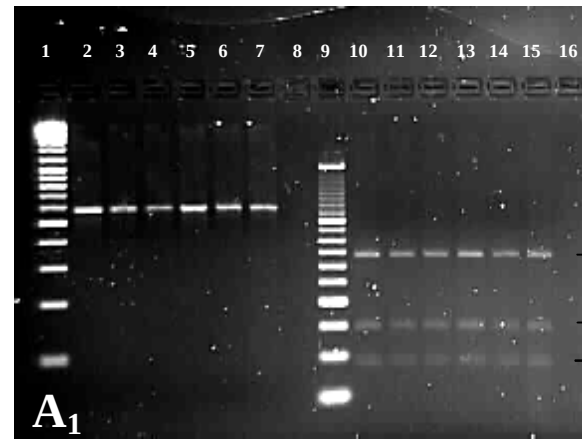
Şekil 6. *MwoI* enzimi ile REA sonrası dört adet bant oluşturan *C. albicans* suşlarının REA ürünlerinin “metaphore agarose” jel görüntüsü

1. DNA ağırlık belirleyicisi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder), 2-6. Sırasıyla 377, 439, 600, 749 numaralı suşların ve *C. albicans* ATCC 14053 suşunun (6 numaralı kolon) PZT ürünleri, 7. DNA ağırlık belirleyicisi (O’RangeRuler 50 bp DNA Ladder), 8-12. 377, 439, 600, 749 numaralı suşların ve *C. albicans* ATCC 14053 suşunun REA sonucu

MwoI enzimi ile 27 *C. parapsilosis* suşunun kesimi sonucunda 336, 146, 88 bp’lık, 26 *C. tropicalis* suşunun kesimi sonucunda ise 325, 154, 97 bp’lık üç adet bant oluştu. Bu kesim sonucu oluşan bant büyüklüklerinin her iki türde de birbirine yakın olması ve gözle ayırt edilememesi nedeniyle *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* türlerinin ayrımı için *BsII* enzimi kullanıldı.

BsII enzimi ile kesim sonucunda *C. parapsilosis* suşları 413, 94, 63 bp’lık üç bant oluşturdu. Yirmialtı adet *C. tropicalis* suşunun aynı enzim ile kesiminden sonra suşların tümünde 326, 187 ve 63 bp’lık üç adet bant elde edildi.

C. parapsilosis ve *C. tropicalis* suşları için *MwoI* ve *BsII* restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu elde edilen sonuçların jel görüntüsü Şekil 7 ve 8’de izlenmektedir.



Şekil 7. *C. parapsilosis* suşlarının *MwoI* ve *BsII* enzimleri ile kesimi sonrası oluşan jel görüntüsü

1, 24, 45, 66, 84 numaralı kolonlar DNA ağırlık belirleyicisi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder); 10, 17, 31, 38, 52, 59, 72, 78, 90, 96 numaralı kolonlar DNA ağırlık belirleyicisi (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder); 8, 16, 95, 101 numaralı kolonlar NK;

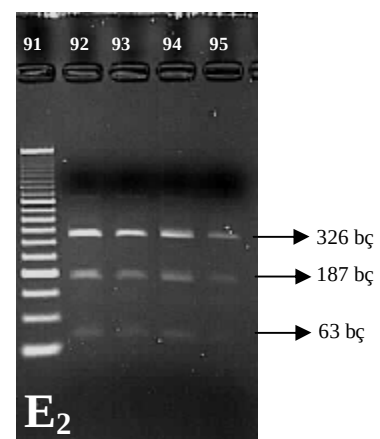
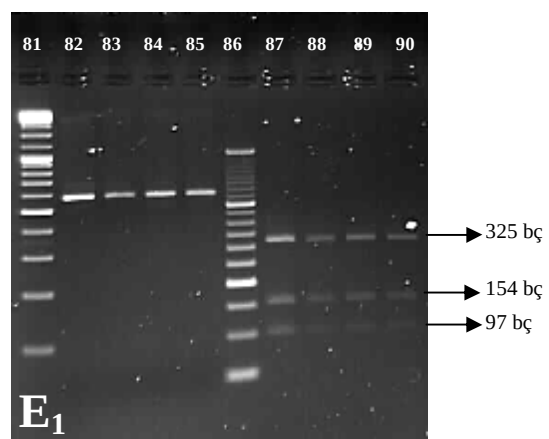
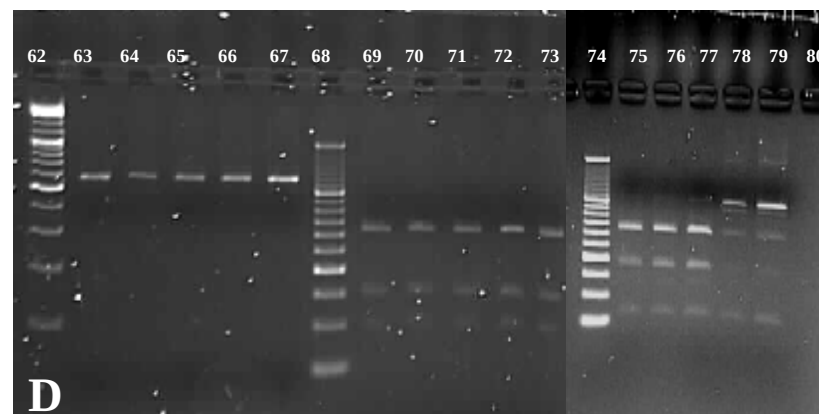
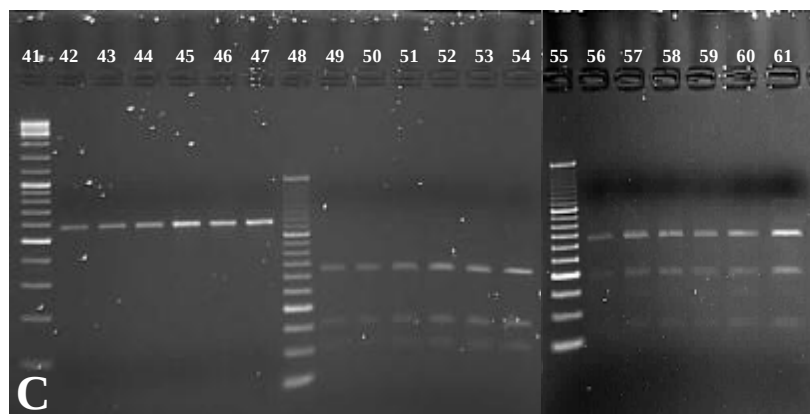
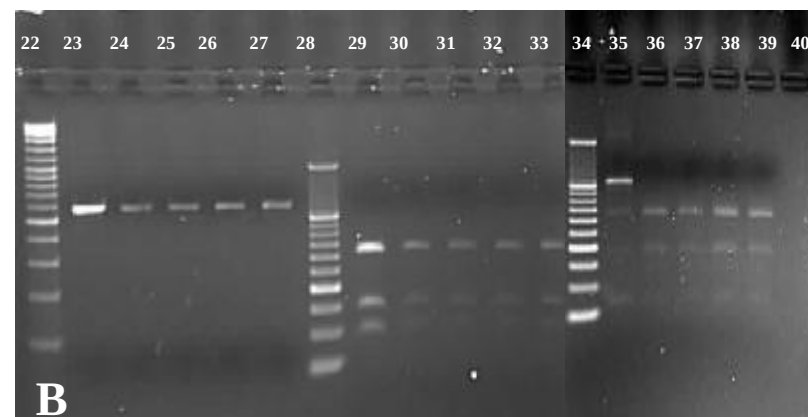
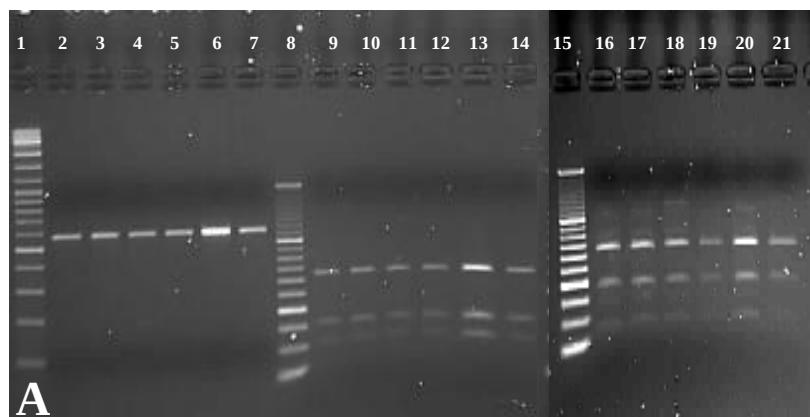
A) Sırasıyla 48, 320, 366, 432, 456, 484 numaralı suşların PZT (2-7 numaralı kolonlar), *MwoI* (10-15 numaralı kolonlar) ve *BsII* (18-23 numaralı kolonlar) enzimi ile kesim ürünleri;

B) 579, 582, 601,616, 696, 699 numaralı suşların PZT (25-30 numaralı kolonlar), *MwoI* (32-37 numaralı kolonlar) ve *BsII* (39-44 numaralı kolonlar) enzimi ile REA sonucu;

C) 178, 289, 351, 645, 706, 726 numaralı suşların PZT (46-51 numaralı kolonlar), *MwoI* (53-58 numaralı kolonlar) ve *BsII* (60-65 numaralı kolonlar) ile kesim sonucu;

D) 730, 739, 742, 744, 745 numaralı suşların PZT (67-71 numaralı kolonlar), *MwoI* (73-77 numaralı kolonlar) ve *BsII* (79-83 numaralı kolonlar) enzimi ile REA sonucu;

E) 733, 747, 755, 769 numaralı suşların PZT (85-88numaralı kolonlar), *MwoI* (91-94 numaralı kolonlar) ve *BsII* (97-101numaralı kolonlar) enzimleriyle kesim sonucu



Şekil 8. Çalışmaya alınan *C. tropicalis* suşlarının *MwoI* ve *BsII* enzimleri ile kesimi sonrası oluşan jel görüntüsü

1, 22, 41, 62, 81 numaralı kolonlar DNA ağırlık belirleyicisi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder); 8, 15, 28, 34, 48, 55, 68, 74, 86, 91 numaralı kolonlar DNA ağırlık belirleyicisi (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder); 40, 80 numaralı kolonlar NK;

A) 2, 4, 71, 97, 301, 309 numaralı *C. tropicalis* suşlarının PZT (2-7 numaralı kolonlar), *MwoI* (9-14 numaralı kolonlar) ve *BsII* (16-21 numaralı kolonlar) enzimi ile kesim sonucu;

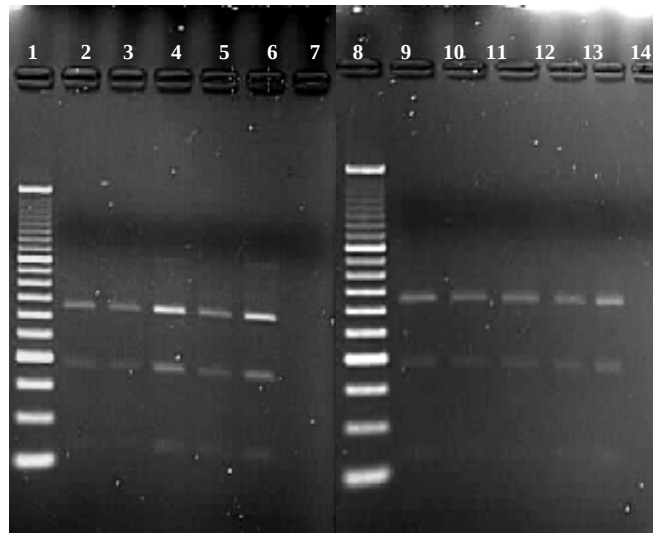
B) 334, 379, 381, 422, 516 numaralı suşların PZT (23-27 numaralı kolonlar) ve *MwoI* (29-33 numaralı kolonlar) ve *BsII* (35-39 numaralı kolonlar) enzimi ile kesim sonucu;

C) 540, 544, 564, 599, 622, 627 numaralı suşların PZT (42-47 numaralı kolonlar), *MwoI* (49-54 numaralı kolonlar) ve *BsII* (56-61 numaralı kolonlar) enzimi ile REA sonucu;

D) 632, 689, 727, 735, 754 numaralı suşların PZT (63-67 numaralı kolonlar), *MwoI* (69-73 numaralı kolonlar) ve *BsII* (75-79 numaralı kolonlar) enzimi ile kesim ürünü;

E) 759, 771, 780, 787 numaralı suşların PZT (82-85 numaralı kolonlar), *MwoI* (87-90 numaralı kolonlar) ve *BsII* (92-95 numaralı kolonlar) ile REA ürünü

