

157979

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

ENFEKSİYON ETKENİ OLARAK İZOLE EDİLEN *CANDIDA ALBICANS* SUŞLARI
İLE KOLONİZE SUŞLAR ARASINDAKİ GENOTİPİK FARKLILIKLARIN
PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS VE ARBITRARILY PRIMED PCR
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Barış Otlu

Tez Yöneticisi

Prof. Dr. Semra Kuştimur

ANKARA

2004

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ	5
GENEL BİLGİLER	8
Taksonomi.....	8
Morfoloji ve Üreme Özellikleri.....	8
Antijenik Yapı.....	10
Virulans Faktörleri.....	10
Patogenez.....	11
Kandidozda Savuma Hücrelerinin Rolü.....	12
Polimorf nükleuslu lökositler.....	12
Monosit ve makrofajlar.....	13
Hücre aracılı immünite.....	14
Patoloji.....	14
Hastane Enfeksiyonları ve <i>Candida albicans</i>	14
Laboratuvar Tanısı.....	16
Mikroskopik inceleme.....	16
Kültür.....	17
Serolojik testler.....	17
Moleküler yöntemler.....	18
Tiplendirme Yöntemleri.....	20
Fenotipik yöntemler.....	21
Serotiplendirme.....	21
Koloni morfolojisi ile tiplendirme.....	22
Rezistotiplendirme.....	22
Biyotiplendirme.....	23
Öldürücü maya tiplendirilmesi.....	23
Protein yapılarına göre tiplendirme.....	24
Genotipik yöntemler.....	24
Pulsed-field jel elektroforez sistemi.....	24
PFGE-Elektroforetik karyotip analizi.....	25

PFGE-Restriksiyon enzim analizi.....	25
Nükleik asit çoğaltma yöntemlerine dayalı tiplendirme.....	26
“Restriction Fragment Length Polymorphism” (PCR-RFLP).....	26
“Arbitrarily Primed PCR” (AP-PCR).....	27
<i>Candida albicans</i> Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi.....	27
Antifungaller ve etki mekanizmaları	29
Antifungallere direnç mekanizmaları.....	31
MATERYAL METOD	33
Hastalar ve <i>Candida albicans</i> izolatları.....	33
Epidemiyolojik İlişki ve Risk Faktörlerine Ait Bilgilerin Toplanması....	33
Kültür ve Suşların İdentifikasyonu.....	33
Moleküler Tiplendirme.....	36
AP-PCR.....	36
PFGE-Karyotiplendirme.....	39
Yöntemlerin ayırım gücü (Diskriminasyon).....	41
BULGULAR	43
TARTIŞMA ve SONUÇ	70
KAYNAKLAR	85
ÖZET	98
İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)	100
ÖZGEÇMİŞ	102

SİMGELER VE KISALTMALAR

NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
PCR	: Polymerase Chain Reaction (polimera zincirleme reaksiyonu)
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
AP-PCR	: Arbitrarily Primed PCR
PNL	: Polimorf Nükleuslu Lökositler
MPO	: Miyeloperoksidaz
MN	: Mononükleer Hücreler
OAS	: Ovatrol aluminium stain
NNIS	: National Nosocomial Infections Surveillance
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
EIA	: Enzim Immunoassay
REA	: Restriksiyon Endonükleaz Analizi
Mb	: Megabaz
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
EK	: Elektroforetik Karyotiplendirme
µl	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
°C	: Santigrat derece
Bp	: Base Pair (baz çifti)

GİRİŞ

Son yıllarda önem kazanan enfeksiyon etkenleri arasında mantarlar ön sırada yer almaktadır. Bağışıklık sistemi baskılanmış konakta hastane enfeksiyonu etkeni olarak bakterilerden sonra dördüncü sıklıkta *Candida* türleri gelmektedir. *Candida* enfeksiyonları bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde, çok kısa sürede hayatı tehdit eden klinik tablolar oluşturabildikleri için etken patojen mikroorganizma en kısa sürede tanımlanmalı ve tedaviye başlanmalıdır ¹.

Candida türleri arasında bulaş, oluşturdıkları klinik tablo, antifungal ilaçlara cevap, morbidite ve mortalite gibi pek çok konuda farklılıklar bulunmaktadır. Türler arasındaki farkların yanında, aynı türe ait olan fakat farklı genotipik özellikleri bulunan suşlar da tanımlanmaktadır ². Bu nedenle tür tanımının yanında genotip ve serotip tayininin de yapılması önerilmektedir ³.

Candida enfeksiyonlarının tedavi edilmesinde kullanılabilecek sınırlı sayıda antifungal ilaç bulunmaktadır. Bu ilaçlardan özellikle azol grubuna ait flukonazol yan etkilerinin az olması nedeniyle tercih edilmektedir. Son yıllarda mantar enfeksiyonlarında ki artışa paralel olarak antifungal ilaçların kullanımında da bir artış görülmektedir. Antifungal ilaçların özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış konaklarda ampirik olarak kullanımı, ilaca direnç gelişmesinde en önemli faktördür. Bu nedenle antifungal duyarlılık testlerinin yapılması zorunluluk haline gelmiştir. Tedaviye cevapsız olgularda, tekrarlayan mantar enfeksiyonlarında bu testler bazı merkezler tarafından uygulanmaya başlanmıştır ⁴. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) tarafından önerilen antifungal duyarlılık yönteminin uzun zaman aldığı, uygulama zorlukları

olduğu ve merkezler arasında önemli standardizasyon farklılıkları görüldüğü bildirilmektedir ⁵. Klinik örneğin izole edilmesinden sonra, en sık kullanılan antifungal ilaçlara duyarlılık sonuçlarının verilmesi tedavinin en erken ve en doğru şekilde başlamasında önemli olmaktadır.

Candida türlerinin genotiplendirilmelerinde referans yöntem olarak “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE) yöntemi önerilmektedir. Bu yöntem; restriksiyon enzimleri ile DNA’nın parçalanması veya parçalanmadan elektroforez yapılması şeklinde uygulanmaktadır ^{6,7}. PFGE yönteminin *Candida* türlerinin genotiplendirilmesinde “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) den üstün olduğu bildirilmektedir ^{8,9}.

Candida türlerinin genotiplendirilmesi, enfeksiyon etkeni olan suşlar ile kolonizasyon etkeni suşlar arasındaki genotipik ilişkinin araştırılması ve mortalitesi çok yüksek olan kandidemi gelişiminde kolonizasyonun önemini ortaya koymaktadır.

Bu tezin amacı; çeşitli kliniklerde takip edilen hastalardan izole edilen *Candida albicans* suşlarının PFGE ve “arbitrarily primed polymerase chain reaction” (AP-PCR) yöntemi ile genotiplendirilmesi, enfeksiyon oluşturmada hasta ve sağlıklı kişilerde kolonize olarak bulunan *Candida*’ların genotipik özellikleri ile karşılaştırılması yapılacaktır. Böylece hastadan hastaya, sağlık personelinin hastaya *Candida* türlerinin geçişi gösterilmiş olacaktır. Ayrıca

günümüzde antifungal ilaç olarak en çok kullanılan flukonazole dirençli olan suşlar arasındaki klonal ilişki araştırılacaktır.



GENEL BİLGİLER

Taksonomi

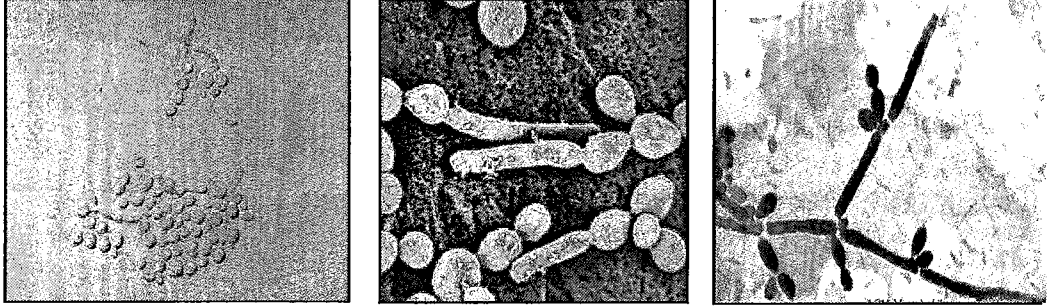
Candida'lar *Deuteromycota* şubesinin *Blastomycetes* sınıfının *Cryptococcales* takımındaki *Cryptococcaceae* ailesi içinde sınıflandırılan, blastosporlarla çoğalan, yalancı hif yapan, nadiren gerçek hif yapan ve eşeyli şekilleri *Hemiascomycetes* sınıfında bulunan bir grup anamorf mayadır ^{10, 11}.

Candida'ların bugün için 200 kadar türü bulunmaktadır. Bunların yaklaşık %20'si insanlarda enfeksiyon oluşturabilmektedir. Bu cins içerisinde *C. albicans* (Robin Berkhout 1923) enfeksiyonlardan en sık izole edilen türdür. İnsanlarda hastalık oluşturabilen diğer önemli türler ise; *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei* ve *C. glabrata*dır. Ancak bunların dışında *C. lusitaniae*, *C. zeylanoides*, *C. norvagensis*, *C. fomat*a, *C. utilis* gibi türlerde sık olmamakla birlikte enfeksiyonlardan izole edilebilmektedir ¹⁰⁻¹³. Bugünkü yaklaşım; artan ilaç kullanımı, cerrahi girişimler, organ nakilleri, malignite, ciddi yanıklar ve AIDS gibi bireyin bağışıklık sistemini baskılayan çeşitli sebeplerle diğer *Candida* türlerinin de patojen olabileceği yönündedir ¹⁴.

Morfoloji ve Üreme Özellikleri

Candida'lar klinik örneklerde ve kültürlerde 3-6µm boyutlarında, küre şeklinde, ovalimsi veya silindirik olabilen, tomurcuklanan hücreler (blastokonidyum veya blastosporlar) olarak görülürler. Tomurcuklanarak meydana gelen yavru hücre ana hücrenin aynısıdır. Ana hücreden ayrılmayı

başaramayan yavru hücreler yalancı hif şeklinde zincirler oluştururlar. Seyrek olarak *C. albicans*'da gerçek hif oluşumu da görülmektedir¹⁻³.



Şekil 1. *C. albicans*'da çimlenme borusu ve hif görünümü.

Sabouraud-dekstroza-agar (SDA) besiyerinde oda ısısında ve 37 °C'de üreyip genellikle hamur kıvamında, kirli beyaz veya krem renginde ve tipik olarak maya kokulu koloniler oluşturur. Koloninin besiyeri üzerinde kalan bölümü blastokonidyumlar tarafından oluşturulurken, yüzeyin altında kalan kısımlar da ise yalancı hifler bulunur^{11, 13}.

Candida hücreleri mısır unlu jeloz gibi besince fakir ortamlarda yedek besin depolayan klamidosporeler oluşturur. Hiflerin içinde, kenarında veya uçlarında gelişebilen, büyük (8-12µm), yuvarlak ve kalın duvarlı bu oluşumlar, açlığa ve diğer değişik şartlara karşı hücreyi korur. Mısır unlu jelozda *C. albicans*'ın 4 değişik morfoloji oluşturarak ürettiği görülür. Bunlar; 1) yalancı misel, 2) blastosporeler, 3) klamidosporeler, 4) seyrek olarak gerçek hiflerdir^{11, 13}.

Klamidosporeler *C. albicans*'ın en belirgin özelliğidir. *C. tropicalis*'in bazı kökenleri ve *C. dubliniensis* de klamidospore yaparlar. Ancak bunlar *C. albicans*'a ait klamidosporelerden morfolojik olarak farklıdır ve *C. tropicalis* sonraki pasajlarında klamidosporelerini kaybeder. Buna karşılık klamidospore oluşumu *C. albicans*'da sabit bir özelliktir¹¹.

C. albicans'ı diğer *Candida*'lardan ayırdetmek için kullanılan bir diğer test de çimlenme borusu (germ tüp) testidir. *C. albicans*'ın maya hücreleri 37°C'de 2 saatte fasulye filizini andıran çimlenme borusu oluştururlar. *C. albicans* kökenlerinde pozitif olan bu deneyin diğer sık rastlanan hiçbir *Candida* türünde bu koşullarda görülmemesi tanısal açıdan son derecede önemlidir ^{10, 11, 13, 15}.

Antijenik Yapı

Mantarlarda hücre duvarı kuru ağırlığının %80-90'ı karbonhidratlardan, %10-20'si protein ve glikoproteinden oluşur. Karbonhidratlar mannan, glukan, galaktan, kitin ve kitozan polimerlerinden meydana gelir. *C. albicans*'da polisakkarit içeriğinin %40'ı potent immunojen olan mannandır. Mannan yapısal farklılığına göre A ve B olmak üzere iki serotipe ayrılır. *C. albicans*'da mannan dışında salgısal proteazlar, enolaz ve ısı şok proteinleri gibi başka antijenlerde saptanmıştır. Doğumdan itibaren *Candida* ile temastan dolayı çoğunlukla serumda mantara karşı hem özgül antikorlar hem de hücre sel bağışıklık vardır ¹³.

Sistemik kandidozda çeşitli *Candida* antijenlerine karşı oluşan antikor düzeylerinde artış saptanmıştır. Ayrıca bu hastalarda hücre duvarı mannani, lateks aglütinasyon veya enzim immunoassay ile gösterilebilmiştir ^{12, 13}.

Virulans Faktörleri

Farklı *Candida* türlerinin konağı hastalandırma dereceleri farklıdır. Diğer yandan deneyler *C. albicans* kökenleri arasında da konağı hastalandırabilme

derecesinde farklılıkların olabileceği yani virülans farklılıklarının varlığını ortaya koymuştur ¹⁴. Hücre duvarı, adezyon ve hücre dışı proteolitik enzim üretimi en önemli üç virulans faktörüdür. Özellikle konakçı epitel ve endotel hücrelerine adezyon, çimlenme borusu oluşturma ve proteinaz enziminin üretimi önemli virulans faktörleri olarak bildirilmiştir. Ayrıca fosfolipaz enzimi, toksinler, fenotip değişimi, hücre duvarı ve yüzey değişimi ile hidrofobisite gibi faktörler de virulans ve patogeneizde önemli rol oynamaktadır^{10,16}.

Patogenez

Candida türleri normal florada bulunduğundan, gelişen enfeksiyon çoğu kez endojen kaynaklıdır. Genellikle enfeksiyondan önce kolonize olan mantar sayısı artış gösterir ve kolonizasyonu enfeksiyon izler ¹³.

Candidalar yüzeysel ve derin enfeksiyonlar olmak üzere başlıca iki grup enfeksiyona neden olurlar. Yüzeysel kandidozlar deri ve mukozaların, derin kandidozlar ise iç organ ve sistemlerin enfeksiyonlarıdır ^{13, 15}.

Enfeksiyonun ilk aşamasını *Candida*'ların mukoza epiteli ve endotel hücrelerine yapışması oluşturur. *C. albicans*'ı bu cins içerisinde en sık karşılaşılan tür olarak öne çıkaran özelliklerin başında mukoza yüzeylerine yapışma yeteneğinin fazla olması gelmektedir¹⁴. Yüzeysel kandidozlarda *Candida* deri veya mukozadaki bir çatlaktan yalancı hifleri ile doku içersine girer. Yalancı hifler ve bunlardan tomurcuklanan blastokonidyumlarla enzimleri sayesinde epitel hücrelere girerek doku içine invazyonunu gerçekleştirir ¹⁷.

Derin veya sistemik enfeksiyonlarda önce gastro-intestinal sistemde bir kolonizasyon vardır. Buradaki mukozayı geçen *Candida*'lar kan

yoluyla özellikle bağışıklık sistemi yetersiz hastalarda hemen hemen her organ ve sisteme yerleşebilirler. Kandidozun gelişmesinde predispozan faktörler tablo 1’de gösterilmiştir¹³.

Tablo 1. Yüzeysel ve derin kandidozlarda predispozan faktörler ¹³.

• Derinin maserasyonu
• Diabetes mellitus
• Hücresel immün yetmezlikler
• Geniş etki alanlı antibiyotikler
• Kortikosteroidler ve başka immunsupresif ilaçlar
• Nötropeni(malignite veya malignitenin tedavisi nedeniyle)
• Bazı ameliyatlar (organ transplantasyonları, kalp veya gastrointestinal kanal ameliyatları)
• Ciddi yanıklar
• Damar kateterleri
• AIDS
• Kronik yatağa bağlayıcı hastalıklar
• Damardan narkotik kullanımı

Kandidozda Savunma Hücrelerinin Rolü

Polimorf nükleuslu lökositler (PNL):

C. albicans’ın neden olduğu sistemik enfeksiyonlara karşı konak savunmasında çok önemli bir role sahiptirler. PNL’lerin fungusidal mekanizmaları oksidatif ve non-oksidatif olmak üzere iki tiptedir. Oksidatif mekanizma nötrofilin bazı potent oksidanları sentez etmesiyle başlar. Bu oksidanlar arasında hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri, hipoklorik asitler ve kloraminler sayılabilir. PNL’den hipoklorik asit ve kloramin sentezi yine kendi sentez ettiği miyeloperoksidaz (MPO) enzimi sayesinde olur. Miyeloperoksidaz, klorid iyonunun hidrojen peroksit tarafından oksidasyonunu kataliz eder ve

böylece söz konusu ürünler ortaya çıkar. Özellikle, MPO ve hidrojen peroksit gibi fungusidal moleküller, PNL'in *C. albicans*'ı öldürmesi için gereklidir. Buna karşı diğer *Candida* türleri non-oksidatif mekanizmalarla yok edilebilmektedir. Non-oksidatif mekanizmada, antifungal aktiviteye sahip bazı protein ve peptidler rol oynar. PNL'in azürofil granüllerinde bulunan antimikrobiklerin *Candida* türlerine karşı aktivite gösterebildikleri ve bazılarının *C. albicans*'ı doğrudan öldürebildikleri, yine aynı granüllerde bulunan katepsin G'nin de antifungal aktivitesinin bulunduğu kaydedilmiştir ¹⁷.

PNL'in kandisidal etkilerine karşı *C. albicans*'ın PNL'in işlevini bozma ya da değiştirme yeteneği bulunmaktadır. *C. albicans*'ın sentez ettiği bir takım ürünler PNL'in azürofil granül içeriklerinin salınmasını inhibe edebilmektedir. Altta yatan bazı hastalıklar ve bunların tedavileri sırasında, PNL'in fonksiyonları bozulmaktadır. Akut lösemililerde, geniş yanıklı hastalarda, solid tümör ya da lenfoma nedeniyle kemoterapi veya radyoterapi gören hastalarda PNL'in azalmış kandisidal aktivite gösterdikleri saptanmıştır ¹⁷.

Monosit ve makrofajlar:

C. albicans'a karşı dirençte PNL'in önemli bir rol oynadığı anlaşılmaktadır. Monosit ve makrofajlar yani mononükleer hücreler (MN) ile ilgili çalışmalar ise, monositlerin oksidatif mekanizmalarla *Candida*'ya karşı savunma işlevini yerine getirdiğini göstermektedir. *C. albicans*'ın pulmoner dokudan eliminasyonunda PNL'ler kadar makrofajların da önemli olduğu saptanmıştır ¹⁷.

Hücre aracılıklı immünite:

Lenfositlerin *Candida* enfeksiyonlarındaki rolü tam anlaşılmış değildir. Aktive lenfositlerden salınan lenfokin benzeri maddelerin *C. albicans* üzerinde toksik etkisi bulunduğu öne sürülmüştür. *Candida* Antijenlerine karşı T-lenfosit yanıtının başlamasında ve makrofajlar ile lenfositlerin aktivasyonunda lenfosit-makrofaj etkileşimi önemlidir. Kronik mukokutanöz kandidozlu hastalarda hücre aracılıklı immünite bozukluklarının bulunuşu, hücre aracılıklı immünitenin *Candida* enfeksiyonlarına karşı dirençte önemli olduğu düşündürmektedir^{13,17}.

Patoloji

Yapılan çalışmalar *C. albicans*'ın hem maya hem de hif formunun doku invazyonunu gerçekleştirebildiğini göstermiştir. Işık mikroskopunda, hemotoksilen-eozin boyalı preparatlarda maya hücreleri ve hifler soluk mavi veya leylak renginde izlenir. Maya hücreleri 3-5 µm çapında, yalancı hifler ise 3-5 µm genişliğindedir. "Owatrol aluminium stain" (OAS) tekniği ile *Candida* türleri parlak kırmızı-mor renkte boyanırlar¹⁷.

Hastane enfeksiyonları ve *Candida albicans*

Hastane enfeksiyonu hastaneye yatış sırasında var olmayan veya kuluçka süresi içinde bulunmayan, ancak hastanede kalma sürecinde başlayan enfeksiyon olarak tanımlanmaktadır. Fırsatçı patojen mantarlarla oluşan hastane enfeksiyonlarının görülme sıklığı giderek artmaktadır¹⁸.

Son 20 yılda nozokomiyal mantar enfeksiyonlarında 2-12 kat artış görülmüştür ¹⁹. "National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS)" verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 115 hastanenin dahil edildiği bir çalışmada; 1980'lerde % 0.2 olan mikoz görülme sıklığı 1990'larda % 0.38'e yükselmiştir ²⁰. Mantarlar tüm hastane enfeksiyonlarının %5'inden sorumludurlar ve *Candida* türleri nozokomiyal mantar enfeksiyonlarının % 80'ine neden olmaktadır. Yapılan çalışmalara göre invaziv kandidoz morbidite ve mortalitenin başlıca nedenidir. Kandidemi hastanede kalış süresini ortalama 30 gün uzatmakta ve ölüm oranı % 40-60 arasında görülmektedir ²¹⁻²⁴.

Bu artışın en önemli sebebi; hastanede yatan hasta popülasyonundaki değişikliklerdir. Kansere ve bağışık yetmezlikli hastaların seyrindeki düzelmeler, organ nakillerinin daha fazla yapılması, yoğun bakım ünitelerinin gelişerek destek tedavisindeki hastaların artması bu hastaların yaşam süresini uzatmış ancak bu hastalarda mikoz görülme sıklığını da artırmıştır. Özellikle kemoterapiyi takiben ciddi ve uzun süreli nötropeni gelişmesi sistemik mantar enfeksiyonları için başlıca risk faktörü olmaktadır ^{18,25}.

Nozokomiyal kandidoz etkeni olarak en sık görülen tür *C.albicans*'dir. ABD'de yapılan bir çalışmaya göre 1980-1990 yılları arasındaki 24222 *Candida* enfeksiyonunun % 76'sı *C. albicans* ile oluşmuştur. 1992 yılındaki verilere göre Hollanda'da bütün kandidozların % 73'ü *C. albicans* kaynaklıdır ¹⁸. Slovakya'da Ulusal Kanser Enstitüsünde 8 yıllık bir sürede 51 *C. albicans*, 32 non-albicans *Candida* fungemisi görülmüştür. Benzer oranlar Güney Amerika, Kanada, Norveç gibi ülkelerden de bildirilmiştir ^{18,22}.

Mantarların neden olduğu hastane enfeksiyonlarının etkenleri yönünden ülkemiz, ABD ve Avrupa ülkelerine benzerlik göstermektedir. Yoğun bakım enfeksiyonları içinde mantarların bulunma sıklığı ülkemizde %6-19 arasında değişen oranlardadır²⁶. Çeşitli merkezlerin verilerine göre *Candida*'ların hastane enfeksiyonları içindeki oranı % 0.4-18 arasında değişmektedir. *C. albicans*'ın ilk sırayı aldığı sonuçlar bildirimler olduğu gibi, non-albicans *Candida*'ların öne geçtiği sonuçlarda vardır²².

