

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Bülent BAYSAL

YOĞUN BAKIM ÜNİTESİNDE YATAN HASTALARIN
İDRARLARINDAN İZOLE EDİLEN *CANDIDA* TÜRLERİNİN
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ
VE
ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARI

Dr. Şerife YÜKSEKKAYA

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Duygu FINDIK

KONYA

2009

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	iii
TABLOLAR ve GRAFİKLER LİSTESİ	iv
RESİMLER LİSTESİ	v
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. MANTARLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	2
2.1.1. Hücre Yapısı.....	2
2.1.2. Mantarların Üremesi.....	3
2.2. <i>CANDİDA</i> 'LARIN GENEL ÖZELLİKLERİ	3
2.2.1. <i>Candida</i> 'ların Tarihçesi.....	3
2.2.3. <i>Candida</i> 'ların Sınıflandırılması.....	3
2.2.3. Ekoloji	4
2.2.4. <i>Candida</i> 'ların Morfolojik Özellikleri	4
2.2.5. <i>Candida</i> 'ların Boyanma Özellikleri	5
2.2.6. <i>Candida</i> 'ların Üreme Özellikleri.....	5
2.3. <i>CANDİDA</i> İNFEKSİYONLARINDA PATOGENEZ	5
2.4. <i>CANDİDA</i> ' LARDA VİRULANS FAKTÖRLERİ.....	6
2.5. <i>CANDİDA</i> 'LARIN LABORATUVAR TANISI.....	10
2.5.1. Direk Mikroskopik İnceleme.....	10
2.5.2. <i>Candida</i> 'ların Klinik Örnekten İzolasyonu	11
2.5.3. Tür Düzeyinde İdentifikasyon.....	11
2.5.4. Serolojik Testler	13
2.5.5. Hasta Örneklerinde Etkenin Spesifik Nükleik Asitlerinin Gösterilmesi.....	14
2.6. <i>CANDİDA</i> İNFEKSİYONLARI	15
2.7. MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİ	19
2.7.1. Fungal İnfeksiyonlarda Moleküler Epidemiyoloji	20
2.7.2. Hastane İnfeksiyonları Kontrolünde Moleküler Mikrobiyolojinin Önemi.....	20
2.8. RANDOM AMPLİFİKATİON OF POLYMORPHİC DNA (RAPD)	20
2.9. <i>CANDİDA</i> İNFEKSİYONLARININ EPİDEMİYOLOJİSİ.....	21

2.9.1. Ülkemizde <i>Candida</i> İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi.....	23
2.10. ANTİFUNGAL İLAÇLAR.....	23
2.11. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ	25
2.11.1. Mikrodilüsyon Yöntemi	27
2.11.2. Antifungal Duyarlılık Testi Olarak Kullanılan Diğer Yöntemler	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. <i>CANDİDA</i> 'LARIN KLİNİK ÖRNEKTEN İZOLASYONU	29
3.1.1. Kültür.....	29
3.1.2. Tür Düzeyinde İdentifikasyon.....	29
3.2. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ	31
3.2.1. RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanması.....	31
3.2.2. Antifungal Dilüsyonlarının Hazırlanması	31
3.2.3. İnokulum Hazırlanması	32
3.2.4. Antifungal Duyarlılık Testinin Uygulanması	35
3.2.5. İnkübasyon ve Sonuçların okunması.....	35
3.3. RANDOM AMPLİFİKATION OF POLYMORPHIC DNA (RAPD) TEKNİĞİNİN UYGULANMASI	36
3.3.1. <i>Candida</i> ' ların DNA İzolasyonunun Yapılması	36
3.3.2. PZR Karışımının Hazırlanması ve Amplifikasyon Programının Uygulanması	37
3.3.3. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Elektroforez.....	38
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	39
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	48
6. ÖZET.....	59
7. ABSTRACT	60
8. TEŞEKKÜR.....	61
9. KAYNAKLAR.....	62

KISALTMALAR

SDA	: Sabauroud Dekstroz Agar
SAP	: Salgısal aspartik proteinaz
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriction Fragment Length polymorphism
VVK	: Vulvovajinal Kandidoz
RAPD	: Random amplification of polymorphic DNA
MLST	: Multilocus sequence typing
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
NCCLS	: National Commite for Clinical Laboratory Standards
DMSO	: Dimetil sulfoksid
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
EUCAST	: European Confederation of Antifungal Susceptibility Testing

TABLolar ve GRAFİKLER LİSTESİ

Tablo 1: Antifungal Duyarlılık Testleri.....	26
Tablo 2: CLSI M27-A2 mikrodilüsyon yönteminin temel prensipleri.....	27
Tablo 3: Referans mikrodilüsyon yönteminde MİK değerlerini görsel okumak için kullanılan skorlar	27
Tablo 4: <i>Candida</i> türleri için MİK direnç sınırları ($\mu\text{g/ml}$).....	28
Tablo 5: Amfoterisin B dilüsyonlarının hazırlanması	33
Tablo 6: Flukonazol dilüsyonlarının hazırlanması	34
Tablo 7: 2X amplifikasyon karışımı	37
Tablo 8: Amplifikasyon karışımı.....	37
Tablo 9: İzole edilen suşların türlere göre dağılımı.....	40
Tablo 10: Türlerle göre amfoterisin B MİK ($\mu\text{g/ml}$) dağılımı.....	40
Grafik 1: Türlerle göre amfoterisin B MİK ($\mu\text{g/ml}$) dağılımı	41
Tablo 11: Türlerle göre flukonazol MİK ($\mu\text{g/ml}$) dağılımı	41
Grafik 2: Türlerle göre flukonazol MİK ($\mu\text{g/ml}$) dağılımı	42
Tablo 12: <i>Candida</i> türlerinin flukanazol duyarlılıkları	43
Tablo 13: Türlerin antifungal MİK aralığı, MİK ₅₀ , MİK ₉₀ değerleri.....	43
Tablo 14: <i>Candida</i> Türlerinin MİK Değerlerinin Ortalaması.	43
Tablo 15: <i>C.albicans</i> suşlarının izolasyon tarihi, RAPD paternleri ve MİK değerleri	45
Tablo 16: <i>C.glabrata</i> suşlarının izolasyon tarihi, MİK değerleri ve RAPD paternleri	46
Tablo 17: <i>C.tropicalis</i> suşlarının izolasyon tarihi, MİK değerleri ve RAPD paternleri.....	47
Tablo 18: Amfoterisin B için yapılan antifungal duyarlılık testleri sonuçları.....	54
Tablo 19: Flukonazol için yapılan antifungal duyarlılık testleri sonuçları.....	55

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Antifungal duyarlılık testi mikropleyti (Çalışmamızdan)	35
Resim 2: <i>C.albicans</i> suşlarının Cnd3 primeri ile elde edilen RAPD paternleri	45
Resim 3: <i>C.glabrata</i> suşlarının Cnd3 primeri ile elde edilen RAPD paternleri	46
Resim 4: <i>C.tropicalis</i> suşlarının Cnd3 primeri ile elde edilen RAPD paternleri	47

1. GİRİŞ

Candida türleri doğada yaygın olarak bulunan maya mantarlarıdır. Birçok bitkide bulunabildikleri gibi memelilerde, gastrointestinal sistem başta olmak üzere mukokutanöz membranlarda bulunurlar.

Yoğun bakım üniteleri (YBÜ) invaziv tanı ve tedavi girişimlerinin sık kullanıldığı, en önemli mortalite ve morbidite nedenleri arasında sayılan nozokomiyal infeksiyonlar için en riskli bölümlerdir. Nozokomiyal fungal infeksiyonlar sıklıkla ağır seyirli, hızlı ilerleyen, tanısı zor ve tedaviye dirençli hastalıklar oldukları için ciddi bir morbidite ve mortalite sebebidir. Tüm hastane infeksiyonlarının %8 ini oluşturduğu bilinen nozokomiyal fungal infeksiyonlar immun yetmezliği olan kişilerin çoğalmasıyla birlikte artmaya devam etmektedir.

Son 30 yıl içinde, idrarda *Candida* varlığı önem kazanmıştır. İmmun yetmezlikli olgulardaki artış, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, üriner sisteme yönelik girişimler, diabetes mellitus gibi altta yatan hastalıklar, ileri yaş, üriner sistemde mikozlara eğilimi artırmaktadır. İdrarda *Candida* türlerinin varlığı, tedavi gerektirmeyen basit bir kolonizasyon olabileceği gibi, tedavi gerektiren ciddi üst üriner sistem infeksiyonunu da gösterebilir.

Mortalitesi yüksek mantar infeksiyonlarının genellikle dışarıdan bulaş ile oluşmadığı; normalde florada bulunan mantar elemanlarından kaynaklandığı bilinmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda yoğun bakım hastalarında, mikozların sadece endojen kaynaklı olmadığı, hastadan hastaya veya sağlık personelinden hastaya geçebildiği epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir.

Antifungal duyarlılık testleri; rutin laboratuvarlarda klinik açıdan gerekli görüldüğü bazı durumlarda tedaviyi yönlendirmek ve epidemiyolojik veriler elde etmek için yapılır. Her merkezde hastanede yatan olgulardan izole edilen suşların antifungal ajanlara duyarlılıklarının periyodik olarak belirlenmesi, o merkezdeki duyarlılık paternini ve direnç oranını belirlemek açısından önemlidir.

Bu çalışmada Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Anestezi ve Reanimasyon AD yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların idrarlarından izole edilen *Candida* suşlarının amfoterisin B ve flukonazole antifungal duyarlılıkları ve moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MANTARLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ

Mantarların yüzbinden fazla türü olduğu bilinmektedir. Ancak 150-200 türünün insanlarda hastalık oluşturduğu, bir düzine türün ise hastalıkların %90'ından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Mantarlar özellikle son 20 yıl içerisinde, özellikle immünyetmezlikli, kemoterapötik ilaç alan, transplantasyon yapılan ve uzun süre hastanede yatan hastalarda ciddi infeksiyonlara neden olması ile önem kazanmıştır (1).

2.1.1. Hücre Yapısı

Mantarlar gerçek bir çekirdeğe sahip ökaryotik mikroorganizmalardır. Tek veya çok hücreli olabilirler, ancak çok hücreli ve çok çekirdekli olma eğilimindedirler. Mantar hücre duvarının kitin içermesi, hücre zarında kolesterol yerine ergosterol bulunması mantarları diğer canlı hücrelerden ayıran önemli özelliklerdir. Hücre duvarının %90'ı karbonhidratlardan, %10-20'si protein ve glikoproteinden oluşur. Karbonhidratlar mannan, glukoz, galaktan, kitin polimerleri ve/veya selülozdan oluşur (1, 2, 3). Hücre zarı iki tabakalı olup, fosfolipid, sifingolipid, glikoprotein ve sterol içerir. Hücre zarındaki ergosterol, antifungal ilaçların güvenle kullanımını sağlar. Bazı mantar türlerinde polisakkarid yapısında kapsül bulunabilir.