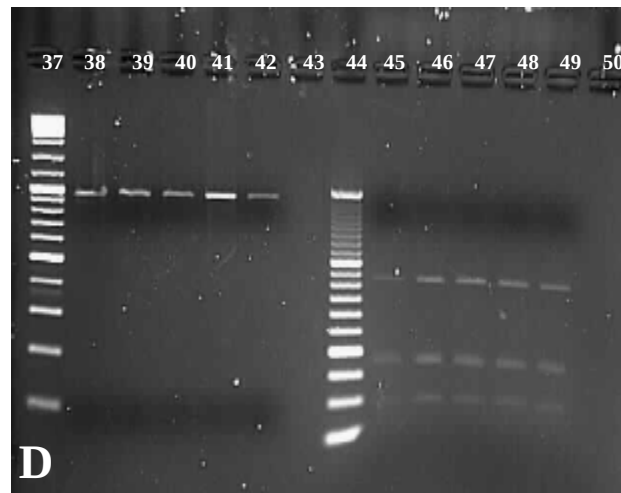
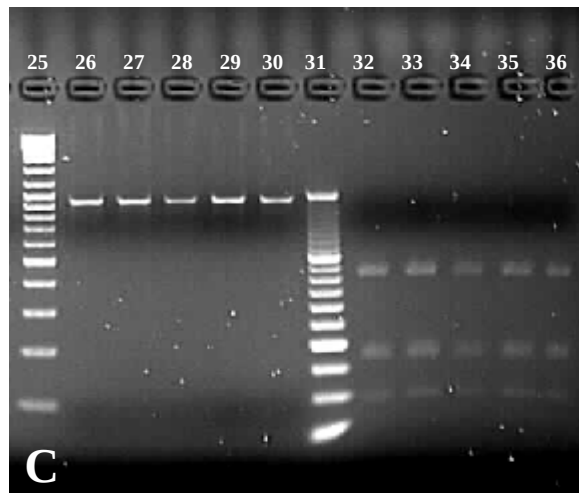
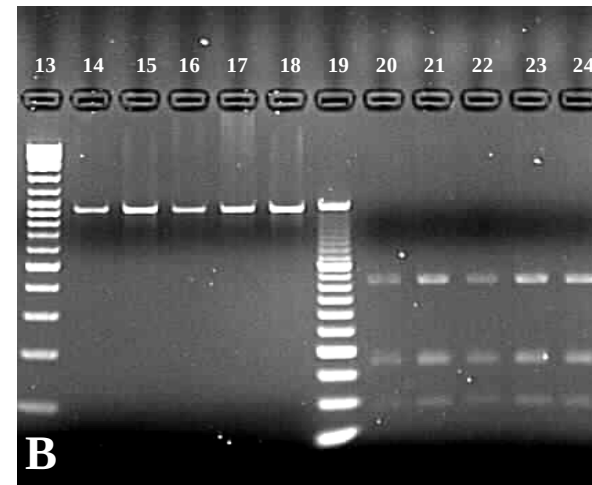
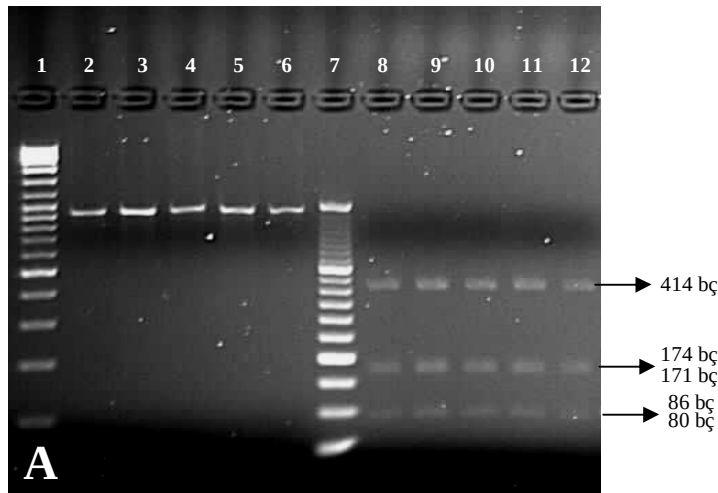
Şekil 8'de yer alan 35, 78 ve 79 numaralı kolonlarda *BsII* enzimi ile kesilmemiş ürünlerin gözlendiği suşların PZT ürünlerinin ½ oranında dilüsyonu ile çalışılması ve 379, 381, 422, 516, 632, 689, 727 numaralı suşların PZT ürünlerinin dilüe edilmeden yapılan REA sonucu elde edilen jel görüntüsü Şekil 9'da görülmektedir.



Şekil 9. *BsII* enzimi ile uygulanan protokolde tam olarak kesilmeyen *C. tropicalis* suşlarının PZT ürünlerinin ½ dilüsyonu ile çalışılması sonucu oluşan REA ürünleri

1 ve 8 numaralı kolonlar DNA ağırlık belirleyicisi (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder); 334, 735, 754 numaralı suşların PZT ürünlerinin ½ dilüsyonu ile yapılan kesim sonucu (2, 12, 13 numaralı kolonlar); 379, 381, 422, 516, 632, 689, 727 numaralı suşların PZT ürünlerinin dilüsyonu yapılmadan uygulanan REA bant paternleri (3-6, 9-11 numaralı kolonlar)

Çalışmamıza dahil ettiğimiz 25 adet *C. glabrata* şuşunun *MwoI* enzimi ile kesimi 414, 174, 171, 86, 80 bp'lık beş adet bant oluşturdu. Elde edilen görüntüler Şekil 10'da görülmektedir.



Şekil 10. *C. glabrata* suşlarının *MwoI* enzimi ile kesim sonrası jel görüntüleri

1, 13, 25, 37, 51 numaralı kolonlar DNA ağırlık belirleyicisi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder); 7, 19, 31, 44, 57 numaralı kolonlar DNA ağırlık belirleyicisi (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder); 43,50 numaralı kolonlar NK;

A) 38, 174, 226, 253, 296 numaralı suşların 925 bç'lik PZT (2-6 numaralı kolonlar) ve kesim (8-12 numaralı kolonlar) ürünleri;

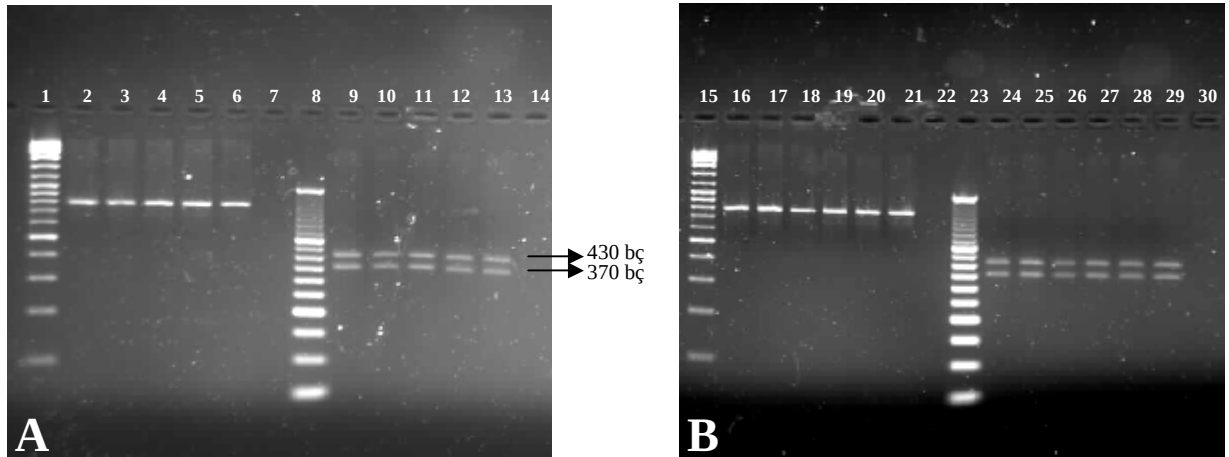
B) 400, 434, 443, 457, 467 numaralı suşların PZT (14-18 numaralı kolonlar) ve kesim (20-24 numaralı kolonlar) ürünleri;

C) 598, 613, 647, 664, 666 numaralı suşların PZT (26-30 numaralı kolonlar) ve kesim (32-36 numaralı kolonlar) sonucu;

D) 643, 683, 684, 703, 711 numaralı suşların PZT (38-42 numaralı kolonlar) ve kesim (45-49 numaralı kolonlar) sonucu;

E) 725, 760, 763, 764, 772 numaralı suşların PZT (52-56 numaralı kolonlar) ve REA (58-62 numaralı kolonlar) ürünleri

Aynı şekilde *C. kefir* suşlarına da *MwoI* enzimi ile REA yapıldığında, tüm suşlar 370 ve 430 bç'lik iki adet bant oluşturdu (Şekil 11).



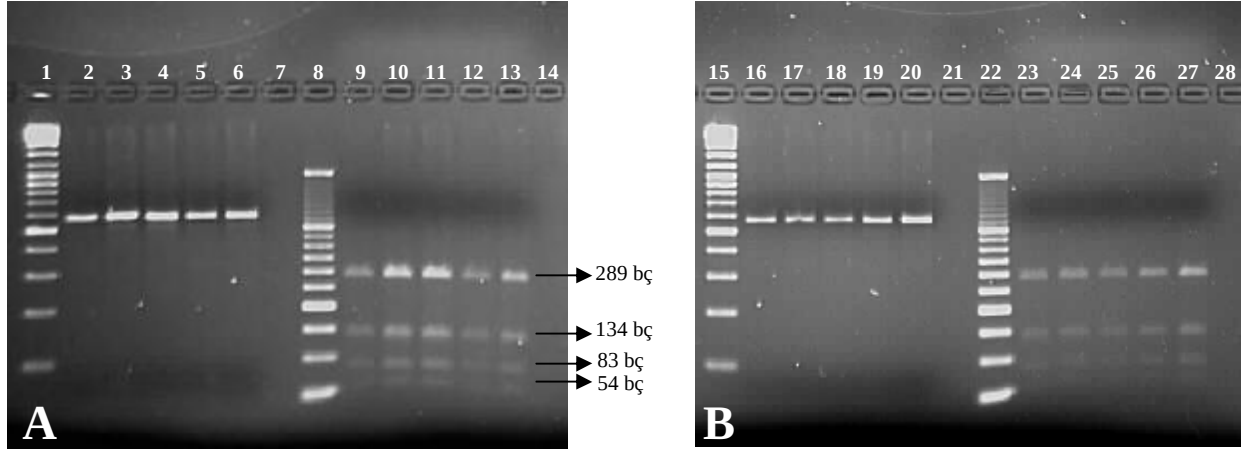
Şekil 11. *C. kefir* suşlarının *MwoI* enzimi ile yapılan REA jel görüntüleri

1 ve 15 numaralı kolonlar DNA ağırlık belirleyicisi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder); 8 ve 23 numaralı kolonlar DNA ağırlık belirleyicisi (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder); 7, 14 numaralı kolonlar NK;

A) Sırasıyla 154, 335, 344, 474, 507 numaralı suşların PZT (2-6 numaralı kolonlar) ve kesim (9-13 numaralı kolonlar) sonucu;

B) 631, 707, 737, 751, 752, 756 numaralı suşların PZT (16-21 numaralı kolonlar) ve REA (23-29 numaralı kolonlar) sonucu

Çalışılan *C. krusei* suşlarının hepsinin *MwoI* enzimi ile kesimi sonucu 289, 134, 83, 54 bç'lik dört adet bant izlendi (Şekil 12).



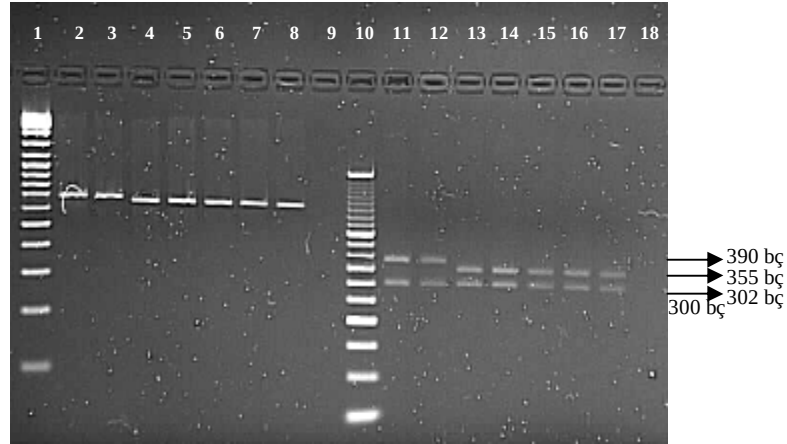
Şekil 12. *C. krusei* suşlarının *MwoI* enzimi ile REA görüntüleri

1, 15 numaralı kolonlar DNA ağırlık belirleyicisi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder); 8 ve 22 numaralı kolonlar DNA ağırlık belirleyicisi (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder); 7, 14, 21, 28 numaralı kolonlar NK;

A) Sırasıyla 82, 222, 245, 246, 405 numaralı *C. krusei* suşlarının PZT (2-6 numaralı kolonlar) ve kesim (9-13 numaralı kolonlar) sonucu

B) 493, 762, 768, 781, 783 numaralı suşlara ait PZT (16-20 numaralı kolonlar) ve REA (23-27 numaralı kolonlar) sonucu;

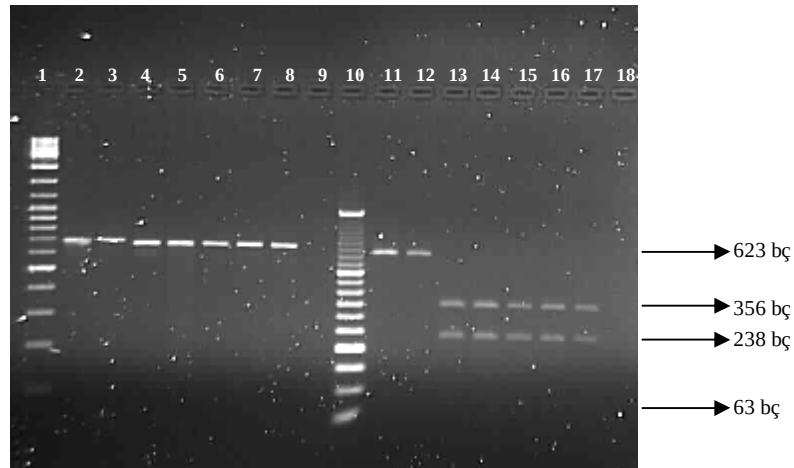
MwoI enzimi ile *C. guilliermondii* suşlarının kesimi sonucunda yedi adet çalışma suşunun beş tanesi 355 ve 302 bç'lik; kalan iki suş ise yaklaşık olarak 390 ve 300 bç'lik iki adet bant oluşturdu. Ürünlerin jel elektroforezi sonrasındaki görüntüleri Şekil 13'te izlenmektedir.



Şekil 13. *C. guilliermondii* suşlarının *MwoI* enzimi ile oluşan ürünlerin jel görüntüleri

1. DNA ağırlık belirleyicisi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder), 2-8. 99, 139, 408, 409, 782, 784, 785 numaralı suşların PZT ürünü, 9. Negatif kontrol, 10. DNA ağırlık belirleyicisi (O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder), 11-12. 99 ve 139 numaralı suşların *MwoI* enzimi ile kesimi sonucu, 13-17. 408, 409, 782, 784, 785 numaralı suşların REA sonucu, 18. NK

Klasik identifikasyon yöntemlerini kullanarak *C. guilliermondii* olarak tanımladığımız yedi adet suşun iki tanesinin PZT sonrası farklı bant büyüklüğü ve REA sonucu farklı kesim paterni göstermesi nedeniyle söz konusu suşlar *BsII* enzimi ile de kesildi. Sonuçta 99 ve 139 numaralı bu iki suşun diğer beş suştan tamamen farklı bir kesim paterni gösterdiği saptandı (Şekil 14).