Laboratuvar Tanısı

Candida'lar üst solunum yolu ve gastro-intestinal sistemin normal flora elemanları olduklarından dolayı laboratuvarında izole edildiklerinde etken patojen açısından değerlendirilmeleri zordur. Boğaz sürüntüsü, balgam, trakea ve bronş salgıları, gastrik sıvı, dışkı örnekleri gibi normal florallı bölgelerden izolasyonu hastanın klinik durumu ile birlikte değerlendirilmelidir. Normalde steril olan kan, beyin omurilik sıvısı , eklem, plevra ve perikard sıvılarından izole edilmeleri enfeksiyonu gösterir^{12, 15}.

Mikroskopik inceleme:

Boyasız ıslak preparatlarda, hiflerin ve tomurcuklanan maya hücrelerinin görülmesiyle çok çabuk sonuç alınabilmektedir. Florasan mikroskopunda Kalkoflor beyazı (Calcoflour White) boyası ile inceleme boyasız preparatlardan daha iyi sonuç vermektedir. Gram boyası ile boyanan sitoloji preparatları, Giemsa veya Wright boyası ile boyanan fungemili hastaların kan

yayma preparatları, Gomorinin metanamin gümüş boyası ile boyanan histoloji preparatları duyarlı direk inceleme yöntemleridir¹². Preparatlarda yalancı hiflerin görülmesi *Candida*'nın dokuya girdiğinin, başka bir deyişle, enfeksiyonun işareti olarak kabul edilir¹³

Kültür:

Tüm örnekler antibiyotikli SDA besiyerine ekilerek oda ısısında (22-26 °C) ve 37 °C inkübe edilirler. *Candida* türleri genellikle 24 saat içerisinde koloni oluştururlar ancak 48 saatte kolonileri daha belirgindir. Tween 80 besiyerine ekim yapıldığında yalancı veya gerçek hif yapıp yapmadığı, blastokonidyumların büyüklüğü, şekli ve dizilimleri ayrıca klamidospore oluşturup oluşturamadıkları saptanabilir¹³.

Candida normal koşullarda ağız ve gastro-intestinal sistemin normal florasında yer aldığı için balgam ve gaita örneklerinden izolasyonu enfeksiyon tanısı için yeterli değildir. Bu nedenle *Candida*'nın bulunduğu florayı içeren örneklerden yapılan kültürler dikkatle yorumlanmalıdır¹³.

Serolojik testler:

Derin kandidoz kuşkusunda *Candida* antikor ve antijenlerini aramaya yönelik serolojik testler kullanılmaktadır. Ancak bu testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü düşüktür¹³.

Candida'lar normal florada bulunduklarından, sağlıklı kişilerde de antikor cevabı gelişmesine neden olmakta bu ise özgül antikorların serolojik

testler ile saptanmasının değerini azaltmaktadır. Kolonizasyon veya yüzeysel enfeksiyona bağlı olarak oluşmuş antikorlar derin kandidozda oluşmuş antikorlardan ayırt edilemezler. Ayrıca bağışık dnl hastalarda antikor yanıtı zayıf olabileceğinden hatalı negatifliklere yol açabilir ^{12,13}. Antikor ölçen testlerden özgüllük ve duyarlılığı en yüksek olan testler, immunoblot ve enzim immünoassay (EIA) yöntemlerine dayalı testlerdir. Yapılan bir çalışmada EIA yöntemiyle *Candida* antikorları %94 özgüllük ve %53 duyarlılık ile saptanmıştır. ^{12,27}

Antikorların saptandığı serolojik tanının bu dezavantajlarından dolayı, konak bağışıklık durumunun etkilemediği, antijen aramaya yönelik testler daha önemli duruma gelmiştir. Özellikle bağışık dnl hastalarda antijen saptayan testler daha fazla önem kazanmıştır. *C. albicans*'ın 47 ve 48 kDa protein antijenlerini ölçen testlerdeki gelişmeler umut vericidir. Bunun yanı sıra mannan antijeni EIA ile %65-70 duyarlılıkta ve %100 özgüllükte saptanabilmektedir ¹².

Moleküler yöntemler:

Mantarların izolasyon ve tür tanısında uzun sreye gereksinim olması, tanıyı abuklaştıracak moleküler yöntemleri gündeme getirmiştir.

Klinik rneklerden *Candida* izolasyonu ve *Candida* enfeksiyonlarının erken tanısı için PCR yöntemi kullanılmaktadır. Geleneksel kültür yöntemlerinde fungal yükün çok az olduğu balgam, BOS ve kan gibi örneklerden dissemine fungal enfeksiyon tanısında PCR testi kültür yöntemlerinden daha duyarlı bulunmuştur ¹². Yeni geliştirilen kültüre dayalı liziz-

santrifügasyon yöntemi ile yapılan karşılaştırılmalı çalışmalarda, bu yöntemin duyarlılığı %25-73 arasında bulunmuştur²⁸. Yapılan çalışmalarda, 1 ml kanın 100 µl'sinde ± 10 *Candida* hücrelerini saptanabildiği rapor rapor edilmiştir^{29,30}. PCR temelli tanının geleneksel kan kültür yönteminden daha duyarlı olduğu ve nötropenik hastalarda yapılan bir çalışmada ise %97.5 gibi yüksek negatif prediktif değere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle fungal yükün çok az olması sebebiyle kültür ve serolojik tanının yetersiz olduğu durumlarda PCR yönteminin çok etkin olduğu görülmektedir.³¹ Buna göre PCR testi optimal tanı yaklaşımı olabilir; çünkü 1) halen geçerli olan kültüre dayalı yöntemlerden daha duyarlıdır, 2) bir çok mantar türüne uygulanabilir, 3) çeşitli örneklerde çalışılabilir¹².

Moleküler yöntemler sadece klinik örnekten mantarı tanımlamak için değil ayrıca tür tayini, ilaç direnci ve epidemiyolojik tiplendirme amacıyla da kullanılmaktadır.

Mantarların epidemiyolojik tiplendirilmeleri için, genomik DNA'nın restriksiyon endonükleaz (RE) ile kesimini takiben PFGE, DNA'nın direk PFGE ile incelenmesi (elektroforetik karyotiplendirme), Southern hibridizasyon analizi, AP-PCR gibi DNA bazlı ve immunoblot finger printing, hücresel proteinlerin poliakrilamid jel elektoroforezi, multilokus enzim elektoroforezi gibi protein bazlı yöntemler kullanılmaktadır.

Tiplendirme yöntemleri

Mantar enfeksiyonlarının klinik önemi bilinmesine rağmen mantar ile kolonizasyon ve enfeksiyonun patogenezi, geçiş şekli ve epidemiyolojisi konusunda bilinenler sınırlıdır. Normal flora üyesi olan *C. albicans* gibi mikroorganizmaların tür düzeyinde tanımlanması, etken organizmanın bulaş kaynağının izlenmesinde, kolonizasyon ve enfeksiyon ayrımının yapılmasında yetersiz kalır. Bu tür organizmalar için tür düzeyinin de altında tiplendirmeye gereksinim vardır ³².

Epidemiyolojik çalışmaların yapılış amaçları Tablo 2 ve ideal bir epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinin özellikleri Tablo 3’de özetlenmiştir

Tablo 2 . Epidemiyolojik tiplendirme yöntemlerinin başlıca amaçları ^{32,33}

-
- 1- Salgının kaynağının belirlenmesi
 - 2- Geçiş yollarını ve alınacak önlemlerin belirlenmesi
 - 3- Re-aktivasyonun yeni bulaştan ayırt edilmesi
 - 4- Hastane enfeksiyonları ve toplumsal kaynaklı enfeksiyonların belirlenmesi
 - 5- Epidemiyolojik sürveyans ve kontrol yöntemlerinin değerlendirilmesi

Tablo 3. İdeal epidemiyolojik tiplendirme yönteminin özellikleri ³².

-
- 1- Standardize olmalı
 - 2- Doğru ve tekrarlanabilir olmalı
 - 3- Stabil olmalı
 - 4- Benzer ancak identik olmayan mikroorganizmaların ayrımında yeterli duyarlılığa sahip olmalı
 - 5- Uygulanabilir ve ucuz olmalı
 - 6- Epidemiyolojik çalışmalarda kanıtlanmış değeri olmalı
-

C. albicans için bu özelliklerin tamamını karşılayan ideal bir tiplendirme yöntemi henüz yoktur. Her yöntemin avantajları ve dezavantajları vardır³².

Candida'ları tiplendirmede kullanılan fenotipik yöntemler; serotiplendirme, morfolojik tiplendirme, rezistotiplendirme, biyotiplendirme, öldürücü maya tiplendirilmesi, hücrel proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi ile analizi, immunoblot finger printing, multilokus enzim elektroforezi'dir. Genotipik yöntemler ise; genomik DNA'nın restriksiyon endonükleaz ile analizi, southern hibridizasyon analizi, pulsed-field jel elektroforez (elektroforetik karyotiplendirme), nükleik asit çoğaltma yöntemleri, baz dizi analizi'dir³².

Fenotipik yöntemler:

Serotiplendirme:

C. albicans suşlarının tiplendirilmesinde, serotiplendirme yönteminin ilk kez 1931 yılında uygulandığı bilinmektedir. *C. albicans* ile diğer *Candida* türleri arasında çapraz reaksiyonların görülmesi bu yöntemin dezavantajıdır. *C. albicans* suşları serotiplendirme ile önce A ve B serotipinde ayrılmış daha sonra sık görülmeyen C serotipi bunlara eklenmiştir³⁴. Yapılan çalışmalarda A serotipinin flusitozine duyarlı, B serotipinin ise dirençli olduğu görülmüştür. Serotiplendirme yöntemi ayrılabilirlik indeksinin düşük olması nedeniyle *C. albicans* suşlarını tiplendirmede iyi bir yöntem olarak görülmemiştir

Koloni morfolojisi ile tiplendirme:

C. albicans'ın farklı koloni morfolojileri gösterebileceği ilk kez 1935 yılında tanımlanmıştır. *C. albicans*'ın morfolojik olarak tiplendirilmelerinde farklı metodlar kullanılmıştır. İlk çalışmalarda malt ekstrakt agara *C. albicans* suşları çizgi şeklinde ekilmiş ve 15 ayrı morfolojik tip tanımlanmıştır. Daha sonraları bu yöntem geliştirilerek bir kodlama sistemi getirilmiş, çizgi ekimde koloniler kenar ve çizgi yüzeyi olarak başlıca iki açıdan değerlendirilmiştir. Koloni kenarları dağılım, genişlik ve yapı yönünden, koloni yüzeyi ise; topografi, kalite, derinlik-gevşeklik özelliklerine göre değerlendirilmiştir. Bu yöntemin uygulandığı bir çalışmada 446 suş 50 farklı morfolojik tipe ayrılmış ve ayrılabilirlik indeksinin oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Yine aynı kaynak da yapılan diğer bazı çalışmalarda da yüzey görünümü, rengi ve kenar durumlarına göre tiplendirme yapılabileceği belirtilmiştir ³². *C. albicans*'ın morfolojileri genellikle sabit kaldığından, ucuz, basit, özel alet ve ekipman gerektirmeyen ve yönteme göre değişmekle birlikte 100'den fazla morfotip ayırımına izin veren, bu tiplendirme yöntemi epidemiyolojik çalışmalar için önerilmektedir ³⁵.

Rezistotiplendirme:

C. albicans'ın rezistotiplendirme ile tiplendirilmesi ilk kez 1979 yılında uygulanmıştır. Yöntemin esası çeşitli inhibitör maddelerin farklı konsantrasyonlarında hazırlanan katı besiyerlerinde, *C. albicans*'ın üremesinin inhibisyonuna göre suş ayırımının yapılmasına dayanır. İnhibitör madde olarak

malaşit yeşili, borik asit, sodyum arsenat, bakır sülfat, akrilamid, 4-klororesekinol, sodyum selenit, gümüş nitrat, klorheksimit, 5-florositozin, tuz gibi kimyasallar farklı konsantrasyonları da kullanılmıştır. Bu yöntemin ayırım gücü farklı çalışmalara göre değişmektedir³⁶⁻³⁸.

Biyotiplendirme:

Hücre dışı enzim veya karbon kaynaklarının asimilasyonunu esas alan bir yöntemdir^{39,40}. Farklı karbon maddelerinin asimilasyonuna dayanan tiplendirme çalışmalarının sonuçları kullanılan karbon maddelerine göre değişmektedir. Karbon kaynağı içeren ticari kitler kullanılarak yapılan biyotiplendirme çalışmalarında ayrılabilirlik indeksinin düşük olduğu görülmüştür⁴¹. Enzim değişikliğine göre yapılan biyotiplendirme çalışmalarında valin anil amididaz, sistin anil amididaz, alfa-glukozidaz, N-asetil-beta-glukoz amnidaz gibi enzimlerin kullanılmış ve *C. albicans* A, B, C, D olmak üzere dört değişik serotipe ayrılmıştır. Bu çalışmada ve bu konuyla ilgili yapılan benzer çalışmalarda yöntemin tekrarlanabilirliği yüksek olmasına karşın ayırım gücü zayıf bulunmuştur³².

Öldürücü Maya Tiplendirilmesi:

Öldürücü mayalar duyarlı mikroorganizmanın hücre duvarına spesifik bağlanan ve antimikrobiyal etkili ekzotoksin salgılama özelliğindedir. Öldürücü maya tiplendirilmesi *C. albicans* suşlarının tiplendirilmesinde ilk kez Polnelli ve arkadaşları tarafından 1983 yılında tanımlanmıştır. Bu çalışmada 25

farklı tip belirlenmiştir. Öldürücü maya tiplendirmesi çeşitli bakterilerin tiplendirilmesinde de kullanılmaktadır ⁴².

Protein yapılarına göre tiplendirme:

Bir hücrenin protein profilinin elektroforetik polimorfizmi ilk defa 1972 yılında tanımlanmıştır. Bu yöntem maya proteinlerinin poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) sonucu oluşan farklı protein profillerinin gösterilmesine dayanır. Bu yöntem sadece serotip A ve B'nin ayırımında yardımcı olmuştur. Yöntemin ayırım gücü farklı proteinlere karşı oluşturulmuş monoklonal antikorlar kullanılarak arttırılmaya çalışılmıştır ³². Daha sonra geliştirilen multilokus enzim profili (izoenzim profili) yöntemi ile her organizma için hücresel enzimlerin elektroforetik protein farklılıkları gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda yöntemin ayırım gücü yeterli bulunmuştur ⁴³.

Genotipik Yöntemler

Pulsed Field Jel Elektroforez Sistemi

Yaklaşık bir megabazdan (Mb) daha büyük doğrusal çift iplikli DNA molekülleri geleneksel agaroz jel elektroforezinde görüntülenememektedir. Bunun nedeni jelin por büyüklüğünün doğrusal DNA'nın jelde göç edebilmesi için yeterli olmamasıdır ⁴⁴. 1984 yılında maya kromozomlarını ayırt etmek için geliştirilen PFGE yöntemi ile 5 Mb boyutundaki DNA parçaları jel üzerinde görüntülenebilmiştir. Bu yöntemde, DNA molekülleri belirli zaman aralıklarında birbirine farklı açıda elektiriksel alanların etkisine bırakılır. Büyük DNA

molekülleri farklı açılardan gelen elektrik akımının etkisiyle agaroz jel üzerinde çözülerek göç eder ⁴⁵.

PFGE'nin türleri yüksek ayırım gücü, tekrarlanabilirlik özelliği ve yorumlama kolaylığı ile bugün moleküler tanı ve epidemiyolojide önemli bir araç olmuştur. Bu yöntemle DNA'nın elektroforetik karyotiplendirmesi, restriksiyon analizi, ribotiplendirme yapılabilmektedir⁴⁶. Bununla birlikte PFGE yönteminin kültürü yapılabilen organizmalara uygulanabildiği, yöntemin oldukça uzun sürdüğü (yaklaşık 4-5 gün) ve pahalı özel araçlara ihtiyaç duyulan bir uygulama olduğu unutulmamalıdır ⁴⁷.

PFGE-Elektroforetik karyotip analizi:

Schwartz ve Cantor geliştirdikleri PFGE yöntemi ile kromozom büyüklüğündeki DNA molekülünün genetik ayrımını (elektroforetik karyotiplendirme) başarmışlardır³². Elektroforetik karyotiplendirme metodu suş ayrımı için yeterli çeşitlilik gösterir.

PFGE-Restriksiyon Enzim Analizi:

“Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)” çift iplikli genomik DNA'nın bir veya daha fazla restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra agaroz jel elektroforezinde kesilen parçaların ayrıştırılması ve jelde görülen bant paternlerinin karşılaştırılması temeline dayanır⁴⁶.

Bu yöntemde, sıvı veya katı besiyerinde üretilen mikroorganizmalar, düşük erime ısısı agarozla karıştırılıp küçük kalıplar içine

dökülmektedir. Agaroz içine karıştırılan maya hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak (in situ-lysis) DNA izolasyonu yapılır. PFGE için genomik DNA tüm olarak gerekli olduğundan, DNA'da kırılmalara yol açan geleneksel DNA izolasyonu bu yöntem için uygun değildir. Agaroz içindeki maya DNA'sı nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi ile kesime uğratılır (in situ-digestion). Daha sonra bu DNA kalıpları agaroz jel içersinde PFGE sistemi ile elektroforeze tabi tutulur. PFGE sistemi ile uygulanan elektrik akımı ile 10-800 kilobazlık DNA parçaları net olarak ayırt edilmesine imkan sağlamaktadır ⁴⁵. Bu yöntemin ayırım gücü kullanılan restriksiyon enzimine bağlıdır. *C. albicans* için en çok kullanılan restriksiyon enzimleri *Sfi I*, *EcoRI*, *Hinf I* dir ^{48, 49}.

Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism):

Restriksiyon enzimleri (RE), özgül olarak DNA'yı belirli bölgelerden keserek genellikle 1000-20.000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir. PCR-RFLP için sıklıkla kullanılan enzimler arasında *SfiI*, *Sma*, *Apal*, *Hind III* sayılabilir. PCR-RFLP ile önce özel bir genomik bölge amplifiye edilir. Daha sonra amplifiye edilen bu bölge restriksiyon enzimleri ile kesilir ve agaroz jel'de geleneksel elektroforeze tabi tutulur. Bu yöntemle alt-tipleme daha kısa sürede ve yüksek güvenirlilikte yapılabilmektedir ⁵⁰.

“Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)” Analizi:

“Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) olarak da bilinen bu yöntemin temel prensibi, hedef bölge olmaksızın rastgele seçilmiş kısa primerler kullanılarak genomik DNA’daki benzer bölgelerin amplifikasyonunun sağlanmasıdır. Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunluktaki (baz çifti) bantların oluşmasına neden olur. Kullanılan primerler genellikle 9-10 bazlık, kısa primerlerdir ve G-C’ce zengindir. Primerlerin bağlanma ısıları düşürülerek (40-50 °C) hem kendilerine özgü bölgelere, hem de özgül olmayan bölgelere bağlanmaları sağlanmaktadır. Aynı tür içindeki farklı suşlarda bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine olan uzaklıkları değişik olacağından, agaroz jel elektroforezinde amplifiye edilen parçaların sayısı ve büyüklüğü de farklılık gösterecektir. Çoğalan ürünlerin görüntülenmesi ile türe özgü “finger print”ler oluşur. Bu yöntem *Candida*’ların tiplendirilmesi için ilk defa 1992 yılında kullanılmıştır. Uygulama kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilmesi yöntemin avantajıdır. En önemli dezavantajı henüz standardizasyonun sağlanamamış olması ve tekrarlanabilirliğinin düşük olmasıdır^{46, 50}.

***Candida albicans* Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi**

Yüzden fazla türü bulunan *Candida*’ların bir kısmının insanlarda hastalık oluşturduğu bildirilmiştir. *Candida* türleri normal koşullarda insanların %30-50’sinin gastro-intestinal kanal ve kadınların %20-30’unun genital yol florasında bulunur. *C. albicans* normal florada en sık bulunan türdür; ağızdan

izolasyonların %60-80'nin, genital yol izolasyonlarının %80-90'nını oluşturur. Bununla birlikte deri florasında *C. albicans* diğer türlere oranla daha az rastlanır. Çevre araştırmalarında da *C. albicans* türü ender olarak izole edilirken, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* gibi diğer patojen türler toprak ve bitkilerden izole edilebilirler¹³.

Kandidozlarda da en sık izole edilen tür *C. albicans*'tır. Enfeksiyolardan izole edilen diğer *Candida* türleri, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, ve *C. glabrata*'dır. Kandidozların büyük bir çoğunluğu endojen kaynaklı olup kişi ağız, deri, vajen veya gastro-intestinal kanal floasında bulunan *Candida*'lar ile enfekte olur. Bunu destekleyen bulgular pozitif basıçlı odalarda çok titizlik gösterilen ortamlarda gelişen kandidozlardır. Ayrıca *Candida* türleri ile kolonizasyonun kandidoz için önemli bir risk faktörü olduğu görülmektedir⁵¹. Bazı çalışmalarda hastanede yatan hastalarda, özellikle yeni doğan servislerinde görülen *Candida* salgınları bildirilmiştir. Bu salgınlardan izole edilen suşların tiplendirilmeleri sonucu, etkenin hastadan hastaya geçişi kanıtlanmıştır^{13, 51, 52}.

Mantar enfeksiyonlarının klinik önemi bilinmesine rağmen mantar ile kolonizasyon ve enfeksiyonun patogenezi, bulaş şekli ve epidemiyolojisi hakkında çok az şey bilinmektedir. Moleküler tiplendirme yöntemleri, *Candida* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin anlaşılmasında ve hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde oldukça önemlidir. Normal flora üyesi olan *C. albicans*'ın tür düzeyinde tanımlanması, etken organizmanın kaynağını izlemeye, kolonizasyon

ve enfeksiyon arasındaki ayrımı belirlemede çok yetersiz kalır. Bu yüzden tür düzeyinin de altında tiplendirmeye gereksinim vardır ⁵¹.

Antifungaller ve Etki Mekanizmaları

Çeşitli nedenlerden dolayı antibakteriyellerle karşılaştırıldıklarında, antifungal ajanlara direnç mekanizmaları konusundaki bilgilerimiz oldukça kısıtlıdır. Bunun önemli nedenlerinden biri fungal etkenlerin yakın zamana kadar önemli patojenlerden kabul edilmemesidir.

Örneğin 1950-1970 yılları arasında kandidoza bağlı ölüm hızı sabit kalmış ancak 1970'li yıllardan sonra hasta yaşamını uzatmaya yönelik gelişen tıbbi uygulamalara bağlı olarak bu enfeksiyonun görülme sıklığında önemli oranda artış görülmüştür. Fungal enfeksiyonlardaki bu artış antifungallere karşı direnç gelişimini ve bunların yol açtığı toksik etkileri de beraberinde getirmiştir. Bunun sonucunda hayatı tehdit eden fungal enfeksiyonlarla savaşta etkili ve güvenli yeni ajanların araştırılması hız kazanmıştır ⁵³⁻⁵⁵.

Antifungal ilaçların geliştirilmesinin temelinde iki önemli strateji bulunmaktadır. Bunlardan biri kullanılan antifungallerin daha geniş spektrumlu ve daha düşük toksisiteye sahip olan türevlerinin geliştirilmesidir. Diğer önemli nokta ise memeli hücrelerine zarar vermeden seçici toksisite sağlayacak hedeflerin bulunmasıdır. Mantarların da ökaryotik hücre yapısına sahip olması seçici toksisitenin sağlanmasını güçleştirmektedir ^{53, 55, 56}.