Morfolojik yapılarına göre mantarlar küf ve maya olmak üzere iki grupta incelenir. Küf mantarları genellikle oda ısısında ürerler. 2-10 mm çapında hif adı verilen iplikçi yapılarından oluşur. Hifler bir araya gelerek miçelyum adı verilen kadifemsi, tüysü oluşumları meydana getirirler. Maya mantarları genellikle tek hücreli ve tek çekirdeklidir. Yuvarlak, oval veya uzamış hif benzeri görünümde olabilir. Mayalar katı besiyerlerinde 37°C'de iki-üç günde opak, beyaz veya çoğu kez krem renkte, yuvarlak, keskin sınırlı, tereyağı kıvamında koloniler oluşturur. Kapsüllü mantarlarda mukoid koloniler gözlenir. Küf ve maya formu dışında; bazı türler, besin içeriği, CO₂ basıncı, ısı, oksidasyon-redüksiyon potansiyeli gibi çevre şartlarının durumuna bağlı olarak iki şekilde de üreyebilirler. Dimorfik mantarlar olarak adlandırılan bu mantarlar; 26°C'de küf, 35-37°C'de maya şeklinde ürerler (1).

2.1.2. Mantarların Üremesi

Mantarlar dış ortama dayanıklı olup, uygun şartlarda çimlenerek koloni oluşturabilen sporlara sahiptir. Bu sporlar mitoz ile oluşmuşsa aseksüel (eşeysiz), mayoz bölünmeye uğramış iki hücrenin stoplazma ve nükleuslarının birleşmesiyle oluşmuşsa seksüel (eşeyli) sporlar denir. Aseksüel sporlar üç farklı yolla oluşabilir. Birinci yol ana hücre içinde ortadan yeni bir hücre duvarı oluşması ile iki yavru hücreye ayrılır. İkinci yol, tomurcuklanma, üçüncü yol ise spor oluşturma yoluyla yeni bir hücre oluşturur. Mantarlar seksüel spor yapısına göre sırasıyla *Zygomycotina*, *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* alt bölümlerine ayrılır. Bunun yanı sıra seksüel sporları tanımlanmamış olan sadece aseksüel sporları bilinen mantarlar *Deuteromycota* (*Fungi Imperfecti*) alt grubunu oluşturur (1). İnsanlar için patolojik olan bir çok tür bu grupta yer alır (4).

2.2. CANDIDA'LARIN GENEL ÖZELLİKLERİ

2.2.1. Candida'ların Tarihçesi

İlk çağlardan beri mantarların deri, saç ve tırnağı hastalandırarak eski hekimlerin dikkatini çektiği düşünülse bile mantarlar hakkında esaslı bilgiler, 19. yüzyılda toplanmaya başlamıştır. Kandidiyazisin tarihçesi MÖ 4. yüzyıla İstanköylü Hipokrat'a kadar uzandığı halde etken, Langenbeck tarafından 1839 yılında tifüslü bir hastanın ağzındaki pamukçuk lezyonundaki kazıntıda gözlenmiştir. Pamukçuğun etkeni olarak mantarların tarifi 1842 yılında Gruby tarafından gerçekleştirilmiştir. 1923 yılına kadar bazı araştırmacılar buldukları mantarların yeni bir tür olduğunu sanarak değişik adlarla tanımlamışlardır. Bu karışıklığa Berkhout yalancı hif geliştiren, askospor üretmeyen maya türlerini kapsayan *Candida* cinsini yeniden kurarak son vermeye çalışmıştır. 1954'de Paris'de toplanan VIII. Ulusal Botanik Kongresinde Berkhout'un kullandığı *Candida* ismi kabul edilmiş ve etkenin adı *Candida albicans* olarak belirlenmiştir (5).

2.2.3. Candida'ların Sınıflandırılması

Candida'lar Deuteromycetes sınıfının *Cryptococcales* takımında *Cryptococcaceae* ailesinde sınıflandırılan, blastosporlarla çoğalan, yalancı ve gerçek hif yapan, bir grup

mayadır (6, 7, 8, 9). *Candida* türleri heterojen bir grup olup bu cins içerisinde türler arasındaki taksonomik ilişkiler tam belirlenmemiştir (9, 10).

Bu aile yaklaşık 200 tür içermektedir. Bu aileye giren *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.glabarata*, *C.parapsilosis*, *C.krusei*, *C.pseudotropicalis*, *C.lusitaniae*, *C.dublinskiensis*, *C.guilliermondi*, *C.catenulata*, *C.ciferrii*, *C.haemulonii*, *C.intermedia*, *C.kefyr*, *C.lambica*, *C.lipolytica*, *C.norvegensis*, *C.pelliculosa*, *C.pulcherrima*, *C.rugosa*, *C.utilis*, *C.viswanathii* ve *C.zeylanoides* gibi *Candida* türleri tıbbi önemi olan ve en çok karşılaşılan türlerdir (6, 9, 10, 11).

2.2.3. Ekoloji

Candida türleri doğada yaygın olarak bulunan maya mantarlarıdır. Birçok bitkide bulunabildikleri gibi özellikle memelilerde, gastrointestinal sistem başta olmak üzere mukokutanöz membranlarda bulunurlar (10, 12). Sağlıklı bireylerde gastrointestinal sistemdeki kolonizasyon, ağızdan kolona doğru gittikçe artmaktadır. *Candida* kolonizasyonunun yoğun olduğu bir diğer yer vajendir. Sağlıklı kadınların %30 unda bulunabilir. Sağlıklı deride *Candida* türlerine fazla rastlanmaz (10).

2.2.4. *Candida*'ların Morfolojik Özellikleri

Klinik örneklerinde ve kültürlerinde 2-8x3-15 µm boyutlarında oval veya yuvarlağımsı, tomurcuklanan hücreler şeklinde görülürler (7, 12, 13). Ana kök hücrenin bir bölümünün uzaması ile oluşan tomurcuklanma sırasında hücre duvarının bir noktası lizise uğrar. Bu noktadan duvar dışarıya doğru balonlaşma yapar. Bu kısım şişerek genişler, ana hücrede mitoz yolu ile çoğalan kromozomlar ve diğer hücre elamanları yeni hücreye taşınır, sonra iki hücre arasındaki bölme gelişerek hücre çoğalması gerçekleşir (1). Tomurcuklanarak meydana gelen yavru hücre ana hücrenin aynıdır, ana hücreden ayrılabilir veya ayrılmaz. Ayrılmayı başaramayan hücre tomurcukları, yalancı hif şeklinde zincirler oluştururlar (1, 7, 12, 13). Yalancı hifin hücre duvarı birbirine paralel olmayıp, hücreler arası daralmalar nedeniyle boğumsal görünüm mevcutken; gerçek hifin hücre duvarları birbirine paraleldir. Ayrıca yalancı hifde uzama gösteren uçtaki hücre bir öncekinden daha kısa; gerçek hifde ise daha uzundur (1). *Candida* türleri arasında *C.albicans* blastospor ve yalancı hif yanında hücre duvarları birbirine paralel gerçek hif de oluşturarak dimorfik özellik gösterir (12).

Candida'lar bir hifin ucunda veya arada bulunan tek hücreli, kalın duvarlı, oval geniş yapı olan klamidospor oluşturabilirler.

2.2.5. *Candida*'ların Boyanma Özellikleri

Candida'nın maya ve miçelyal formları Gram pozitifler (8, 13). Bunun yanında floresan boyalardan potasyum hidroksit-Kalkoflor beyazı ile boyanabilirler. Kalkoflor beyazı maya hücre duvarındaki kitin ve sellüloza nonspesifik bağlanarak yeşilden maviye değişen renklerde floresan verir. Bu boya özellikle maya hücrelerinin örnekler içinde aranmasında kullanılır (11, 14).

2.2.6. *Candida*'ların Üreme Özellikleri

Candida türleri rutinde kullanılan mikolojik ve bakteriyolojik besiyerlerinde iyi ürerler (15). Bu cinste yer alan mayalar, karbon, azot, ve fosfat kaynakları ve biotin varlığında ve 20-40°C'de, pH:2-8'de üreyebilirler; üreme hızları 0.3-0.4/saattir (2). Besinlerini absorpsiyon yolu ile buldukları ortamdan kolayca sağlayabilmeleri için üreme ortamının relatif nem oranı % 95-100 oranında olmalıdır (11). Üreme genellikle 24 saatte görülmesine rağmen, belirgin üreme genellikle 48-72 saat arasında oluşur. *Candida* türleri genellikle kirli beyaz veya krem renginde, buruşuk veya düzgün kenarlı, nemli, yumuşak kıvamlı, maya kokan koloni oluştururlar (12, 13).

2.3. *CANDIDA* İNFEKSİYONLARINDA PATOGENEZ

Hastalık yapıcı karakterdeki bir mantarın vücuda girmesi infeksiyonun oluşmasındaki ilk aşamadır ancak infeksiyonun meydana gelmesi için yeterli değildir. Mantarla konak arasındaki karşılıklı etkileşim sonucuna bağlı olarak ya subklinik düzeydeki infeksiyonlar ve/veya klinik bulguların ortaya çıkması şeklinde hastalık meydana gelir veya meydana gelmesi önlenir. Etkenin hastalık yapıcı birçok özelliği ile konağın duyarlılığı tarafından belirlenen bu olay özellikle insanlarda sıradan bir kommensal olarak bulunan fakat konağın savunması zedelendiğinde dokulara yayılarak ona zarar verebilen *Candida*'ların yaptıkları infeksiyonların altındaki gerçeği oluşturur (16). *Candida* infeksiyonlarının patogenezinde konağın savunma sistemi çeşitli yollarla olaya katılır. Savunma mekanizmalarında yer alan

hücreler, faktörler, yapılar ve bunların fonksiyonlarındaki defektler konağın savunma mekanizmasındaki rolünü belirler. Bunlar;

- 1) Mikrobiyal antogonizma ve *Candida* kolonizasyonu,
- 2) Birinci basamak savunma
Deri ve mukoza
- 3) İkinci basamak savunma
Sıvısal savunma mekanizmaları
Hücresel savunma mekanizmaları
- 4) Konak savunmasını etkileyen faktörler
Beslenme ve yaş
- 5) Konak savunmasına etki eden hastalıklar
Lösemi ve Lenfoma
Alkolizm ve hepatik siroz
İnfeksiyonlar
Kronik renal yetmezlik
Orak hücre anemisi
- 6) İmmüniteyi baskılayan ilaçlar
Glukokortikosteroidler
İmmüniteyi baskılayan başka ilaçlar
- 7) Işınlama

Candida infeksiyonlarının gelişiminde konak faktörlerinin yanında virulans faktörlerinin de önemi büyüktür. *Candida*; virulans özellikleri sayesinde, konak hücre membranının bütünlüğünü ve işlevlerinin bozulmasına neden olur ve bu sayede hücre ölümü ile konak hücresi içine invazyon yapar (17).