Şekil 14. *BsII* enzimi ile REA yapılan *C. guilliermondii* suşlarının REA ürünlerinin jel görüntüleri

1. DNA ağırlık belirleyicisi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder), 2-8. 99, 139, 408, 409, 782, 784, 785 numaralı suşların PZT ürünü, 9. NK, 10. DNA ağırlık belirleyicisi

(O'RangeRuler 50 bp DNA Ladder), **11-12.** 99 ve 139 numaralı suşların REA ürünleri, **13-17.** 408, 409, 782, 784, 785 numaralı suşların REA ürünleri, **18.** NK

6.4. İstatistiksel Analiz Sonuçları

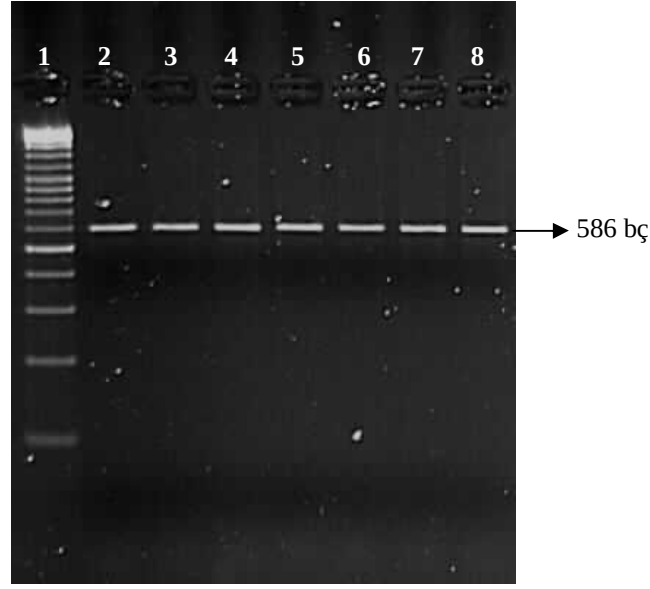
REA yönteminin *Candida* türlerinin identifikasyonu açısından duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri, güven aralıkları ile birlikte Tablo 3'te görülmektedir.

Tablo 3. Çalışmaya alınan *Candida* türleri açısından *MwoI* ve *BsII* enzimleri ile yapılan REA yönteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri

<i>MwoI</i> enzimi ile uygulanan REA				
	Duyarlılık (Güven Aralığı) (%)	Özgüllük (Güven Aralığı) (%)	Pozitif Prediktif Değer (Güven Aralığı) (%)	Negatif Prediktif Değer (Güven Aralığı) (%)
<i>C. albicans</i>	90 (75,4- 96,7)	100 (95,6- 100,0)	100 (88,0- 100,0)	96,4 (90,4- 98,8)
<i>C. glabrata</i>	100 (83,4- 100,0)	100 (96,2- 100,0)	100 (83,4- 100,0)	100 (96,2- 100,0)
<i>C. krusei</i>	100 (65,5- 100,0)	100 (96,6- 100,0)	100 (65,5- 100,0)	100 (96,6- 100,0)
<i>C. kefyr</i>	100 (67,9- 100,0)	100 (96,6- 96,7)	100 (67,9- 96,7)	100 (96,6- 96,7)
<i>C. parapsilosis</i>	100 (84,5- 100,0)	78,2 (69,5- 85,0)	50,9 (37,0- 64,7)	100 (96,6- 100,0)
<i>C. tropicalis</i>	100 (84,0- 100,0)	81,5 (74,1- 87,3)	49,1 (35,3- 63,0)	100 (96,1- 100,0)
<i>C. guilliermondii</i>	100 (46,3- 100,0)	98,6 (94,5- 99,8)	71,4 (30,3- 94,9)	100 (96,7- 100,0)
<i>BsII</i> enzimi ile uygulanan REA				
<i>C. parapsilosis</i>	100 (84,5- 100,0)	100 (96,1- 100,0)	100 (84,5- 100,0)	100 (96,1- 100,0)
<i>C. tropicalis</i>	88,5 (68,7- 97,0)	100 (96,1- 100,0)	100 (82,2- 100,0)	97,6 (92,5- 99,4)
<i>BsII</i> enzimi ile uygulanan ve PZT ürünlerinin ½ dilüe edildiği REA				
<i>C. tropicalis</i>	100 (84,0- 100,0)	100 (96,1- 100,0)	100 (84,0- 100,0)	100 (96,1- 100,0)

6.5. Dizi Analizi İçin Yapılan PZT Uygulaması Sonuçları

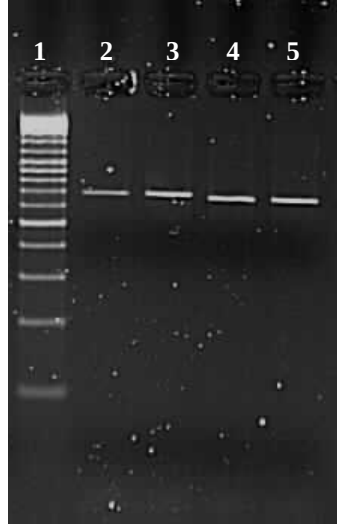
Kırk *C. albicans* suşu içerisinde *MwoI* enzimi ile kesilerek üç bant oluşturan (261 bç, 184 bç, 141 bç) 36 suştan ikisi ile farklı bölgelerden kesilerek dört bant oluşturan (184 bç, 141 bç ve yaklaşık 165 bç, 95 bç) dört adet suş ve pozitif kontrol olarak kullandığımız *C. albicans* ATCC 14053 numaralı suş dizi analizi öncesi PZT uygulaması sonucunda 586 bp'lik ürün oluşturdu. Dizi analizine alınan yedi *C. albicans* suşunun PZT ürünlerinin jel görüntüsü Şekil 15'te izlenmektedir.



Şekil 15. Dizi analizine alınan *C. albicans* suşlarının PZT ürünlerinin jel görüntüsü

1. DNA ağırlık belirleyicisi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder) 2. 377 3. 439 4. 600 5. 749 6. 307 7. 332 numaralı suşlar, 8. *C. albicans* ATCC 14053

Çalışmaya alınan yedi *C. guilliermondii* suşu içerisinde *MwoI* enzimi ile bir bölgeden kesilerek yaklaşık 380 ve 300 bç'lik iki bant oluşturan iki adet suş ile 355 ve 305 bç'lik iki bant oluşturan iki adet suşun dizi analizi öncesi PZT ürünü jel görüntüsü Şekil 16'da izlenmektedir.



Şekil 16. Dizi analizine alınan *C. guilliermondii* suşlarının PZT ürünlerinin %2'lik agaroz jelde yürütülmesi ile elde edilen görüntü

1. DNA ağırlık belirleyicisi (GeneRuler 100 bp DNA Ladder) 2. 99 3. 139 4. 408 5. 409 numaralı suşlar

6.5.1. Dizi Analizi Çalışması Sonuçları

307 ve 332 numaralı *C. albicans* suşları ve *C. albicans* ATCC 14053 numaralı suş, *MwoI* enziminin tanıdığı iki bölgeden kesilerek 261 bp, 184 bp, 141 bp'lik üç adet fragman oluşturdu. Aynı enzim ile bu suşlardan farklı bölgelerden kesilen 439, 600, 749 numaralı suşlar ise üç bölgeden kesilerek 184 bp, 141 bp ve yaklaşık 165 bp, 95 bp'lik dört adet fragman ortaya çıkardı. Bu üç suşta fazladan oluşan kesim noktasında Bio- Edit versiyon 7.0 programı kullanarak değerlendirdiğimiz dizi analizi uygulaması sonucunda **adenin** yerine **guanin** nükleotidinin geldiği nokta mutasyonlar saptandı. Oluşan nokta mutasyonların amino asit değişimine yol açmayan sessiz mutasyonlar olduğu belirlendi. Bu bölgedeki **adenin** **guanin** değişimi sonucu oluşan nokta mutasyona bağlı olarak *MwoI* enziminin tanıdığı 5'...G C N N N N N↓N N G C...3' bölgesinin oluştuğu, böylelikle fazladan üçüncü bir kesim noktasının ortaya çıktığı saptandı. *MwoI* enzimi ile yapılan REA sonucunda 439, 600, 749 numaralı suşlar ile aynı bölgeden kesilen dördüncü suş olan 377 numaralı suşta ise üç farklı nükleotitte (adenin, timin, timin) delesyon ve iki farklı nükleotitte de (timin, sitozin) insersiyon tipi mutasyonlar saptandı. Oluşan ikinci insersiyona bağlı olarak diğer üç suş ile benzer olarak *MwoI* enziminin tanıdığı 5'...G C N N N N N↓N N G C...3' bölgesinin oluştuğu, böylelikle üçüncü bir kesim noktasının ortaya çıktığı gözlemlendi. Bu nedenle söz

konusu dört suşta *MwoI* enzimi ile kesim sonrasında 184 bç, 141 bç ve yaklaşık 165 bç, 95 bç'lik dört adet fragman elde edildiği belirlendi (Şekil 17, 18).

Rutin identifikasyon yöntemleri ile *C. guilliermondii* olarak tanımladığımız, ancak *MwoI* ve *BsII* enzimleri ile aynı türün diğer suşlarına göre farklı kesim noktaları bulunan 99 ve 139 numaralı suşların ve *MwoI* enzimi ile diğer *C. guilliermondii* suşları ile benzer bölgelerden kesilen 408 ve 409 numaralı suşların dizi analizi sonucunda; 99 ve 139 numaralı suşların, Gen bankasında bu bölgenin DNA dizisi verilen AM176631, AM176630, AM176629, AM176628, AB260136, AB260135, AM176626, AM176627, AB032176, AM117815, AB054109, AM160625 numaralı *C. guilliermondii* dizilerine göre (% 66,6) AJ606465, AJ585348, AJ539367 numaralı *C. membranaefaciens* suşlarına gerek nükleotid dizilimi (% 91,2) gerekse aminoasit dizilimi açısından çok daha fazla bir benzerlik gösterdiği saptandı. 408 ve 409 numaralı suşların dizilerinin ise Genbankasında yer alan AM176631, AM176630, AM176629, AM176628, AB260136, AB260135, AM176626, AM176627, AB032176, AM117815, AB054109, AM160625 numaralı *C. guilliermondii* suşları ile nükleotid ve aminoasit dizilimi açısından aynı olduğu belirlendi (Şekil 19, 20).

İncelediğimiz iki kaynakta *C. guilliermondii* türünün iki varyetesi olduğu ve bunların *C. guilliermondii* var. *guilliermondii* ve *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* olarak sınıflandırıldığı saptandı (130, 131). Bu açıdan tüm suşlarımızın *C. guilliermondii* türü olduğu ancak farklı varyeteler olmaları nedeni ile farklı kesim paternleri elde edildiği sonucuna varıldı.

	190	200	210	220	230	240
AB049119	TGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATATGAATTGCAGATAT					
AB049120						
AB049121						
AB049122						
L28817						
AF455524						
AF455476						
AF455428						
AF455531						
AF455457						
AY939786						
AY939789						
AY939807						
ATCC 14053 <i>C. albicans</i>						
332 <i>C. albicans</i>						
307 <i>C. albicans</i>						
439 <i>C. albicans</i>						
600 <i>C. albicans</i>						
749 <i>C. albicans</i>						
377 <i>C. albicans</i>						

	250	260	270	280	290	300
AB049119	TCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCGGGAGGGCATGCC					
AB049120						
AB049121						
AB049122						
L28817						
AF455524						
AF455476						
AF455428						
AF455531						
AF455457						
AY939786						
AY939789						
AY939807						
ATCC 14053 <i>C. albicans</i>						
332 <i>C. albicans</i>						
307 <i>C. albicans</i>						
439 <i>C. albicans</i>						
600 <i>C. albicans</i>						
749 <i>C. albicans</i>						
377 <i>C. albicans</i>						

	310	320	330	340	350	360
AB049119	TGTTTGAGCGTCGTTTCTCCCTCAAACCGCTGGGTTTGTTGAGCAATACGACTTGGG					
AB049120						
AB049121						
AB049122						
L28817						
AF455524						
AF455476						
AF455428						
AF455531						
AF455457						
AY939786						
AY939789						
AY939807						
ATCC 14053 <i>C. albicans</i>						
332 <i>C. albicans</i>						
307 <i>C. albicans</i>						
439 <i>C. albicans</i>						
600 <i>C. albicans</i>						
749 <i>C. albicans</i>						
377 <i>C. albicans</i>						