Amfoterisin B yaklaşık 30 yıl boyunca ciddi mantar enfeksiyonlarında tek seçenek olarak kalmıştır. Ancak yol açtığı şiddetli nefrotoksisite, bu antifungalın kullanımını kısıtlamaktadır. 1980'lerin sonları ve

1990'ların başlarında kullanıma girmiş olan imidazol ve triazol grubu ilaçlar, lokal ve sistemik fungal enfeksiyonların tedavisinde etkin ve güvenli (düşük toksisiteli) seçenekler olarak karşımıza çıkmaktadır ⁵⁶.

Antifungal ilaçlar; mantar hücresinin zarına, duvarına, sitoplazmasına, mikrotübüler proteinlerine bağlanarak toksik etki gösterirler. Bu etki “fungustatik” (üremelerini durdurucu) veya “fungisit” (öldürücü) olabilir .

Bugüne kadar klinik kullanıma girmiş olan antifungallerin önemli bir bölümü ergosterol metabolizmasını ya da ergosterolün kendisini hedef almaktadır ⁵⁷. Ergosterol fungal plazma membranında bulunan majör steroldür. Başta hücre zarının akışkanlığı, bütünlüğü, kitin sentezi gibi zarda bulunan enzimlerin fonksiyonunun düzenlenmesi gibi hücresel olaylarda önemlidir ⁵⁸.

Tablo 4. Antifungaller ve hedefleri.		
Hedef	Kimyasal sınıf	Ajan
DNA/RNA sentezi	Pirimidin	Flucytosine (5FC)
Membran bariyer fonksiyonu	Polienler	Amfoterisin B Nistatin
Ergosterol biyosentezi		Naftitin, terbinafin Tolnaftat
Skualen epoksidaz	Alilaminler Tiyokarbamat Azoller	Bifanazol, Bifanazol,
14 α -Demetilaz (sitokrom p450-14DM)	İmidazol	Bifanazol, Klotrimazol, Ekonazol,
	Triazoller	Ketakonazol, Mikanazol Flukanazol, itrakonazol, terkonazol
Δ^{14} -Redüktaz ve $\Delta^{8\rightarrow7}$ -izomeraz Mitoz (mikrotübüller)	Morfolinler	Amorfolin Griseofulvin

Antifungallere Direnç Mekanizmaları

Derin mikozlardaki artışla birlikte antifungallerin yaygın kullanılması sonucunda bu ilaçlara direnç geliştiği; direncin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasıyla direncin ortaya çıkması ve yayılmasını önleyecek stratejiler geliştirilmesi sağlanabilecektir ⁵⁶.

Antifungal ilaçlara yanıtta; klinik faktörler, mantar hücresi ile ilgili faktörler ve moleküler faktörler olmak üzere üç yönü bulunmaktadır. Klinik faktörler; hastanın bağışıklık durumu, ilacın farmakolojisi veya mikozun tipi ve derecesi ile ilgili olabilir ve hastalığın tedavisinin başarısız kalmasına yol açar. Mantar hücresi ile ilgili olanlar; doğal dirençli türlerin gen ekspresyonu yoluyla direnç genlerinin duyarlı kökenlere aktarılması sonucu dirençli fenotipler ortaya çıkar. Moleküler faktörler; (i) sitoplazma zarının engelleyici işlevinin bozulması, (ii) makromolekül sentezinin baskılanması (iii) ergosterol sentezinin baskılanması veya (iv) mikrotübüller ile etkileşim biçimindedir. *C. albicans* 'da gösterildiği gibi eflüks pompasında değişimler, hedef enzimin biyosentezi sırasında işlev gören diğer enzimlerde değişimler bu faktörler arasında sayılmaktadır ^{53,59}.

Antifungal direnç primer ve sekonder olarak da ifade edilir. *C. lusitaniae* ve *Pseudoallescheria boydii* kökenleri amfoterisin B'ye; *Mucorales*'de yer alan mantarlar flukonazol'e doğal direnç gösterirler. Bu "primer direnç" olarak adlandırılır. Ancak bazı durumlarda antifungal maddeye başlangıçta duyarlı olan mantarların duyarlılıklarında daha sonra azalma ortaya çıkabilir veya o antifungale karşı direnç gelişebilir. Bu ise "sekonder direnç" olarak adlandırılır.

Bu durum klinik tedavi ve enfeksiyonun seyri açısından çok daha önemlidir. Edinilmiş direnç klinik başarıyı etkileyen önemli bir unsurdur.

Bazı mantarlar antifungal maddenin etkisine “tolerans” adı verilen bir başka direnç şekli gösterirler. Toleransa sahip olan bir mantar fungusid olan bir ilaç tarafından öldürülmeyip üremesi inhibe olan organizmadır. Diğer bir deyişle fungusid özellikteki antifungalın fungistatik özellik taşıyor hale geçmesidir. Dolayısıyla bazı mantarlar bu ilacın etkisini fungistatik olduğu noktaya kadar tolere ederler.

Antifungaller etkili oldukları yere göre üç grupta toplanabilirler; (i) allilaminler, azoller, morfolinler; mantarın esas sterolü olan sentezini baskılayarak, (ii) polienler, doğrudan hücre zarı ergosterolün üzerinde hasar oluşturarak, (iii) 5-fluorositozin makro moleküllerin sentezini baskılayarak antifungal etki gösterirler ⁵⁶.

MATERYAL METOD

Hastalar ve *Candida albicans* İzolatları:

Bu çalışma, 1150 yataklı Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesin’de yapılmıştır. Hastanemizin Hematoloji-Onkoloji servisinde 03.2000-12.2002 tarihleri arasında toplam 43 hastadan, enfeksiyon etkeni olarak kabul edilen 51 *C. albicans* suşu izole edildi. Kolonizasyon suşları için, 26.02.2001 ile 30.05.2001 tarihleri arasında, erişkin hastaların takip edildiği yoğun bakım ünitelerinde yatan tüm hastaların ağız, burun, cilt, perine, kateter olmak üzere farklı vücut bölgelerinden ve varsa idrar sondasından, yara yüzeyinden sürüntü örnekleri alındı.

Epidemiyolojik İlişki ve Risk Faktörlerine Ait Bilgilerin Toplanması:

Çalışmaya alınan her hasta için epidemiyolojik çalışma formu dolduruldu. Hastaların adı-soyadı, cinsiyeti, hastaneye yatış-çıkış tarihleri, altta yatan hastalık, *C. albicans*’ın izole edildiği tarih, izole edildiği örnek çalışma formuna kayıdedildi.

Kültür ve Suşların İdentifikasyonu:

Steril eküvyonlar ile alınan örnekler Sabouraud dekstrozu agar (SDA) plaklarına ekildi ve plaklar 48 saat 35⁰C’de inkübe edildi. Oluşan maya kolonilerinden “çimlenme borusu” oluşumuna bakıldı. Çimlenme borusu pozitif

olan örnekler *C. albicans* olarak ayrılıp, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile özgül primerler kullanılarak moleküler olarak da *C. albicans* doğrulaması yapıldı.

Polimeraz zincir reaksiyonu ile *C. albicans*'ın tespiti:

C. albicans'a özgül primerlerin seçimi:

Miyakawa ve arkadaşlarının³⁰ *C. albicans*'ın EO3 gen bölgesinden seçtikleri, 105 baz çiftlik *C. albicans*'a özgül bölgeyi hedef alan primerler kullanıldı.

Primer 1: 5'--CAC CAA CTC GAC CAG TAG GC--3'

Primer 2: 5'--CGG GTG GTC TAT ATT GAG AT--3'

DNA ekstraksiyonu:

I-Gerekli çözeltiler

-Lizis tamponu

10 mM Tris (pH 7.6), 10 mM EDTA (pH 8.0), 50 mM NaCl₂, % 0.2 SDS,
200 µg/ml proteinaz K

-Sferoblast parçalama tamponu

Örnek başına 2 U/ml lyticase,

50 mM Tris (pH 7.6), 1 mM EDTA, % 0.2 β-merkaptoetanol

-%10'luk SDS

- 4 M Sodyum asetat

II-Yöntem

-Maya hücreleri 1ml lizis tamponuna McFarland 0.5 olacak şekilde süspanse edilip, 65 °C’de 2 saat inkübe edildi.

-İnkübasyondan sonra 500 µl sferoblast oluşturma tamponu eklenip 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi.

-5 dakika kaynatmadan sonra 5M potasyum asetat eklenerek buzda 25 dakika bekletildi. Daha sonra 13.000Xg’de 10 dakika santrifüj edilip üst sıvı yeni bir tüpe alındı.

-İsopropil alkol ve %70 etanol kullanılarak sırasıyla, DNA çöktürme ve yıkama işlemi gerçekleştirildi. Çöktürülen DNA 30 µl distile su ile sulandırıldı.

PCR reaksiyon karışımı:

	Son Konsantrasyon	
PCR 10 X buffer	1 X	5µl
MgCl ₂	2.5 mM	5µl
Primer 1	50 pmol/µl	1µl
Primer 2	50 pmol/µl	1µl
Taq DNA polimeraz)	2.5 U/µl	0.5 µl
DNTP’s	200 µM	1µl
Ekstrakte DNA		5 µl
Su		31.5 µl
Toplam Hacim		50 µl

Amplifikasyon programı:

Denaturasyon için 94 °C’de 4 dakika

Denaturasyon için 94 °C’de 30 saniye

Primer bağlanması için 56 °C’de 1 dakika

Primer uzaması için 72 °C’de 2 dakika

Primer uzaması için 72 °C’de 5 dakika

35 siklus

Amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jelde, 1X TBE tamponunda, 1 saat, 100V elektroforeze tabi tutuldu. Etidyum bromürle ile boyanarak UV translüminatör altında bantlar görüntülendi.

Moleküler Tiplendirme:

AP-PCR:

C. albicans'ın tiplendirilmesinde M13 primerleri kullanılarak AP-PCR ile genotiplendirme yapıldı.

I-Gerekli çözeltiler:

%1 SDS

TE tamponu; 10 mM Tris, 1mM EDTA (pH:8.0)

Fenol

Kloroform

%70-100'lük Etanol

II-Yöntem:

Ekstraksiyon (DNA eldesi):

AP-PCR için *C. albicans* DNA'larının izolasyonunda, Akada ve arkadaşlarının⁶⁰ PCR için uyguladıkları ve sadece %0.025'lik SDS kullanarak maya kolonilerinden DNA eldesi sağlayan protokolleri, aşağıda gösterildiği gibi modifiye edilerek kullanıldı:

a-İzolatların hazırlanması:

1-*C. albicans* izolatları'nın SDA besiyerine pasajları alınıp, 24 saat 35 °C'de üretildi.

2- Saf kültür halinde üreyen koloniler (plağın yaklaşık dörtte biri) 1.5 ml %1'lik SDS içerisinde süspanse edildi.

b-DNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması:

1-1.5 ml'lik Eppendorf tüpde, %1'lik SDS içerisinde hazırlanan maya süspansiyonları en az 30 saniye vortekslendi.

2- 3000 X g'de 5 dakika santrifüj edildi.

3- Üst fazın 600 µl'si yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine, 600 µl fenol eklenip vortekslendi ve 13.000 X g'de 5 dakika santrifüj edildi.

4- Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı. 600 µl kloroform eklenip, vortekslendi ve 13.000 X g'de 5 dakika santrifüj edildi.

5- Üst faz yeni bir tüpe alınıp ve üzerine 1ml, %'100 lük etanol eklenip -70 °C'de 2 saat bekletildikten sonra, soğutmalı santrifüjde 13.000 X g'de 15 dakika santrifüj edildi.

6- Üst sıvı atık kabına döküldükten sonra üzerine 1 ml soğutulmuş %70 etanol eklenip 10 dakika santrifüj edildi ve üst kısımdaki alkol tamamen boşaltıldı.

7-DNA pelletleri oda ısısında kurutulduktan sonra, 50 µl TE tamponu ile sulandırıldı.

8-UV spektrofotometre (GeneQuant, Pharmacia Biotech) kullanılarak DNA konsantrasyonları ölçüldü. DNA süspansiyonları, konsantrasyonları 50 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.

c-AP-PCR

AP-PCR için Durmaz ve arkadaşları tarafından daha önce bakteriler için standardize edilmiş olan, M13 primerinin kullanıldığı^{61,62} protokol uygulandı.

I- 2X amplifikasyon karışımının hazırlanması:

10 X Amplifikasyon tamponu	200 µl
dNTP miks (2 mM)	200 µl
MgCl ₂ (25 mM)	320 µl
Steril DNaz ve RNaz içermeyen su	280 µl
Toplam Hacim	1000 µl

II- 50 µl olan amplifikasyon karışımının hazırlanması:

2 X Amplifikasyon karışımı	25 µl
Primer M13 (100 pmol/µl)	1 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.5 µl
Steril Dnaz ve Rnaz içermeyen su	21.5 µl
Toplam Hacim	50 µl

Primer: M13: 5'--GAG GGT GGC GGT TCT--3'

III- Amplifikasyon programı

Denaturasyon için 94 °C'de 5 dakika	} 2 siklus
Primer bağlanması için 40 °C'de 5 dakika	
Primer uzması için 72 °C'de 1 dakika	
Denaturasyon için 94 °C'de 1 dakika	} 40 siklus
Primer bağlanması için 40 °C'de 1 dakika	
Primer uzması için 72 °C'de 2 dakika	

d-Sonuçların gözlenmesi:

12 µl amplifikasyon ürününe ¾ oranında brom fenol mavisi eklendikten sonra %2 agaroz jel içinde 1x TBE buffer ile, önce 1 saat 100 V'ta sonra 1 gece 50 V'da elektroforeze tabi tutulup, agaroz jel etidyum bromid ile boyandı. Bantlar UV translüminatör ile görüntülenip fotoğrafları çekildi.

e-Bantların yorumlanması:

M13 primerleri ile AP-PCR'da genotip ayrımı için, GelCompar bilgisayar programı kullanıldı. Benzer genotiplerin belirlenmesi için "Dice similarity coefficient" (benzerlik katsayısı) esas alındı⁶³. Buna göre benzerlik katsayı %70'in altı olan izolatlar ayrı genotip, benzerlik katsayısı %70-90 arası olanlar altı, %95-100 olanlar aynı genotip olarak değerlendirildi.

PFGE-Elektroforetik karyotiplendirme:

I-Gerekli çözeltiler

- 75 mM NaCl + 25 mM EDTA (pH 8)
- 125 mM EDTA (pH 7.5)
- 0.5 mM EDTA (pH 9) + %7.5 β-merkaptoetanol
- 50 mM EDTA (pH 7.5)
- ES (0.5 M EDTA pH 9-9.5 +%1 Sarcosine)+ 1 mg/ml proteinaz K
- 0.5 M EDTA (pH 9)

II-Yöntem

a-Disklin hazırlanışı

1- SDA'da 48 saat 30 °C'de üreyen maya hücreleri 2 ml 75mM NaCl ve 25 mM EDTA (pH:8) tampon solusyonunda süt bulanıklığı olacak şekilde süspanse edildi.

2- Maya süspansiyonu 230 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant atılıp, pellet 2 ml NaCl –EDTA solusyonunda süspanse edildi.

3- 125 mM EDTA (pH 7.5) içinde %1.5'luk düşük erime ısıli agaroz hazırlandı ve 37 °C'deki hücre süspansiyonuna eklendi (1:1 olacak şekilde 250 µl alınarak eklenir.). 2000 U Zymolyase 20T'den 50 µl/ml olacak şekilde ilave edildi. Hücre-Agaroz-Zymolase karışımından diskler hazırlanıp, 1 saat +4 °C'de buzdolabında bekletildi.

4- Diskler donduktan sonra 5 ml 0.5 mM EDTA (pH 9.0) %7.5 β-merkaptoetanol süspansiyonuna alındı ve 37 °C'lik su banyosunda yavaş şekilde çalkalayarak bir gece inkübasyona kaldırıldı.

5- Sıvı döküldükten sonra plaklar 5 ml 50 mM EDTA (pH 7.5) ile 1 kez yıkandı.

6- Yıkamadan sonra 5 ml ESP (0.5 mM EDTA, pH 9-9.5, %1 sarcosine, 1mg/ml proteinaz K solüsyonu) solüsyonunda 50 °C'de sıcak su banyosunda kuvvetle çalkalayarak bir gece inkübe edildi.

Diskler 0.5 M EDTA'ya (pH 9) transfer edildi ve +4 °C 'de saklandı.

b-Pulse-Field Gel Electrophoresis

Cihaz: CHEF DR II (Biorad)

Agaroz jel: %0.7 (Seakem Agar)

Tampon solusyonu: 1 X TBE (0.1 M Tris, 0.09 M Boric acid, 0.01 M EDTA)

Elektroforez koşulları:

0.5X TBE Buffer

Başlangıç zamanı: 90saniye

Bitiş zamanı: 360 saniye

Toplam süre: 36 saat

3.5V/cm², 12 °C

e-Bantların yorumlanması:

Çekilen resimler GelCompar (Applied Maths) bilgisayar programına aktarılarak bantların analizi yapıldı. Bir veya daha fazla bant farklılığı gösteren izolatlar farklı tip olarak yorumlandı.

Yöntemlerin ayırma gücü (Diskriminasyon):

AP-PCR ve PFGE-EK ile suşların ayrılabilirlik indeksini belirlemek ve yöntemin ayırma gücünü tespit için Hunter ve Gaston⁶⁴ geliştirdikleri matematiksel formül kullanıldı.

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

D : Ayrılabilirlik indeksi

N : Çalışmada test edilen suş sayısı

s : Belirlenen toplam tip sayısı

n_J : J inci tipe ait suş sayısı

Bu formülde D değeri 0 ile 1 arasında değişebilir. Bir tiplendirme yönteminde bulunan D değerinin 1'e yakınlığı tiplendirme yönteminin ayırım gücünün yüksek olduğunu gösterir ³².



BULGULAR

I-Hasta ve *C. albicans* izolatları

Hematoloji-Onkoloji servisinde toplam 43 hastadan izole edilen 51 *C. albicans* izolatı çalışmaya alındı. İzolasyonu yapılan örneklerin 20'si ağız içi plak, 10'u balgam, 8'i idrar, 5'i gaita, 2'si BAL (Bronkoalveoler lavaj), 3'ü yara, 1'i ETA (endotrakeal aspirat), 1'i katater ucu, 1'i intra abdominal mayi idi. *C. albicans* suşlarının izolasyon tarihleri tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Hematoloji-Onkoloji servisinde izole *C. albicans* suşlarının aylara göre dağılımı.

	Ağız içi plak	Balgam	İdrar	Gaita	BAL	Yara	ETA	Kateter	İnt Ab mayi
05.2000			18						
06.2000									
07.2000									
08.2000	19								
09.2000						4			
10.2000	11,9	50	12	51					
11.2000	8	5							7
12.2000	15,14,6,	16	17	10					
01.2001	2,	13,1							
02.2001			24						
03.2001	27,23,25	45	28	21					
04.2001		39			22				
05.2001									
06.2001	26,3								
07.2001									
08.2001									
09.2001									
10.2001	33,31,32								
11.2001	46	47	48		20			29	
12.2001			49						
01.2002		38	43			37			
02.2002	44,42	30		34,36		41			
03.2002							40		
04.2002									
05.2002									
06.2002									
07.2002									
08.2002									
09.2002									
10.2002									
11.2002									
12.2002	35								

Not: Rakamlar suş numaralarını göstermektedir.

Çeşitli yoğun bakımlarda yatan 21 hastanın farklı vücut bölgelerinden alınan toplam 105 örneğin 32'sinde *C. albicans* üretildi. Bu örneklerin 11'i ağız içi, 6'sı perine, 3'ü cilt, 4'ü yara, 2'si sonda ucu, 2'si burun mukozası, 1'i nazofarenks, 1'i katater, 1'i idrar ve 1'i ağız kenarından izole edildi. *C. albicans* izolatlarının izole edildikleri yoğun bakımlar ve tarihleri tablo 6 ve 7'de gösterilmektedir.

Tablo 6. İzole edilen *C. albicans* suşlarının yoğun bakımlara göre dağılımı.

	Ağız içi	Perine	Cilt	Sonda ucu	Burun	Nazofarenks	Katater	İdrar	Yara	Toplam
GCYB	65,69,66	70					67		68	6
KVCYB	79,78,61,74	81	82						60,80	8
BCYB	52,71,57		55	53,59	58			56	54,62	10
Reanimasyon	73	72,75,83,77	76		63	64				8
Toplam	11	6	3	2	2	1	1	1	5	32

GCYB: Genel cerrahi yoğun bakım KVCYB: Kardiyovasküler cerrahi yoğun bakım

BCYB: Beyin cerrahi yoğun bakım

Not: Rakamlar suş numaralarını göstermektedir.

Tablo 7. Yoğun bakımlardan izole edilen suşların aylara göre dağılımı.

	Ağız içi	Perine	Cilt	Sonda ucu	Burun	Nazofarenks	Katater	İdrar	Yara
02.2002 01-15									
15-31	52,57		55	53,59	58			56	54,62
03.2002 01-15									
15-31									60
04.2002 01-15					63				
15-31									
05.2002 01-15	65,66,71,69	70					67		68
15-31	61,73,78,79,74	72,75,81,83	76,77,82			64			80

Tiplendirme çalışmalarına her iki gruptan epidemiyolojik, demografik ve klinik bilgilerine ulaşabildiğimiz, 51'i hematoloji onkoloji servisi, 32'si yoğun bakımlardan olmak üzere toplam 83 *C. albicans* izolatı dahil edildi.

II-Epidemiyolojik ilişki ve risk faktörlerine ait bilgilerin toplanması

Hematoloji-Onkoloji servisinden 33 aylık periyotta 51 *C. albicans* suşu izole edildi. Hastaların 24'ü erkek, 19'u kadın olup yaşları 38-75 arasındaydı. Hastaların yatış süreleri 21-83 gün arasında değişmekteydi. Hastaların tümüne çeşitli invaziv girişimler uygulanmıştır. Hastaların klinik, demografik, epidemiyolojik verileri ve risk faktörleriyle ilgili ayrıntılı bilgiler tablo 8'de gösterilmiştir.

Kolonizasyon suşlarının genotipik farklılığını ve enfeksiyonla ilişkisini ortaya koymak için 21 yoğun bakım hastasından 02.2002-05.2002 tarihleri arasında 32 *C. albicans* suşu izole edildi. Bu hastaların 13'ü erkek 8'i kadın olup yaşları 35-76 arasında değişmekteydi. İzole edilen *C. albicans* suşlarının hiç biri enfeksiyon etkeni olarak kabul edilmedi ve hastalar antifungal ilaç kullanmadı. Yoğun bakım hastalarının klinik, demografik ve risk faktörlerine ait bilgiler tablo 9 yer almaktadır.

Tablo 8. Hematoloji-Onkoloji servisinde incelemeye alınan hastaların klinik ve epidemiyolojik bulguları.