2.4. *CANDIDA*' LARDA VİRULANS FAKTÖRLERİ

Adezyon: Yapışma, hücrelerin yüzey özellikleri ile ilişkilidir. *Candida*'ların mukoza, epitel ve endotel hücrelerine yapışması kolonizasyonun ilk aşamasıdır (16). Adezyon *C.albicans* ve *C.tropicalis*'de yüksek iken, *C.parapsilosis*'de düşüktür. *C.krusei*, *C.kefyr* ve *C.guilliermondii*'de adezyon gösterilememiştir (18). Mantarların aderansını sağlayan yüzey karbonhidrat yapıları mannan, β -glukan, ve kitine karşılık konakta bunların bağlanabileceği fukos, N-asetilglukozamin ve sialik asit gibi bağlayıcı yapılar vardır (17). *Candida* türlerinin çeşitli yüzeylere bağlanmasını şekerler, metal iyonları, pH, ısı gibi çevresel faktörlerin yanı sıra fibrinojen, fibronektin, laminin, tip I ve tip IV kollojen gibi

konak proteinleri ve maya hücrelerinin morfolojileri, üreme fazları, yüzey özellikleri, diğer mikroorganizmalar ile etkileşimi belirlemektedir (18).

Proteinaz Enzimi: Mantarlar, konağın hücre zarlarında işlev bozukluğuna sebep olarak dokuda invazyonlarına yardımcı olan enzimler oluşturma yeteneğine sahiptirler. Zarların lipid ve protein yapıları bu enzimlerin hedefini oluştururlar. *C.albicans* proteinazları, in vivo olarak albümin, keratin ve deri proteinlerini parçalayabilme özelliğini taşırlar. Günümüzde *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* ve *C.glabrata*'nın da asit proteinaz salgıladıkları bilinmektedir (19).

Salgısal aspartik proteinaz, başta *C.albicans*, daha az derecede *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis* kökenleri olmak üzere en patojen *Candida* türleri tarafından salgılanmaktadır (16,19). Klinikle ilişkili diğer *Candida* türleri (*C.glabrata*, *C.krusei*, *C.kefyr* ve *C.guilliermondii*) hücre dışı proteinaz üretmiyor gibi görünmektedir. Bu durum *Candida* türlerinin insandaki virülans sıralamasına yansımaktadır (16).

Salgısal aspartik proteinazların virülans etkisi birkaç olası mekanizma ile gerçekleşir. Bunlar, konak proteinlerini sindirmesi ile oluşan konak doku zedelenmesiyle adezyonun kolaylaşması, konak proteinlerinin yıkılmasıyla konak immun yanıtının bozulması, peptid yıkım ürünleri ile hücre nitrojen kaynaklarının artırılması, endotel hücre hasarı ve konakta proteolitik mekanizmaları uyarmak yoluyla (17).

Aspartik proteinaz enziminin vücutta fizyolojik önemi olan albumin, immunglobulin, laktoferin, laktoperoksidaz, müsin ve sistatin A gibi substratları sindirdikleri ve böylece vücutta koruyucu olan pek çok koruyucu proteini parçalayarak daha kolay invaze oldukları gösterilmiştir (20).

Fosfolipaz Enzimi: Hücre zarlarındaki fosfolipitlerin yıkımında rol oynayan fosfolipaz enzimleri, birçok canlıda zara bağlı veziküllerde bulunur. Bu enzimin aktivasyonu ile fosfolipidlerden lizofosfolipidler meydana gelir ve biyolojik membranın bozulmasına neden olur (20,21). Fosfolipazlar (PL) parçaladıkları özgül ester bağlarına göre A, B, C ve D olmak üzere dört tipe ayrılmışlardır (16,20).

Slime faktörü: Kompleks polisakkarit yapıda biyolojik bir film tabakası olan slime maddesi, mikroorganizmanın konak hücre yüzeyine yapışmasında, kateter ve tüp gibi düz yüzeyli tıbbi aletlere tutunarak buralarda çoğalmasında önemli rol oynar. Diğer taraftan opsonizasyon, fagositoz ve kemotaksis gibi immun mekanizmalara karşı

mikroorganizmayı koruyan slime faktörünün, lökosit ve lenfosit etkinliğinde de azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (22). *Candida*'lar bu yüzeylerde fibrin, fibronektin ve slime faktörü ile birlikte biyofilm tabakası oluşturarak kolonizasyon meydana getirmektedirler (23).

Kateterler, ekstraselüler matriks içinde biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ile kolonize olmakta ve mikroorganizmanın bu biyofilmden ayrılması çoğu kez septisemi ile sonuçlanmaktadır (24). Slime faktör mikroorganizmayı kaplayarak vücudun savunma mekanizmalarından korur. Bu maddenin kemotaktik etkisinin de olduğu, fakat slime tarafından uyarılan polimorf nüveli lökositlerde miyeloperoksidaz salınımının yetersiz olduğu gösterilmiştir (22). Bu mikroorganizmanın hücre içinde yaşam süresinin uzamasına ve fagositozdan korunmasına neden olmaktadır. Ayrıca slime üreten mikroorganizmalara bağlı infeksiyonların tedavisinin daha güç olduğu gözlemlenmiştir (23).

Germ Tüp- Hif Oluşumu (Dimorfizm): Hif oluşumu *Candida*'ların aktif semptomatik infeksiyonu ile ilişkilidir. *C.albicans*'ın hifleri insan dokusunda bulunan bir grup moleküler yapıya bağlanma kapasitesine sahiptir. Ayrıca hif, epitelyal hücreleri parçalayan proteinaz üretir (25). Hif şekli ile infeksiyon arasındaki sebep sonuç ilişkisi; hifin dokuya maya hücrelerinden 50 kat daha fazla yapışması, fagositler tarafından sindirilememesi, örneklerden sıklıkla izole edilmesi, plastik yüzeylere yapışmayı sağlayan fibriller yüzey tabakası oluşturması ve lezyondan kazınan materyalde *C.albicans*'ın çoğunlukla hifli şekilde gözlenmesi virulansdaki rolünü kanıtlayan bulgulardır (16,26).

Toksinler: *C.albicans*'ın endotoksin benzeri toksinleri olduğu gösterilmiştir. Sistemik kandidozun Gram negatif sepsisinden ayırdedilememesi *Candida* toksinlerinin patogeneğinde önemli rol oynadığının en önemli göstergesi oluşturmuştur (16,26).

Fenotipik Değişim: *Candida albicans*'ın fenotipik değişimi virulans faktörü olarak konakçı savunmasına karşı gelişen direncin ve ilaçlara duyarlılığın değişmesine neden olabilir. Mantar populasyonunda hücre veya koloni morfolojisinin değişimi ile saptanabilir. En az yedi koloni tipi veya opak(O)-beyaz(W) fenotip arasında, sıçrama göstermektedirler. Beyaz fenotipde düzgün (S) yüzeyli beyaz renkli koloniler ve tomurcuklu hücreler meydana gelmektedir. *C.albicans* kökenlerinin çoğu beyaz fenotipindedir. Opak fenotipde geniş yüzeyli, yassı, yüzey pürtüklü (R) gri koloniler ve uzun büyük hücreler oluşmaktadır (2, 16, 26). Opak ve beyaz koloni tiplerinin hücreleri arasında hif oluşturma yeteneği, generasyon süresi, düşük ve yüksek sıcaklıklara duyarlılık farklı olmaktadır (16). Ayrıca *C.albicans*'ın antifungallere karşı gösterdiği direncin açıklanmasında fenotipik değişim

mekanizmalarının tanımlanmasının önemli olduğu ileri sürülmüştür. Azollere direncin mekanizmalarından, antifungallerin dışarı atılımını hızlandırma ve sitokrom P450 hedef enziminin fazla yapımının fenotip değişim ile ilişkisi olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda beyaz fenotipli kolonilerin flukonazol direnci opak kolonilere göre yüksek bulunmuştur (26).

Hücre Duvarı-Mannoprotein, Yüzey Değişimi ve Hidrofobisite: Mannan bir adezin olarak konak hücresinin tanınmasında ve konakta antikor cevabı oluşmasında, önemli bir virulans proteini olup antijen olarak konağa sunulur. Bu komponentler immünomodülatör etkisi kuvvetli moleküllerdir. Mannan hücresel veya humoral yanıtı artırır veya baskılar ve bu da infeksiyonun sürekliliğine neden olur. Mannoprotein eritrositlerin erimesi ve demir salınımına neden olarak mikroorganizmanın üremesi için gerekli demiri sağlar (18).

Belirli şekerleri, özellikle galaktozu yüksek yoğunluklarda içeren besiyerlerinde geliştirildiklerinde bütün *C. albicans* kökenlerinde olmasa da bir kısmında in vitro epitel hücrelerine yapışmanın artırılabilirdiği gözlemlenmiştir. Farklı şekerlerin yüksek yoğunlukları ile *C. albicans*'da in vivo yüzey değişiklikleri indüklemesi karbonhidrattan zengin diyetdeki kişilerde ağız kandidiyazı gelişmesi ve ısrarlı olmasını açıklayabilir (16,26).

Tomurcuklu hücreden germ tüpe geçişte hücre bileşimindeki birçok değişikliklerin olması çeşitli adezinlerin oluşumu ve aynı zamanda hücre yüzey hidrofobisitesini etkilemektedir. Hidrofobik moleküller, hücreler arası yüzeyler arasında çekime yol açarlar. *C.albicans* 'ın hifal formları ve 25°C'de ya da yüksek galaktoz varlığında üreyenler daha fazla hidrofobtur (2). Hidrofobisite *C.albicans*'ın plastik yüzeylere ve insan epitel hücrelerine bağlanma yeteneğiyle uyumludur (26).

Yüksek sıcaklıkta üreme özelliği: Vücut ısısı olan 37°C'de ve ateşin yüksek olduğu dönemde (38-42°C) üreme yeteneği sistemik infeksiyonlar için önemlidir (27).

Farklı pH'da üreme: *C.albicans* pH gibi fizyolojik değişikliklere adapte olmalıdır. Bu mikroorganizma ile oluşan kan ve doku infeksiyonlarında nötral pH'da maksimum aktivite gösteren PHR1 geni, vajen infeksiyonlarında ise asit pH'da aktivite gösteren PHR2 geni eksprese edilerek adaptasyon sağlanmaktadır (27).

2.5. CANDIDA'LARIN LABORATUVAR TANISI

Candida'lar normal florada da bulduklarından, laboratuvarlarda karşılaşılan en büyük problemlerden birisi klinik örneklerde üreyen *Candida*'ların klinik bir öneminin olup olmadığını belirlemek ve rapor edilip edilmemesine karar vermektir. Bu nedenle laboratuvar verilerin doğru yorumlanabilmesi için iyi bir klinik laboratuvar işbirliğinin kurulması gerekir (28). Diğer mikrobiyal infeksiyonlarda olduğu gibi *Candida* infeksiyonlarının tanısı klinik bulgular ve laboratuvar sonuçlarının birlikte değerlendirilmesine bağlıdır (15).

Mantar infeksiyonlarının tanısında laboratuvar yaklaşımı;

Mikrobiyolojik Klinik örneğin direk mikroskopik incelemesi

Kültürde etyolojik etkenin soyutlanması

İzolatların morfolojik, fizyolojik, immunolojik ve moleküler özelliklerine göre tanımlanması

İmmünolojik Antikorların belirlenmesi için testler

Antijenlerin belirlenmesi için testler

Moleküler Klinik örnekte direk tespit ve identifikasyon için testler: Polimeraz zincir reaksiyonu ve diğer amplifikasyon yöntemleri

Tür düzeyinde identifikasyon için yapılan testler: Nükleik asit problemleri

Biyokimyasal Metabolitlerin, hücre duvarı bileşenlerinin ve enzimlerin tespiti (29, 30).