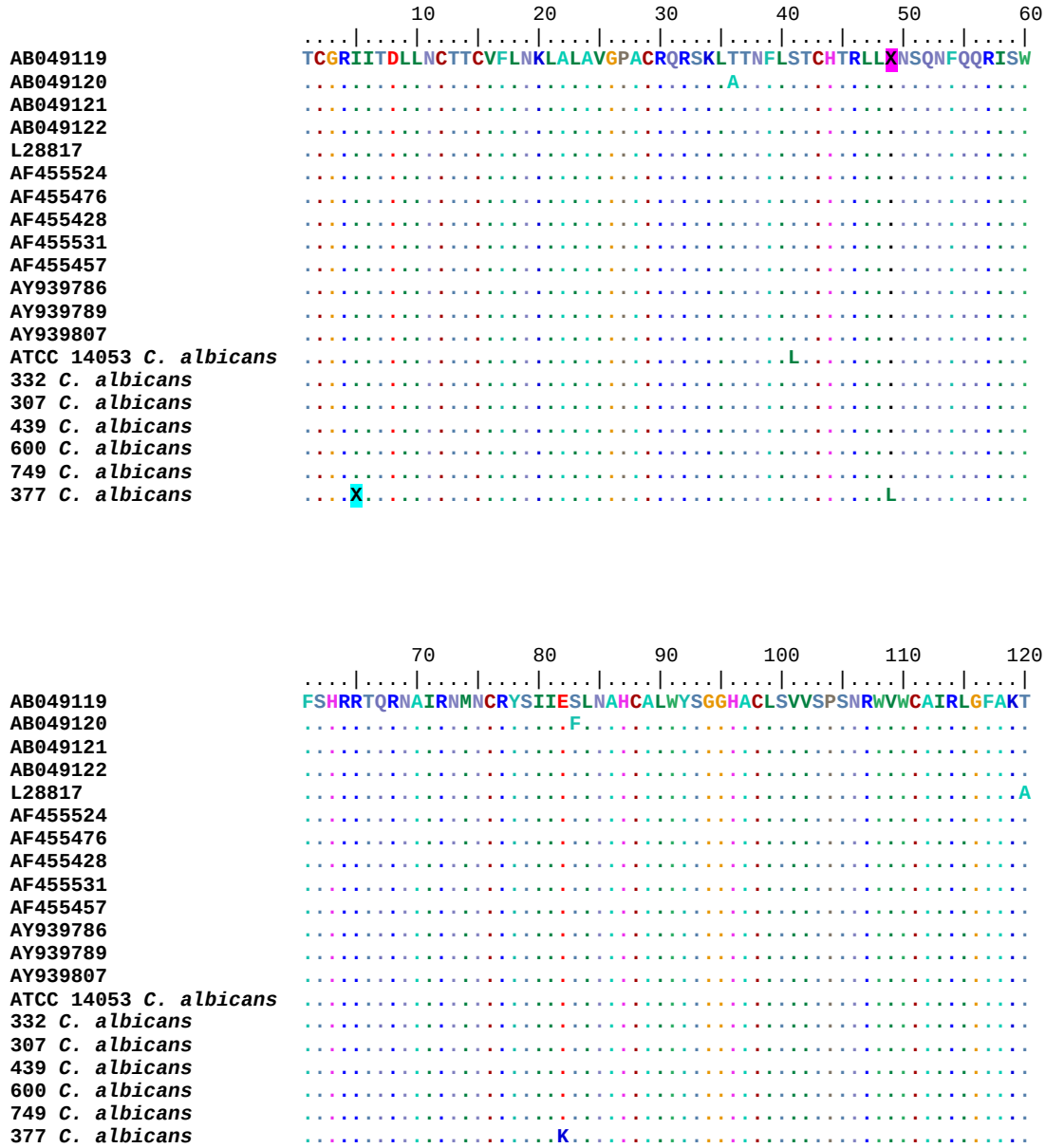
	370	380	390	400	410	420
AB049119	TTTGCTTGAAAGACGGTAGTGGTAAGGCGGGATCGCTTTGACAATGGCTTAGGTCTAACC					
AB049120						
AB049121						
AB049122						
L28817	AG.....					
AF455524						
AF455476						
AF455428						
AF455531						
AF455457						
AY939786						
AY939789						
AY939807						
ATCC 14053 <i>C. albicans</i>						
332 <i>C. albicans</i>						
307 <i>C. albicans</i>						
439 <i>C. albicans</i>						
600 <i>C. albicans</i>						
749 <i>C. albicans</i>						
377 <i>C. albicans</i>	A.....					

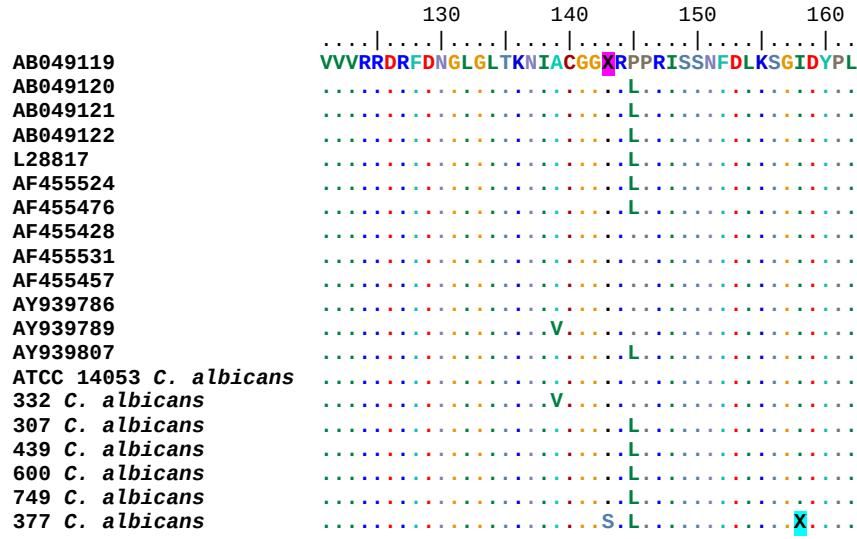
	430	440	450	460	470	480
AB049119	AAAAACATTGCTTGCGGGGTAA-CGTCCACCACGTATATCTTCAAACCTTTGACCTCAAA					
AB049120	T.....					
AB049121	T.....					
AB049122	T.....					
L28817	T.....					
AF455524	T.....					
AF455476	T.....					
AF455428						
AF455531						
AF455457						
AY939786						
AY939789	T.....					
AY939807	T.....					
ATCC 14053 <i>C. albicans</i>	T.....					
332 <i>C. albicans</i>	T.....					
307 <i>C. albicans</i>	T.....					
439 <i>C. albicans</i>	GCGGCGGTAG-C.....T.....					
600 <i>C. albicans</i>	GCGGCGGTAG-C.....T.....					
749 <i>C. albicans</i>	GCGGCGGTAG-C.....T.....					
377 <i>C. albicans</i>	GCGGCGGTAGC.....T.....					

	490	500
AB049119	TCAGGGTAGGACTACCCGCTT	
AB049120		
AB049121		
AB049122		
L28817		
AF455524		
AF455476		
AF455428		
AF455531		
AF455457		
AY939786		
AY939789		
AY939807		
ATCC 14053 <i>C. albicans</i>		
332 <i>C. albicans</i>		
307 <i>C. albicans</i>		
439 <i>C. albicans</i>		
600 <i>C. albicans</i>		
749 <i>C. albicans</i>		
377 <i>C. albicans</i>		

Şekil 17. Dizi analizi yapılan altı adet *C. albicans* suşunun ve Genbankasından indirilmiş *C. albicans* suşlarının değerlendirilmesi sonucunda saptanan nükleotid değişimleri

Mavi renk ile taralı bölgeler *MwoI* enziminin tanıdığı kesim bölgeleri, pembe renk ile taralı nükleotidler nokta mutasyonunun gerçekleştiği bölgeler, (-) işaretli bölgeler insersiyon delesyon bölgeleri





Şekil 18. Şekil 17’deki *C. albicans* suşlarının dizi analizi ile saptanan amino asit değişimi sonuçları

Mavi ile taralı bölgeler delesyon, pembe ile işaretli bölgeler insersiyonlu bölgeler

	10	20	30	40	50	60
AM176631 <i>C. guilliermondii</i>	ATGAAAAACCGGCGAAATATGATAAATATGAAC	TGCAGATTTTGTGAACCATCGTATT				
AM176630 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....G.T.....					
AM176629 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....					
AM176628 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....					
AB260136 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....					
AB260135 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....					
AM176626 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....					
AM176627 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....					
AM160625 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....					
AM117815 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....					
AB054109 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....					
AB032176 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....					
408 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....					
409 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....					
99 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....					
139 <i>C. guilliermondii</i>	GC.....					
AJ606465 <i>C. membranifaciens</i>	GC.....					
AJ539367 <i>C. membranifaciens</i>	GC.....					
AJ585348 <i>C. membranifaciens</i>	GC.....					

	70	80	90	100	110	120
AM176631 <i>C. guilliermondii</i>	TTTGAACGTACCCTGCGTCCGCTGGTGTTCAGCGTGCGTGCCGTGTTTGAACGTCATTTT					
AM176630 <i>C. guilliermondii</i>						
AM176629 <i>C. guilliermondii</i>						
AM176628 <i>C. guilliermondii</i>						
AB260136 <i>C. guilliermondii</i>						
AB260135 <i>C. guilliermondii</i>						
AM176626 <i>C. guilliermondii</i>						
AM176627 <i>C. guilliermondii</i>						
AM160625 <i>C. guilliermondii</i>						
AM117815 <i>C. guilliermondii</i>						
AB054109 <i>C. guilliermondii</i>						
AB032176 <i>C. guilliermondii</i>						
408 <i>C. guilliermondii</i>						
409 <i>C. guilliermondii</i>						
99 <i>C. guilliermondii</i>	G.C.....					
139 <i>C. guilliermondii</i>	G.C.....					
AJ606465 <i>C. membranifaciens</i>						
AJ539367 <i>C. membranifaciens</i>						
AJ585348 <i>C. membranifaciens</i>						

	130	140	150	160	170	180
AM176631 <i>C. guilliermondii</i>	AGCCTGAAACCGCGGGCCCTGGTGTGAGCGATACCCCTGAGCCGTACCCGTCGTCTGCTG					
AM176630 <i>C. guilliermondii</i>						
AM176629 <i>C. guilliermondii</i>						
AM176628 <i>C. guilliermondii</i>	G.C.....					
AB260136 <i>C. guilliermondii</i>						
AB260135 <i>C. guilliermondii</i>						
AM176626 <i>C. guilliermondii</i>						
AM176627 <i>C. guilliermondii</i>						
AM160625 <i>C. guilliermondii</i>						
AM117815 <i>C. guilliermondii</i>						
AB054109 <i>C. guilliermondii</i>						
AB032176 <i>C. guilliermondii</i>						
408 <i>C. guilliermondii</i>						
409 <i>C. guilliermondii</i>						
99 <i>C. guilliermondii</i>	T.....ACCCGT.....TG.....GAA					
139 <i>C. guilliermondii</i>	T.....ACCCGT.....TG.....GAA					
AJ606465 <i>C. membranifaciens</i>	T.T.....T.....ACC.AAT.C.TG.....A.					
AJ539367 <i>C. membranifaciens</i>	T.T.....T.....ACC.AAT.C.TG.....A.					
AJ585348 <i>C. membranifaciens</i>	T.T.....T.....ACC.AAT.C.TG.....A.					

	70	80	90
AM176631 <i>C. guilliermondii</i>		EKYAWVVLD	SCTSQCIRFIQLVERCGGIFLVLLAR
AM176630 <i>C. guilliermondii</i>			
AM176629 <i>C. guilliermondii</i>			
AM176628 <i>C. guilliermondii</i>			
AB260136 <i>C. guilliermondii</i>			
AB260135 <i>C. guilliermondii</i>			
AM176626 <i>C. guilliermondii</i>			
AM176627 <i>C. guilliermondii</i>			
AM160625 <i>C. guilliermondii</i>			
AM117815 <i>C. guilliermondii</i>			
AB054109 <i>C. guilliermondii</i>			
AB032176 <i>C. guilliermondii</i>			
408 <i>C. guilliermondii</i>			
409 <i>C. guilliermondii</i>			
99 <i>C. guilliermondii</i>		MAG.LDSFLIIQCIRFIQLVEGSGVKFLVAIARLQ	
139 <i>C. guilliermondii</i>		MAG.LDSFLIIQCIRFIQLVEGSGVKFLVAIARLQ	
AJ606465 <i>C. membranifaciens</i>		IAGVLDSELVIQCIRFIQLVEDWGSKFLV.LARLQ	
AJ539367 <i>C. membranifaciens</i>		IAGVLDSELVIQCIRFIQLVEDWGSKFLV.LARLQ	
AJ585348 <i>C. membranifaciens</i>		IAGVLDSELVIQCIRFIQLVEDWGSKFLV.LARLQ	

Şekil 20. Şekil 19'daki suşların dizi analizi ile saptanan amino asit değişimi sonuçları

Çalışmamızda *MwoI* ve *BsII* enzimleri kullanılarak yapılan PZT-REA yöntemi ile klinik örneklerden en sık soyutlanan *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* türlerinin identifikasyonu 33-34 saat gibi bir sürede tamamlanabildi.

7. TARTIŞMA

Son yıllarda organ nakli hastaları, hematolojik maligniteli veya kazanılmış immun yetmezlik sendromlu (AIDS) hastalar gibi immunsupresif hasta sayısında artışın yanında geniş spektrumlu antibiyotik, kortikosteroid ile kanser ilaçlarının yaygın kullanımı ve tıbbi yaklaşımlarda gelişmeler nedeniyle fırsatçı fungal infeksiyonların önemi artmıştır (132).

1995 yılında hastane kökenli infeksiyon etkenleri, risk faktörleri ve mortalite ile ilgili ilk büyük nokta prevalans araştırması; Avrupa’da 17 ülkede, 6250’si antimikrobiyal sağaltım veya profilaksi alan 10038 YB hastasında yapılmış ve bu hastalarda infeksiyon etkeni olarak funguslar %17,1 oran ile beşinci sıklıkta saptanmıştır (133).

Hastalıktan korunma ve kontrol merkezi [Centers for Disease Control and Prevention (CDC)] tarafından hazırlanan ulusal hastane infeksiyonları izlem (NNIS) raporlarında hastane kökenli fungal infeksiyon sıklığının 1980-1990 yılları arasında % 0.2’den % 0.38’e çıktığı belirtilmiştir. Bildirilen fungal infeksiyonların %70-80’ini *Candida* türleri oluşturmaktadır. Yine NNIS raporlarına göre, *Candida* türleri hastane kökenli patojenler arasında altıncı, hastane kökenli sepsis etkenleri arasında ise dördüncü sıklıkla rastlanan mikroorganizmalardır (133, 134, 135).

Sistemik *Candida* infeksiyonlarında en sık saptanan etkenler *C. albicans* ve *C. tropicalis* olmasına karşın, flukonazolün profilaktik olarak yaygın kullanımı özellikle immun baskılanmış hastalarda etken olan *Candida* türlerinde değişime yol açmıştır. (137, 138, 139). Artış gösteren non-*albicans Candida* türlerinden bazılarının amfoterisin B’ye, bazılarının ise triazollere karşı duyarlılıklarında azalma saptanması nedeniyle *Candida*’ların tür düzeyinde identifikasyonunun yapılması büyük önem taşımaktadır (134, 140). Örnekten soyutlanan *Candida* türünün belirlenmesi, antifungal ilaçlara duyarlılık hakkında bilgi verdiği gibi ampirik sağaltım seçimine de ışık tutabilmektedir (135). Bu nedenle hızlı, doğru identifikasyon yaklaşımları son yıllarda önem kazanmış ve konuyla ilgili çalışmaların sayısı artmıştır.