NO	Örnek	Cinsiyet	Yaş	Yatış/Çıkış Tarihi	İzolasyon Tarihi	Numune	Antifungal		Oda	Tanı
							Flukonazol			
27	Ö-116	E	38	01.03.01 27.03.01	07.03.01	Ağız içi plak	4		812	MM
39	Ö-168	K	52	21.02.01 14.05.01	30.04.01	Balgam	<0.25		808	MM
12	Ö-13	E	62	05.10.00 21.10.00	19.10.00	İdrar	<0.25		837	AML/katater
44	Ö-171	E	61	12.01.02 26.02.02	18.02.02	Ağız içi plak	<0.25		Enf servis odası	KLL
30	Ö-148	K	72	12.02.02 24.03.02	21.02.02	Balgam	<0.25		813	AML
49	Ö-176	K	67	10.12.01 25.12.01	15.12.01	İdrar	<0.25		815	MM
2	Ö-39	K	30	10.12.00 10.02.01	13.01.01	Ağız içi plak	<0.25		1331	Over CA
13	Ö-55			15.01.01	Balgam	<0.		Over CA		
43	Ö-170	K	56	23.01.02 12.02.02	31.01.02	İdrar	4		841	AML
33	Ö-157	K	57	13.09.01 18.10.01	01.10.01	Ağız içi plak	>128		835	MM
21	Ö-91	E	60	22.02.01 01.04.01	01.03.01	Gaita	<0.25		838	AML
19	Ö-66	K	55	07.08.00 28.08.00	10.08.00	Ağız içi plak	1		814	AML
22	Ö-94	K	45	17.03.01 12.04.01	02.04.01	BAL	64		840	AML
46	Ö-139	K	58	05.08.01 27.11.01	17.11.01	Ağız içi plak	<0.25		814	
40	Ö-166	K	64	08.03.02 25.03.02	12.03.02	ETA	<0.25		838	Akc Ca

Tablo 8. Devam

50	Ö-177	K	35	07.07.01 05.01.01	12.10.0	Balgam	<0.25	839	AML
51	Ö-182					Gaita	<0.25		
15	Ö-44	K	64	13.12.00 09.01.01	18.12.00	Ağız içi plak	0.25	813	AML
16	Ö-45					Balgam	0.25		
37	Ö-169	K	27	10.12.01 29.01.02	23.01.02	Anal sürünütü/ Yara	<0.25	841	Burkit lenfoma
28	Ö-102	E	53	23.02.01 05.04.01	23.03.01	İdrar	128		Lenfoma
4	Ö-43	K	44	17.09.00 09.11.00	26.09.00	Yara	8	835	NHL
17	Ö-59	E	42	23.10.99 18.12.99	08.12.99	İdrar	>128	837	Akc Ca
29	Ö-146	K	44	10.10.01 03.12.01	03.11.01	Katater ucu	128	816	AML
14	Ö-56	E	67	13.11.00 22.12.00	05.12.00	Ağız içi plak	<0.25	1332	AML
5	Ö-20	E	40	09.10.00	10.11.00	Balgam	<0.25	1429	AML
20	Ö-79	E	62	23.10.01 08.12.01	01.11.01	BAL	8	BAL	ALL
34	Ö-149	K	55	10.02.02 03.03.02	21.02.02	Gaita	>128	817 840	AML
36	Ö-149	K			24.02.02	Gaita	>128		
1	Ö-37	E	40	03.01.01 02.03.01	05.01.01	Balgam	<0.25	1342	AML
3	Ö-40			21.5.01	01.06.01	Ağız içi plak	<0.25	829	
47	Ö-141	K	67	28.10.01 10.12.01	03.11.01	Balgam	<0.25	Enf ser odası	Pnömoni Mucormikozis glioblastoma

Tablo 8. Devam

8	Ö-18	E	51	10.11.00 20.01.01	25.11.00	Ağız içi plak	<0.25	842	Mide lenfoma
7	Ö-19	E	43	15.11.00 30.11.00	22.11.00	İntra. Mai	<0.25	Özel	Lenfoma
38	Ö-162	E	27	13.01.02 18.01.02	23.01.02	Balgam	<0.25	839	HH
31	Ö-143	K	64	05.10.01 12.11.01	18.10.01	Ağız içi plak	32	829	Metastatik liyomiyosarkom
41	Ö-174	K	41	11.01.02 25.02.02	11.02.02	Protez / Yara	<0.25	842	AML
42	Ö-175	K	41	11.01.02 25.02.02	11.02.02	Ağız içi plak	2	842	AML
6	Ö-22	K	50	07.11.00	19.12.00	Ağız içi	<0.25	829	Hogdkin lenfoma
10	Ö-7					Gaita	<0.25	829	
11	Ö-14			21.08.00 14.10.00	11.10.00	Boğaz	<0.25	835	
32	Ö-144	E	55	12.09.01 15.11.01	11.10.01	Ağız içi plak	64	817	MM
24	Ö-84	E	52	28.03.01 30.03.01	02.02.01	İdrar	128	815	AML
48	Ö-142	E	73	01.11.01 15.11.01	07.11.01	İdrar	2	834	KII
35	Ö-154	E	54	10.12.02 25.12.02	19.12.02	Ağız içi plak	16	817	MM
9	Ö-2	E	15		19.10.00	Ağız içi plak	<0.25		
23	Ö-97	E	75	20.03.01 30.06.01	26.03.01	Ağız içi plak	<0.25	812	AML
26	Ö-100				23.06.01	Ağız içi plak	<0.25		
18	Ö-60	K	62	01.03.00 14.04.00	01.03.00	İdrar	<0.25	813	PAM
25	Ö-115	K	40	23.02.01	07.03.01	Ağız içi plak	32	832	ALL-L2
45	Ö-117			23.06.02	15.03.01	Balgam	64	832	

Tablo 9. Yoğun bakım hastalarının klinik ve epidemiyolojik bulguları.

NO	Örnek	Cinsiyet	Yaş	İzolasyon Tarihi	Numune	Yoğun bakım	Tanı
52	Ko-1	K	46	26.02.01	Ağız	NRŞ	Kafa travması
53	Ko-4				Sonda ucu		
54	Ko-2				Yara		
55	Ko-3				Cilt		
60	Ko-11	K	52	19.03.01	Yara	KVC	Endokardit
72	Ko-28	E	44	16.05.01	Perine	Reanimasyon	MI
64	Ko-17				Nazofarenks		
65	Ko-18	E	43	01.05.01	Ağız	Genel Cerrahi Yoğun bakım	İleus
79	Ko-41	K	29	30.05.01	Ağız	KVC	Hemotoraks
58	Ko-7	E	76	26.02.01	Burun	NRŞ NRŞ	SVO
59	Ko-8			26.02.01	Sonda		
71	Ko-27	K	32	01.05.01	Ağız	BCYB	Malignansi
56	Ko-5	K	48	26.02.01	İdrar	NRŞ	SAK (subaraknoid kanama)
57	Ko-6			26.02.01	Ağız		
75	Ko-34	K	34	16.05.01	Perine		Whipple hastalığı
76	Ko-33	K		16.05.01	Cilt		

Tablo 9. Devam

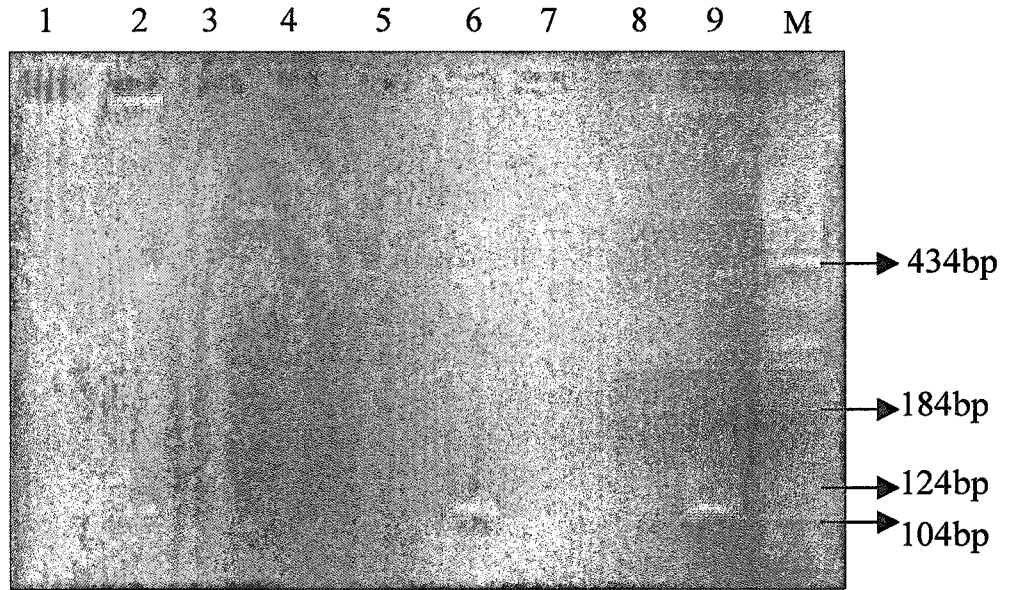
68	Ko-22	E	44	01.05.01	Yara	Genel cerrahi YB	Dalak perforasyonu
62	Ko-10	E	66	26.02.02	Yara	NRŞ	SVO
67	Ko-20	E	29	01.05.01	Katater	Genel cerrahi YB	Mide tümörü
69	Ko-23	E	48	01.05.01	Ağız	Genel cerrahi YB	Ülseratif colit
73	Ko-29	E	52	16.05.01	Ağız	Reanimasyon	Hemopnemotoraks
83	Ko-45				Perine		
66	Ko-19	E	54	01.05.01	Ağız	Genel cerrahi YB	Mezenterik lenfadenit
78	Ko-40	E	36	30.05.01	Burun	KVC KVC	Mediasten travması
80	Ko-42				Ağız		
81	Ko-43				Perine		
82	Ko-44				Cilt		
77	Ko-37	K	35	16.05.01	Perine		Over CA
61	Ko-12	K	49	30.05.01	Ağız	KVC	MI
70	Ko-25	E	57	01.05.01	Perine	GCRYB	İleus
74	Ko-32	K	47	30.05.01	Ağız	KVC	Akciğer CA
63	Ko-15	E	59	16.04.03	Burun	Reanimasyon	Ensefalit

II-Çevre ve Hastane personelinden İzolasyon Çalışmaları

C. albicans izolatlarının izole edildiği dönemde, hastaların çevresinden (hava, masalar, ilaç dolabı, lavabo, yatak ve musluklar) ve ilgili sağlık personellerinin ağız, el ve burunlarından alınan örneklerin yapılan izolasyon çalışmalarının hiç birinde *C. albicans* izole edilemedi.

IV-Suşların identifikasyonu

Toplanan tüm örneklerin SDA besiyerine ekimleri yapıp 48 saat 35 °C’de inkübe edildi. Üreyen kolonilerden çimlenme borusu testi yapılarak pozitif sonuç veren örnekler olası *C. albicans* izolatı olarak saklandı. Daha sonra bu örneklerin *C. albicans*’a özgü primerler kullanılarak PCR ile doğrulaması yapıldı. 105 bp’lik bölgede bant gözlenen örnekler kesin *C. albicans* olarak tanımlandı.



Şekil2. 2, 6 ve 9. örnekler *C. albicans* pozitif. Marker: HaeIII (Fermentas, MBI)

V-Suşların antifungal duyarlılık profili

Hematoloji-Onkoloji hastalarından enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 51 *C. albicans* izolatında NCCLS M27A belgesine uygun olarak in vitro sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile flukonazol duyarlılıkları araştırıldı ⁶⁵. Bu örneklerin 12'si flukonazole dirençli olarak bulundu.

VI-Alt tiplendirme

A-Epidemiyolojik Graplama

Çalışmaya alınan suşlar epidemiyolojik verilerine göre gruplandırıldı. Ayrıca suşlar, izolasyon dönemlerine göre (bir aylık periyot) alt gruplara ayrıldı. Bir aylık periyotta izole edilen *C. albicans* izolatları aynı epidemiyolojik gruba dahil edildi (Tablo 10). (Tablo da her bir harf epidemiyolojik olarak farklı bir suşu temsil eder)

Tablo 10. Hematoloji-Onkoloji suşlarında klasik epidemiyolojik gruplama.

Suş	Epidemiyolojik grup
18	A
19	B
4	C
11,9,50,12,51	D
8,5,7	E
15,14,6,16,17,10	F
2,13,1	G
24	H
27,23,25, 45,28,21	I
39,22	J
3,26	K
33,31,32	L
46,47,48,20,29	M
49	N
38,43,37	O
44,42,30,34,36,41	P
40	R
35	S

Yoğun bakım hastalarından izole edilen *C. albicans* izolatlarının klasik epidemiyolojik verilerine göre gruplandırılması tablo 11’de gösterilmiştir. Yoğun bakım üniteleri, hastane içersinde aynı koridor üzerinde yer almaktadırlar. Bu yüzden yoğun bakım ünitelerinin farklılığı epidemiyolojik gruplamaya yansıtılmamıştır. Bir aylık periyotta yoğun bakım hastalarından izole edilen *C. albicans* izolatları aynı epidemiyolojik gruba dahil edilmiştir.

Tablo11. Yoğun bakım suşlarında epidemiyolojik gruplama

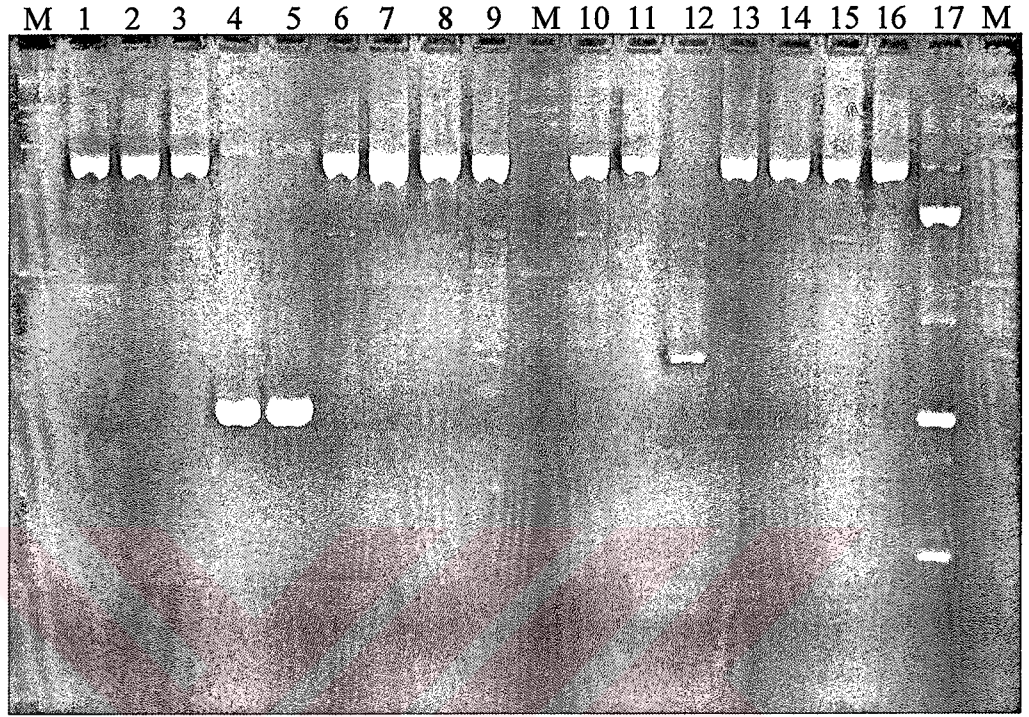
Suş	Epidemiyolojik grup
52,57,55,53,59,58,56,54,61,62	A
60	B
63	C
65,66,71,69,70,67,68	D
78,79,74,72,75,81,83,76,77,82,64,80,73	E

B-Moleküler Tiplendirme

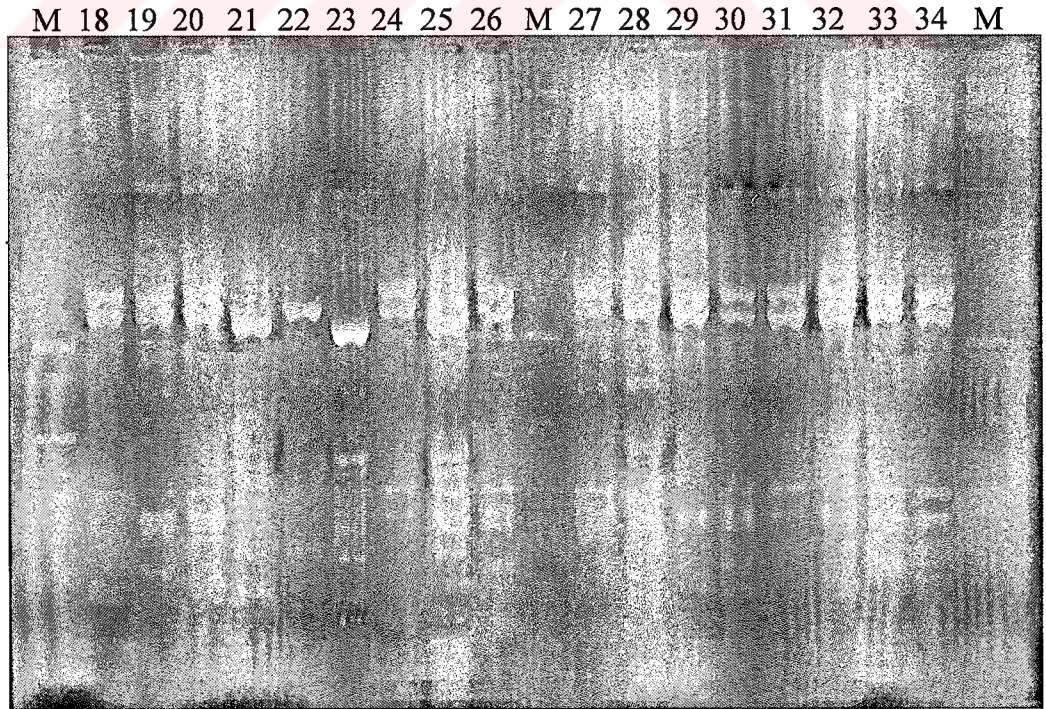
I-AP-PCR

Amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezinden sonra “Nikon coolpix 995” dijital kamera ile çekilen fotoğraflar GelCompar programına aktarılarak analizleri yapıldı. Marker olarak 1Kb DNA Leader (Promega) kullanıldı.

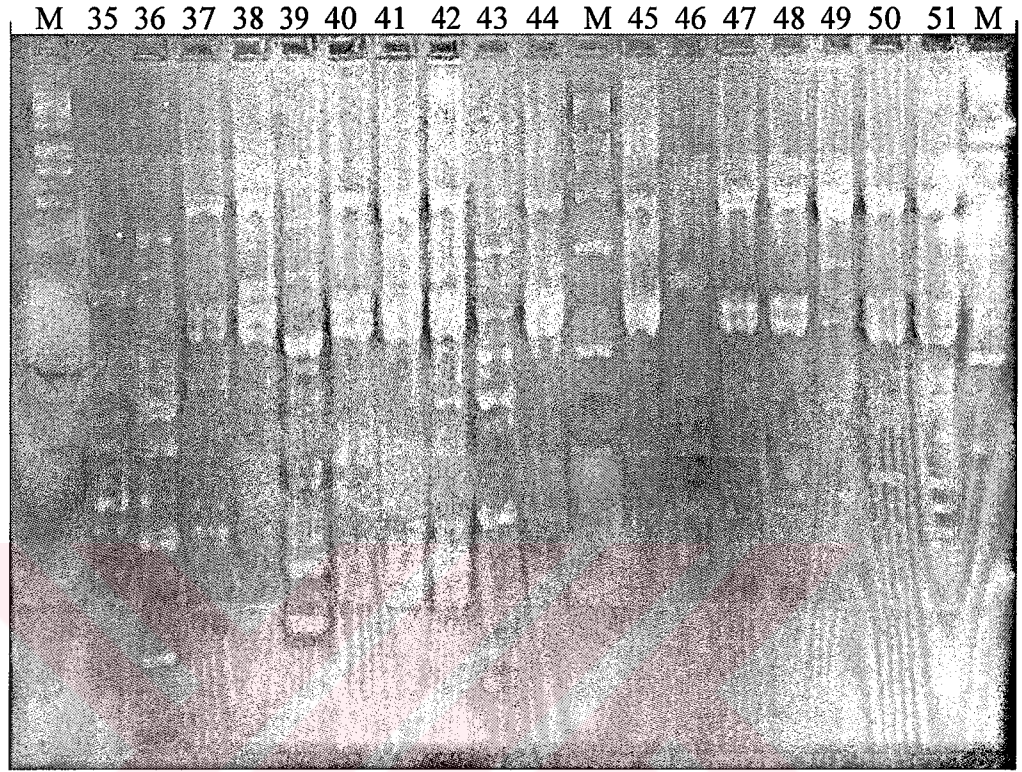
Hematoloji-Onkoloji izolatlarının AP-PCR ile tiplendirme sonuçları şekil 3 (1-17 numaralı izolatlar), şekil 4 (18-34 numaralı izolatlar), şekil 5’de (34-51 numaralı izolatlar), yoğun bakım izolatları ise şekil 6 (42-68 nolu izolatlar) ve 7’de (69-83 numaralı izolatlar) gösterilmiştir.



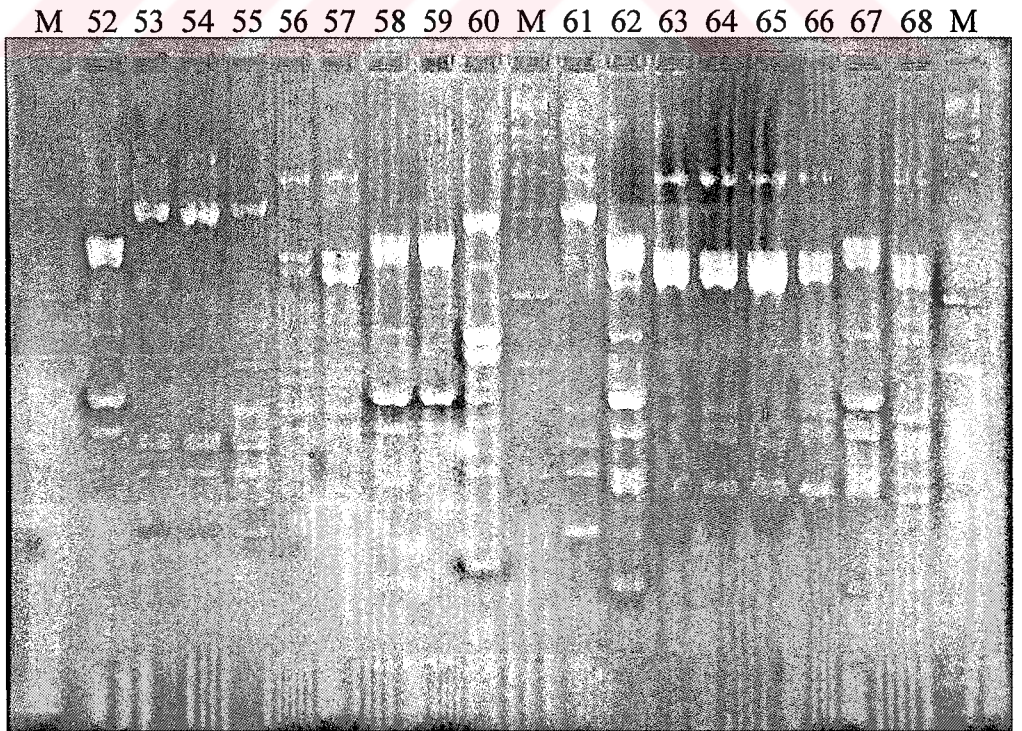
Şekil 3. Hematoloji-Onkoloji suşlarının AP-PCR sonuçları (1-17 nolu izolatlar).