2.5.1. Direk Mikroskopik İnceleme

Laboratuvara ulaşan, kültürü yapılacak örneklerin, hastanın tedavisine bir an önce başlanabilmesi açısından, bekletilmeden, doğrudan mikroskopik yöntemler ile incelenmesi gerekir (14). Gram boyama; hızlıdır birçok mantar ve hif elamanını boyar ancak boyanma sırasında mantarların tipik morfolojisi değiştiğinden gram ile boyanmaları önerilmez. KOH; bazı örneklerin berraklaşması zordur ve karışıklığa neden olabilecek artefaktlar olabilir. Mantar elamanlarının görülebilmesi için örneği berraklaştırır. Kalkoflor beyazı; hızlıdır, parlak fluoresansı ile hücre duvarını kitinini gösterir. KOH ile birlikte çok

yararlıdır (29, 31). Örnek üzerine %10-15 KOH +%1 kalkoflor beyazı konarak hazırlanan preperat fluoresans mikroskopta incelenir (14).

2.5.2. *Candida*'ların Klinik Örnekten İzolasyonu

Primer izolasyon için laboratuvarlarda en sık kullanılan besiyeri Sabauroud Dekstroz Agar (SDA)'dır. Kültür için alınan örnekler uygun besiyerine ekildikten sonra 26 ve 37 °C'de inkübe edilirler (11). Üreyen yumuşak kıvamlı, maya kokan kolonilerden yapılan preperatlarda mayalar genellikle blastospor oluşumu şeklinde, tek hücre halinde görülür (29).

2.5.3. Tür Düzeyinde İdentifikasyon

Üreyen mantarların %75 i *C.albicans* olduğu için, bunu diğer mantarlardan kolaylıkla ayırt etmeye yarayan bir test kullanılabilir (24, 29, 31). Bu amaçla germ tüp testi, *C.albicans*'a özgü enzimlerin tespitine dayalı bir test olan hızlı kolorimetrik test yada kromojenik substratlar içeren agar besiyerleri kullanılabilir (29).

Germ tüp (çimlenme borusu) deneyi: Maya kolonisinden az bir miktar, içerisinde 0.5 ml insan veya tavşan serum veya plazması bulunan test tüpünde süspansiyon edilir. Test tüpü 3 saat 37°C'de inkübe edilir. Bir damla maya-serum süspansiyonu lam üzerine alınır. Mikroskopta germ tüp varlığı aranır (31, 32). Germ tüp maya hucresinden orijin aldığı noktada boğumlanma yapmaksızın maya hücresinin hif benzeri uzaması olarak görülür.

Diğer *Candida* türlerinden *C.dubliniensis*'de gerçek germ tüp yapar ancak bu tür nadir görülür. *C.tropicalis* maya hücresinden orijin aldığı noktada boğumlanma yapan yalancı germ tüp yapar (8, 31). *C. albicans* suşlarının %95-97' si germ tüp oluşturur (15).

Klamidospor, Blastospor, Artrospor, Yalancı hif ve Hif Oluşturma Özelliğinin İncelenmesi: Maya kolonisinden bir miktar alınır. %1 Tween-80 içeren cornmeal agar besiyerine 3-4 tane paralel çizgi ekim yapılır. Üzerine steril lamel kapatılarak 30°C'de inkübe edilir. Besiyeri üzerine kapatılan lamelin, ortamın oksijenini azaltması ve Tween-80'nin yüzey gerilimini düşürmesi klamidospor ve yalancı hif üretimini artırır (31). 48 saat sonra hif, yalancı hif, blastospor, klamidospor varlığı mikroskop altında değerlendirilir (12, 31, 32).

Mısırunlu jelozda *C.albicans*'ın 4 değişik Őekil oluşturarak geliştiği görülür: i) Yalancı hif ii) Blastosporlar iii) Klamidosporlar iv) ok seyrek olarak gerçek hif. Mısırunlu jeloz gibi besince fakir bir ortam, maya hücrelerinin, iyi yedek besin depolayan klamidosporlar oluŐturmasına yol açar. Bunlar oluŐurken hifin veya yalancı hifin bir yerinde, sitoplazma yoęunlaŐır, burası hifin çapından daha geniş olacak tarzda ŐiŐer ve duvarı kalınlaŐır. Kalın duvarların polisakkaritten (β -1,3 glukan) yapılı bir dış tabakası, protein ve çok miktarda lipid taŐıyan bir de i tabakası vardır (7, 13).

Candida albicans izolatlarının büyük bir çoğunluğu (>%90), mısırunlu agar, pirinçli-Tween-80 agar gibi besiyerlerine ekildikleri ve 25°C'de 72 saat inkübe edildikleri zaman karakteristik klamidospor oluştururlar. Bu zellik *C.albicans* için germ tüp oluşumu kadar tipiktir. Bu bakımdan *C.albicans* ile diğer *Candida*'ların ayırđedilmesinde faydalı olur.

Candida tropicalis 25 °C'de 72 saat inkübe edildikten ve bir haftadan fazla süreyle +4 °C'de bırakıldıktan sonra klamidospor oluşturabilir. *C.tropicalis*'in oluşturduğu klamidosporlar kalın bir duvarın olmaması ve sitoplazma içerisinde yansıma yapan globüllerin bulunmamasıyla *C.albicans*'ın oluŐturduklarından farklılık gösterir (12). Ayrıca *C.tropicalis* ilk izole edildiğinde klamidospor yapar daha sonra yapılan pasajlarda bu özellik kaybolur. Buna karşılık klamidospor oluşumu *C.albicans*'da sabit bir olgudur. *C.albicans* genellikle gerçek veya yalancı hiflerin ucunda tek tek klamidosporlar üretilir. Buna karşın *C.dublınıensis*'in klamidosporları çiftler halinde veya l hatta bazen salkımlar oluŐtururarak olaęandıŐı düzen gösterirler (7).

Biyokimyasal Testler

a) Karbonhidrat asimilasyon-fermentasyon testi: Fermantasyon, karbonhidratların CO₂ ve etanol üretimiyle sonuçlanan anaerobik kullanımıdır. Fermantasyon testleri mayaların, karbonhidratları fermente edip edemediklerini araŐtırır. Asimilasyon testleri mayaların verilen substratı tek karbon veya azot kaynağı olarak kullanabilme yeteneklerini değerlendirir (8, 13, 33).

Klasik olarak mayaların karbonhidrat kullanma zellikleri Wickerham'ın asimilasyon ve fermentasyon yöntemleriyle incelenir. Klinik laboratuvarların çoğunda bu testlerin yerini API 20 C, ID 32 C ve Uni-Yeast-Tek gibi hazır ticari test sistemleri almıŐtır. Bunların içerisinde en yaygın kullanılanlar API sistemleridir (33).

b) Üreaz testi: *Candida* cinsi içerisinde hem üreaz pozitif hem de negatif türler bulunmaktadır; ancak klinik önemi olan türlerin büyük çoğunluğu üreaz negatiftir. Maya, üre agarına ekim yapıldıktan sonra 30°C’de 4-5 gün inkübe edilir. Üreaz enzimi varlığında ürenin parçalanması ile ortaya çıkan amonyakın neden olduğu alkali pH, renk indikatörünü (fenol red) pembeye dönüştürür. Sonuç olarak Christensen’in üre agarının rengi pembeye dönüşürse pozitif, renk değişimi olmadan orijinal sarı renginde kalırsa negatif reaksiyon olarak değerlendirilir (33).

2.5.4. Serolojik Testler

Sistemik kandidozların serolojik tanısında antikor arama testleri yüz güldürücü sonuçlar vermemiştir. Tek bir serum örneği ile tanıya ulaşmak, titre çok yüksek olmadıkça mümkün değildir. İki-üç hafta ara ile alınan örneklerde dört kat titre artışı infeksiyon lehine bir bulgu olmakla beraber, mantar infeksiyonları genellikle immunolojik olarak baskılanmış kişilerde geliştiğinden yeterli antikor yanıtı olmayıp, yalancı negatiflikler testlerin duyarlılığını düşürmektedir. *Candida*’larda mukoza yüzeylerindeki kolonizasyonlar yalancı pozitif sonuçlara yol açarak testlerin özgüllüklerini azaltmaktadır. Antijen testleri ile kombine değerlendirildiklerinde tanıya yardımcı olabilirler (30, 34). Serumda veya vücut sıvılarında mantar antijenlerinin veya metabolitlerinin aranmasına yönelik testler sistemik mantar infeksiyonlarının serolojik tanısı için daha değerlidirler.

Mannan: Mannan; *Candida* hücre yüzeyinin, infeksiyon sırasında, dolaşıma geçen karbonhidratıdır. Sağlıklı bireylerde antimannan antikorları mannani dolaşımdan hızla uzaklaştırdığı için kandaki düzeyi hızlı düşer. Bu nedenle saptanabilmesi için hastadan sık kan örneği alınması gerekir. Ancak immünsüprese kişilerde yeterli antikor yanıtı olmadığından mannan antijeninin aranması yararlı olmaktadır. Değişik çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüğüne ilişkin farklı oranlar bildirilmektedir. Ardışık serum örneklerinin test edilmesi duyarlılığı arttırabilir (34, 35, 36, 37). Ayrıca infeksiyonun antifungal tedaviye cevabını kontrol etmeye de yarayabileceği öne sürülmektedir (24). Günümüzde en yaygın kullanılan test mannan antijen testidir.

D-arabinitol: D-arabinitol aslında bazı *Candida* türlerinin metabolik ürünüdür. Sistemik kandidozlu hastaların idrarında düzeyi artar. Bu testinin duyarlılığı %50 civarındadır (14, 35). D-arabinitol’un belirlenmesi tanıya destek olduğu gibi;

konsantrasyonunun azalması mantar metabolizmasının yavaşlaması ile hastalığın iyi, yükselmesi ise hızlanması ile kötü seyrini gösterir (30).

Enolaz: Hücre duvarı antijenleri ile kolonizasyon durumunda da karşılaşmak mümkün iken sitoplazmik antijenlerin sadece invazyonda bulunması gerektiği varsayılarak çeşitli testler geliştirilmiştir. Bunlardan enolaz aranmasının, çok merkezli bir çalışmada % 86 duyarlı, % 96 özgül olduğu saptanmış, ilerisi için umut verici bulunmuş ve hatta kan kültürlerinin önüne geçeceği dahi savunulmuştur (30, 37). Ardışık alınan kanlarda aranmasının duyarlılığı artıracığı kabul edilmektedir. Ayrıca enolaz *Candida* türlerine oldukça özgül olup yüzeysel kandidozlarda serumda saptanmaması bir avantajdır (35).

Salgısal aspartik proteinaz (SAP): *Candida* türleri tarafından ekstraselüler olarak salgılanan, aktif doku invazyonu sırasında üretilen, indüklenebilir bir enzimdir. Teorik olarak diagnostik antijen olarak kullanımı, bu özelliği nedeniyledir. Enzimin üretimi invazif hastalıkla korele iken basit kolonizasyon ile korele değildir (34, 37).