Candida infeksiyonlarının standart laboratuvar tanısı için; etkenin klinik örnekten direk mikroskopik olarak saptanması, histopatolojik olarak dokuda belirlenmesi, kültürden soyutlanması ve identifikasyonu gerekmektedir (80, 81). Standart laboratuvar yöntemleri ile identifikasyon 1-5 gün süreyi alabilmektedir. Ticari karbonhidrat asimilasyon temeline dayalı

sistemler genellikle *Candida* türlerinin identifikasyonunda kullanılmakta, bununla birlikte tanımlama sorunları ortaya çıkabilmektedir (141, 142).

Son yıllarda fungal infeksiyonların tanısında ve patojen fungusların identifikasyonunda çok sayıda DNA temelli yöntem geliştirilmiştir (143, 144). PZT'ye dayalı yöntemler basitlik, duyarlılık ve özgüllük açısından umut verici görülmektedir. *Candida* türlerinin identifikasyonunda kullanılan çok sayıda PZT amplifikasyon tekniği bulunmakta olup, bu tekniklerde kullanılmak üzere ribozomal genler popüler hedeflerdir (129, 117).

Amplifikasyon için genellikle mitokondriyal DNA (yaklaşık 30 kopya) genleri ve daha sıklıkla genom içerisinde 40-80 kopya olarak bulunan rDNA genleri tercih edilmekte olup, tüm mantarlar için ortak, çok tekrarlı ve ileri derecede korunmuş 18S, 5.8S ve 28S rDNA alt üniteleri klinik örneklerde panfungal PZT için kullanılmaktadır. Bu bölgeler türler arasında yeterince farklılık göstermediğinden identifikasyon için uygun değildir. *Candida*'ların tür düzeyinde tanımlanmasında ribozomal alt birimleri kodlayan gen bölgelerinin arasına giren ve protein kodlamayan "internal transcribed spacer" (ITS1, ITS2) bölgeleri, sitokrom P-450 lanosterol- alfa-demetilaz, aspartik proteinaz, aktin, kitin sentetaz ve ısı şok proteini kodlayan gen bölgeleri hedef bölge olarak kullanılmaktadır (129, 109, 111, 110, 145). Bu nedenle çalışmamızda identifikasyon için uygun bölgeler olan ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2'ye yönelik öncüller kullanmayı yeğledik. Böylelikle korunmuş bir bölge ile değişken olan iki bölgenin birlikte çoğaltılması ile identifikasyonda avantaj sağlanması amaçlandı. Benzer şekilde üç bölgenin birlikte kullanıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır (129, 142, 161).

Fungusların identifikasyonunun sağlanması amacıyla DNA temelli testlerin kullanıldığı birçok araştırma bulunmaktadır. Çalışmalarda bu testlerin laboratuvar identifikasyonu için gereken süreyi kısalttığı ve sonuçlarının zaman kazanımı açısından umut verici olduğu bildirilmektedir (121). Fungal patojenlerin identifikasyonu amacıyla multipleks PZT, "nested" PZT, "real time" PZT, PZT-REA ve "reverse-transcriptase" PZT gibi yöntemler kullanılmıştır (146, 147, 148, 149).

PZT-REA'nın, fungal patojenlerin saptanması ve tür identifikasyonlarına hızlı ve doğru bir yaklaşım getirdiği bildirilmiştir (149). Yöntemin hızlı, kolay uygulanabilir ve ucuz olduğu, tıbbi açıdan önemli mayaların ekonomik identifikasyonu amacıyla rutin laboratuvarlarda da kullanılabileceği belirtilmiştir (129). Çalışmamızda özellikle sistemik örneklerden soyutlanan ve klasik yöntemler ile tanımlanan *Candida albicans* ve non-*albicans Candida* türlerinin daha hızlı ve güvenilir identifikasyonu amacıyla REA yönteminin uygulanması ve sonuçların karşılaştırılması hedeflenmiştir.

PZT uygulanabilmesi için DNA eldesinin hızlı ve kolay bir şekilde gerçekleştirilmesi gerekmektedir (150). Bu nedenle fungal DNA eldesi kritik bir basamağı oluşturmakta ve son yıllarda bu konuda geliştirilmiş birçok protokol bulunmaktadır. Geleneksel DNA eldesi yöntemleri için en önemli kısıtlılığı sert fungal hücre duvarının lizisi oluşturmaktadır. Basit lizis yöntemleri olarak fiziksel, enzimatik, ardışık dondurma çözme döngülerinden oluşan sıvı nitrojen ile, sıcak deterjanlarda ve proteazlarda inkübasyon sonucu parçalanma ve fenol kloroform veya guanidin tiyosiyanat gibi kullanımı zor, toksik kimyasalların kullanıldığı parçalanma yöntemleri sayılabilir. Ancak bu yöntemler zorluk, zaman ve bulaş sorunlarından dolayı rutin laboratuvarlarda kullanım açısından uygun değildir (150, 151, 152). İlk ekstraksiyon protokollerinde fungal hücre lizisinin gerçekleştirilmesi amacıyla zimolaz kullanılmış olup, bu yöntemlerde fungal sferoplast oluşumu için hücrenin osmotik duyarlılığının artırılması prensibinden yararlanılmıştır. Zimolaz kullanımının özellikle *Candida* ve *Cryptococcus* gibi mayalarda DNA eldesi için etkin olduğu bildirilmiştir (111). Fungal hücre duvarının parçalanması litikaz, müreinaz, β -1,3-glukan laminaripentaohidrolaz, β -1,3-glukanaz gibi enzimler yardımı ile de sağlanabilmektedir. Bunun yanında etilen diamin tetra asetat (EDTA), sodyum dodesil sülfat (SDS) veya proteinaz K uygulanmaları da yapılmaktadır. Günümüzde DNA eldesi “in house” yöntemlerin yanı sıra ticari kitler yardımıyla da gerçekleştirilmektedir (150, 151).

Fungal DNA eldesi amacıyla ticari kitlerle birlikte mekanik, enzimatik, termik-enzimatik hücre lizisi yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, özellikle zimolaz kullanımı ile örneklerin 55°C’de iki saat inkübe edildiği termik-enzimatik yöntem ile yapılan ekstraksiyonun en duyarlı yöntem olduğu belirtilmiş, sonrasında gerçekleştirilen PZT’nin duyarlılığı *C. albicans* ve *S. cerevisiae* için 9×10^1 , *A. fumigatus* için 9×10^2 hücre olarak saptanmıştır. Yöntemin en önemli kısıtlılığının, diğer yöntemlere oranla daha fazla zaman gerektirmesi ve yaklaşık olarak sekiz saatte gerçekleştirilmesi olduğu vurgulanmıştır (152).

Çalışmamızda PZT-REA uygulanmasından önce DNA eldesi Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Almanya), EDTA, litikaz, sorbitol tampon kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Uygulanan yöntem ile koloniden ekstraksiyon aşamasında bir sorun yaşanmamıştır. Loeffler ve arkadaşları (150) tarafından yapılan ve DNA eldesinde ticari olarak mevcut beş ekstraksiyon kiti ve el ile uygulanan termik-enzimatik ekstraksiyon yönteminin duyarlılık, zaman ve maliyet açısından karşılaştırıldığı bir çalışmada, tüm ticari kitlerin DNA ekstraksiyonu için harcanan süreyi kısalttığı, ancak maliyeti arttırdığı belirtilmiştir. Karşılaştırılan ticari kitler arasında QIAmpTissue Kit’in (Qiagen, Los Angeles,

California) el ile uygulanan yöntem ile aynı duyarlılık (1-10 hücre/ ml) ve saflıkta fungal DNA açığa çıkardığı bildirilmiştir.

REA yönteminde kullanılan restriksiyon endonükleazlar (RE), kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilere yakın bölgelerden veya bu diziler içindeki özgül bölgelerden DNA'yı kesen yapılar olup, büyük bir kısmı bakterilerden soyutlanmıştır. Bu enzimler, DNA tanıma bölgesi ve katalitik bölge olmak üzere iki fonksiyonel alt birimden oluşmaktadır. DNA tanıma bölgesi özgül bölgeyi tanır ve katalitik bölgeyi buraya yerleştirir. Tanıma dizisine yerleşen katalitik bölge de DNA heliksinin fosfodiester bağlarını kırar (153).

RE'ler, metilaz aktivitelerine, alt ünite yapılarına, kesim özgüllüklerine ve kofaktör ihtiyaçlarına göre sınıflandırılmıştır. Tip1 RE'ler tanıma dizilerine bağlanmalarına rağmen, kesimlerini dizi dışında rastgele gerçekleştirmektedir. Tip2 RE'ler tam hedef nükleotitten veya çok yakınından kesim yapma özellikleri nedeniyle araştırmalar için ideal enzimlerdir. Bunlar, Mg^{+2} iyonlarının varlığında çift zincir DNA üzerindeki 4-8 bp büyüklüğünde palindromik dizileri tanır ve bu dizi içindeki özel bölgeden kesim yaparlar. Tip2 RE'ler restriksiyon fragmanları ve jelde bant paternleri oluşturmaları bakımından diğer tip RE'lere göre üstündür. Günümüzde sayısı 3612'yi bulan Tip2 RE'lerin 588 tanesi ticari olarak satılmaktadır. Tip3 RE'lerin tam bir kesim yapma özellikleri zayıf olup, DNA'ya tanıma dizilerinden bağlanmalarına rağmen, kesimi tanıma bölgesinden farklı bir yerden gerçekleştirirler. Çalışmamızda kullandığımız *MwoI* ve *BsII* RE'leri de Tip2 RE'leri arasında yer almakta ve bu tip enzimlerin sahip olduğu üstünlükleri taşımaktadır (136, 154, 155, 156).

Aynı diziyi tanıyan ve farklı organizmalardan elde edilmiş RE'lere izoşizomer denir. İzoşizomerler sıklıkla farklı optimum reaksiyon koşullarına ve stabiliteye sahiptir. Aynı diziyi tanımlarına karşın, kesimi dizinin farklı bölgelerinden de yapabilen RE'ler neoşizomer olarak adlandırılmaktadır (157). REA amacıyla kullanmış olduğumuz *MwoI* enzimi *HpyF10VI* enziminin neoşizomeri, *BsII* enzimi de *BseLI* ve *BsiYI*'in izoşizomeridir.

Çalışmamız kapsamında, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji laboratuvarında sistemik örneklerden soyutlanarak rutin yöntemlerle identifikasyonu yapılan 146 adet *Candida* suşu yer almıştır. Suşların türlere göre dağılımının en sık soyutlanan türleri içerecek şekilde olmasına özen gösterilmiş; bu nedenle araştırmamıza *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. kefyr* ve *C. guilliermondii*'yi içeren yedi tür alınmıştır.

PZT sonucunda çalışmamıza alınan 40 *C. albicans* suşu 586 bp'lik bantlar oluşturmuştur. *MwoI* enzimi ile kesilen *C. albicans* suşlarının 36 tanesi Trost ve

arkadaşlarının (129) bulguları ile paralel olan 261, 184 ve 141 bç'lik üç adet, dördü ise 184 bç, 141 bç ve yaklaşık 165 bç, 95 bç'lik dört adet bant oluşturmuştur. Farklı kesim paterni gösteren dört suşun dizi analizi sonuçları değerlendirildiğinde bir adet suşta insersiyon/delesyon tipi mutasyon, diğer üç suşta ise nokta mutasyonu saptanmıştır. Bu suşlarda diğer 36 suştan farklı olarak meydana gelen kesim noktasında **adenin** yerine **guanin** nükleotidinin geldiği mutasyonlar olduğu belirlenmiş; bu bölgedeki **adenin** **guanin** değişimi sonucu oluşan mutasyona bağlı olarak fazladan üçüncü bir kesim noktasının ortaya çıktığı izlenmiştir. Bu sonuca göre *C. albicans* suşlarında *MwoI* enzimi ile uygulanan REA'nın duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla % 90, % 100, % 100 ve %96,4 olarak saptanmıştır.

Araştırmamızda 27 *C. parapsilosis* ile 26 *C. tropicalis* suşunun, öncül1 ve öncül3 kullanılarak ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 bölgelerinin PZT ile çoğaltılması sonucu sırasıyla 570 ve 576 bç'lik bantlar elde edilmiştir. *MwoI* enzimi ile kesim sonucunda *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* suşlarında sırasıyla 336, 146, 88 bç'lik ve 325, 154, 97 bç'lik üçer adet bant izlenmiştir. *MwoI* enziminin bu iki türün ayırımını sağlayacak bant paternlerini oluşturmaması nedeniyle Trost ve arkadaşlarının (129) kullandığı ikinci bir restriksiyon enzimi olan *BsII* ile suşlar kesime alınmıştır. *BsII* enzimi ile kesim için 55°C'de 45 dakika inkübasyon ve 80°C'de 20 dakika ısı ile inaktivasyon uygulanmıştır. *C. parapsilosis* suşları bu kesim sonucunda 413, 94, 63 bç'lik üç adet banttan oluşan bir bant paterni ortaya çıkarmıştır. Bu açıdan *C. parapsilosis* için *MwoI* enzimi ile uygulanan REA'nın özgüllük, pozitif prediktif değerlerinin düşük bulunduğu, *BsII* kullanımının özgüllüğü ve pozitif prediktif değeri (% 100) arttırdığı gözlenmiştir (Tablo 3). *BsII* enzimi ile REA uygulanması sonucunda 26 *C. tropicalis* suşunun 23'ünde elde edilen bant büyüklükleri 326, 187 ve 63 bç'den oluşurken, kalan üçünde beklenen büyüklükte üç bant ile birlikte PZT ürünü büyüklüğünde, tam olarak kesilmemiş bir bant daha izlenmiştir. Bu bantın oluşum nedeninin DNA miktarının yoğun olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülerek bu suşların PZT ürünleri 1/2 oranında dilüe edilerek çalışılmış ve sorunun çözümlendiği görülmüştür. *BsII* enzimi ile kesim sonucunda *C. tropicalis* için duyarlılık % 88,5 ve negatif prediktif değer % 97,6 olarak saptanırken, 1/2 dilüsyon sonrası *BsII* enzimi ile kesimin *C. tropicalis* için duyarlılık ve negatif prediktif değeri % 100'e yükselttiği görülmüştür.