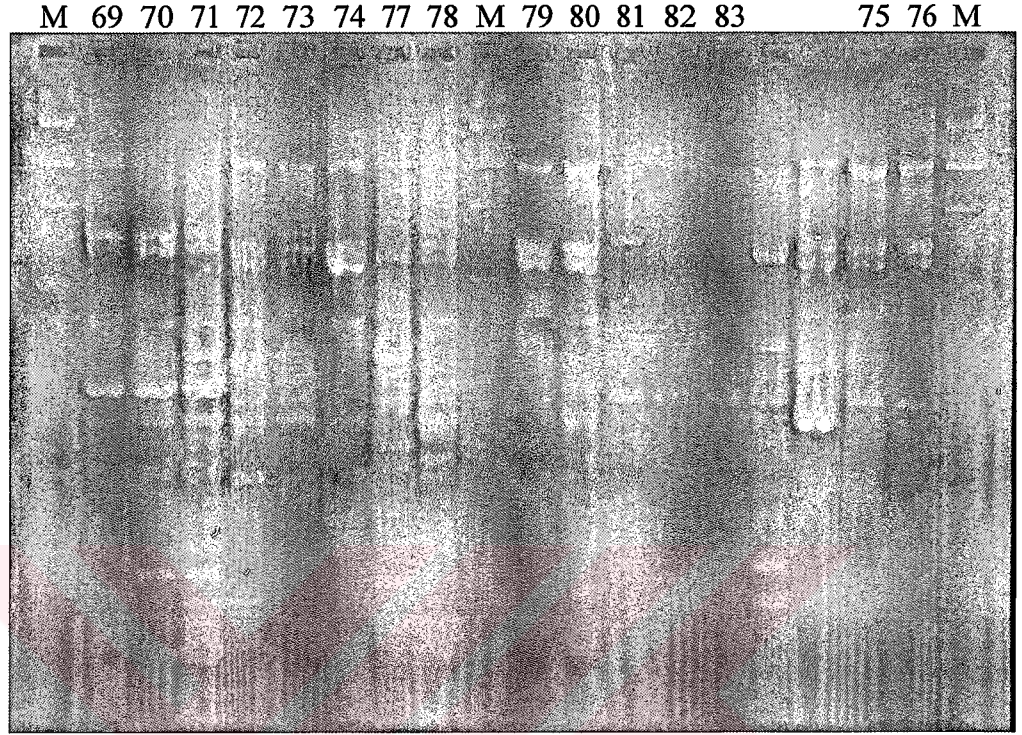
Şekil 4. Hematoloji-Onkoloji suşlarının AP-PCR sonuçları (18-34 nolu izolatlar).



Şekil 5. Hematoloji-Onkoloji suşlarının AP-PCR sonuçları (34-51 nolu izolatlar).

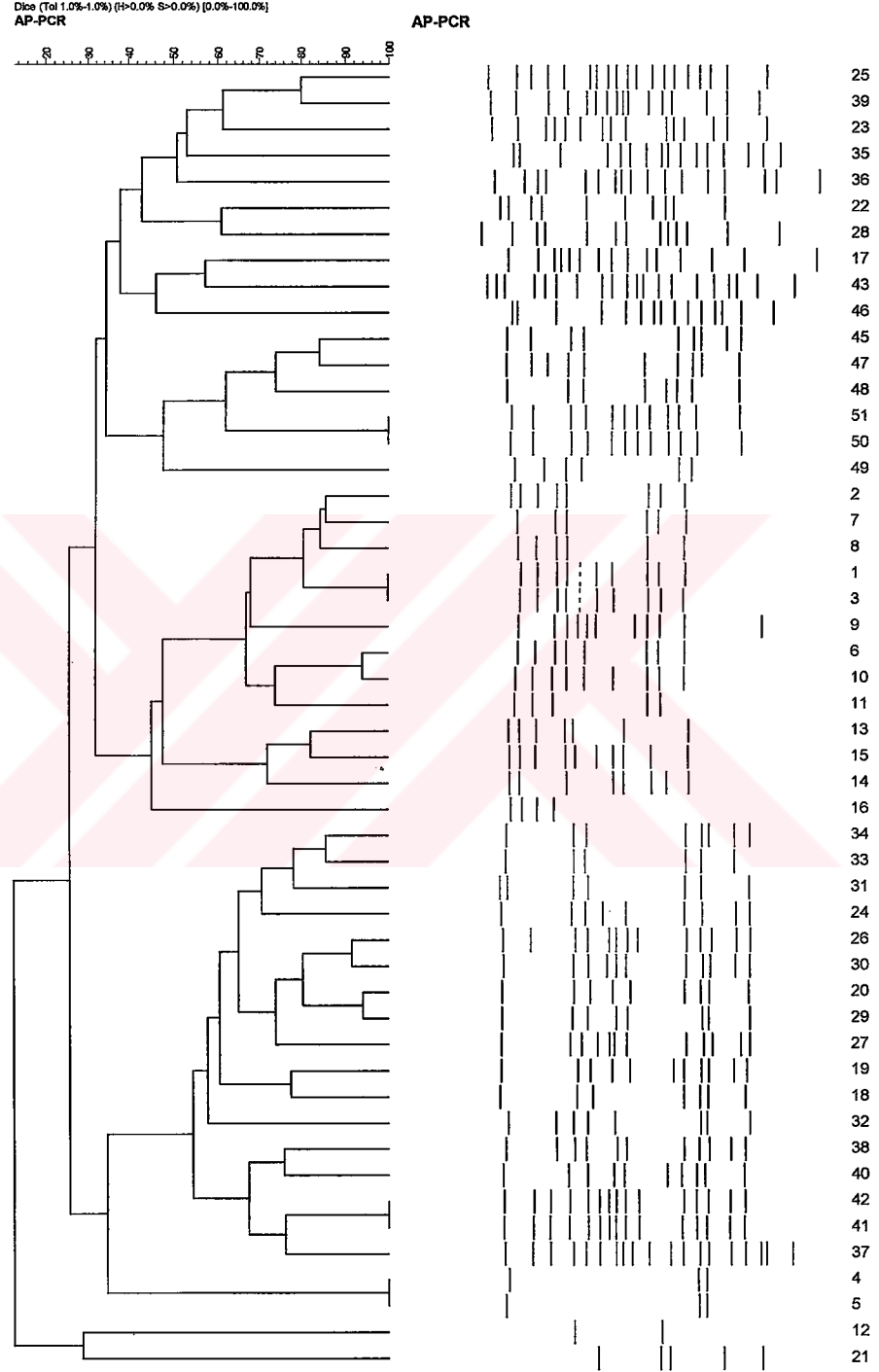


Şekil 6. Yoğun bakım suşlarının AP-PCR sonuçları (52-68 nolu izolatlar).

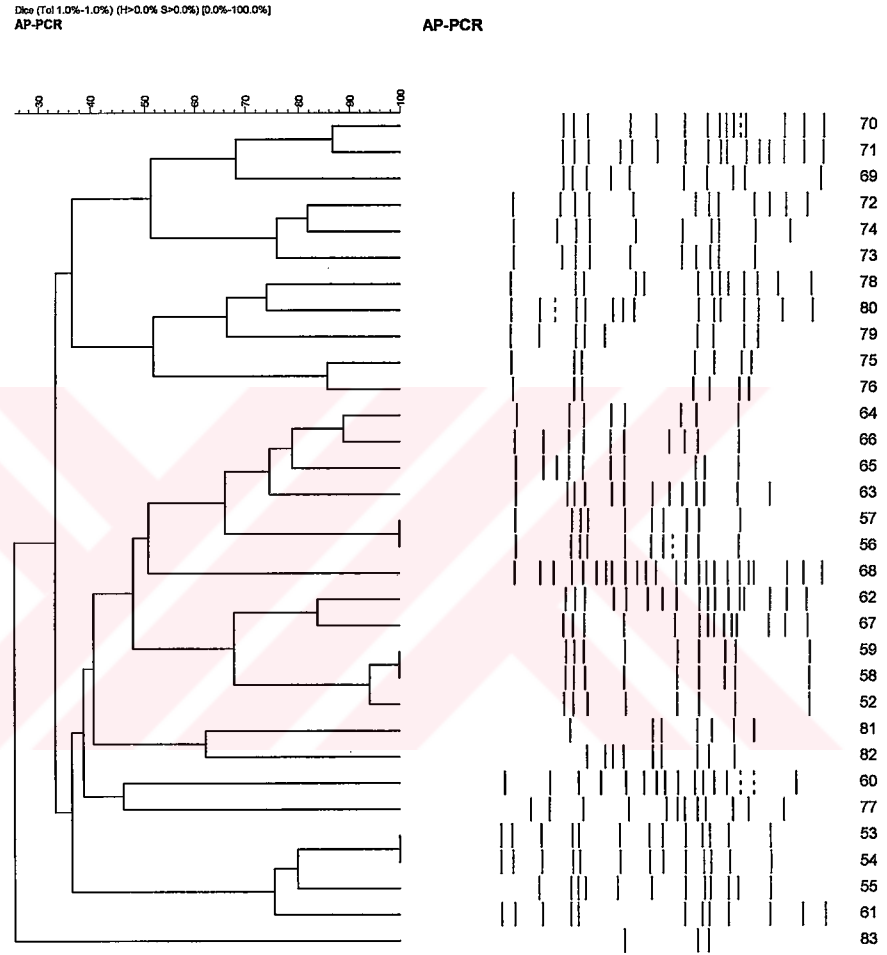


Şekil 7. Yoğun bakım suşlarının suşlarının AP-PCR sonuçları (69-83 nolu izolatlar).

Hematoloji-Onkoloji ve yoğun bakım izolatlarının GelCompar sistemiyle “Dice similarity coefficient” (benzerlik katsayısı) esas alınarak yapılan analizleri şekil 7 ve şekil 8 ’de görülmektedir. Benzerlik oranı %90-100 arasında olan suşlar aynı, %70-90 arasında olan suşlar ilişkili, kabul edilmiştir.



Şekil 8. Hematoloji-Onkoloji izolatlarının GelCompar ile “Dice Similarity Coefficient” esas alınarak elde edilen dendogramı.



Şekil 9. Yoğun bakım izolatlarının GelCompar ile “Dice Similarity Coefficient” esas alınarak elde edilen dendogramı.

Tablo 12. Hematoloji-Onkoloji suşlarının AP-PCR ile genotiplenmesi sonucu klonal ilişkili suşlar.

İzolat No	Genotip	İzolat No	Genotip
25	1	34	18
39	1a	33	18a
45	10	31	18b
47	10a	24	18c
48	10b	26,23	19
51,50	11	20,29	19a
1-3	13	27	19b
2	13a	19	20
7	13b	18	20a
8	13c	42,41	22
6,10	15	37	22a
11	15a	38	24
13	16	40	24a
15	16a		
14	16b		

Hematoloji-Onkoloji hastalarından elde edilen, toplam 43 hastaya ait 51 izolat AP-PCR ile tiplendirilmiştir. Bu yöntemle 24 farklı genotipte izolat tanımlanmıştır. Genotipik olarak aynı yada benzer olan suşlar tablo 12’de gösterilmiştir.

AP-PCR ile tiplendirme sonucunda %90-100 arasında benzerlik gösteren; 51=50 (genotip 11), 1=3 (genotip 13), 6=10 (genotip 15), 26=23 (genotip 19), 20=29 (genotip 19a) ve 42=41 (genotip 22) numaralı izolatlar aynı genotip olarak tanımlanmıştır (Şekil 8, Tablo 12). Bu izolatlardan 20=29 (genotip 19a) hariç, aynı grupta yer alan izolatlar aynı hastanın farklı örneklerinden izole edilmiş suşlardır. AP-PCR ile %70-90 arasında benzerlik gösteren suşlar klonal

ilişkili olarak değerlendirilmiştir. 18-18a-18b-18c ve 19-19a-19b-19c genotipleri klonal ilişkili bulunan en kalabalık gruplardır.

Tablo 13. Yoğun bakım suşlarının AP-PCR ile genotiplemesi sonucu klonal ilişkili suşlar.

İzolat	Genotip	İzolat	Genotip
70	1	64	7
71	1a	66	7a
72	3	65	7b
74	3a	63	7c
73	3b	57=56	8
78	4	62	10
80	4a	67	10a
75	6	59=58	11
76	6a	52	11a
		54	16
		55	16a
		61	16b

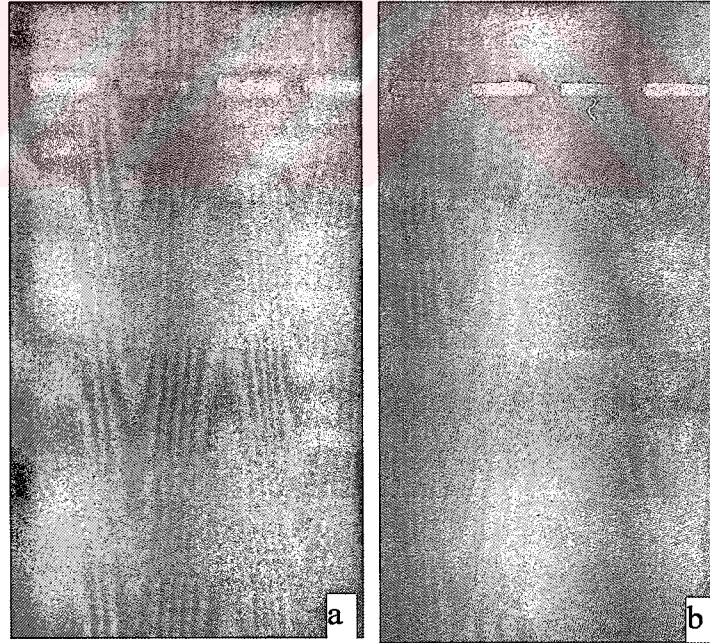
Yoğun bakım hastalarından izole edilen 32 *C. albicans* izolatu AP-PCR ile 16 farklı genotipe ayrılmıştır (Şekil 9). Genotipik olarak aynı yada benzer olanlar tablo 13’de gösterilmiştir.

57=56 (genotip 8) ve 59=58 (genotip 11) numaralı suşlar %90-100 arasında benzerlik gösterdiklerinden aynı grupta yer almışlardır. Genotip 8’e dahil olan suşlar aynı hastanın idrar ve ağız içi sürüntü örnekleridir. Genotip 11’de yer alan suşlar aynı hastanın burun sürüntüsü ve sonda ucundan izole edilmiştir.

AP-PCR sonuçlarına göre %70-90 arasında benzerlik bulunan en kalabalık grup, genotip 7, 7a, 7b, 7c’dir. Bu izolatların hiç biri aynı hastaya ait değildi.

II-PFGE- Elektroforetik Karyotiplendirme

C. albicans izolatlarının jel içerisinde ekstraksiyonlarından sonra, PFGE sistemiyle elektroforez için kaynaklar gözden geçirilerek verilen akımın farklı başlangıç-bitiş zamanları, akım ve elektroforez süreleri denendi. Kaynaklar göz önüne alınarak yapılan 48 saatlik, 90-300 saniye, 6 V/cm², 0.5X'lik TBE (0.1 M Tris, 0.09M Boric acid, 0.01 M EDTA) tamponundaki (şekil 10a) ve 53 saatlik (130 saniye 140 V 20 saat, 300 saniye 150 V 14 saat, 300 saniye 110 V 22 saat olmak üzere) 0.5X'lik TBE (0.089 M Tris, 0.089 M Boric acid, 0.0025 M EDTA) tamponundaki elektroforez sonuçlarında bantların fotoğraflanamayacak kadar silik olduğu gözlemlendi (Şekil 10b).



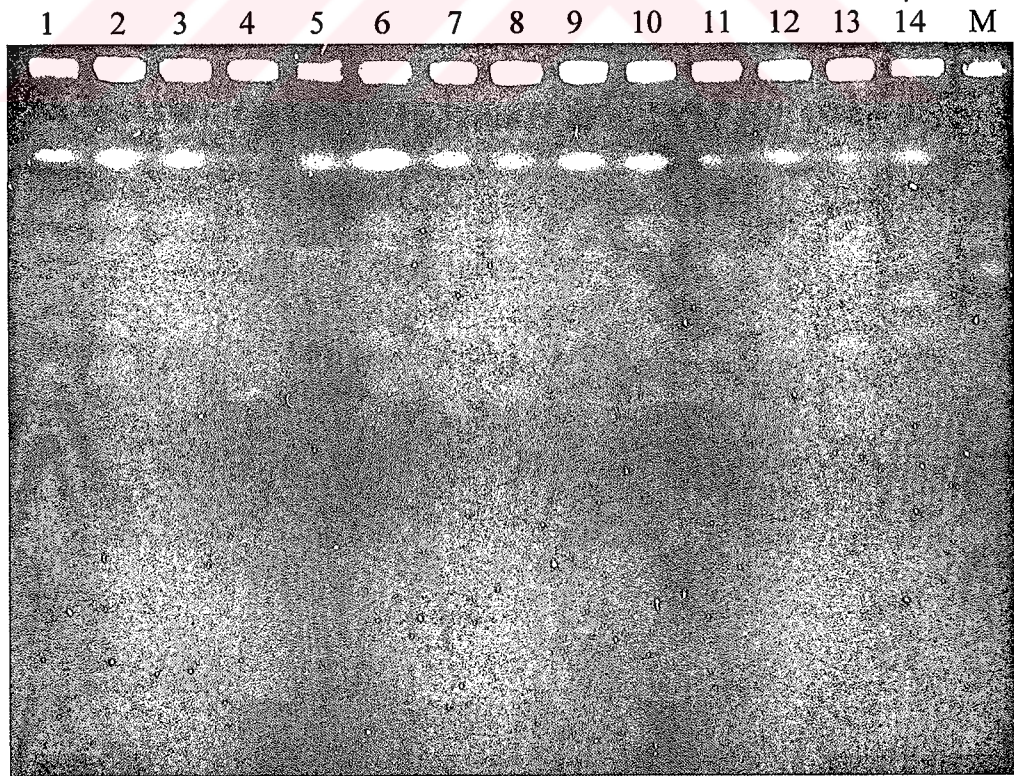
Şekil 10. a- 48 saatlik, 90-300 saniye, 6 V/cm²
b- 130 saniye 140 V 20 saat, 300 saniye 150 V 14 saat,
300 saniye 110 V 22 saat olmak üzere toplam 56 saat

Bunun üzerine kaynak bilgileri modifiye edilerek elektroforez koşulları; 90-360 saniye (başlangıç-bitiş zamanı), 3.5V/cm² akımda, 36 saat

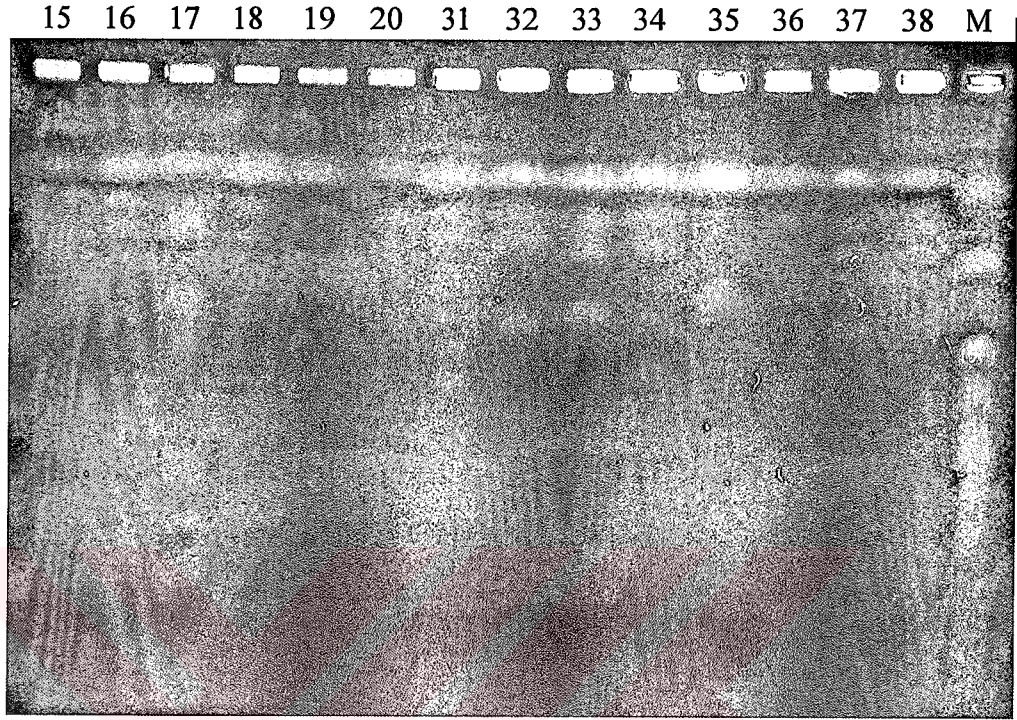
olarak değiştirildi. Elektroforezden sonra, jel 0.5 µg/ml'lik etidium bromid ile 15 dakika boyandı. Karyotiplendirme için en iyi sonuç bu koşullardaki elektroforezde elde edildi. Bant büyüklüklerinin karşılaştırılması için 50-2250 Kb'lık Pulse Marker (Sigma) kullanıldı.

Daha sonra Nikon Coolpix 995 ile fotoğraf çekildi ve resimler GelCompar II programına aktarılarak bant analizleri yapıldı. Elektroforetik karyotiplendirmede izolatlar, tek bir bant farkında bile ayrı suş olarak değerlendirildi.

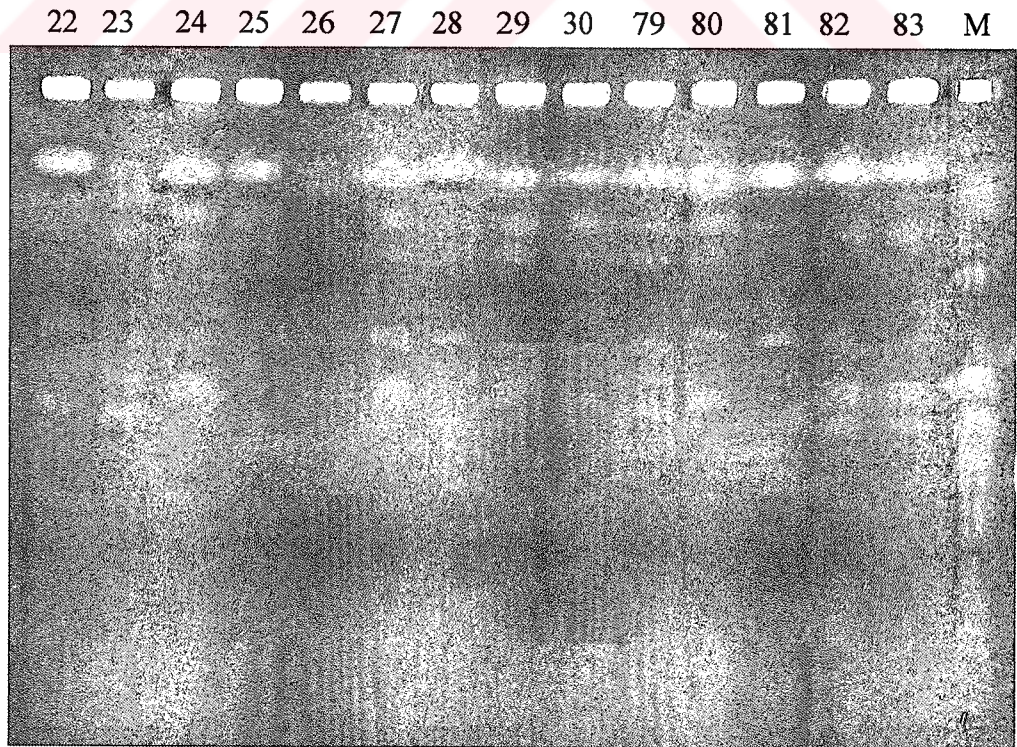
Hematoloji-Onkoloji ve yoğun bakım suşlarının, PFGE kullanılarak yapılan elektroforetik karyotiplendirme sonuçları şekil 11, 12, 13, 14, 15 ve 16'da gösterilmiştir.