β -D-Glukan: β -D-Glukan testi sadece kandidozlara özgü olmayıp *Zygomycetes* ve *Cryptococcus* türleri dışındaki mantarlarda bulunan polisakkarid yapıda karakteristik hücre duvarı elamanıdır. Prokaryotlar, virüsler ve insanda bulunmaz. Febril epizottaki hematolojik maligniteli hastalarda yapılan ilk çalışmalarda duyarlılığı % 90, özgüllüğü % 100 bulunmuştur. Tanı spektrumunun geniş olması bir avantajı iken tür belirleyememesi bir dezavantajdır (34, 35, 36, 37).

2.5.5. Hasta Örneklerinde Etkenin Spesifik Nükleik Asitlerinin Gösterilmesi

Geçen yüzyılda tanısal yaklaşımlar daha çok mikroorganizmanın biyokimyasal veya morfolojik fenotipinin belirlenmesine dayalı olarak gerçekleştirilmekte iken, moleküler yöntemlerin son yıllarda yaygınlaştığı dikkati çekmektedir. Moleküler tanısal uygulamalar etiyolojik tanıda hız, duyarlılık ve bazı durumlarda da özgüllük artışına sebep olmuştur. Kandidozlar konusundaki moleküler çalışmalar üç ana hedefe yönelik olarak gerçekleştirilmektedir.

- i. Klinik örneklerden *Candida* türlerinin erken ve çabuk saptanması
- ii. Doğrudan klinik örnek veya kültür ortamında cins veya tür düzeyinde hızlı tanımlama
- iii. Antifungal duyarlılığın ve tedaviye yanıtın ortaya konması (38).

Örneklerin mikroskopik incelemesi, mantar infeksiyonlarının tanısında oldukça özgül ve önemli olmakla beraber, duyarlılığının düşük olması farklı tanı yollarını gerekli kılmıştır. Etkenin üretilerek gösterilmesi daha özgül olsa da mantarlar geç üredikleri için zaman kaybına yol açmaktadır. İmmünsüprese hastalarda antikor yanıtı iyi olmadığından serolojik testlerin başarısı ne yazık ki düşüktür. Antijen ve metabolit tarayan testler ümit verici olmakla beraber altın standart bir test henüz geliştirilememiştir. Dolayısıyla nükleik asit tespitine dayalı tanı yolları gündeme gelmiş, yeni olmakla beraber bazı sonuçlar alınmaya başlanmıştır (30).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve diğer benzer amplifikasyon yöntemleri, klinik örneklerde küçük miktardaki hedef DNA'yı belirlemeye izin verir. Literatürlerde sistemik mantar infeksiyonlarının tanısında PZR kullanımı konusunda ve kültür ve serolojik yöntemlere göre duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olduğuna ilişkin yayınlar vardır (39). En iyi amplifikasyon sonuçları realtime PZR ile elde edilmiştir. Maaroufi ve ark. yaptıkları bir çalışma sonucunda, PCR-RFLP (Polymerase chain reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) analizi ile kan örneğinde 5 CFU/ml maya hücresinin bile saptanabildiği ifade edilmektedirler. *C.albicans*'ın PZR temelli tanısının geleneksel kan kültüründen çok daha duyarlı (%100), özgül (%97) ve tekrarlanabilir (%96-99) olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple fungal yükün çok az olması sebebiyle kültür ve serolojik tanının henüz yetersiz olduğu evrede, PZR temelli tanı çok etkindir (38). Ancak çalışmalar araştırma programları olan akademik merkezlerde sınırlı kalmıştır. Ayrıca maliyet oldukça yüksektir. Duyarlılığı artıracak ve maliyeti düşürecek birçok çalışmanın daha yapılması gereklidir. Nükleik asit belirlenmesinin gelecekte primer tanı yolu olacağı tahmin edilmektedir (30).

2.6. *CANDIDA* İNFEKSİYONLARI

Oral Kandidiyaz: Dudaklar, dil, damak dişetleri, yanak mukozası olmak üzere ağzın her yerinde gelişebilir. Genellikle lezyonlar ayrı ayrı küçük veya bir katman oluşturan pamukçuk şeklindedir. Daha çok antibiyotik veya kortikosteroid kullanan hastalar, diyabetikler veya hücrel bağışıklık bozukluğu gösteren hastalarda, süt emen bebeklerde ve AIDS' li hastalarda görülür. Lezyon genellikle kendini sınırlar (3, 40, 41).

Candida Özefajiti: Sıklıkla kazanılmış immün yetmezlik sendromu, lenfoma, lösemi ile ilişkili olmakla birlikte immünkompromize olmayan hastalarda da meydana gelebilir.

Orofarengeal kandidiyazla birlikte ya da bağımsız bir bulgu olarak ortaya çıkabilir (3, 41, 42).

Onikomikoz ve Paronişya: Tırnak infeksiyonlarının %5-10'unda etken *Candida*'lardır. Bu infeksiyonda nem önemli bir predispozandır. Tırnak ile birlikte tırnak çevresindeki yumuşak dokunun infeksiyonu olan paronişya birlikteliği karakteristiktir (3).

Kronik Mukokutenöz Kandidiyaz: Genellikle erken çocukluk döneminde başlayan, hücrel immün yetmezlik ve endokrinopatilerle ilişkili bir hastalıktır. Bu grup bozukluklar, cilt, tırnak ve muköz membranlardaki kalıcı ve tekrarlayan *Candida* infeksiyonları ile oluşmaktadır (3, 41, 42).

Vulvovajinal Kandidoz (VVK): Yaş, östrojen, gebelik, antibiyotik kullanımı, diabetes mellitus, başta lichen sklerozis, ekzema, dermatit olmak üzere vulval dermatozlar, *Candida* kolonizasyonunu ve daha sonra da semptomatik VVK riskini arttırmaktadır (43). Doğurganlık çağındaki sağlıklı kadınların %75'i hayat boyunca en az bir VVK atağı geçirirler (3, 41, 43). VVK lu kadınlarda en sık görülen klinik semptom kaşıntıdır. Akıntı sıklıkla azdır veya bulunmamaktadır. Hastada vajinal ağrı, irriyasyon vulval yanma, disparoni ve dizüri siktir (43).

Kandidemi: Bir veya birden fazla kan kültüründen *Candida* izole edilmesi (kandidemi) invazif kandidozun en sık karşılaşılan şeklidir ve invazif kandidozu olan hastaların % 50-70'inde karşımıza çıkar (44). Ciddi organ tutulumu olanların yaklaşık %50'inde kandidemi saptanamayabilir (3,42). Kandidemi sıklıkla sepsisin ve organ disfonksiyonunun klinik bulguları ile birlikte dir. Kandidemisi olan hastaların temsil ettiği klinik tablo oldukça geniş spektrumludur (kontamine santral venöz katetere bağlı geçici veya kendisini sınırlayan kandidemiden, sepsise, çoklu organ yetmezliği ve hızlı ölüme kadar giden bir klinik tablo) (44). Kan kültürü pozitif çıkanların hepsinde derin infeksiyon olduğu iddia edilemezse de kanında *Candida* saptanan hastalar, gerek infeksiyonun akut etkilerini gerekse uzun dönemli sekellerini önlemek üzere, tedavi edilmelidir (3).

Akut Dissemine Kandidiyaz: Fulminan bir infeksiyondur. Nötropenik olan ve olmayan hastalarda görülebilir. En sık rastlanan komplikasyonlar; menenjit, beyin apsesi, renal apse, miyokardit, endokardit, endoftalmit, kutenöz apselerdir (3).

Kronik Dissemine Kandidiyaz: Çoğunlukla lösemili hastaların nötropenik döneminde ortaya çıkar, ısrarcı ateş vardır. Nötrofil sayısı normale dönse de ateş ve kilo kaybı devam

eder. Karaciğer-dalاک büyüeyebilir; alkalen fosfataz genellikle çok yüksek olup, tomografide çoklu lezyonlar görülür (3).

Pulmoner Kandidiyaz: Ender bir klinik tablodur. Nötropenik hastalarda mikroorganizmanın hematojen yayılımı sonucu; düşük doğum ağırlıklı bebeklerde ise ağız salgısının aspirasyonu sonucu ortaya çıkar (3).

Menenjit: Dissemine kandidiyazın bir belirtisi olarak ya da bağımsız bir klinik tablo şeklinde gelişebilir. Düşük doğum ağırlıklı bebeklerde veya ventriküloperitoneal şantı bulunan hastalarda, hematojen yayılım sonucu ya da bir travma ile mantarın doğrudan subdural bölgeye inokülasyonuna bağılı olarak ortaya çıkar (3, 45).

Beyin Apsesi ve Metastatik Ensefalit: Nadir görülen hastalıklardır. Büyük beyin apseleri fokal nörolojik belirtiler verir; hematojen yayılım sonucu oluşan mikroapseler ise nörolojik bozukluklara yol açmayabilirler (3).

Endokardit: İnfeksiyon, özellikle protez kalp kapağı olanlarda ve damar içi madde bağımlılarında giderek artış göstermektedir (41, 46). Kan kültürleri ve embolilerden alınan pıhtıdan yapılan kültürler tanı koydurucudur (3)..

Miyokardit: Endokarditin bir komplikasyonu olarak apse gelişebilir ya da genellikle hematojen yayılım sonucu gelişen dissemine infeksiyonun bir belirtisi olarak ortaya çıkabilir. *Candida* miyokarditli hastaların %50'si dissemine infeksiyondan ölür (3).

Osteomyelit: Genellikle hematojen yayılım sonucu ortaya çıkar. Bazen aspirasyon ya da kortizon injeksiyonu sırasında ve daha seyrek olarak bir travma sonrası gelişebilir. Kanser hastalarında ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerde daha fazla görülür (3).

Artrit: Hematojen yayılım, infekte kemikten yayılım veya travmayı takiben mikroorganizmanın direkt inokülasyonu sonucu oluşur. Genellikle omuz, diz gibi büyük eklemler tutulur ve özgül olmayan pek çok semptomlar da belirir (3).

Üriner Sistem İnfeksiyonları: Diyabetes mellitus, uzun süreli antibiyotik kullanımı, Foley kateter ve üriner sistemde diğey yabancı cisimlerin varlığı risk faktörleridir. Renal toplayıcı sistemde fungus topu ve alt üriner sistemde infeksiyon gelişebilir (3).

Renal Kandidiyaz: Dissemine kandidiyazlı hastaların %80'inde, genellikle organizmanın hematojen yayılımı sonucu gelişir. Apse oluşumu siktir. Bazen hif kümeleri pelvis ve üreterleri tıkayarak hidronefroza veya anüriye yol açabilir (47, 48, 49).

Alt Üriner Sistem İnfeksiyonları: Genellikle bir üretral kateterden ya da genital veya GİS'den yayılım sonucu meydana gelir. Diyabetli ya da üriner sisteminde anormallik veya hasar bulunanlar risk altındadır (47). Tanı: *C.albicans* en sık rastlanan etken olmakla beraber, üretral kateterli ve diyabetes melitusluların %30'undan *C.glabrata* izole edilmektedir. Kültürlerin yorumunda $10^3, 10^4, 10^5$ maya/ml idrar üst, alt üriner sistem infeksiyonunu ayırt ettirmediği gibi, kolonizasyon ile aktif infeksiyonun ayırımında da kesin fikir vermez. Bununla birlikte genel klinik durum ile birlikte değerlendirildiğinde az sayıda maya varlığı bile önemli olabilir (3).