Çalışmaya aldığımız 25 *C. glabrata*, 11 *C. kefyr* ve 10 adet *C. krusei* suşu sadece *MwoI* enziminin kullanıldığı REA ile birbirinden ayırt edilebimiştir. *C. glabrata* suşları *MwoI* enzimi ile kesim sonucunda 414, 174, 171, 86, 80 bç'lik bantlar oluştururken, *C. kefyr* suşları

için 370, 430 bç'lik iki adet bant ve *C. krusei* suşları için ise 289, 134, 83, 54 bç'lik dört adet banttıan oluşan paternler elde edilmiştir.

Geleneksel yöntemlerle *C. guilliermondii* olarak tanımladığımız suşların *MwoI* enzimi ile kesimi sonucunda beş suş 355, 302 bç'lik; kalan iki suş ise yaklaşık olarak 390 ve 300 bç'lik iki adet bant oluşturmuştur. Bu yöntemin *C. guilliermondii* türleri için duyarlılığı, özgülüğu, pozitif ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %100, % 98,6, % 71,4, %100 olarak saptanmıştır. Suşlarımızda farklı paternler elde edilmesi üzerine *BsII* enzimi ile REA uygulanarak *MwoI* ile farklı kesilen 99 ve 139 numaralı suşların kesim sonrasında yine diğerlerinden tamamen farklı bir kesim paterni gösterdiği izlenmiştir. Farklı kesilen iki suş ile diğer gruptaki iki adet suşun dizi analizi sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; 99 ve 139 numaralı suşların nükleotid ve aminoasit dizilimlerinin Gen bankasındaki *C. membranaefaciens* türleri ile büyük benzerlik (% 91,2) gösterdiği saptanmıştır. İncelediğimiz bazı kaynaklarda *C. guilliermondii* türünün, var. *guilliermondii* ve var. *membranaefaciens* olmak üzere iki adet varyetesi olduğu ve genellikle bu iki varyetenin ticari identifikasyon sistemleri ile ayırt edilemediği belirtilmiştir (130, 131). Çalışmamızda da bu bulgu ile paralel olarak üç defa tekrar ettiğimiz API 20C AUX identifikasyon sonuçları % 92,1 oranında *C. guilliermondii* olarak saptanmıştır. Çalışmaya alınan yedi adet suşun, aynı türün farklı varyeteleri olmaları nedeniyle farklı PZT ve kesim bant paternleri oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Trost ve arkadaşlarının (129) yaptığı çalışmada *C. membranaefaciens* ayrı bir tür olarak alınmış ve çalışmada *C. membranaefaciens* ATCC 201377 standart suşu ile bizim *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* için elde ettiğimiz aynı bant paterni saptanmıştır.

Önceki yıllarda patojen olarak pek kabul edilmeyen ve azollere dirençli bir tür olarak tanımlanan *C. membranaefaciens* ilk olarak 2005 yılında Fanci ve arkadaşları (158) tarafından non-Hodgkin lenfomalı bir hastanın kan kültürü ve kateterinden soyutlanarak santral venöz kateter ilişkili infeksiyon etkeni olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda *C. guilliermondii* var. *membranaefaciens* olarak belirlenen suşların bir tanesi kan kültüründen diğeri ise eklem sıvısından soyutlanmıştır.

İdentifikasyon amacıyla REA yönteminin kullanıldığı bir çalışmaya 16 *Candida* türü dahil edilmiş; ITS 1, ITS 2 ve 5.8S rDNA bölgeleri hedef alınarak PZT gerçekteştirilmiş ve sonuçta 480 bç ile 929 bç arasında değişen büyüklüklerde bantlar elde edilmiştir. Çalışmaya alınan 16 farklı *Candida* türünün *MwoI* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucunda *C. tropicalis* ile *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* ile *C. membranaefaciens* dışındaki türler farklı büyüklükte bantlar oluşturmuş ve tanımlanabilmiştir. Bu türleri birbirinden ayırmak için ise

BsII enzimi kullanılmış ve restriksiyon paternlerine göre de *C. tropicalis* ile *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* ile *C. membranaefaciens* birbirlerinden ayırt edilebilmiştir. Bu araştırmada *MwoI* enzimi, 12 *Candida* türünün ayırımına olanak sağlayan bant paternlerini oluşturması yanında *C. albicans* ile *C. dubliniensis* arasındaki ayrımı da net olarak ortaya çıkarmıştır. *BsII* enzimi ise *MwoI* enzimi ile tanımlanamayan diğer türlerin ayırımına olanak sağlamıştır. Böylelikle PZT ürünlerine *MwoI* ve *BsII* restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı REA uygulanması sonucu 16 *Candida* türü tanımlanabilmiştir (129). Araştırmamızda *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* türleri için her iki enzim de kullanılarak benzer sonuçlar saptanmış, sadece nokta mutasyonu ve insersiyon/delesyon tipi mutasyon belirlenen *C. albicans* suşları için farklı bant paternleri elde edilmiştir.

Williams ve arkadaşları (159) tarafından yapılan, “intergenic spacer regions” bölgelerinin çoğaltılmasına yönelik olarak ITS1 ve ITS4 öncüllerinin kullanıldığı bir çalışmada, *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata* 'yı içeren sekiz *Candida* türünün tanımlanması amacıyla suşlara PZT ve REA uygulanmıştır. PZT sonrası oluşan bant paternlerinin *C. guilliermondii*, *C. glabrata* ve *C. kefyr* türlerinin ayırımına olanak sağladığı ancak bu bantların birbirine yakın büyüklükte olduğu; *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* türlerinin ise REA sonucu oluşan kesim paternlerine göre ayırt edilebildiği saptanmıştır. *HaeIII*, *BfaI* ve *DdeI* restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı çalışmada araştırmacılar bu üç enzimden *BfaI*'in türlerin ayırımında en iyi sonuçları verdiğini saptamışlardır. *C. glabrata*, *C. kefyr* ve *C. guilliermondii* türlerinin hızlı tanımlanması için çoğaltılan PZT ürünlerinin elektroforezi yeterliyken, diğer beş türün tanımlanması için suşların özellikle *DdeI* ve *BfaI* enzimleriyle kesiminin gerekli olduğu belirtilmiştir.

Beş *Candida* türünü içeren 44 klinik *Candida* izolatının incelendiği diğer bir çalışmada ITS1ve ITS4 öncül'leri kullanılarak gerçekleştirilen PZT sonucunda, *C. glabrata*, *C. rugosa*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* türleri için büyüklükleri sırasıyla yaklaşık olarak 800 bç, 500 bç ve diğerleri için de yaklaşık olarak 520 bç'lik ürünler saptanmıştır. Benzer büyüklükte ürünler oluşturan bu üç türün tanımlanmasının yapılabilmesi için *HaeIII*, *DdeI* ve *BfaI* enzimleri ile REA uygulanmış ve oluşan restriksiyon paternlerine göre *HaeIII* enziminin diğerlerine göre türler arasındaki farklılığı en iyi saptayan enzim olduğu belirtilmiştir. Tek başına *HaeIII* kullanıldığında, *C. parapsilosis* ve *C. krusei* benzer büyüklükte bantlar oluşturmuş, ancak bu suşların *BfaI* ile kesimi sonucunda *C. krusei* için ayırt edici sonuçlar

elde edilmiştir. Bu bulgular eşliğinde çalışmada *HaeIII* enziminin *C. albicans* ve diğer non-*albicans Candida* türlerinin kesin olarak ayırt edilmesini sağladığı, *BfaI* enziminin *C. parapsilosis* ve *C. krusei* arasındaki farklılığın saptanmasında ve *DdeI* enziminin ise *C. albicans* türlerinin doğrulanmasında kullanılabileceği sonuçlarına varılmıştır (15).

Klinik örneklerden en sık soyutlanan yedi türü içeren 114 *Candida* izolatu ve 65 referans suşun tanımlanması amacıyla ITS bölgesine yönelik ITS5 ve NL4 öncülleri kullanılarak amplifikasyonun gerçekleştirildiği bir araştırmada, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* ve *C. inconspicua* suşları farklı büyüklükte ürünler oluşturmuş, bunlar dışında kalan *Candida* türleri'nin (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*) benzer büyüklükte PZT ürünü oluşturduğu saptanmıştır. Bu nedenle bu dört türün ayırt edilmesi için amplifikasyon ürünleri *HaeIII*, *DdeI* ve *BfaI* enzimleri ile kesilmiştir. *DdeI* enzimi ile kesim sonucu *C. albicans* ve *C. dubliniensis* suşları dört adet bant oluşturmuş ancak bu bantlardan üçü aynı büyüklükte olmasına rağmen dördüncü banttaki büyüklük farkı nedeniyle iki tür birbirinden ayırt edilebilmiştir. Sonuç olarak; bu çalışmada *C. glabrata*, *C. guilliermondii* ve *C. inconspicua* 'nın PZT ürün büyüklüklerine göre tanımlanabildiği, bunun dışında kalan diğer dört türün tanımlanması için ise PZT ürünlerinin restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmesi gerektiği bildirilmiştir (160).

Son yıllarda REA ile ilgili çalışmalar daha çok *C. albicans* ile *C. dubliniensis*'in ayırımına yönelik olarak planlanmıştır. İki türün ayırımı için gerekli süreyi kısaltmak ve iş yükünü azaltmak amacıyla özellikle tek restriksiyon enziminin kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır. Graf ve arkadaşları (161) ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgelerini çoğaltmaya yönelik olarak kullandıkları öncül1 ve öncül2 ile PZT sonucunda *C. albicans* ile *C. dubliniensis* için sırasıyla 586 ve 589 bp'lık bantlar elde etmişlerdir. PZT ürünlerinin *MwoI* restriksiyon enziminin neozizomeri olan *HpyF10VI* ile kesilmesi sonucunda *C. albicans* 141, 184 ve 261 bp, *C. dubliniensis* 264 ve 325 bp'lık bantlar oluşturarak tek enzimin kullanıldığı REA ile birbirlerinden ayırt edilebilmiştir. Onikişer *C. albicans* ve *C. dubliniensis* suşunun incelendiği bir başka çalışmada ise araştırmacılar REA'da kullanılmak üzere *BlnI* enzimini seçmişlerdir. 37°C'de iki buçuk saatte kesim sonucunda *C. dubliniensis* suşları tek bir bölgeden kesilerek iki adet bant oluşturmuş ancak enzimin *C. albicans* suşlarında kesim bölgesi bulunmaması nedeniyle REA sonrası PZT ürünü büyüklüğünde bant elde edilmiştir. Araştırmanın sonucunda REA'nın morfolojik olarak birbirine benzeyen türler olan *C. albicans* ve *C. dubliniensis*'in birbirinden ayırımında kolay ve hızlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır (162).

Yüz otuz yedi klinik *Candida* suşunun alındığı bir çalışmada ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgeleri çoğaltılarak; *MspI* enzimi ile kesilmiştir. Kesim sonucunda çalışmada yer alan *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* türleri gibi klinik örneklerden sıklıkla soyutlanan altı adet *Candida* türü identifiye edilebilmiştir. Ancak bu yöntemle *C. albicans* ve *C. dubliniensis* için ayırım sağlayacak bant paternleri elde edilememiştir. Araştırmacılar sonuçta REA'nın tıbbi mikoloji laboratuvarında *Candida* türlerinin identifikasyonunda kullanılabilecek kolay bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir (142).

C. albicans suşları için SDA besiyerinde üretildikten sonra geleneksel identifikasyon yöntemleri ile tanımlama, eğer sadece çimlenme borusu ile yapılabiliyorsa üç saat gibi bir süreyi alırken; çimlenme borusu testinin negatif olduğu durumlarda süre 72 saate dek uzayabilmektedir. Klinik örneklerden en sık soyutlanan *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* türlerinin identifikasyonu için genellikle 72 saat gibi bir süre gerekli olmaktadır. Çalışmamızda *MwoI* ve *BsII*'nin kullanıldığı REA'nın uygulanmasıyla bu türlerin identifikasyonu için geçen süre 33-34 saat olarak saptanmıştır.

Candida suşlarının prognostik, epidemiyolojik ve terapötik nedenlerle erken, hızlı ve doğru identifikasyonu kritik öneme sahip olup; klasik yöntemler identifikasyon için halen altın standart olarak kabul edilmektedir. Sonuç olarak; klasik yöntemler ile tanımlamada sorun yaşanan *Candida* türlerinin identifikasyonunda veya çok hızlı tanımlama gerektiren durumlarda REA yönteminin kullanabileceği ancak bu yöntemde de bazı farklılıkların izlenebileceğinin göz önünde bulundurulması gerektiği düşünülmüştür. Günümüzde moleküler yöntemler henüz klasik yöntemlerin yerini alabilecek durumda olmayıp, hız ve doğruluk açısından identifikasyona ek kazanımlar getirebilecektir.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

§ Çalışmamıza çimlenme borusu testi, mısır unu tween 80 agar ve CHROMagar *Candida* (CHROMagar, Fransa) besiyerlerindeki morfolojileri ve API 20C AUX (Biomérieux, Fransa) otomatik identifikasyon sonuçlarına göre tanımlanmış 146 *Candida* suşu alınmış ve *Candida* türlerinin (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*) ITS1, 5.8S rDNA ve ITS2 bölgelerini hedefleyen PZT ile amplifikasyonu sonucu sırasıyla 586 bç, 570 bç, 576 bç, 925 bç, 800 bç, 560 bç ve 657 bç'lik ürünler elde edilmiştir.