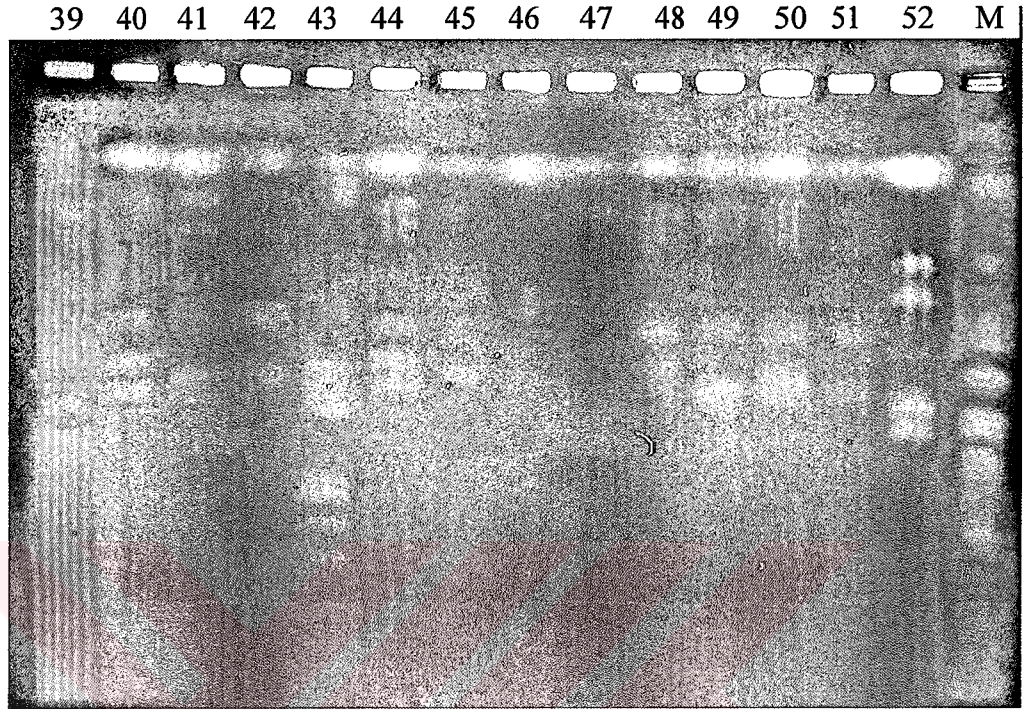
Şekil 11. Hematoloji-Onkoloji suşlarının PFGE-Karyotiplendirme sonuçları (1-14 nolu izolatlar)



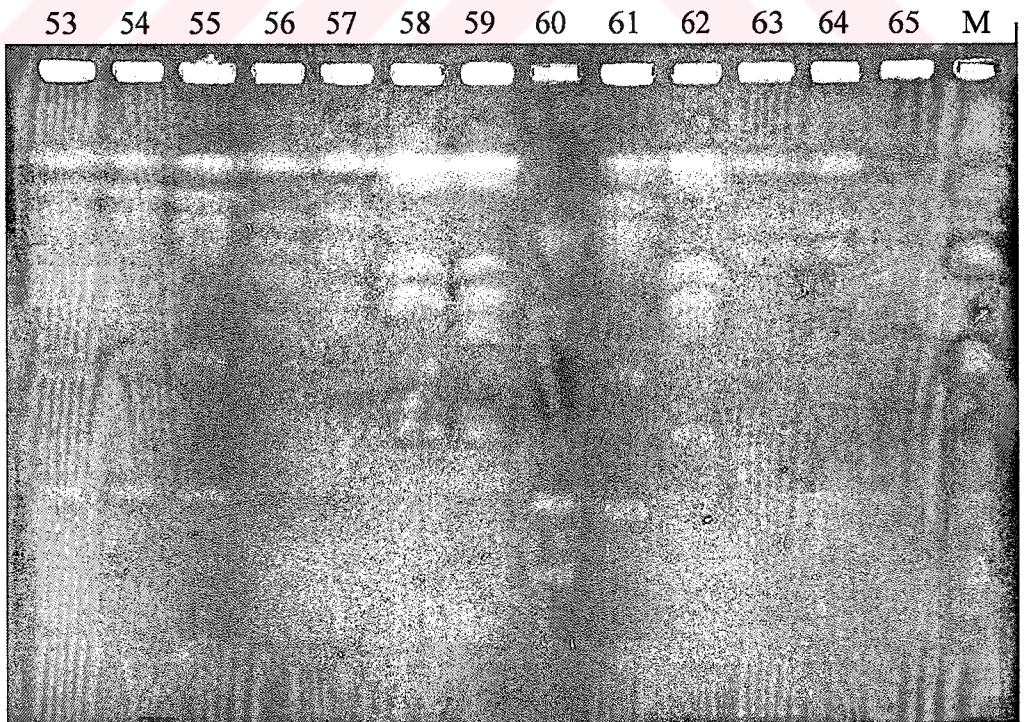
Şekil 12 . Hematoloji-Onkoloji suşlarının PFGE-Karyotiplendirme sonuçları
(15-20 ve 31-38 nolu izolatlar)



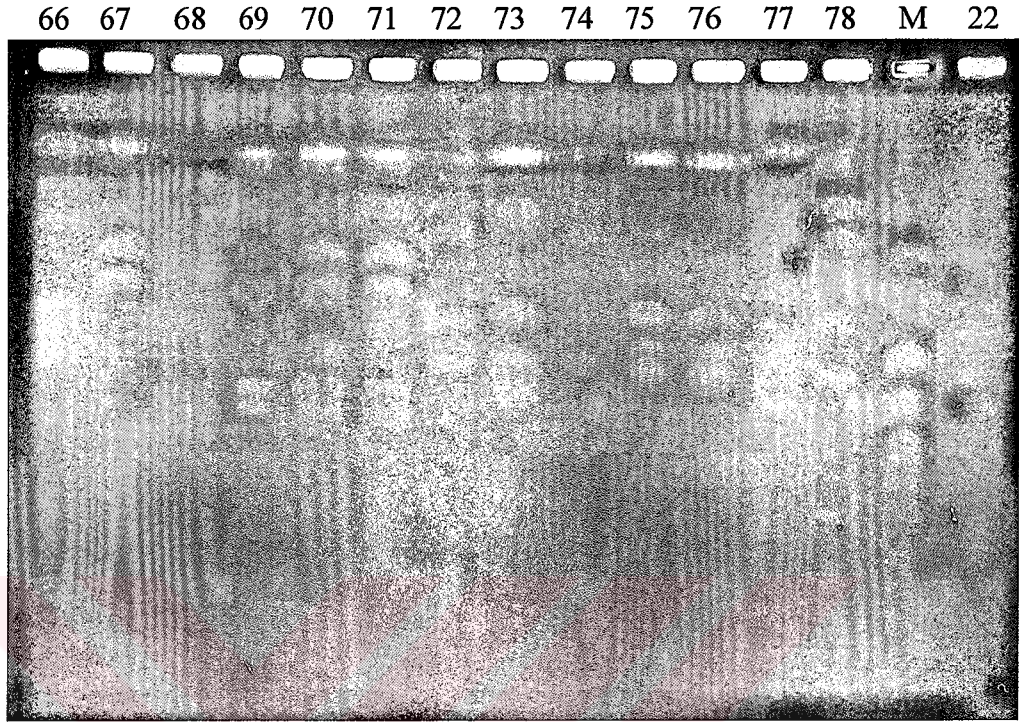
Şekil 13. 22-30 arası nolu izolatlar Hematoloji-Onkoloji suşlarının,
79-83nolu izolatlar Yoğun Bakım suşlarının PFGE-Karyotiplendirme sonuçları.



Şekil 14. Hematoloji-Onkoloji suşlarının karyotiplendirme sonuçları.
(39-52 nolu izolatlar)



Şekil 15. Yoğun bakım suşlarının karyotiplendirme sonuçları (53-65 nolu izolatlar)



Şekil 16. Yoğun Bakım suşlarının PFGE-Karyotiplendirme sonuçları
(66-78 nolu izolatlar) (22 nolu izolat Hematoloji-onkoloji suşu)

Tablo 14. PFGE-EK ile aynı olan Hematoloji-Onkoloji suşları.

İzolat	Genotip
51=50	1
25=27	7
41=42	26
1=3	29
15=16	33
36=37	42

PFGE-EK tiplendirme yöntemi ile aynı bulunan suşlar tablo 14'te gösterilmiştir. Buna göre 51=50 (genotip 1), 25=27 (genotip 7), 41=42 (genotip 26), 1=3 (genotip 29), 15=16 (genotip 33) ve 36=37 (genotip 42) numaralı izolatlar aynı olarak bulunmuştur.

Tablo 15. PFGE-EK ile aynı olan yoğun bakım suşları.

İzolat	Genotip
75-76	1
53-54	4
83-82	10
64-65	11

PFGE-EK tiplendirme ile aynı bulunan yoğun bakım suşları tablo 15’de gösterilmiştir. Yoğun bakım hasatlarından izole edilen 75-76 (genotip 1), 53-54 (genotip 4), 83-82 (genotip 10) ve 64-68 (genotip 11) numaralı izolatlar aynı bulunmuştur.

III-Klasik epidemiyolojik bilgiler, AP-PCR ve PFGE-EK yöntemlerinin karşılaştırılması

İncelenen suşların AP-PCR, PFGE-EK ve klasik epidemiyolojik gruplandırma sonuçları karşılaştırıldı (Tablo 16). Klasik epidemiyolojik gruplandırma, farklı hastalardan izole edilen *C. albicans* suşları için değerlendirilmiştir.

Hematoloji-Onkoloji hastalarında EK ile aynı genotipte çıkan 50-51, 1-3 ve 41-42 numaralı izolatlar AP-PCR ile de aynı genotip içerisinde yer almışlardır.

41 ve 42 (genotip 22) numaralı izolatlar aynı hastaya ait farklı örneklerdir. AP-PCR ile farklı hastalara ait 37, 38 ve 40. numaralı (genotip 22a, 22b, 22c) izolatlar, 41 ve 42 numaralı izolatlarla ilişkili bulunmuştur. Bu izolatlar klasik epidemiyolojik gruplandırmada da aynı grup içinde yer almışlardır. Ancak PFGE-EK ile 37, 38 ve 40 numaralı izolatlar 41=42 numaralı izolatlardan genotipik olarak farklı bulunmuştur (Tablo 16).

PFGE-EK ile aynı genotipte yer alan ve aynı hastaların farklı örneklerinden izole edilen 25=27, 37=36 numaralı izolatlar AP-PCR ile

birbirlerinden tamamen farklı bulunmuştur. EK ile aynı bulunan 15 ve 16 numaralı suşlardan 16 nolu suş yeterli bant sağlayamadığından AP-PCR ile tiplendirilememiştir.

Tablo 16- Hematoloji-Onkoloji izolatlarının AP-PCR, PFGE-EK ve klasik epidemiyolojik gruplandırma sonuçlarının karşılaştırılması.

İzolat	AP-PCR Genotip	PFGE-EK Genotip	Klasik epidemiyolojik gruplandırma
25	1	7	I
39	1a	28	J
45	10	27	I
47	10a	13	M
48	10b	3	M
51	11	1	D
50	11	1	D
1	13	29	G
3	13	29	K
2	13a	30	G
7	13b	14	E
8	13c	18	E
6	15	15	F
10	15	19	F
11	15a	20	D
13	16a	23	G
15	16b	33	F
14	16c	21	F
34	18a	40	P
33	18b	8	L
31	18c	41	L
24	18d	2	H
23	19	31	I
26	19	37	K
29	19a	4	M
27	19b	7	I
19	20a	9	A
18	20b	10	B
41	22	26	P
42	22	26	P
37	22a	42	P
38	24a	43	P
40	24b	32	R
16	--	33	F
36	4	42	P

Yoğun bakım izolatları incelendiğinde, 53 ve 54 numaralı izolatlar PFGE-EK ve AP-PCR ile aynı genotipte bulunmuşlardır. PFGE-EK ile genotipik olarak aynı bulunan 75 ve 76 numaralı suşlar AP-PCR ile klonal ilişkili bulunmuştur. PFGE-EK ile aynı genotipte yer alan 82 ve 83 numaralı izolatlardan 83 numaralı izolat yeterli bant sayısı elde edilemediğinden AP-PCR ile tiplendirilememiştir. AP-PCR ile genotipik olarak aynı bulunan 57 ve 56, 59 ve 58 numaralı izolatlar PFGE-EK ile farklı bulunmuşlardır.

Tablo 17- Yoğun Bakım izolatlarının AP-PCR, PFGE-EK ve klasik epidemiyolojik gruplandırma sonuçlarının karşılaştırılması.

İzolat	AP-PCR Genotip	PFGE-EK Genotip	Klasik epidemiyolojik gruplandırma
70	1	21	D
71	1a	23	D
72	3	2	E
74	3a	3	E
73	3b	6	E
78	4	13	E
80	4a	8	E
75	6	1	E
76	6a	1	E
64	7	11	E
66	7a	29	D
65	7b	16	D
63	7c	11	C
57	8	14	A
56	8	15	A
62	10	18	A
67	10a	24	D
59	11	17	A
58	11	19	A
52	11a	25	A
53	16	4	A
54	16	4	A
55	16a	5	A
61	16b	26	A
83	---	10	E
82	13	10	E

Yöntemlerin ayırım gücü (Diskriminasyon):

Hunter ve Gaston'un ⁶⁴ geliştirdikleri matematiksel formül kullanılarak, AP-PCR ve PFGE-EK yöntemlerinin ayırım güçleri hesaplandı. Yapılan hesaplama sonucunda her iki yöntemin ayırım gücü de yüksek bulundu (AP-PCR D=0.999, PFGE-EK D=0.999).



TARTIŞMA

Candida türleri insanlarda enfeksiyon oluşturabilen en yaygın fungal patojendir. Bu organizmalar invaziv olmayan yüzeysel enfeksiyonlardan, derin dokuları tutan sistemik enfeksiyonlara kadar geniş hastalık spektrumuna sebep olurlar. Yüzeysel kandidoz ağız boşluğu, farinks, özafagus, barsaklar, mesane ve vajinayı kapsayan mukozalar ve epidermis ile ilgiliyken; derin kandidozun sıklıkla görüldüğü organlar böbrekler, karaciğer, dalak, beyin, gözler ve kalptir ⁶⁶.

İkiyüzü aşkın *Candida* türü içerisinde, enfeksiyonlardan en sık izole edilen tür *C. albicans*'tır. Enfeksiyonlardan izole edilen diğer türler ise *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. dublinensis* ve *C. glabrata*'dır ⁶⁷.

Nozokomiyal enfeksiyonlar içerisinde *Candida*'lar önemli bir yer tutar ve yüksek morbidite ve mortalite nedenidirler ^{21,23,24,68}. *Candida* enfeksiyonlarının klinik öneminin bilinmesine rağmen kolonizasyon ve enfeksiyonun patogenezi, geçiş şekli ve epidemiyolojisi konusunda bilinenler sınırlıdır ⁹. Normal florada yer almayan etkenleri epidemiyolojik çalışmalarda tür düzeyinde saptamak genellikle yeterli olmaktadır. Ancak normal flora veya çevrenin üyesi olan *C. albicans* gibi mikroorganizmaları tür düzeyinde tanımlamak, etken organizmanın kaynağını izlemek, kolonizasyon ve enfeksiyon arasındaki ayrım için oldukça yetersiz kalır. Bu yüzden bu tür organizmaların epidemiyolojik çalışmaları için tür düzeyinin de altında tiplendirmeye gereksinim vardır ³².

C. albicans için ideal bir tiplendirme yöntemi henüz yoktur. Kullanılan yöntemlerin avantajları ve dezavantajları söz konusudur. Kullanılan tiplendirme yönteminin başarısı tekrarlanabilirliğine ve ayırım gücünün yüksek olmasına bağlıdır. *C. albicans* için bir çok tiplendirme yöntemi olmasına karşın henüz standart bir yöntem bulunmamaktadır.

Candida'ları tiplendirmede kullanılan fenotipik yöntemler; serotiplendirme, morfoliplendirme, rezistotiplendirme, biyotiplendirme, öldürücü maya tiplendirmesi, hücresel proteinlerin analizi, immunblot fingerprinting ve multilokus enzim elektroforezidir^{9,34,38,43,69,70}. Ancak bu yöntemlerin ayırım gücü çoğunlukla yetersiz kalmakta ve izolatların birbiri ile genetik olarak ilişkili olup olmadığını ayırt edememektedir⁶⁶.

Moleküler ve genetik tiplendirme yöntemlerinin uygulama alanına sokulması ile fenotipik yöntemlerin yetersiz ayırım gücünden kaynaklanan dezavantajları ortadan kaldırılmıştır⁶⁶. *C. albicans*'ın tiplendirilmesinde genotipik yöntemler oldukça başarılı bulunmuştur⁷¹.

Moleküler tiplendirme yöntemlerinin sayısı her geçen gün artmaktadır. Fakat "altın standart" denilebilecek bir yöntem belirlenememiştir⁷². Sıklıkla kullanılan yöntemler, AP-PCR (RAPD), PFGE-EK, PCR-RFLP, PFGE-REA, Sourthen hibridizasyon analizleridir. Bu yöntemler arasından hangisinin kullanılacağı, yöntemin ayırım gücü, tekrarlanabilirliği, kullanım kolaylığı, kurulum maliyeti, testin süresi ve yorumlama kolaylığı gibi bazı kriterler göz önünde bulundurularak karar verilir⁶⁶. Bununla birlikte epidemiyolojik çalışmalar

için birden fazla moleküler yöntemin birlikte kullanılmasını öneren yayınlar da bulunmaktadır^{21,73}.

Epidemiyolojik tiplendirme amacıyla en çok başvuru alan yöntemlerden biri olan AP-PCR tekniğinde mikroorganizma genomu, bir veya daha fazla primerle rastgele çoğaltılır ve ortaya çıkan patern farklılıkları değerlendirilir. Kullanılan primerler genellikle 9-10 bazlık kısa primerler olup G-C'ce zengindir^{50,66}. Kullanılan primerler tiplendirilecek mikroorganizmanın genom bilgisine gerek olmadan rastgele seçilebileceği gibi, genom üzerindeki belli bölgelere yönelik bilinçli olarak da seçilebilir. *C. albicans*'ın tiplendirilmesinde AP-PCR yöntemi, kolay uygulanabilir olması ve kısa sürede sonuç vermesi gibi özellikleri nedeniyle diğer yöntemlere göre daha avantajlı gözükmemekte ve sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir^{66,74,75}.

AP-PCR ile tiplendirmede yöntemin ayırıcı gücü kullanılan primerlere göre değişmektedir. Yapılan çalışmalarda *Candida*'ların tiplendirilmesi için sıklıkla kullanılan primerler, OBU1-OBU-2-OBU3, RSD11-RSD-12, ERIC1-ERIC2, OPBO1-OPBO20-OPG10, PC1-PC2 ve M13 primerleridir^{21,76-79}. Ülkemizde yapılan iki çalışmada Cnd3-Cnd-4 ve ERIC1-ERIC-2 primerleri kullanılmıştır^{74,80}. Bizde bu çalışmamızda *C. albicans* suşlarını tiplendirmek için ayırıcı gücü yüksek olarak bildirilen⁸¹⁻⁸³ M13 primerini tercih ettik.

AP-PCR uygulaması için farklı DNA ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde mantar hücre duvarını parçalamak için Lyticase ve Proteinaz K gibi enzimler kullanılmakta, bu da hem süreyi hem de maliyeti arttırmaktadır^{21,78,84}. Çalışmamızda, Akada ve arkadaşlarının⁶⁰ mantarların

PCR'ı için kullandıkları ekstraksiyon yöntemini modifiye ederek ilk kez epidemiyolojik bir çalışmada kullandık. Bu yöntemde mantar hücre duvarını parçalayarak genomik DNA'yı tahrip etmeden elde etmek için %1'lik SDS kullandık. DNA saflaştırması için fenol-kloroform, çöktürme ve yıkama için etanol kullanılmıştır. Herhangi bir enzim kullanmadığımız için yöntemin uygulama süresi kısa ve maliyeti oldukça düşüktür. Buna karşın ekstraksiyondan sonra ölçtüğümüz DNA miktarları AP-PCR uygulaması için yeterli düzeyde (500-1000 ng/ml) bulunmuştur.

C. albicans'ın tiplendirilmesi için M13 primerleri ile yapılan AP-PCR çalışmalarında ortalama 7-15 bant elde edildiği belirtilmektedir ^{81,85,86}. Yaptığımız çalışmada 10-16 arasında bant elde edilmiş ve elde edilen bant sayısı suşları tiplendirmek için yeterli bulunmuştur. 4,5,12,21,83 numaralı izolatlar, iki kere çalışılmasına rağmen yeterli bant sayısı elde edilemediğinden çalışmaya dahil edilmemiştir.

Hematoloji-Onkoloji hastalarından elde edilen toplam 43 hastaya ait 51 izolat AP-PCR ile tiplendirilmiştir. Bu yöntemle 24 farklı genotipte izolat tanımlanmıştır. Yoğun bakım hastalarının AP-PCR ile tiplendirilmesinde ise 32 izolat 16 farklı genotipe ayrılmıştır.

Çalışmamızda bir diğer moleküler tiplendirme yöntemi olarak da elektroforetik karyotiplendirme kullanılmıştır. Elli kilobaz üzerindeki DNA elektroforetik olarak ayrılmaz olarak bilinirken, 1984 yılında geliştirilen PFGE sistemi ile kromozom büyüklüğündeki DNA molekülünün genetik ayrımı (elektroforetik karyotiplendirme) gösterilebilmiştir ³². Elektroforetik karyotip

analizi (EK), kromozomlardaki büyüklük değişimlerinin pulsed field elektroforez ile değerlendirilmesi temeline dayanır. Elektroforetik karyotip analizi, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. galbarata*, *C. neoformans*, *C. immitis* ve *H. capsulatum* için kullanılmıştır ⁸⁷.

Magee ve arkadaşlarının 1987 yılında yaptıkları bir çalışmada dört *C. albicans* suşunu karyotiplendirdiklerinde 5-7 DNA bandı elde etmişler ve her suşun farklı DNA paternini göstermişlerdir ⁸⁸. Yapılan bir başka çalışmada 17 hastadan izole edilen *C. albicans* suşlarının karyotiplendirilmesinde 6-9 band elde edilmiş ve 14 farklı karyotip belirlenmiştir ⁸⁹. Bütün bu çalışmaların sonucunda elektroforetik karyotiplendirme yönteminin suş ayrımı için yeterli varyasyon gösterdiği ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabileceği bildirilmiştir. Yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda elektroforetik karyotiplendirme analizinin, tekrarlanabilirliği yüksek, duyarlı ve yorumlaması kolay bir yöntem olduğu bildirilmiştir ^{6,69}.