Kandidüri: Yatan hastalarda kandidüri görülme sıklığı artmasına rağmen idrarda maya varlığının önemi açıkça belli değildir. İdrarda *Candida* varlığı, kontaminasyon, kolonizasyon veya infeksiyonun bir yansıması olabilir; ancak kolonizasyonu infeksiyondan ayırt edebilecek güvenilir bir yöntem henüz yoktur (28, 49, 50, 51). Kandidüri olgularının çoğu asemptomatiktir (48, 52). *C.tropicalis*, *C.glabrata* gibi non-*albicans* türler sıklıkla idrardan izole edilselerde *C.albicans* hala en sık görülen türdür (50). İdrardan *C.tropicalis* izolasyonu, dissemine kandidiyazın belirtisi olarak *C.albicans* izole edilmesinden daha anlamlıdır (47, 51). *C.parapsilosis* yenidoğanların idrarında daha sık bulunur ve genellikle bu grupta sistemik infeksiyonla ilişkilidir (53). İleri yaş, cinsiyet, uzun süre hastanede yatış, diabetes mellitus, total parenteral beslenme, mekanik ventilasyon, antimikrobik kullanımı, üriner kateterler gibi risk faktörleri kandidüri ile yakından ilişkilidir (44, 50, 53). Akut ve kronik ciddi hastalığı olanlarda kandidüri, sistemik kandidiyaz için risk oluşturabilir (46, 52, 54, 55). Hatta ciddi hastalığı olanlarda kandideminin önemli bir belirteci olabilir (51, 56, 57). Kandidüriye bağlı kandidemi gelişme riski % 0-10.5 oranları arasında bildirilmiştir. Özellikle üriner sistemde tıkanıklık olan hastalarda kandidüriye bağlı kandidemi riski artmaktadır. Asemptomatik kandidürinin sıklıkla yaşlı debil hasta grubunda mortalite riski açısından bir gösterge olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (44). Kandidüri tedavisinde amfoterisin B ile mesane irigasyonu ve kısa süreli sistemik amfoterisin B ya da flukonazol gibi antifungal ajanların kullanılması gerekebilir (52).

Nozokomiyal Fungal İnfeksiyonlar

Nozokomiyal mantar infeksiyonları açısından en riskli grubu yoğun bakım ünitelerinde izlenen hastalar oluşturur (46). Yoğun bakım ünitesinde patojen olarak mantarların önemi; hastalara sunulan yaşam desteği imkanının artması, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, invazif girişimlerin sık kullanılması ve infeksiyonlara duyarlı yaşlı hasta popülasyonundaki artışın sonucu olarak artmaktadır (54, 55, 58). *Candida* türleri nozokomiyal kan infeksiyonları arasında dördüncü sırada iken, yoğun bakım ünitesinde nozokomiyal kan infeksiyonları arasında üçüncü sıradadır (59).

Son zamanlarda non-*albicans Candida* türleri yoğun bakım ünitesinde hastalar için önemli patojen olarak artmaktadır (55, 58). En sık izole edilenler *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* olarak sayılabilir (58). Yapılan çalışmalarda yoğun bakım hastalarında, mikozların sadece endojen kaynaklı olmadığı, hastadan hastaya veya sağlık personelinin hastaya geçebildiği epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir (46).

2.7. MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİ

Moleküler epidemiyoloji, potansiyel genetik ve çevresel risk faktörlerinin katkılarına odaklanmış mikroorganizmaların etiyojisini, dağılımını ve yayılma yollarını moleküler seviyede tanımlayan bir bilimdir (60). ‘‘DNA fingerprinting’’ oluşturmayı hedefleyen moleküler tiplendirme yöntemleriyle tür içinde değişken ancak suşlarda stabil olan belirli genetik göstergeler kullanılarak salgın esnasında toplanan, epidemiyolojik olarak ilişkili, aynı tür içindeki izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılmaktadır (61). Epidemiyolojik olarak bağlantılı suşlar aynı DNA profillerini veya paterni paylaşır. Aynı zamanda sporadik veya epidemiyolojik olarak bağlantısız suşlar belirgin şekilde farklı paternlere sahiptirler. Şayet farklı hastalardan izole edilen suşlar aynı fingerprinting (parmakizini) paylaşıyorlarsa bu suşların aynı klondan kaynaklandıkları, hastadan hastaya veya ortak bir kaynak veya mekanizma ile bulaştıkları muhtemeldir (60). Klonal ilişkili suşlar ortak virulans faktörleri, biyokimyasal özellikleri ve genetik karakterleri paylaşan, aynı türün üyesidir (61). Epidemiyolojik amaçlı tiplendirmelerin en yaygın kullanım alanları;

- I) Salgınların kaynağı ve yayılma yollarının belirlenmesi.

- II) Antifungal tedavi sonrasında hastadan aynı mantar türünün tekrar izole edilmesi durumunda bunun relaps mı yoksa reenfeksiyon mu olduğunun belirlenmesi.
- III) Hastane ortamındaki mikroorganizma klonlarının ortaya konması.
- IV) İnfeksiyon etkeni mikroorganizmanın infeksiyon bölgesine translokasyon sonrası mı ulaştıkları veya kolonize olmuş olan türün mü etken olduğunun belirlenmesi şeklinde özetlenebilir (60, 61, 62, 63, 64).

2.7.1. Fungal İnfeksiyonlarda Moleküler Epidemiyoloji

Fungal genotiplendirmede sıklıkla kullanılan yöntemler; restriction fragment length polymorfism (RFLP), random amplification of polymorphic DNA (RAPD), multilocus sequence typing (MLST), mikrosatellit analizi, elektroforetik karyotipleme, baz dizi analizi olarak sayılabilir.(39, 63, 65).

2.7.2. Hastane İnfeksiyonları Kontrolünde Moleküler Mikrobiyolojinin Önemi

Hastane infeksiyonları sporadik, endemik ve epidemik olarak görülür. Endemik infeksiyonlar en sık görülendir ve kontrol önlemlerinin sürekli ve yaygın uygulandığı alanlardır. Riskli hastaların yattığı yoğun bakım üniteleri gibi birimlerde endemik infeksiyonların 1/3'ünden fazlası çapraz bulaşmayla meydana gelmektedir; kontrol önlemlerinin yetersizliği halinde bu oran daha da yükselir. Moleküler mikrobiyolojik yöntemler hastane infeksiyonları etkenlerinin bulaşma yollarını, mekanizmalarını çıkarmada, klonal ilişkinin varlığı veya yokluğunu belirleyerek infeksiyonların yayılımının takibine çok önemli katkı sağlar (66). Moleküler tiplendirme yöntemleri hastane ve toplum kaynaklı infeksiyonlarının ayrımını yapabilmektedir. Epidemik klonların sirkülasyonu ve zaman içindeki prevalansı izlenerek, epidemiyolojik sürveyans ve kontrol yöntemlerinin değerlendirilmesi yapılmaktadır (67).

2.8. RANDOM AMPLİFİKATION OF POLYMORPHİC DNA (RAPD)

1990'ların başından itibaren polimeraz zincirleme reaksiyonu (PZR) tekniği ile çok küçük miktarlardaki DNA'nın çoğaltılması ve kolaylıkla agaroz jel de görülebilmesi mümkün olmuştur. Böylece türe özgül DNA ürünlerinin çoğaltılması ve birbirine çok

yakın türlerin ayrılabilmesi sağlanmıştır (68). Epidemiyolojik tiplendirme amacıyla en çok başvurulan yöntemlerden biri olan RAPD tekniğinde mikroorganizma genomu rasgele olarak çoğaltılır ve ortaya çıkan patern farklılıkları değerlendirilir (62, 63). Kullanılan primerler, tiplendirilecek mikroorganizmanın genom bilgisine gereksinim olmaksızın tamamen rasgele olarak seçilebilecekleri gibi, genom içerisindeki belirli bölgelere yönelik bilinçli olarak seçilebilir (62, 69). Bu yöntem ilk kez 1990 yılında Welsh ve McClelland tarafından tanımlanmıştır.

Primerlerin bağlanma yerleri arasındaki uzaklık farklılıkları agaroz jelde saptanabilen farklı sayı ve uzunlukta (baz çifti) bantların oluşmasına neden olur. Kullanılan primerler genelde 9-10 bazlık kısa primerlerdir ve G-C'den zengindirler (en az %40 G+C içermelidir). Bağlanma ısısı 40-50°C'ye düşürülmüştür. Bağlanma sırasında primerler kromozom üzerinde hem kendilerine özgül bölgelere hem de diğer bölgelere bağlanmaktadır. Aynı tür içinde farklı suşlarda primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirlerine uzaklıkları farklı olacağı için, jel elektroforezinde amplifiye edilen parçaların sayı ve büyüklüğü de farklı olacaktır. Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırılır. Aynı bant profili gösteren izolatlar epidemiyolojik olarak ilişkili kabul edilir (69).

Uygulama kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilmesi açısından geniş kullanım alanı bulan bu yöntemin en önemli dezavantajı henüz standardizasyonun sağlanamamış olmasıdır. Standardizasyonu sağlamak için, standardize edilmiş amplifikasyon karışımı, aynı thermocycler'da standart bir amplifikasyon protokolüyle uygulanmalı, tüm izolatlar aynı anda çalışılmalıdır (69).

2.9. *CANDIDA* İNFEKSİYONLARININ EPİDEMİYOLOJİSİ

Son iki dekatta önemli patojenler haline gelen *Candida* türleri, hem yüzeysel hem de derin infeksiyonlara sebep olabilirler. Yüzeysel infeksiyonlar çoğunlukla toplumda görülürken, derin sistemik infeksiyonlar nozokomiyal orijinlidir. Nozokomiyal özelliği yanı sıra *Candida* infeksiyonlarının fırsatçı özelliği de belirgindir. İnfeksiyonlar çeşitli risk faktörleri olan kişilerde görülür ve risk faktörlerinin derecesi ile orantılı olarak ciddiyeti artar. Fırsatçı mantar patojenleri arasında en önemli yeri *Candida* türleri almaktadır. *Candida* türleri tüm nozokomiyal kan dolaşımı infeksiyonlarının % 8-10'unu oluştururken, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) sıklığı yılda 6-23/100.000 olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda nozokomiyal kandidozun mortaliteyi % 10-49 oranında artırıcı etkisi olduğu saptanmıştır. Bunun ötesinde ciddi boyutlarda maliyet artışına sebep olmaktadır. *C.albicans* hasta örneklerinden halen en fazla izole edilen türdür ve mukoza infeksiyonlarının % 90-100'ü ve kandidemilerin % 50-70'i *C.albicans* ile gelişir. *Candida* türlerinin etken olduğu kan dolaşımı infeksiyonlarının % 95-97'si *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* ve *C.krusei* olmak üzere beş *Candida* türü ile gelişmektedir. Kalan infeksiyonlardan (% 3-5) ise *C.lusitaniae*, *C.guilliermondii*, *C.rugosa* gibi farklı türler sorumlu olmaktadır. Bu türlerin sayısı 12-14 civarındadır ve özellikle 2004 yılından sonra kan kültürlerinde bu türlerle karşılaşma ihtimali artmıştır (70).