§ PZT sonrası saflaştırılarak REA uygulanan 40 *C. albicans* suşunun *MwoI* enzimi ile kesimi sonucunda 36 tanesinde 261, 184, 141 bç'lik üç adet bant elde edilirken, dört adet suşun farklı bölgelerden kesilerek 184, 141 ve de yaklaşık 165 ve 95 bç'lik bantlar oluşturduğu gözlenmiştir. Farklı bir kesim paterni oluşturan bu dört suştan üç tanesinde adenin guanin değişimi sonucunda oluşan nokta mutasyonu, diğer suшта ise insersiyon/delesyon tipi mutasyon saptanmıştır.

§ *MwoI* enzimi ile *C. parapsilosis* suşlarının kesimi sonucunda 336, 146, 88 bç'lik, *C. tropicalis* suşlarının kesimi ile ise 325, 154, 97 bç'lik üç adet bant oluşmuştur. Bu kesim sonucu oluşan bant büyüklüklerinin iki türün birbirinden ayırt edilmesini sağlamaması nedeniyle kullanılan *BsII* enzimi ile kesim sonucunda sırasıyla 413, 94, 63 bç'lik ve 326, 187 ve 63 bç'lik üç adet bant elde edilmiştir.

§ *C. glabrata* suşlarının *MwoI* enzimi ile kesimi sonucunda 414, 174, 171, 86, 80 bç'lik bantlar oluştururken, *C. kefyr* suşları için 370, 430 bç'lik iki adet bant, *C. krusei* suşları için ise 289, 134, 83, 54 bç'lik dört adet banttan oluşan paternler izlenmiştir.

§ Klasik identifikasyon yöntemlerini kullanarak *C. guilliermondii* olarak tanımlanan suşların *MwoI* enzimi ile kesimi sonucunda beş suşun 355, 302 bç'lik; kalan iki suşun ise yaklaşık olarak 390 ve 300 bç'lik iki adet bant oluşturduğu, *BsII* enzimi ile REA uygulanması sonucunda da söz konusu iki suшта farklı bir kesim paterni ortaya çıktığı saptanmıştır. Diğer *C. guilliermondii* suşlarına göre REA sonucunda farklılık gösteren suşların nükleotid ve

aminoasit dizilimlerinin Gen bankasındaki *C. membranaefaciens* türleri ile büyük benzerlik (% 91,2) gösterdiği, bu türün de *C. guilliermondii*'nin bir varyetesi olduğu belirlenmiştir.

§ Araştırmamızda tek başına *MwoI* enziminin kullanılması ile *C. glabrata*, *C. kefir*, *C. krusei* ve *C. guilliermondii* identifiye edilirken; ek olarak *BsII* enziminin de kullanıldığı REA'nın gerçekleştirilmesi ile *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* türlerini de içeren altı *Candida* türü tanımlanmıştır. *C. albicans* sadece *MwoI* enziminin kullanılması ile diğer türlerden farklı bant paternleri oluşturarak ayırım sağlayıcı sonuçlar ortaya çıkarmış ancak, nokta mutasyonu ve insersiyon/delesyon tipi mutasyon belirlenen suşlar için diğerlerinden farklı bant paternleri gözlenmiştir. *C. albicans* suşlarında sadece *MwoI* enziminin kullanılması sonucu duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler sırasıyla %90, %100, %100, %96,4 olarak elde edilmiştir.

§ *MwoI* enzimi ile *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* türleri için duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değerler sırasıyla %100, %78,2- 81,5, %49,1- 50,9, %100 olarak; *BsII* enziminin kullanılmasıyla ise tüm değerler %100 olarak bulunmuştur. *C. glabrata*, *C. kefir*, *C. krusei* ve *C. guilliermondii* türlerinin *MwoI* enziminin kullanıldığı REA ile identifikasyonu için duyarlılıkları %100 iken, özgüllükleri %98,6- 100, pozitif prediktif değerleri %71,4- 100 ve negatif prediktif değerleri %100 olarak saptanmıştır.

§ Yöntem süre açısından değerlendirildiğinde 33-34 saatte sonuç vermekte olup, laboratuvarlarda en sık soyutlanan *Candida* türlerinin hızlı ve güvenilir identifikasyonunda gerekli durumlarda kullanılmak üzere uygundur.

§ Sonuç olarak; klasik yöntemler ile tanımlamada sorun yaşanan *Candida* türlerinin identifikasyonunda veya hızlı ve güvenilir tanımlama gerektiren durumlarda REA yönteminin kullanabileceği ancak bu yöntemde de seçilen restriksiyon enzimi için kesim bölgesi oluşturan mutasyonlara bağlı olarak bazı farklılıkların izlenebileceğinin göz önünde bulundurulması gerektiği düşünülmüştür.

9. KAYNAKLAR

1. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. Jpn J Med Mycol 2007; 48: 1- 12.
2. Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JN, et al. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. Med Mycol 1998; 36 (Suppl. 1): 156- 165.
3. Hazen. KC. New and emerging yeast patogen. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 462- 478.
4. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, et al. SENTRY Participant Group: International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. J Clin Microbiol 2001; 39: 3254- 3259.
5. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, et al. Fungal infection network of Switzerland. Epidemiology of candidaemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends 1991–2000. Clin Infect Dis 2004; 38: 311- 320.
6. Uzun O, Anaissie EJ. Predictors of outcome in cancer patients with candidemia. Ann Oncol 2000; 11: 1517- 1521.
7. Singh N. Changing spectrum of invasive candidiasis and its therapeutic implications. Clin Microbiol Infect 2001; 7 (Suppl. 2): 1- 7.
8. Snyderman DR. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial *Candida* infections. CHEST 2003; 123: 500- 503.
9. Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman L, et al. National Epidemiology of Mycoses Survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. Clin Infect Dis 1999; 29: 253- 258.

10. Pfaller MA, Diekema DJ. Role of sentinel surveillance of candidemia: Trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3551- 3557.
11. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, et al. National surveillance of nosocomial bloodstream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: Frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diag Microbiol Dis* 1998; 30: 121- 129.
12. Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, et al. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa Organisms Study. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1298- 1302.
13. Safdar A, Chaturvedi V, Cross EW, Park S, et al. Prospective study of *Candida* species in patients at a comprehensive cancer center. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2129- 2133.
14. Ellepola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol* 2005; 43: 65- 84.
15. Cirak MY, Kalkanci A, Kustimur S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of Fluconazole resistance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 1027- 1032.
16. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassouljian-Barrett SL, et al. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4042- 4051.
17. De Baere T, Claeys G, Swinne D, Verschraegen G, et al. Identification of cultured isolates of clinically important yeast species using fluorescent fragment length analysis of the amplified internally transcribed rRNA spacer 2 region (ITS2). *BMC Microbiol* 2002; 2: 1- 8.

- 18.** Calderone RA. Introduction and Historical Perspectives. In: Calderone RA, ed. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press, 2002 p. 3- 13.
- 19.** John E, Edwards JR. *Candida* species. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition. Pennsylvania, Churchill Livingstone, 2000 p. 2656- 2674.
- 20.** Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Phaller MA. Mechanisms of Fungal Pathogenesis In: Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Phaller MA, eds. Medical Microbiology. Fourth Edition. St. Louis: Missouri, Mosby, 2002 p. 629- 631.
- 21.** Mitchell TG. Medical Mycology. In: Brooks GF, Butel JS, Morse SA, eds. Medical Microbiology. Twenty third edition. Singapore: McGraw-Hill Companies, 2004 p. 623- 659.
- 22.** Vasquez JA, Sobel JD. Candidiasis. In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD editor. Clinical Mycology. First edition. Oxford University Press, 2003 p. 141- 219.
- 23.** Saniç A. Mantarlar: Genel Mikrobiyolojik Özellikler ve Sınıflandırma Mutlu Ulusoy S, Arman D, Uzun Ö editör. Fungal İnfeksiyonlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2006 p. 9- 20.
- 24.** Fromtling RA, Rhodes JC, Dixon DM. Taxonomy, Classification, and Morphology of Fungi. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover JC, eds. Manual of Clinical Microbiology. Eighth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2003 p. 1653- 1658.
- 25.** Calderone RA. Taxonomy and biology of *Candida*. In: Calderone RA ed. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2002 p. 15- 27.
- 26.** Hazen KC, Howell SA. Yeasts. In: Howard DH ed. Pathogenic Fungi in Humans and Animals. Second Edition. New York, NY, USA: Marcel Dekker Incorporated, 2002 p. 499- 529.

27. John E, Edwards JR. *Candida* species. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition. Pennsylvania, Churchill Livingstone, 2000 p. 2656- 2674.
28. Hilmioglu S, Ilkit M, Badak Z. Comparison of 12 liquid media for germ tube production of *Candida albicans* and *C. tropicalis*. Mycoses 2007; 50: 282- 285.
29. Tümbay E. *Candida* türleri. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Öncü Basımevi- Güneş Kitabevi, 1999 p. 1081- 1086.
30. Topçu AW, Çerikçioğlu N. *Candida* türleri. In:Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, eds. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Matbaacılık, 2002 p. 1797- 1808.
31. Lopez-Ribot JL, Casanova M, Murgui A, Martinez JP et al. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 41: 187- 196.
32. Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 130- 180.
33. Chauahan N, Li D, Singh P, Calderone RA, Kruppa M. The Cell Wall of *Candida* spp. In: Calderone RA, ed. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press, 2002 p. 159- 175.
34. Adams DJ. Fungal cell wall chitinases and glucanases. Microbiol 2004; 150: 2029- 2035.
35. Hazen KC, Howell SA. Fungi - *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover JC eds. Manual of Clinical Microbiology. Eighth.edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2003 p. 1693- 1711.
36. Whiteway M, Bachewich C. Morphogenesis in *Candida albicans*. Annu Rev Microbiol 2007; 61: 529- 553.

37. Hoepelman AIM. Opportunistic Fungi. In: Cohen J, Powderly WG, ed. Infectious Diseases. Second Edition. Mosby, Elsevier, 2004 p. 2341- 2348.
38. Pabuççuoğlu HU. Mikoşlar - Patogenez ve Patoloji. İzmir, Güven- Nobel Tıp Kitabevi, 1999 p. 63- 75.
39. Romani L. Immunology of invasive candidiasis. In: Calderone RA ed. *Candida* and Candidiasis. First Edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2002 p. 223- 241.
40. Haynes K. Virulence in *Candida* species. TRENDS Microbiol 2001; 9: 591- 596.
41. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. J Microbiol Immunol Infect 2003; 36: 223- 228.
42. Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. Mol Microbiol 2006; 60(1) : 5- 15.
43. Hollmer C, Essmann M, Ault K, Larsen B. Adherence and blocking of *Candida albicans* to cultured vaginal epithelial cells: treatments to decrease adherence. Infect Dis Obstet Gynecol 2006; 2006: 98218.
44. Klotz SA, Gaur NK, Lake DF, Chan V, et al. Degenerate peptide recognition by *Candida albicans* adhesins Als5p and Als1p. Infect Immun 2004; 72(4): 2029- 2034.
45. Zhao X, Pujol C, Soll DR, Hoyer LL. Allelic variation in the contiguous loci encoding *Candida albicans* ALS5, ALS1 and ALS9. Microbiol 2003; 149: 2947- 2960.
46. Nett J, Andes D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. Curr Opin Microbiol 2006; 9: 340- 345.
47. Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS Yeast Res 2006; 6: 979- 986.

48. Kumamoto CA. *Candida* biofilms. Curr Opin Microbiol 2002; 5: 608- 611.
49. Calderone RA, Gow NAR. Host recognition by *Candida* species. In: Calderone RA, ed. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press, 2002 p. 67- 86.
50. Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/ pathogen interactions. Cell Microbiol 2004; 6: 915- 926.
51. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. Mycoses 2005; 48: 365- 377.
52. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev 2003; 67: 400- 428.
53. Zaugg C, Borg-Von Zepelin M, Reichard U et al. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. Infect Immun 2001; 69: 405- 412.
54. Kuştımur S. *Candida*'da Virulans Faktörleri. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı: p. 145- 150, 4- 6 Mayıs 1999, İzmir.
55. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiol 2001; 147: 1997- 2005.
56. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. Mycoses 2001; 44: 361- 367.
57. Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ Y. Sağlıklı ve *Candida* enfeksiyonu olan bireylerden soyutlanan *Candida albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. Enfeksiyon Derg 2000; 14: 405- 408.
58. Fotedar R, Al-Hedaithy SS. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. Mycoses 2005; 48 (1): 62- 67.

59. De Brito Costa EM, dos Santos AL, Cardoso AS, Portela MB, Abreu CM, et al. Heterogeneity of metallo and serine proteinases in oral clinical isolates of *Candida albicans* in HIV-positive and healthy children from Rio de Janeiro, Brazil. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 38: 173- 180.
60. Dos Santos AL, de Carvalho IM, da Silva BA, Portela MB, et al. Secretion of serine peptidase by clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 46: 209- 220.
61. Arıkan S. Mantarlarda Pleomorfizm. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi (27- 30 Mayıs 2003) Kitabı: 77- 86.
62. Gow NA, Brown AJ, Odds FC. Fungal morphogenesis and host invasion. Curr Opin Microbiol 2002; 5: 366- 371.
63. Soll DR. Phenotypic Switching. In: Calderone RA, ed. *Candida* and candidiasis. First edition. Washington DC, ASM Press, 2002 p. 123- 142.
64. Miller MG, Johnson AD. White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. Cell 2002; 110: 293- 302.
65. Kvaal C, Lachke SA, Srikantha T, Daniels K, et al. Misexpression of the opaque-phase-specific gene *PEP1* (*SAP1*) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. Infect immun 1999; 67: 6652- 6662.
66. Vargas K, Messer SA, Pfaller M, Lockhart SR, et al. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus positive individuals prior to first thrush episode. J Clin Microbiol 2000; 38: 3593- 3607.
67. Colling L, Essmann M, Hollmer C, Larsen B. Surface modifying substances that reduce apparent yeast cell hydrophobicity. Infect Dis Obstet Gynecol 2005; 13(3): 171- 177.