PFGE-Karyotiplendirme analizlerinde yeterli sayıda bant sağlanabilmesi için belirleyici unsurun elektroforez şartları ve süresinin olduğu belirtilmektedir. Ayrıca elektroforez koşulları için herhangi bir standart protokol de yoktur. Bu çalışmada, en iyi sonucu 90-360 saniye, 3.5 V/cm², 0.5X TBE ve 36 saatte elde ettik. Tiplendirme sonucunda sıklıkla 4-9 bant elde edilmiştir. Elektroforetik karyotiplendirmede suşlar arasındaki tek bir band farklılığı bile, suşların birbirlerinden tamamen farklı olduğunu göstermektedir ^{87,90}.

Bu çalışmada; PFGE-Karyotiplendirme yöntemi ile Hematoloji-Onkoloji hastalarından izole edilen 51 suş 45 farklı genotipe, yoğun bakım

hastalarından izole edilen 32 suş ise 28 farklı genotipe ayrılmıştır. Elektroforetik karyotiplendirme ve AP-PCR'ın ayırım gücü yüksek bulunmuştur. Her iki yöntemin de ayrılabilirlik indeksi $D=0.999$ olarak bulunmuştur. Hematoloji-Onkoloji hastalarında EK ile aynı genotipte çıkan 50=51, 1=3 ve 41=42 numaralı izolatlar AP-PCR ile de aynı genotip içerisinde yer almışlardır (Tablo 16).

Her iki yöntemle de aynı bulunan bu izolatlar incelendiğinde; 50 ve 51 numaralı izolat aynı hastaya ait aynı zamanda alınmış balgam ve gaita örneklerinden izole edilmiş suşlardır. Bir başka hastadan elde edilen 1 ve 3 numaralı izolatlar hastanın 5 ay arayla alınmış ağız içi plak ve balgam örneklerinden izole edilmiş suşlardır. 41 ve 42 numaralı izolatlar da bir hastanın yara (protez) ve ağız içi plak örneklerinden izole edilmiş suşlardır.

EK ile aynı bulunan 15 ve 16 numaralı suşlardan 16 nolu suş yeterli bant sağlayamadığından AP-PCR ile tiplendirilememiştir. Bu suşlar aynı hastanın ağız içi plak ve balgam numunelerinden izole edilmiştir.

Buna karşın EK ile aynı genotipte yer alan 25 ve 27, 37 ve 36 numaralı izolatlar AP-PCR ile birbirlerinden tamamen farklı bulunmuştur. Bu izolatlar birbirinden farklı hastalardan elde edilmiştir. 25 ve 27 numaralı izolatlar ağız içi plak numunelerinden, 37 numaralı izolat yara (anal sürüntü) ve 36 numaralı izolat ise gaita örneklerinden izole edilmiştir.

AP-PCR ile aynı bulunan 6 ve 10, 23 ve 26 numaralı izolatlar EK ile farklı genotipe bulunmuşlardır. 6 ve 10 numaralı izolatlar aynı hastadan izole edilmiş ağız içi plak ve gaita numunelerine aittir. 23-26 numaralı izolatlar ise yine aynı hastadan izole edilmiş balgam ve ağız içi plak numunelerine aittir.

Yoğun bakım hastalarından izole edilen suşların karşılaştırılmasında EK ile aynı genotipte yer alan 53 ve 54 numaralı izolatlar AP-PCR ile de aynı bulunmuşlardır. EK ile aynı genotipte bulunan 75 ve 76 numaralı suşlar AP-PCR ile klonal olarak ilişkili bulunmuştur. EK ile aynı genotipte yer alan 82 ve 83 numaralı izolatlardan 83 numaralı izolat yeterli bant sayısı elde edilemediğinden AP-PCR ile tiplendirilememiştir.

AP-PCR ile aynı bulunan 57=56 ve 59=58 numaralı izolatlar PFGE- EK ile farklı genotipte bulunmuşlardır.

Hem Yoğun Bakım hastalarından hem de Hematoloji-Onkoloji izolatlarının AP-PCR ile tiplendirilmesinde, aynı olmayan fakat klonal olarak ilişkili suşlar bulunmuştur (Tablo 16, 17). Klonal olarak ilişkili bulunan suşların biri dışında hepsi EK ile farklı bulunmuşlardır.

Her iki yöntemin de ayırım gücü yüksek olarak bulunmuştur. Ancak her iki grup da, EK yöntemi ile daha fazla genotipe ayrılmıştır. Bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak, EK analizi ile AP-PCR'ın karşılaştırıldığı bir çalışmada EK analizi ile daha fazla genotip tanımlanmış ve EK *Candida* suşları arasındaki değişiklikleri belirlemede faydalı bir yöntem olarak tanımlanmıştır⁹¹. Bizim de kullandığımız M13 primeri ile yapılan AP-PCR ve EK analizinin karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada yine EK'nın ayırım gücü daha yüksek bulunmuştur⁷⁸. Elektroforetik karyotiplendirmenin RFLP ile karşılaştırılmasının yapıldığı bir çalışmada, EK tekrarlanabilirliği yüksek, yorumlaması RFLP'den daha kolay bir yöntem olarak tanımlanmıştır⁶⁹. Barton ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da EK'nın epidemiyolojik çalışmalarda tek başına kullanılabileceği

belirtilmiştir ⁹². Buna rağmen PFGE-EK, AP-PCR ve RFLP'nin karşılaştırıldığı bir çalışmada, en düşük ayırım derecesine sahip yöntem olarak EK bulunmuştur. Otuz sekiz izolatın tiplendirildiği bu çalışmada, RFLP ile 22, AP-PCR ile 34 ve EK ile 19 farklı suş tanımlanmıştır ⁸⁶. Bunun yanında her iki yöntemin sonuçlarının uyumlu olduğunu bildiren çalışmalar da vardır ⁸¹. Aile üyelerinden izole edilen *C. albicans* izolatlarının benzerliğinin araştırıldığı bir çalışmada REA, AP-PCR ve PFGE-EK kullanılmış ve her üç yönteminde ayırım gücünün yüksek ve sonuçların benzer olduğu belirtilmiştir ⁴⁹.

Elektroforetik karyotiplendirme ve AP-PCR'ın ayırım güçleri ile ilgili farklı sonuçlar elde edilmesinin nedeni, her iki yöntemin de standardize olamayışından kaynaklanıyor olabilir. AP-PCR yönteminin dezavantajı, sadece laboratuvarlar arası değil, aynı laboratuvar içinde dahi tekrarlanabilirliğinin düşük olmasıdır. Primer kalıp konsantrasyonlarındaki farklılıklar, amplifikasyon reaksiyonlarındaki ısı ve MgCl₂ miktarı değişiklikleri ve thermocycler cihazı farklılıkları gibi nedenler AP-PCR paternlerini etkileyebilir ⁷⁴. Buna karşın bir çok çalışmada EK tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü yüksek bir metod olarak tanımlanmıştır ^{64, 87, 90, 93-95}.

Candida türlerinin tiplendirilmesinde kullanılan DNA tabanlı tiplendirme yöntemlerinin laboratuvarlar arası uyumunun incelendiği bir çalışmada, 3 farklı laboratuvarın EK analizi sonuçları *C. albicans* için %87 uyumlu bulunmuştur ⁹⁶. Ancak AP-PCR ile yapılan çalışmalarda, başta primer seçimi olmak üzere yöntemin ayırım gücünü değiştirecek bir çok farklılıklar gözlenmiştir.

Ancak yapılan bir çalışmada EK analizinde görülen bant farklılıklarının her zaman farklı bir suşu göstermeyeceği bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre, aynı suşun kromozomlarının yeniden düzenlenmesi ile de farklı EK paternleri oluşabilir. Bu tip durumlarda EK analizinden sonra, klonal ilişkileri gösterebilen AP-PCR yönteminin kullanılması önerilmektedir ⁹².

Nozokomiyal kandidozun kontrolünde ve önlenmesinde enfeksiyonun endojen veya ekzojen kaynaklı olduğu göz önüne alınması gereken önemli bir noktadır ²⁴. Çoğu nozokomiyal kandidozun endojen kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Özellikle ağız, barsak, vajen veya deri gibi kaynak olabilecek yerlere kolonizasyon söz konusudur. *Candida* türleri ile kolonizasyon olması, invaziv kandidoz gelişimi için önemli bir risk faktörü olarak gösterilmiştir ⁵¹.

Çalışmamızda, AP-PCR ve EK ile yaptığımız tiplendirme sonuçlarına göre *C. albicans* enfeksiyonlarında endojen flora ile bulaşın oldukça önemli olduğu görülmüştür.

Hastanede yatan hastalarda endojen kaynaklı *Candida* enfeksiyonunun delili, hastanın farklı vücut bölgelerinden aynı *C. albicans* izolatının izole edilmesidir ²⁴. Yaptığımız çalışmada tiplendirme yöntemleri ile aynı bulunan 50-51, 41-42 ve 6-10-11 numaralı izolatların sonuçları endojen flora ile enfeksiyonu doğrulamaktadır.

Hematoloji-Onkoloji hastalarının sonuçları incelendiğinde; genotipik olarak aynı olan 50 ve 51 numaralı izolatlar, aynı hastanın balgam ve gaita örneklerinden izole edilmiştir. Yine bir hastanın, yara yeri ve protezinden

Üretilen *C. albicans* (izolat 41) ile aēız iēi plaēından üretilen *C. albicans* (izolat 42) aynı genotipte bulunmuştur.

AP-PCR ile aynı genotipte bulunan 6 ve 10 numaralı izolatlar aynı hastaya ait aēız iēi plak ve gaita örneklerinden elde edilmiştir. Yine bu hastanın yaklaşık iki ay önceki aēız iēi plaēından üretilen *C. albicans* suşu (izolat 11) bu izolatlar ile klonal olarak iliştiki bulunmuştur.

Her iki tiplendirme yöntemiyle de genotipik olarak aynı olan 1 ve 3 numaralı izolatlar, yaklaşık 5 ay arayla alınmış aēız iēi plaktan üretilmiş *C. albicans* suşlarıdır. Yine AP-PCR ile yapılan tiplendirmede aynı hastanın 3 ay arayla aēız iēi plaēından üretilen *C. albicans* suşları genotipik olarak aynı bulunmuştur (23-26 numaralı izolatlar-genotip 19). Bu sonuēlara göre normal flora yesi ve kalıcı olan *C. albicans* suşu, şartlar oluştuēunda yeniden enfeksiyon geliştirebilmektedir.

Genotip 19 ile klonal iliştiki olan, farklı hastaya ait 27 (genotip 19a) numaralı izolat, klasik epidemiyolojik bilgilere göre de aynı grupta yer almaktadır. Bu da bu hastalar arasında ēapraz geēişin olabileceēini dştndrmektedir.

Yoēun bakım hastalarında *C. albicans* kolonizasyonunu incelemek iēin hastaların ēeşitli vücut bölgelerinden, varsa yara, katater ve sonda ucundan 105 örnek alınmış ve bunların 35'inden *C. albicans* retilmiştir. Üreyen *C. albicans* izolatlarının hiē biri etken olarak kabul edilmemiş ve hastalar antifungal ilaē kullanmamışlardır.

Yoğun bakım hastalarından birinin, ağız içinden, cildinden, sonda ucundan ve yarısından *C. albicans* izole edilmiştir. Bu suşların tiplendirilmesinde sonda ucu ve yaradan üretilen suşlar AP-PCR ve EK analizi ile aynı, ciltten üretilen suş ise AP-PCR ile bu suşlarla klonal ilişkili bulunmuştur. Ağız içinden üretilen suşun ise bu suşlardan tamamen bağımsız olduğu görülmüştür.

Yine bir hastanın burun (izolat 78) ve ağız içinden (izolat 80) izole edilen *C. albicans* suşları klonal olarak ilişkili iken, perine (izolat 81) ve ciltten (izolat 82) izole edilen suşlar birbirlerinden genotipik olarak farklı bulunmuştur. Bunun gibi bir çok hastanın farklı vücut bölgelerinden izole edilen *C. albicans* suşlarının genotipik olarak farklı olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, kolonizasyona neden olan suşların farklı genotiplerde olabileceğini göstermiştir.

Yoğun bakım hastalarından birinin ağız içinden (izolat 57) ve idrarından (izolat 58) aynı genotipte *C. albicans* suşu izole edilmiştir. Ağız içi florasının üyesi olduğundan buradaki *C. albicans* izolasyonu dikkati çekmezken, aynı suşun idrar gibi normal florası olmayan bölgeden izolasyonu ve burada hastalık oluşturmada kolonize olarak bulunması dikkat çekicidir. Yapılan çalışmalarda yoğun bakım hastalarında, *Candida* kolonizasyonunun derecesi, enfeksiyon için en güçlü risk faktörünü oluşturduğu bilinmektedir⁹⁷. Bu hastanın perine ve cilt bölgesinden alınan sürüntü örneklerinde *C. albicans* üretilenmemiştir.

Yine bir hastada, burun mukozasından (izolat 58) ve sonda ucundan (izolat 59) izole edilen *C. albicans* suşları genotipik olarak aynı bulunmuştur. Bu hastanın da cilt ve perine bölgesinde *C. albicans* izole edilememiştir. Bu sonuç, burun mukozasından, sonda ucuna aynı genotipteki *C.*

albicans suşunun taşındığını göstermektedir. Taşınma sağlık çalışanlarının elleri ile veya hastaya temas eden aletlerle gerçekleşmiş olabilir.

Nozokomiyal kandidozun gelişiminde çeşitli risk faktörleri rol oynar. Bu risk faktörleri içerisinde yoğun bakım hastalarının sıkça karşılaştıkları, parenteral beslenme, malignite, immunosüpresif tedavi, üretral kataterler, cerrahi ve çeşitli invaziv girişimler kandidoz riskini arttıran faktörlerdir. Buna rağmen yoğun bakım hastalarından izole ettiğimiz 32 *C. albicans* izolatının hiç biri enfeksiyon oluşturmamıştır. Bunun yanında kolonizasyon suşları arasında klonal olarak ilişkili baskın bir genotip dikkati çekmemiştir.

Flukonazol farmakokinetik özelliklerinden ve iyi tolere edilebilmesinden dolayı iyi bir antifungal ilaçtır ⁷¹. *Candida* türlerinde gözlenen azol direnci birkaç farklı mekanizma ile oluşmaktadır. Bu mekanizmalar; ergosterol sentezinde görev alan enzimlerde yapısal değişikliğe neden olan yapısal mutasyonlar, ergosterol sentezinde görev alan enzimlerin aşırı miktarda üretilmeleri ve azollerin hücre dışına atılmasını sağlayan pompa fonksiyonunu kontrol eden genlerin aşırı ekspresyonudur. Flukonazol ile tedaviye yanıtta başarısız olmanın iki nedeni olabilir. Bunlardan biri; *C. albicans* suşunun flukanozole direnç kazanması, diğeri ise yeni bir suşla enfeksiyonun gerçekleşmesidir ⁸⁶.

Yaptığımız çalışmada Hematoloji-Onkoloji hastalarından izole edilen 51 izolattan 12'si flukonazole dirençli bulunmuştur. Flukonazole dirençli suşlar ile duyarlı suşlar arasındaki farklılığı gösterecek klonal bir ilişki bulunamamıştır. AP-PCR ile klonal ilişkili suşlar gösterilebilirken EK analizi

yalnızca aynı suşları tanımlayabilmektedir. Bu yüzden flukanazole dirençli ve duyarlı suşlar arasındaki klonal ilişki incelenirken AP-PCR sonuçları dikkate alınmıştır. Yapılan çalışmalarda flukonazole direncin epidemiyolojisinin araştırılmasında, EK, AP-PCR, PFGE-REA ve DNA prob analizleri kullanılmıştır ^{76, 85, 86, 98, 99}.

Çalışmamızda flukonazole dirençli suşlar arasında klonal bir ilişki bulunamamıştır. Bunun yanında dirençli ve duyarlı suşlar arasında baskın bir genotipik patern de tespit edilememiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda, antifungal ajana duyarlı ve dirençli izolatların göstermiş oldukları mutasyona bağlı genomik farklılıkların, AP-PCR yöntemi veya çoğaltılan bir gen bölgesinin “single strand conformational polymorphism” (SSCP) analizi ile değerlendirilebileceği bildirilmektedir. Bu yöntemin klasik antifungal duyarlılık testlerine gereksinimi ortadan kaldırdığını iddia eden çalışmalar da mevcuttur. Ancak özellikle AP-PCR yönteminin tekrarlanabilirliğinin düşüklüğü ve antifungal dirence neden olan genler dışındaki her türlü mutasyondan etkilenerek bant paternlerinin değişebileceği unutulmamalıdır ^{66, 77}. Ayrıca AP-PCR yönteminde kullanılan primerler ve reaksiyon karakteristikleri de standart değildir. Bu yüzden dirençli ve duyarlı suşların AP-PCR profillerinin değerlendirilebileceği bir veri tabanı oluşturulması oldukça zordur ⁷⁷.

Kandidoz, çoğunlukla bireyin kendi ağız veya gastrointestinal sistemindeki maya florasının aşırı üremesi sonucu, endojen florayla meydana gelir

Candida enfeksiyonlarının çoğunlukla endojen kaynaklı olduğu bildirilmektedir^{21,24,100}. Ancak yapılan yayınlarda hastalar arası ve fomitlerle bulaş bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada çapraz bulaş ve çevresel kaynaklardan bulaş tespit etmek için, hastaların çevresinden (hava, masalar, ilaç dolabı, lavabo, yatak ve musluklar) ve ilgili sağlık personellerinin ağız, el ve burunlarından örnekler alınmıştır. Alınan örneklerin hiç birinde *C. albicans* üretilmemiştir. Buna karşın, uyguladığımız tiplendirme yöntemleriyle aynı suşun izole edildiği hastalar arasında çapraz bulaşın olduğu düşünülebilir. Ancak muhtemel bulaş kaynağı tespit edilememiştir.

Yapılan çalışmalarda bardaklardan, yatak örtülerinden, damlalıklardan, tansiyon aletlerinden, elektrokardiograf cihazından potansiyel enfeksiyon kaynağı olarak *C. albicans* üretilmiştir¹⁰¹. Yoğun bakımlarda yapılan bir çalışmada *C. albicans* ile enfeksiyonun başlıca nedeni olarak endojen flora gösterilirken, eksojen bulaş kaynakları olarak da kontamine parenteral nutrisyon veya intravasküler cihazlar gösterilmiştir¹⁰⁰. Çapraz bulaşta sağlık personelinin elleri ve hastalar tarafından paylaşılan fomitler önemli rol oynamaktadır. Sağlık çalışanlarının elleri ile çapraz bulaş bir çok yayında bildirilmiştir²⁴. Yapılan bir çalışmada tansiyon aletleri ve tek kullanımlık cihazların yeniden kullanılması ile hastadan hastaya bulaş olduğu bildirilmiştir²⁴. Yine çapraz bulaşın araştırıldığı bir çalışmada, hemşirelerin giysilerinden *C. albicans* izole edilmiş ve en az bir hastaya bulaş gösterilmiştir²¹. Dirençli suşların yayılımının incelendiği bir çalışmada, flukonazole dirençli hastayla ilgilenen hemşirenin ellerinden dirençli *C. albicans* suşu izole edilmiştir.

Sonuç olarak, AP-PCR ve PFGE-EK analizleri *C. albicans*'ın moleküler tiplendirilmesinde kullanışlı, ayırım gücü yüksek yöntemler olarak bulunmuşlardır. Buna rağmen, çalışmamızda PFGE-EK metodu ile daha fazla genotip belirlenmiştir.

Çalışmamızda baskın bir salgın suşu tespit edilmemiştir. Enfeksiyon etkeni olarak izole edilen suşların tiplendirme çalışmalarında endojen kaynaklı *C. albicans* enfeksiyonları tanımlanmıştır. Bunun yanında tekrarlayan enfeksiyona neden olan suşların 5 ay kadar değişmediği görülmüştür. Hastadan hastaya *C. albicans* geçişini düşündürecek bulgular elde edilmiştir. Ancak sağlık çalışanlarından ve hastaların çevrelerinden alınan örneklerde *C. albicans* izole edilememiştir.

Flukonazole dirençli veya duyarlı suşlar arasında klonal ilişki veya baskın bir genotip bulunamamıştır.

KAYNAKLAR

1. Beck-Sague,C., Jarvis,W.R.: Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System., *J Infect Dis*, 167:1247-1251 . (1993)
2. Biswas,S.K., Yokoyama,K., Wang,L., Nishimura,K., Miyaji,M.: Typing of *Candida albicans* isolates by sequence analysis of the cytochrome b gene and differentiation from *Candida stellatoidea*., *J Clin Microbiol*, 39:1600-1603 . (2001)
3. Guarro,J., GeneJ, Stchigel,A.M.: Developments in fungal taxonomy., *Clin Microbiol Rev*, 12:454-500 . (1999)
4. Sheehan,D.J., Hitchcock,C.A., Sibley,C.M.: Current and emerging azole antifungal agents., *Clin Microbiol Rev*, 12:40-79 . (1999)
5. Pfaller,M.A., Rinaldi,M.G., Galgiani,J.N., Bartlett,M.S., Body,B.A., Espinel-Ingroff,A., Fromtling,R.A., Hall,G.S., Hughes,C.E., Odds,F.C., .: Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts., *Antimicrob Agents Chemother*, 34:1648-1654 . (1990)
6. Boekhout,T., Renting,M., Scheffers,W.A., Bosboom,R.: The use of karyotyping in the systematics of yeasts., *Antonie Van Leeuwenhoek*, 63:157-163 . (1993)
7. Muller,F.M., Lischewski,A., Harmsen,D., Hacker,J.: Standardized molecular typing., *Mycoses*, 42 Suppl 2:69-72 . (1999)
8. Vazquez,J.A., Beckley,A., Sobel,J.D., Zervos,M.J.: Comparison of restriction enzyme analysis and pulsed-field gradient gel electrophoresis as typing systems for *Candida albicans*., *J Clin Microbiol*, 29:962-967 . (1991)

9. Vazquez,J.A., Beckley,A., Donabedian,S., Sobel,J.D., Zervos,M.J.: Comparison of restriction enzyme analysis versus pulsed-field gradient gel electrophoresis as a typing system for *Torulopsis glabrata* and *Candida* species other than *C. albicans*. , J Clin Microbiol, 31:2021-2030. (1993)
10. McCullough,M.J., Ross,B.C., Reade,P.C.: *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. , Int J Oral Maxillofac Surg, 25:136-144. (1996)
11. Yücel A, Kanatarcıoğlu S: *Candida albicans*'ın Taksonomisindeki Önemli Bazı Değişiklikler. Cerrahpaşa J Med 30:236-2. (1999)
12. Kuştımur S: *Candida* infeksiyonlarının tanı yöntemlerinin değerlendirilmesi, . Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, (Özgüneş, İ., Usluer, G., Çolak H., ed), s. 72-74, Antalya, (1999).
13. Tümbay E: *Candida* Türleri, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, (Ustaçelebi, Ş .,ed), s. 1081-1086, Güneş Kitabevi, Ankara, (1999).
14. Yücel, A., Kantarcıoğlu, S. *Candida*'ların patojenlik belirtgenleri. Cerrahpaşa J Med 30:172-186. (2000)
15. Koneman E, Allen S, Janda J, Schreckenberger P, Winn W: Diagnostic Microbiology. Philadelphia, J.B. Lippincott, 2004,
16. Kuştımur S: *Candida*'da Virulans Faktörleri, 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Tutanaklar Kitabı, (Tümbay, E., İnci, R., Hilmioğlu, S., Aydemir, Ş., ed), No:36, S. 145-150, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, İzmir, (1999).