Özellikle immünsüpresif hasta grubunda *C.albicans* dışında kalan *Candida*'ların neden olduğu çeşitli infeksiyonlar önemle vurgulanmış ve 1980'lerde %1-5 olarak belirtilen infeksiyon oranının 1990'dan sonra %10-25 olarak saptandığına dikkat çekilmiştir (24).

Candida glabrata, ABD ve Kanada'da *C.albicans*'dan sonra ikinci sıklıkta izole edilen türdür. Başta flukonazol olmak üzere azol grubu antifungallere dirençli olabilmesi açısından önemlidir. ABD'de *Candida*'ya bağlı kan dolaşımı infeksiyonlarında %22 oranında izole edilirken, Avrupa'da %8-9, Latin Amerika'da % 4-6 oranında görülür.

Candida parapsilosis, Avrupa (%12) ve Asya-Pasifik (%17) ülkelerinde, *C.albicans*'dan sonra ikinci sıklıkta izole edilen türdür. Latin Amerika'da da insidansı giderek artmaktadır. *C.parapsilosis* vasküler kateterler ile ilişkili olup, hastane çalışanlarının elinde en fazla bulunan türdür.

Candida tropicalis özellikle kanser hastalarında ve kemik iliği alıcılarında kandidemi ve invazif kandidozdan sorumlu olan türdür. *C.tropicalis* ile kolonize nötropenik hastalarda % 60-80'e varan oranlarda invazif kandidoz gelişme riski vardır. Bu tür hastalarda profilaktik flukonazol tedavisinin en önemli hedefi *C.tropicalis* ve *C.albicans* kolonizasyonunu azaltmaktır. Kuzey Amerika'da *C.tropicalis*, *Candida*'ya bağlı kan dolaşımı infeksiyonlarında dördüncü sırada (%7) görülürken, Latin Amerika'da ilginç olarak ikinci (%20) sıradadır. *Candida krusei*, *Candida*'ya bağlı kan dolaşımı infeksiyonlarının % 2-4'ünden sorumludur. Özellikle flukonazol profilaksisinin görülme sıklığına etkisi üzerinde durulmaktadır (70).

2.9.1. Ülkemizde *Candida* İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

Ülkemizde *Candida* infeksiyonlarının epidemiyolojisi hakkında yeterli veri bulmak zordur. Ülkemizde insidansa yönelik olarak sadece iki veri bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi Yapar ve ark'na ait olup, 10.000 başvuruda kandidemi görülme sıklığını 5.6 olarak bulmuşlardır (71). Diğer çalışmada ise Ener ve ark 10.000 başvuruda görülme sıklığını 22 olarak vermişlerdir (72). Ülkemizde *Candida* tür dağılımı ile ilgili daha fazla bilgi vardır. Ülkemizde kandidemilerde *C.albicans* oranı % 32-65 arasında değişmektedir. Genel olarak bakıldığında ikinci sırada bulunan tür *C.parapsilosis'* dir. *C.glabrata* ve *C.krusei* ülkemizde genel olarak düşüktür. Genel olarak bakıldığında ülkemizde kandidemilerde *C.albicans'* dan diğer *Candida* türlerine kayış olduğu söylenebilir (70).

2.10. ANTİFUNGAL İLAÇLAR

Amfoterisin B

1950'li yılların sonlarına doğru kullanıma giren amfoterisin B, *Streptomyces nodosus'*un bir suşundan elde edilmiştir. Hücre membranında ergosterole irreversibl bağlanarak hücre permeabilitesini bozar, sitoplazmik içerik dışarı sızarak hücre ölümü meydana gelir. Sistemik kandidiazis ile aspergillozis, mukormikozis, kriptokokkozis, koksidiomikozis, dissemine histoplazmozisde en sık tercih edilen ilaç olup fungisid etkilidir (73). *C.lusitania*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis* türlerinde direnç bildirilmiştir (74). Mantarların hücre membranlarındaki ergosterol sentezini azaltarak, amfoterisin B'ye dirençli hale geldikleri düşünülmektedir (74, 75).

Oral kullanımda emilimi iyi değildir, Deri ve mukozadan, gastrointestinal sistemden emilim iyi değildir. Plazma lipo-proteinlerine yüksek derecede bağlanır. Yan etkileri: döküntü, ateş, bulantı, anafilaksi, eklem ve kas ağrıları olabilir (73). Tedavi sırasında nefrotoksisite görülebilir. İlacın böbreklere olan yan etkisi, doza bağlı olarak. direk vazokonstrüktif etki ile böbrek kan akımını ve glomerulerfiltrasyon hızını azaltmasıyla meydana gelir (76).

Flusitozin

Etkinliğini primidin metabolizmasını bozarak fungal hücrede DNA ve protein sentezini engelleyerek gösterir. Sitozin permeaz aracılığıyla fungal hücreye girer ve burada sitozin

deaminaz ile 5-florourasil dönüşür. 5-florourasil urasilfosforibozil transferaz ile 5 floro-uridilik asit ve 5 floro-deoksiuridin monofosfata çevrilir. 5 floro-uridilik asit RNA ile etkileşir ve protein sentezini bozar. Aynı zamanda 5 floro-deoksiuridin monofosfat DNA sentezinde rol oynayan timidilat sentetazı inhibe eder (74).

Suda çözünebilir ve oral olarak verildiğinde % 80-90 oranında emilir. Böbreklerden % 90'ı değişikliğe uğramadan atılır. Proteinlere bağlanma oranı düşüktür. Etki spektrumu; *C.krusei* dışındaki *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, ve *Aspergillus* türlerini içerir. Yan etkileri doza bağlıdır. Düşük dozlarda bulantı, kusma, diyare, başağrısı, karaciğer enzimlerinde yükselme görülür (76). Direnç gelişimi önemli bir problem olup en önemli nedeni ilacın tek başına kullanımınıdır. Direnç sitozin deaminazdaki hasar yada urasilfosforibozil transferaz enziminin aktivitesinde azalma, sitozin permeaz aktivitesinin kaybına bağlı gelişebilir (75).

Azoller

Azollerin etki mekanizması lanosterolün ergosterole dönüşümünden sorumlu olan sitokrom P450'ye bağımlı olan 14 α -demetilazı inhibe etmek yoluyla olur. Bu süreç fungal organizmalar için gerekli ergosterolü azaltır. Azollerin antifungal aktivitesi sonucunda sitoplazmik membran bütünlüğü ve fonksiyonları bozulur, besin transportu ve kitin sentezi kaybolur ve mantarın büyümesi inhibe olur (75). İnsan hücrelerindeki sitokrom P450 enzimi ile etkileşime girerek, testesteron ve glukukortikosteroid yapımı azalır (76). Azollere direnç önemli bir klinik sorundur. İlacın hedefi olan lanosterol demetilaz enziminin kalitatif ve kantitatif değişiklikleri ve dolayısıyla hücre içindeki ilaç konsantrasyonunda azalma yada daha önemli olarak başlangıçta hedefine kolayca giren ilacın efluks sistemi ile dışarı atılması, olası direnç mekanizmaları olarak sayılabilir (75).

Flukonazol: *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformansa* karşı etkilidir. *C.krusei* flukonazole karşı intirinsik direnç göstermektedir. *C.glabrata*'da genellikle yüksek MİK değerlerine sahiptir (73, 77). Oral ve parenteral olarak kullanılır. Yüksek kan düzeyine ulaşır ve BOS dahil tüm dokulara iyi dağılır. Ağızdan verildikten sonra hızlı ve tama yakını emilir, ağızdan ve parenteral verilmede eşdeğer serum yoğunluklarına ulaşır. Serum proteinlerine düşük oranda bağlanır (%11). Yan etkileri; genellikle iyi tolere edilir. En sık karşılaşılan yan etki bulantı olup, tedaviyi kesmek nadiren gerekebilir, kusma, karında

gerginlik, rahatsızlık bildirilmiştir. Hastalarda karaciğer enzimlerinde yükselme olabilir bu yüzden tedavi uzadığında karaciğer fonksiyonları izlenmelidir (73).

Itrakonazol: *Aspergillus* türleri, *Candida* türeri, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, diğer dimorfik primer patojen mantarlar ve *Sporothrix schenckii*, dermatofit türleri, *Malassezia* türleri, subkutan infeksiyon etkenlerine etkilidir. Oral kullanımda emilimde değişkendir, gastrointestinal yoldan emilim tam olmaz (%55), yiyeceklerle birlikte verildiğinde emilim artar. Mide asidi arttığında serum yoğunluğu düşer. Protein bağlama %99, BOS yoğunluğu en az düzeyde olup, akciğer, karaciğer ve kemikteki yoğunluğu serumdakinden 2-3 kat daha yüksektir. Yan etkileri; iyi tolere edilir fakat bulantı, kusma, karında rahatsızlık ve epigastrik ağrı, kabızlık, baş ağrısı (nadir), baş dönmesi, pruritus, allerjik döküntüye sebep olabilir. Yüksek dozda (400 mg/kg/gün) uzun süreli tedavi sırasında hipokalemi olasıdır, karaciğer hastalığı olan kişilerde kullanımından kaçınılmalıdır (73).

Ekinokandinler

Memelilerde bulunmayan 1-3 beta D-glukan sentezini inhibe eder. Bunun sonucunda hücre duvar bütünlüğü bozulur ve hücrenin ölümüyle sonuçlanır. Kaspofungin, 1-3 beta D-glukan sentetaz enziminin nonkompetatif inhibitörüdür. *Candida*'lara karşı fungisidaldir. *Aspergillus*'a karşı etkili olmakla birlikte çoğalmakta olan hiflere etkisi sınırlıdır. *Cryptococcus neoformans*'a karşı etkisizdir (76).

2.11. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

Mantarlar için standart antifungal duyarlılık testlerinin geliştirilmesi için ilk çalışmalar 1982 yılında "National Commite for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) tarafından başlatılmıştır. İlk olarak 1992 de referans standart yöntem olarak M27-P kabul edildi. 1995'de M27-T açıklandı. 1992'de ise antigungal ilaçlar için uyumlu inhibisyon konsantrasyonlarını geliştiren çalışma sonuçları ve referans yöntemi için bazı özel koşullarda uygulanması önerilen değişiklikleri içeren M27-A hazırlandı. En son olarak 2002'de CLSI M27-A2 dökümanını hazırlamıştır. Antifungal duyarlılık testleri;

1) Etken mikroorganizmaya etkili olduğu bilinen antifungal ilaç ile tedaviye yanıt alınmadığı durumlarda,

- 2) Alternatif ilaçların araştırılmasının gerektiği ve özellikle seçilen ilaca karşı mantarın direnci olduğu bilinen durumlarda (örn: *C.lusitaniae* ile amfoterisin B gibi),
- 3) Flusitozin ile tedavi yapılıyorsa (direnc sıklıkla görülmektedir),
- 4) Yeni ilaçların kullanıldığı durumlarda,
- 5) Ağır immun sistem yetmezliği bulunan hastalarda (nötropeni v.b.) sistemik infeksiyon geliştiği zaman,
- 6) İn vitro ve in vivo uyumun araştırıldığı durumlarda uygulanmalıdır (78).