68. Knight SA, Vilaire G, Lesuisse E, Dancis A. Iron Acquisition from Transferrin by *Candida albicans* Depends on the Reductive Pathway. *Infect Immun* 2005; 73: 5482- 5492.
69. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Mycology. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth edition. Philadelphia: PA Lippincott Co, 2006 p. 1151- 1242.
70. Ruhnke M. Skin and Mucous Membrane Infections. In: Calderone RA ed. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2002 p. 307- 326.
71. Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD, Filler SG et al. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 662- 678.
72. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Jpn J Med Mycol* 2007; 48: 1- 12.
73. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P et al. Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991–2000. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 311- 320.
74. Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin N Am* 2006; 20: 485- 506.
75. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1172- 1177.
76. Ellis ME, Al-Abdely H, Sandridge A, Greer W, Ventura W, et al. Fungal endocarditis: evidence in the world literature, 1965- 1995. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 50- 62.
77. Miller DJ, Mejicano GC. Vertebral osteomyelitis due to *Candida* species: case report and literature review. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 523- 530.
78. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 772- 785.

- 79.** Iwen PC. Mycotic Diseases. In: McPherson RA, Pincus MR. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, Twenty-First edition. Philadelphia PA, Saunders Elsevier, 2006 p. 454- 465.
- 80.** Richardson MD, Carlson P. Culture and Non-culture Based Diagnostics for *Candida* species. In: Calderone RA, ed. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press, 2002 p. 387- 394.
- 81.** Brandt ME, Warnock DW. Laboratory aspect of medical mycology . In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD, ed. Clinical Mycology. First edition. Oxford University Press, 2003 p. 3- 22.
- 82.** Merz WG, Roberts GD. Algorithms for Detection and Identification of Fungi. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. Manual of Clinical Microbiology. Eighth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press, 2003 p. 1668- 1685.
- 83.** LaRocco MT. Reagents, Stains, and Media: Mycology. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. Manual of Clinical Microbiology. Eighth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press, 2003 p. 1686- 1692.
- 84.** Hilmioğlu S. *Candida* infeksiyonlarının laboratuvar tanısı: Klasik tanıda izlenecek yol ne olmalı? *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu (21- 22 Haziran 2002) Tutanaklar: 125-131.
- 85.** Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus* and Other Yeasts of Medical Importance. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. Manual of Clinical Microbiology. Ninth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2007 p. 1762- 1788.
- 86.** Kalkancı A, Kuştımur S, Güneş İ, Otlı B. Nötropenik hastalarda invazif *Candida* infeksiyonunun polimeraz zincir reaksiyonu ile tanısı. *İnfeksiyon Dergisi* 2003; 17: 171- 174.

- 87.** Buschelman B, Jones RN, Pfaller MA, Koontz FP, et al. Colony morphology of *Candida* spp. as a guide to species identification. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 35: 89- 91.
- 88.** Richardson MD, Carlson P. Culture and Non-culture based diagnostics for *Candida* species. In: Calderone RA ed. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2002: p. 387- 394.
- 89.** Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Laboratory Methods in Basic Mycology. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Twelfth Edition. Mosby Inc, 2007 p. 629- 716.
- 90.** Larone DH. Yeast and yeast like organisms. Medically Important Fungi A guide to identification. Fourth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press, 2002 p. 109- 143.
- 91.** Wilson DA, Joyce MJ, Hall LS, Reller LB, et al. Multicenter evaluation of a *Candida albicans* Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization Probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2909- 2912.
- 92.** Rigby S, Procop GW, Haase G, Wilson D, et al. Fluorescence In Situ Hybridization with Peptide Nucleic Acid Probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2182- 2186.
- 93.** Baron EJ. Rapid Identification of bacteria and yeast: Summary of a National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed guideline. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 220- 225.
- 94.** Murray MP, Zinchuk R, Larone DH. CHROMagar *Candida* as the sole primary medium for isolation of yeasts and as a source medium for the rapid assimilation of trehalose test. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1210- 1212.
- 95.** Freydiere AM, Robert R, Ploton C, Marot-Leblond A, et al. Rapid identification of *Candida glabrata* with a new commercial test, GLABRATA RTT. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3861- 3863.

- 96.** Freydiere AM, Parant F, Noel-Baron F, Crepy M, et al. Identification of *Candida glabrata* by a 30-Second Trehalase Test. J Clin Microbiol 2002; 40: 3602- 3605.
- 97.** Willinger B, Wein S, Hirschl AM, Rotter ML, et al. Comparison of a new commercial test, GLABRATA RTT, with a dipstick test for rapid identification of *Candida glabrata*. J Clin Microbiol 2005; 43: 499- 501.
- 98.** Ellepola NB, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol 2005; 43: 65-84.
- 99.** Baixench MT, Taillandier A, Paugam A. Clinical and experimental evaluation of a new chromogenic medium (OCCA, Oxoid) for direct identification of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. Mycoses 2006; 49: 311- 315.
- 100.** Yucesoy M, Oztek AO, Marol S. Comparison of three differential media for the presumptive identification of yeasts. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 245- 247.
- 101.** Cooke VM, Miles RJ, Price RG, Midgley G, et al. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. Appl Environ Microbiol 2002; 68: 3622- 3627.
- 102.** Letscher-Bru V, Meyer MH, Galois AC, Waller J, et al. Prospective evaluation of the new chromogenic medium Candida ID, in comparison with Candiselect, for isolation of molds and isolation and presumptive identification of yeast species. J Clin Microbiol 2002; 40: 1508- 1510.
- 103.** Yucesoy M, Oztek AO, Marol S. Performance of CHROMAGAR *Candida* and BIGGY agar for identification of yeast species. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2003; 2: 1- 7.
- 104.** Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. Med Mycol 2001; 39: 9- 33.
- 105.** Hata DJ, Hall L, Fothergill AW, Larone DH, et al. Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. J Clin Microbiol 2007; 45: 1087- 1092.

- 106.** Carrillo-Munoz AJ, Quindos G, Cardenes CD, Alonso-Vargas R, et al. Performance of BactocardTM Candida compared with the germ tube test for the presumptive identification of *Candida albicans*. Mycoses 2003; 46: 467- 470.
- 107.** Chemaly RF, Procop GW, Sarıbaş Z, Arıkan S. Patojen Mantarların Moleküler Yöntemlerle Saptanması ve Tanımlanması. In: Persing DH, Tenover FC, Versolovic J, Tang Y-W, Unger ER, Relman DA, Tekeli A, Ustaçelebi Ş. eds. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar Ankara, Palme Yayıncılık, 2006 p. 551- 559.
- 108.** Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 499- 511.
- 109.** Sullivan DJ, Coleman DC. Molecular Approaches to Identification and Typing of *Candida* Species In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press, 2002: p. 427- 441.
- 110.** Scherer S, Magee PT. Genetics of *Candida albicans*. Microbiol Rev 1990; 54: 226- 241.
- 111.** Chen SC, Halliday CL, Meyer W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. Med Mycol 2002; 40: 333- 357.
- 112.** Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. J Clin Microbiol 2000; 38: 3016- 3021.
- 113.** Jaeger EE, Carroll NM, Choudhury S, Dunlop AA, et al. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using Nested PCR. J Clin Microbiol 2000; 38: 2902- 2908.
- 114.** Yağcı A. Restriction Fragment Length Polymorphism ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bazlı Tanı Yöntemleri. Durmaz R. ed. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Malatya, Nobel Tıp Kitapevi, 2001: p. 149- 160.

- 115.** Borst A, Theelen B, Reinders E, Boekhout T, et al. Use of Amplified Fragment Length Polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., including *C. dubliniensis*. J Clin Microbiol 2003; 41: 1357- 1362.
- 116.** Sachse K. Specificity and Performance of Diagnostic PCR Assays. In: Sachse K, Frey J. ed. PCR Detection of Microbial Pathogens. First Edition. New Jersey, Humana Press Inc, 2003: p. 3- 29.
- 117.** Luo G, Mitchell TG. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 2002; 40: 2860- 2865.
- 118.** Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, et al. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. J Clin Microbiol 2001; 39: 3466 -3471.
- 119.** Loeffelholz M, Deng H. PCR and Its Variations. In: Tang YW, Stratton CW. ed. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. First Edition. New York NY, USA: Springer Science, 2006: p. 166- 183.
- 120.** Bougnoux ME, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, et al. Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by Nested PCR. J Clin Microbiol 1999; 37: 925- 930.
- 121.** Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. J Clin Microbiol 2002; 40: 2483- 2489.
- 122.** Klingspor L, Jalal S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 745- 753.
- 123.** Bretagne S, Costa JM. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 45: 361- 368.

- 124.** Bulut H, Doymaz MZ. Blotlama Teknikleri ve Mikrobiyolojide Kullanımları. Durmaz R. ed. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Malatya, Nobel Tıp Kitapevi; 2001: p. 123- 147.
- 125.** Hayden RT, Qian X, Roberts GD, Lloyd RV. In situ hybridization for the identification of yeastlike organisms in tissue section. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10: 15- 23.
- 126.** McIlhatton BP, Keating C, Curran MD, McMullin MF, et al. Identification of medically important pathogenic fungi by reference strand-mediated conformational analysis (RSCA). *J Med Microbiol* 2002; 51: 468- 478.
- 127.** McGinnis MR, Nunn GB, Sarıbaş Z, Arıkan S. Mantarların dizi analizine dayalı tanımlanması ve sınıflandırılması. In: Persing DH, Tenover FC, Versolovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, Tekeli A, Ustaçelebi Ş. eds. *Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar* Ankara, Palme Yayıncılık; 2006: p. 551- 559.
- 128.** Tekeli A, Akan OA, Koyuncu E, Dolapci I et al. Initial *Candida dubliniensis* isolate in *Candida* spp. positive haemocultures in Turkey between 2001 and 2004. *Mycoses* 2006; 49: 60- 64
- 129.** Trost A, Graf B, Eucker J, Sezer O et al. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/ RFLP. *J Microbiol Meth* 2004; 56: 201- 211.
- 130.** <http://www.doctorfungus.org/imageban/synonyms/Candida.htm>
- 131.** De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*. Second Edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures Utrecht, The Netherlands. American Society for Microbiology Press, 2000 p. 1027-1028.
- 132.** Kullberg BJ, Oude Lashof AM. Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *Eur J Med Res* 2002; 7: 183-191.
- 133.** Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe: results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) study. *JAMA* 1995; 274: 639-644.

- 134.** Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, et al. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa Organisms Study. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1298-1302.
- 135.** Leone M, Albanese J, Antonini F, Michel-Nuguyen A, et al. Long term epidemiological survey of *Candida* species: comparison of isolates found in an intensive care unit and in conventional wards. *J Hosp Infect* 2003; 55: 169-174.
- 136.** Perona JJ. Type II restriction endonucleases. *Methods* 2002; 28: 353-364.
- 137.** Singh N. Changing spectrum of invasive candidiasis and its therapeutic implications. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7 (Suppl. 2): 1-7.
- 138.** Snyderman DR. Shifting patterns in the epidemiology of nosocomial *Candida* infections. *CHEST* 2003; 123: 500-503.
- 139.** Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Saiman SL, et al. National Epidemiology of Mycoses Survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 253-258.
- 140.** Safdar A, Chaturvedi V, Cross EW, Park S, et al: Prospective study of *Candida* species in patients at a comprehensive cancer center. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2129-2133.
- 141.** Baere TD, Claeys G, Swinne D, Massonet C, et al. Identification of cultured isolates of clinically important yeast species using fluorescent fragment length analysis of the amplified internally transcribed rRNA spacer 2 region. *BMC Microbiol* 2002; 2: 21.
- 142.** Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. *Jpn J Med Mycol* 2006; 47(3): 225- 229.

- 143.** Reiss, E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, et al. 1998. Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Med Mycol* 1998; 36 (Suppl. 1): 249- 257.
- 144.** Walsh TJ, Chanock SJ. Diagnosis of invasive fungal infections: advances in nonculture systems. *Curr Clin Top Infect Dis* 1998; 18: 101- 153.
- 145.** Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ, Morrison CJ. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 2001; 9: 3505- 3511.
- 146.** Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, et al. Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3466- 3471.
- 147.** Maaroufi Y, Ahariz N, Husson M, Crokaert F. Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3159- 3163.
- 148.** Luo G, Samaranayake LP, Cheung BP, Tang G. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP expression in *Candida glabrata* and its possible role in vitro haemolysin production. *APMIS* 2004; 112: 283- 290.
- 149.** Dendis M, Horváth R, Michálek J, Růžička F, et al. PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 1191- 1202.
- 150.** Löffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, et al. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3311- 3312.
- 151.** Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5122- 5128.

- 152.** Lugert R, Schettler C, Gross U. Comparison of different protocols for DNA preparation and PCR for the detection of fungal pathogens in vitro. *Mycoses* 2006; 49: 298- 304.
- 153.** Goodsell DS. The molecular perspective: Restriction Endonucleases. *Stem Cells* 2002; 20: 190- 191.
- 154.** Kovall RA, Matthews BW. Type II restriction endonucleases: structural, functional and evolutionary relationships. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3: 578- 583.
- 155.** Pingoud A, Fuxreiter M, Pingoud V, Wende W. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol. Life Sci* 2005; 62: 685-707.
- 156.** Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D. REBASE- restriction enzymes and DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 230- 232.
- 157.** Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, et al. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 1805- 1812.
- 158.** Fanci R, Pecile P. Central venous catheter-related infection due to *Candida membranaefaciens*, a new opportunistic azole-resistant yeast in a cancer patient: a case report and a review of literature. *Mycoses* 2005; 48: 357- 359.
- 159.** Williams DW, Wilson MJ, Lewis MA, Potts AJ. Identification of *Candida* species by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of Intergenic Spacer Regions of ribosomal DNA. *J.Clin. Microbiol.* 1995; 33: 2476- 2479.
- 160.** Irobi J, Schoofs A, Goossens H. Genetic identification of *Candida* species in HIV positive patients using the Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of its DNA. *Mol. And Cell. Probes* 1999; 14: 401- 406.
- 161.** Graf B, Trost A, Eucker J, Göbel UB, et al. Rapid and simple differentiation of *C. dubliniensis* from *C. albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48: 149- 151.

162. Mirhendi H, Makimura K, Zomorodian K, Maeda N, et al. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using a single-enzyme PCR-RFLP method. Jpn J Infect Dis 2005; 58: 235- 237.