17. Papuçoğlu, U: Mikozlar Patogenez ve Patoloji. s. 63-75, Güven-Nobel Tıp Kitabevi, İzmir , (2000).
18. Lunel,F., Meis,J.F., Voss,A.: Nosocomial Fungal Infection:Candidemia., Diagn Microbiol Infect Dis, 34:213-220. (1999)
19. Pittet D, Risk factors for nosocomial candidiasis in critical care. J Hosp Infect 40:147-150. (1998))
20. Warris,A.: Hospital water as a source of filamentous fungi: new route of transmission?., Micologia, 17:112-113 . (2000)
21. Bart-Delabesse,E., van Deventer,H., Goessens,W., Poirot,J.L., Lioret,N., van Belkum,A., Dromer,F.: Contribution of molecular typing methods and antifungal susceptibility testing to the study of a candidemia cluster in a burn care unit., J Clin Microbiol, 33:3278-3283. (1995)
22. Kuştimur S: Hastane infeksiyonlarına neden olan mantarların dünya'da ve Türkiye'de dağılımı, 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, (Yeğenoğlu, Y, Erturan, Z., ed) No:46 s. 47-58, Türkiye Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları, İstanbul, (2004).
23. Voss,A., Hollis,R.J., Pfaller,M.A., Wenzel,R.P., Doebbeling,B.N.: Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients., J Clin Microbiol, 32:975-980. (1994)
24. Voss,A., Pfaller,M.A., Hollis,R.J., Rhine-Chalberg,J., Doebbeling,B.N.: Investigation of Candida albicans transmission in a surgical intensive care unit cluster by using genomic DNA typing methods., J Clin Microbiol, 33:576-580. (1995)

25. WR,J.: Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species., *Clin Infect Dis*, 20:1526-1530. (1995)
26. Ener B: Yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) mantar enfeksiyonları., (Özgüneş İ, Usluer G, Çolak H, ed): s. 93-94, 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi , Antalya (1999).
27. Sendid,B., Tabouret,M., Poirot,J., Mathieu,D., Fruit,J.: New enzyme immunoassay for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannanantibodies: Useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis., *J Clin Microbiol*, 37:1510-1517. (1999)
28. Hopfer,R.L.: Use of molecular biological techniques in the diagnostic laboratory for detecting and differentiating fungi., *Arch Med Res*, 26:287-292. (1995)
29. van Deventer,A.J., Goessens,W.H., van Belkum,A., van Vliet,H.J., van Etten,E.W., Verbrugh,H.A.: Improved detection of *Candida albicans* by PCR in blood of neutropenic mice with systemic candidiasis., *J Clin Microbiol*, 33:625-628. (1995)
30. Miyakawa,Y., Mabuchi,T., Fukazawa,Y.: New method for detection of *Candida albicans* in human blood by polymerase chain reaction., *J Clin Microbiol*, 31:3344-3347. (1993)
31. Saraçlı M: Mantar enfeksiyonlarının tanısında moleküler yöntemler., X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi Kitabı, s.208-210, Adana, (2001).
32. Kiraz N: *Candida* türlerinin fenotipik ve genotipik tiplendirme, 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, (Tümbay, E., İnci, R., Hilmioglu, S., Aydemir, Ş. eds), s. 125-135, İzmir, (1999).

33. Durmaz R: Moleküler Epidemiyolojinin Prensipleri, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, (Durmaz, R. ed), s.139-147, Nobel Tıp Kitapevi Yayınları, Ankara, (2001)
34. Mercure,S., Senechal,S., Auger,P., Lemay,G., Montplaisir,S.: Candida albicans serotype analysis by flow cytometry., J Clin Microbiol, 34:2106-2112. (1996)
35. Hunter,P.R.: Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods., J Clin Microbiol, 28:1903-1905. (1990)
36. Merz,W.G.: Candida albicans strain delineation., Clin Microbiol Rev, 3:321-334. (1990)
37. Phelps,M., Ayliffe,G.A., Babb,J.R.: An outbreak of candidiasis in a special care baby unit: the use of a resistogram typing method., J Hosp Infect, 7:13-20. (1986)
38. McCreight,M.C., Warnock,D.W., Martin,M.V.: Resistogram typing of Candida albicans isolates from oral and cutaneous sites in irradiated patients., Sabouraudia, 23:403-406. (1985)
39. Tsang,P.C., Samaranayake,L.P., Philipsen,H.P., McCullough,M., Reichart,P.A., Schmidt-Westhausen,A., Scully,C., Porter,S.R.: Biotypes of oral Candida albicans isolates in human immunodeficiency virus-infected patients from diverse geographic locations., J Oral Pathol Med, 24:32-36. (1995)
40. Betremieux,P., Chevrier,S., Quindos,G., Sullivan,D., Polonelli,L., Guiguen,C.: Use of DNA fingerprinting and biotyping methods to study a Candida albicans outbreak in a neonatal intensive care unit., Pediatr Infect Dis J, 13:899-905. (1994)

41. Bernhardt,H., Zimmermann,K., Knoke,M., Schwesinger,G.: [Enzymatic activities of *Candida albicans* strains from different locations]., *Mycoses*, 34 Suppl 1:69-71 . (1991)
42. Polonelli,L., Archibusacci,C., Sestito,M., Morace,G.: Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains., *J Clin Microbiol*, 17:774-780 . (1983)
43. Lehmann,P.F., Kemker,B.J., Hsiao,C.B., Dev,S.: Isoenzyme biotypes of *Candida* species., *J Clin Microbiol*, 27:2514-2521 . (1989)
44. Olgun A: DNA'nın izolasyonu ve saflaştırılması, *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*, (Temizkan, G., Arda, N., eds), s. 33-49, Güneş Basımevi, İstanbul, (1999).
45. Durmaz R, Durmaz B: Pulsed-Field Gel Electrophoresis, *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, (Durmaz, R. ed), s. 161-168, Nobel Tıp Kitap Evleri,Ankara, (2001).
46. Kuştimur S: Mantarların Tanı ve Araştırmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler. *Mikrobiyoloji Bült* 34:189-192. (2000)
47. Albay A: "Pulsed-Field Gel Electrophoresis" Uygulamaları, X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, s. 188-190, Adana, (2001).
48. Fujita,S., Hashimoto,T.: DNA fingerprinting patterns of *Candida* species using *Hinf*I endonuclease., *Int J Syst Evol Microbiol*, 50 Pt 3:1381-1389 . (2000)
49. Mehta,S.K., Stevens,D.A., Mishra,S.K., Feroze,F., Pierson,D.L.: Distribution of *Candida albicans* genotypes among family members., *Diagn Microbiol Infect Dis*, 34:19-25 . (1999)

50. Yağcı A: Restriction fragment length polymorphism ve polimeraz zincir reaksiyon bazlı tiplendirme yöntemleri., Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, (Durmaz, R. ed),s.149-160, Nobel Yayıncılık Kitap Evleri, Ankara, (2001).
51. Kıraz N: Candida enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, (Özgüneş, İ., Usluer, G., Çolak, H., eds),s. 69-70, (1999).
52. Bauer,T.M., Ofner,E., Just,H.M., Just,H., Daschner,F.D.: An epidemiological study assessing the relative importance of airborne and direct contact transmission of microorganisms in a medical intensive care unit., J Hosp Infect, 15:301-309. (1990)
53. Bernhardt,H., Zimmermann,K., Knoke,M.: Fungal resistance., Infection, 27 Suppl 2:S52-S54. (1999)
54. Ng,A.W., Wasan,K.M., Lopez-Berestein,G.: Development of liposomal polyene antibiotics: an historical perspective., J Pharm Pharm Sci, 6:67-83. (2003)
55. Solovastru,L., Petrescu,Z., Dobrescu,A.: [Antifungals, their potentials, limits and outlook]., Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 102:80-82. (1998)
56. Ghannoum,M.A., Rice,L.B.: Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance., Clin Microbiol Rev, 12:501-517. (1999)
57. White,T.C., Marr,K.A., Bowden,R.A.: Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance., Clin Microbiol Rev, 11:382-402. (1998)

58. Farkas,V.: Structure and biosynthesis of fungal cell walls: methodological approaches., *Folia Microbiol (Praha)*, 48:469-478. (2003)
59. Vanden Bossche,H., Warnock,D.W., Dupont,B., Kerridge,D., Sen,G.S., Improvisi,L., Marichal,P., Odds,F.C., Provost,F., Ronin,O.: Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance., *J Med Vet Mycol*, 32 Suppl 1:189-202. (1994)
60. Akada,R., Murakane,T., Nishizawa,Y.: DNA extraction method for screening yeast clones by PCR., *Biotechniques*, 28:668-70, 672, 674. (2000)
61. Durmaz,R., Ayan,M.:Acinetobacter baumannii izolatların moleküler epidemiyolojisinde "arbitrarily primed" PZR ve "pulsed-field gel" elektroforezi, *Moleküler Epidemiyolojinin Prensipleri, Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*, (Durmaz, R. ed), s.139-147, Nobel Tıp Kitapevi Yayınları, Ankara, (2001)
62. Ayan,M., Durmaz,R., Aktas,E., Durmaz,B.: Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired Acinetobacter baumannii infection in a teaching hospital., *J Hosp Infect*, 54:39-45. (2003)
63. Rementeria,A., Gallego,L., Quindos,G., Garaizar,J.: Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns., *Clin Microbiol Infect*, 7:331-336. (2001)
64. Hunter,P.R., Gaston,M.A.: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity., *J Clin Microbiol*, 26:2465-2466. (1988)
65. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference method for diution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved Standard M27-A. Philadelphia, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, 1997,

66. Saraçlı M: Candida infeksiyonlarının laboratuvar tanısında moleküler ve genetik tanı yöntemleri, Candida mikrobiyolojisi ve infeksiyonları simpozyumu, (Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., eds) s.133-144 Eskişehir, (2002).
67. Yeğenoğlu Y: Candida infeksiyonlarının epidemiyolojisi. Candida mikrobiyolojisi ve infeksiyonları simpozyumu, (Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., eds) s.53-65 Eskişehir, (2002).
68. Lee, W., Burnie, J., Matthews, R.: Fingerprinting *Candida albicans*, J Immunol Methods, 93:177-182. (1986)
69. Lupetti, A., Guzzi, G., Paladini, A., Swart, K., Campa, M., Senesi, S.: Molecular typing of *Candida albicans* in oral candidiasis: karyotype epidemiology with human immunodeficiency virus-seropositive patients in comparison with that with healthy carriers., J Clin Microbiol, 33:1238-1242. (1995)
70. Odds, F.C., Auger, P., Krogh, P., Neely, A.N., Segal, E.: Biotyping of *Candida albicans*: results of an international collaborative survey., J Clin Microbiol, 27:1506-1509. (1989)
71. Millon, L., Manteaux, A., Reboux, G., Drobacheff, C., Monod, M., Barale, T., Michel-Briand, Y.: Fluconazole-resistant recurrent oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype., J Clin Microbiol, 32:1115-1118. (1994)
72. Koç, A.: Mantarlarda moleküler tanı yöntemleri., 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi. (Kuptimur, S., Kalkancı, A. eds), s:105-117, Ankara, (2001).

73. Doi,M., Homma,M., Iwaguchi,S., Horibe,K., Tanaka,K.: Strain relatedness of *Candida albicans* strains isolated from children with leukemia and their bedside parents., *J Clin Microbiol*, 32:2253-2259. (1994)
74. Gulay,Z., Ergon,C., Ozkutuk,A., Yucesoy,M., Biçmen,M.: Anestezi yoğun bakım ünitesi hastalarından izole edilen *Candida albicans* suşlarının antifungal ajanlara duyarlılığı ve moleküler epidemiyolojik izlenimi., *Mikrobiyoloji Bült*, 36:309-316. (2002)
75. Milan,E.P., Laet Sant',A.P., Azevedo Melo,A.S., Sullivan,D.J., Coleman,D.C., Lewi,D., Colombo,A.L.: Multicenter prospective surveillance of oral *Candida dubliniensis* among adult Brazilian human immunodeficiency virus-positive and AIDS patients., *Diagn Microbiol Infect Dis*, 41:29-35. (2001)
76. Dassanayake,R.S., Ellepola,A.N., Samaranayake,Y.H., Samaranayak,L.P.: Molecular heterogeneity of fluconazole-resistant and -susceptible oral *Candida albicans* isolates within a single geographic locale., *APMIS*, 110:315-324. (2002)
77. Jain,P., Khan,Z.K., Bhattacharya,E., Ranade,S.A.: Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and -sensitive strains of *Candida albicans*., *Diagn Microbiol Infect Dis*, 41:113-119. (2001)
78. Ji,L.-R., RK,M., WR,K., S,P., TF,P.: Comparison of DNA-based typing methods to assess genetic diversity and relatedness among *Candida albicans* clinical isolates., *Rev Iberoam Micol*, 17:49-54. (2000)
79. Vrioni,G., Matsiota-Bernard,P.: Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit., *J Infect*, 42:50-56. (2001)
80. Yağcı A, Akbenlioglu C, Canpolat C, Bakır B: Pediatrik hematoloji-onkoloji hastalarında *Candida* Kolonizasyonu., *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 30:246-251. (2002)

81. Ruhnke,M., Grosch-Worner,I., Lischewski,A., Neubauer,A., Steinmuller,A., Trautmann,M., Morschhauser,J.: Genotypic relatedness of yeast isolates from women infected with human immunodeficiency virus and their children., *Mycoses*, 42:385-394. (1999)
82. Lieckfeldt,E., Meyer,W., Borner,T.: Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting., *J Basic Microbiol*, 33:413-425. (1993)
83. Schonian,G., Meusel,O., Tietz,H.J., Meyer,W., Graser,Y., Tausch,I., Presber,W., Mitchell,T.G.: Identification of clinical strains of *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the polymerase chain reaction., *Mycoses*, 36:171-179. (1993)
84. Lischewski,A., Ruhnke,M., Tennagen,I., Schonian,G., Morschhauser,J., Hacker,J.: Molecular epidemiology of *Candida* isolates from AIDS patients showing different fluconazole resistance profiles., *J Clin Microbiol*, 33:769-771. (1995)
85. Berenguer,J., Diaz-Guerra,T.M., Ruiz-Diez,B., Bernaldo de Quiros,J.C., Rodriguez-Tudela,J.L., Martinez-Suarez,J.V.: Genetic dissimilarity of two fluconazole-resistant *Candida albicans* strains causing meningitis and oral candidiasis in the same AIDS patient., *J Clin Microbiol*, 34:1542-1545. (1996)
86. Diaz-Guerra,T.M., Martinez-Suarez,J.V., Laguna,F., Rodriguez-Tudela,J.L.: Comparison of four molecular typing methods for evaluating genetic diversity among *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive patients with oral candidiasis., *J Clin Microbiol*, 35:856-861. (1997)
87. Dib,J.C., Dube,M., Kelly,C., Rinaldi,M.G., Patterson,J.E.: Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a typing system for *Candida rugosa*: comparison of karyotype and restriction fragment length polymorphisms., *J Clin Microbiol*, 34:1494-1496. (1996)

88. Magee,B.B., Magee,P.T.: Electrophoretic karyotypes and chromosome numbers in *Candida* species., *J Gen Microbiol*, 133 (Pt 2):425-430. (1987)
89. Merz,W.G., Connelly,C., Hieter,P.: Variation of electrophoretic karyotypes among clinical isolates of *Candida albicans*., *J Clin Microbiol*, 26:842-845. (1988)
90. Klempp-Selb,B., Rimek,D., Kappe,R.: Karyotyping of *Candida albicans* and *Candida glabrata* from patients with *Candida* sepsis., *Mycoses*, 43:159-163. (2000)
91. Di Francesco,L.F., Barchiesi,F., Caselli,F., Cirioni,O., Scalise,G.: Comparison of four methods for DNA typing of clinical isolates of *Candida glabrata*., *J Med Microbiol*, 48:955-963. (1999)
92. Barton,R.C., van Belkum,A., Scherer,S.: Stability of karyotype in serial isolates of *Candida albicans* from neutropenic patients., *J Clin Microbiol*, 33:794-796. (1995)
93. Doebbeling,B.N., Lehmann,P.F., Hollis,R.J., Wu,L.C., Widmer,A.F., Voss,A., Pfaller,M.A.: Comparison of pulsed-field gel electrophoresis with isoenzyme profiles as a typing system for *Candida tropicalis*., *Clin Infect Dis*, 16:377-383. (1993)
94. Dorko,E., Viragova,S., Jautova,J., Pilipcinec,E., Danko,J., Sviscky,E., Tkacikova,L.: Electrophoretic karyotyping of *Candida albicans* strains isolated from premature infants and hospital personnel in a neonatal intensive care unit. , *Folia Microbiol (Praha)*, 46:453-457. (2001)
95. Mahrous,M., Lott,T.J., Meyer,S.A., Sawant,A.D., Ahearn,D.G.: Electrophoretic karyotyping of typical and atypical *Candida albicans*., *J Clin Microbiol*, 28:876-881. (1990)

96. Espinel-Ingroff,A., Vazquez,J.A., Boikov,D., Pfaller,M.A.: Evaluation of DNA-based typing procedures for strain categorization of *Candida* spp., *Diagn Microbiol Infect Dis*, 33:231-239. (1999)
97. Yucel,A., Kanatarcıoglu,S.: Hastane kaynaklı (Nozokomiyal) mantar infeksiyonlarının epidemiyolojisi., *Cerrahpaşa J. Med*, 32:259-269. (2001)
98. Pizzo,G., Barchiesi,F., Falconi,D.F., Giuliana,G., Arzeni,D., Milici,M.E., D'Angelo,M., Scalise,G.: Genotyping and antifungal susceptibility of human subgingival *Candida albicans* isolates., *Arch Oral Biol*, 47:189-196. (2002)
99. Redding,S.W., Pfaller,M.A., Messer,S.A., Smith,J.A., Prows,J., Bradley,L.L., Fothergill,A.W., Rinaldi,M.G.: Variations in fluconazole susceptibility and DNA subtyping of multiple *Candida albicans* colonies from patients with AIDS and oral candidiasis suffering one or more episodes of infection., *J Clin Microbiol*, 35:1761-1765. (1997)
100. Reagan,D.R., Pfaller,M.A., Hollis,R.J., Wenzel,R.P.: Evidence of nosocomial spread of *Candida albicans* causing bloodstream infection in a neonatal intensive care unit., *Diagn Microbiol Infect Dis*, 21:191-194. (1995)
101. Matta-Essayag,S., Burnie,J., Bailey,G., Mandall,B.: Genotyping fluconazole resistant *Candida albicans* from human immunodeficiency virus positive patients., *Opportunistic Pathogens*, 9:27-37. (1997)

ÖZET

Mantar enfeksiyonlarının klinik önemi bilinmesine rağmen mantar ile kolonizasyon, enfeksiyonun patogenezi, geçiş şekli ve epidemiyolojisi hakkında bilinenler oldukça sınırlıdır. Moleküler tiplendirme yöntemleri *Candida* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin değerlendirilmesinde önemlidir.

Çalışmamızın amacı; enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *C. albicans* suşları ve kolonizasyon suşlarındaki genotipik farklılık oranlarını, enfeksiyonun kaynağının endojen mi veya ekzojen mi olduğunu araştırmaktır. Bir diğer amacımız da flukonazol dirençli ve duyarlı suşlar arasında klonal ilişki olup olmadığını araştırmaktır .

Bu amaçla Hematoloji-Onkoloji hasatlarından enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 51 *C. albicans* suşu ve Yoğun bakım hastalarından izole edilen ve etken kabul edilmeyen 32 kolonizasyon suşu çalışmaya alınmıştır.

C. albicans'ın tiplendirilmesinde AP-PCR ve PFGE-EK analizi metodları kullanılmıştır. 51 Hematoloji-Onkoloji izolatu AP-PCR ile 24 genotipe, EK ile 45 genotipe ayrılmıştır. Yoğun bakım hastalarından izole edilen 32 kolonizasyon suşu AP-PCR ile 16 genotipe, PFGE-EK ile 28 genotipe ayrılmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında PFGE-EK ve AP-PCR'ın ayrılabilirlik indeksleri yüksek bulunmuştur. Ancak PFGE-EK ile daha fazla genotip tanımlanmıştır.

Enfeksiyon etkeni suşların tiplendirilmesi sonucunda, enfeksiyonların endojen kaynaklı olduğu görülmüştür. Bunun yanında çapraz bulaşla ilgili bulgular da vardır. Çapraz geçişin ve ekzojen kaynaklı bulaşın tespiti

için evre ve sağlık personelinden örnekler alınmış ancak *C. albicans* retilenemiştir.

Kullandığımız tiplendirme yöntemleriyle flukonazol dirençli ve duyarlı suşlar arasında klonal bir ilişki ya da baskın bir genotip bulunamamıştır.

Sonuç olarak AP-PCR ve PFGE-EK analizi *C. albicans*'ın tiplendirilmesinde başarılı bulunmuştur. Enfeksiyonların çoğunun endojen flora kaynaklı olduğu görülmüş ancak hastalar arasında ya da hastalarla sağlık personeli arasında apraz geişin olabileceği dşnlmştir.

SUMMARY

Although the clinical importance of fungal infections is well known there is limited knowledge about the colonization with the fungi, pathogenesis of infection, route of transmission and the epidemiology. Molecular typing methods are important for evaluating of *Candida* infections.

The aim of our study is to search the genotypic relation between *C. albicans* strains isolated as infection agents and to search the origin of infection is either exogenous and endogenous. Another aim of this study is to search clonal relation between fluconazole resistant and susceptible strains. 51 *C. albicans* strains isolated from haematology-oncology patients and 32 colonization strains that are not accepted as infecting agents were taken into this study.

We used AP-PCR and PFGE-EK analysing methods for molecular typing of *C. albicans*. 51 strains taken from Haematology-Oncology patients revealed 24 different genotypes by AP-PCR and 45 genotypes by PFGE-EK. 32 colonization strains isolated from intense care units revealed 16 genotypes by AP-PCR and 28 genotypes by PFGE-EK. Discrimination indexes for both of the methods were high, but PFGE-EK identified more genotypes than AP-PCR.

After the molecular typing of infecting strains we realized that these infection were endogenous. Besides, findings about cross transmission were noted. We collected environmental materials and materials from health workers in order to detect the origin of exogenous transmission and cross transmission but any *C. albicans* strain was not isolated.

We could not find any clonally related or dominant genotype between fluconazole resistant or susceptible strains with the molecular typing methods we used.

As a result, AP-PCR and PFGE-EK analysing methods are found successful methods for the molecular typing of *C. albicans* strains. We determined that most of the infections originated from the endogenous flora but cross transmission between patient to patient or health workers to patients could also be possible.



ÖZGEÇMİŞ

1974 İstanbul doğumluyum. İlk ve orta öğrenimimi Elazığ'da, Lise öğrenimimi Malatya'da tamamladım. Yüksek öğrenimime 1992 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde başladı ve 1996 yılında mezun oldum. Lisans üstü öğrenimime 1997 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans programı ile başladım. 1997 yılında aynı anabilim dalında araştırmas görevlisi olarak başladım. 2000 yılında yüksek lisans eğitimimi tamamladıktan sonra aynı yıl Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Doktora programına başladım. Evli ve bir çocuk babasıyım.