Antifungal duyarlılık testlerinin iki farklı uygulama amacı vardır; rutin laboratuvarlarda klinik açıdan gerekli görüldüğü bazı durumlarda tedaviyi yönlendirmek ve epidemiyolojik veriler elde etmektir. Her merkezde hastanede yatan olgulardan izole edilen suşların antifungal ajanlara duyarlılıklarının periyodik olarak belirlenmesi, o merkezdeki duyarlılık paternini ve direnc oranını belirlemek açısından önemlidir. Bu tür epidemiyolojik çalışmalarla, *Candida* suşlarını flukonazole ve flusitozine duyarlılığın belirlenmesi önerilmektedir (79). Önerilen antifungal duyarlılık testleri Tablo 1’de görülmektedir (78).

Tablo 1: Antifungal Duyarlılık Testleri

Yöntemler	MİK değerlerinin ölçülmesi
Buyyon makrodilüsyon	Görsel (1:5 kontrol üreme bulanıklığı ile karşılaştırma), ATP fotometre, bulanıklığı ölçme (turbidometre), kolorimetre, radyometre
Buyyon mikrodilüsyon	Görsel (kontrol üreme bulanıklığı ile karşılaştırma), ATP fotometre, bulanıklığı ölçme (turbidometre), kolorimetre, radyometre
Kolorimetrik buyyon mikrodilüsyon	Renk değişiminin görsel izlenmesi
Agar dilüsyon	Görsel
Agar difüzyon	Görsel (zon çapı ölçümü)
Disk	Görsel (inhibisyon zonu)
E-test	

2.11.1. Mikrodilüsyon Yöntemi

Tablo 2: CLSI M27-A2 mikrodilüsyon yönteminin temel prensipleri

Özellik	Standart
Yöntem	Mikrodilüsyon
İnokulum konsantrasyonu	$0.5 \times 10^3 - 2.5 \times 10^3$ cfu/ml
Besiyeri	RPMI 1640
Tampon	3-N-Morfolino-propan-sülfonik asit (MOPS)
pH	7
İnkubasyon ısı	35°C
İnkubasyon süresi	48 saat (<i>Candida</i>)
MİK değeri	
Amfoterisin B:	Hiç üreme görülmeyen (berrak) en düşük konsantrasyon (skor 0)
Azoller ve 5-flusitozin	Üreme kontrol çukuruna göre bulanıklığı belirgin (~%50)azaltan en düşük konsantrasyon (skor 2)

Tablo 3: Referans mikrodilüsyon yönteminde MİK değerlerini görsel okumak için kullanılan skorlar

Skorların Anlamı	
+4	Üreme kontrol kuyucuğu ile eşit bulanıklıkta
+3	Üreme kontrol kuyucuğundaki bulanıklığın %75'i kadar bulanık
+2	Üreme kontrol kuyucuğundaki bulanıklığın %50'si kadar bulanık
+1	Üreme kontrol kuyucugundaki bulanıklığın %25'i kadar bulanık
0	Bulanıklık yok (optik olarak berrak)

Minimum inhibitör konsantrasyon direnç sınırları flukonazol, itrakonazol ve 5-flusitozin için kesin olarak belirlenmiştir. Buna göre flukonazol için MİK ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$ duyarlı, 16-32 $\mu\text{g/ml}$ arası doza bağımlı duyarlı, ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ dirençli olarak bildirilmiştir. Itrakonazol için MİK ≤ 0.125 $\mu\text{g/ml}$ duyarlı, 0.25-0.5 $\mu\text{g/ml}$ arası doza bağımlı duyarlı, ≥ 1 $\mu\text{g/ml}$ ise dirençli olarak bildirilmiştir. 5-Flusitozin içinse MİK ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ duyarlı, 8-16 $\mu\text{g/ml}$ arası orta duyarlı, ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ dirençli olarak bildirilmiştir. Amfoterisin B, kaspofungin ve yeni azoller için MİK direnç sınır değeri belirlenememiştir (80).

Tablo 4: *Candida* türleri için MİK direnç sınırları ($\mu\text{g/ml}$)

Antifungal	Duyarlı (S)	Doz bağımlı duyarlı (S-SD)	Orta duyarlı (I)	Dirençli (R)
Flukonazol	≤ 8	16-32	-	≥ 64
İtrakanozol	≤ 0.125	0.25-0.5	-	≥ 1
Flusitozin	≤ 4	-	8-16	≥ 32

2.11.2. Antifungal Duyarlılık Testi Olarak Kullanılan Diğer Yöntemler

E Test: Plastik strip üzerine çeşitli konsantrasyonları emdirilen antifungal ilacın agarlı besiyerine geçişi ile gerçekleştirilen ve MİK değerini saptayabilen bir difüzyon yöntemidir. Mantarların nonüniform büyümesi, flusitozin ve özellikle azoller için yaygın inhibisyon son noktası vermesi, MİK son noktasının belirlenmesini zorlaştırır. Buna rağmen standardize edilmiş tekniklerle, bu metod ve referans metod arasındaki korelasyon *Candida* spp ve azoller için kabul edilebilirdir (81).

Flow Sitometri: *Candida* 'larda yapılan çalışmalarla geliştirilen, hızlı sonuç veren flow sitometrinin referans metodla iyi korelasyon gösterdiği görülmüştür. Yapılan çalışmalar florasan boyaların mayalar ve küflerde ilaca bağlı oluşmuş hasarın şeklini araştırmak için kullanılabileceğini göstermiştir (81).

Kolorimetrik MİK testleri: Mikrodilüsyon yöntemini esas alan ancak MİK okunması için kolaylık ve daha objektif son nokta elde edilmesini sağlamak amacıyla ortama bir oksidasyon-redüksiyon indikatörü ilave edilen yöntemlerdir. Bir çok araştırmacı indikatör olarak Alamar mavisini kullanmıştır. Başlangıçta mavi olan bu indikatör mantarın üremesi ile kırmızı renge dönüşmektedir. MİK değeri kırmızı rengin oluşmasını önleyen en düşük ilaç konsantrasyonudur. Redox potansiyelinin tespiti için kolorimetrik markır olarak MTT veya XTT kullanılmaktadır (78, 81).

Bu yöntemlerin hepsiyle, güvenilir ve standart yöntemle korelasyon gösteren sonuçlar elde etmek mümkündür. Ancak E test pahalı oluşu, kolorimetrik mikrodilüsyonun mevcut yöntemin zorluklarını ortadan kaldıramayışı, flow sitometri ise her mikoloji laboratuvarında uygulamasının mümkün olmayışı nedeniyle pratikte yaygın uygulama alanı bulamamaktadır (79).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Travma, kardiyak arrest ve ameliyat sonrası gelişen solunum yetmezliği gibi nedenlerle uzun süre Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların idrar örnekleri Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarında değerlendirildi. 46 hastadan izole edilen 22'si *C.albicans* 19'u *C.glabrata* 15'i *C.tropicalis* olan 56 suş çalışmaya alındı. Diğer *Candida* türleri çalışmaya alınmadı. Bir hastadan üremenin olmadığı bir periyodun ardından ikinci kez izole edilen aynı ve/veya farklı tür suşlar çalışmaya alındı.

Çalışmamız 7102020 nolu proje ile Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Hastanemiz Etik kurulundan 23.07.2007 tarih ve 2007/159 sayılı kararla onay alınmıştır.

3.1. CANDIDA'LARIN KLİNİK ÖRNEKTEN İZOLASYONU

3.1.1. Kültür

Örnekler Sabouraud Dextrose Agar besiyeri ve kanlı agar besiyerine çift ekim yapılarak 72 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi. Tüm örnekler için üreme olup olmadığı günlük kontrol edildi. Besiyerlerinde inkübasyon sonrası kirli beyaz veya krem renginde, buruşuk veya düzgün kenarlı, nemli, yumuşak kıvamlı, maya kokulu 0,5-1 mm çapındaki kolonilerden basit boyama yapıldı. Mikroskopide maya olduğu anlaşılan mikroorganizmalara tür düzeyinde identifikasyon için germ tüp oluşturma, cornmeal agar morfolojisi, karbonhidrat asimilasyon testleri yapıldı.

3.1.2. Tür Düzeyinde İdentifikasyon

Germ Tüp Oluşturma Özelliği; Test edilecek maya kolonisinden öze ile bir miktar alınıp tüp içindeki 0,5 ml insan serumu içinde süspansiyon haline getirildi; 37°C'de 3 saat inkübe edildikten sonra süspansiyondan bir damla alınıp lam-lamel arası direkt preparat hazırlanarak ışık mikroskobunda 40x objektifle incelendi. Blastospordan köken alan, başlangıç noktasında boğumlanma göstermeyen ve maya hücresinin 3-4 katı uzunluğundaki hif benzeri yapılar, germ tüp olarak kabul edildi. Ana hücreden boğumlanma göstererek oluşan yapılar, pseudogerm tüp oluşumu olarak değerlendirildi.

İleri identifikasyonda bu oluşumların *C.tropicalis*'e ait oldukları saptandı. Germ tüp oluşturan maya kökenleri *C.albicans* olarak tanımlandı.

Cornmeal Agar Besiyerinde Klamidospor, Blastospor, Artrospor, Yalancı hif ve Hif Oluşturma Özelliğinin İncelenmesi: Saf maya kolonilerinden iğne uçlu öze ile alınarak cornmeal agar besiyerine, birbirine paralel 3-4 çizgi şeklinde ekim yapıldı. Ekim çizgilerinin üzerini kaplayacak şekilde steril lamel kapatıldı. 30°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra hif, yalancı hif, blastospor, klamidospor varlığı ışık mikroskopunda 40x objektif ile değerlendirildi. Yalancı hiflerin uçlarında ve yan dallarında görülen büyük, kalın duvarlı, yuvarlak çok fazla küme yapmamış klamidosporlar ile hif birleştirme yerlerindeki blastospor kümeleri *C.albicans*; hif yapısı ve hif boyunca tek tek veya ufak kümeler yapacak şekilde dizilim gösteren blastosporlar *C.tropicalis*; yalancı hif yapısı olmadan ucunda tomurcuklanmalar görülen küçük oval blastosporlar *C.glabrata* olarak değerlendirildi.

Karbonhidrat Asimilasyon Testleri: Mayaların karbon kaynağı olarak karbonhidratları kullanmaları API ID 32 C (BioMérieux, France) ile test edildi. Bu test panelleri mayaların değişik şekere enzimatik etkilerini belirleyen 32 asimilasyon testinden oluşmaktadır. Kullanılan başlıca maddeler; D-galaktoz, sikloheksimid, sükröz, N-asetil-glikozamin, laktik asit, L-arabinoz, D-sellobioz, D-rafinoz, D-maltoz, trehaloz, potasyum 2-ketoglukonat, metil- α D-glikopiranozid, D-mannitol, D-laktoz, inozitol, D-sorbitol, D-ksiloz, D-riboz, gliserol, L-ramnoz, palatinoz, eritriol, D-melibioz, sodyum glukuronat, D-melezitoz, potasyum glukonat, levulinat, D-glikoz, L-sorboz, glikozamin, eskülin, ferik sitrat'tır.

Ticari kit içindeki süspansiyon besiyerinde Mc Farland 2'ye göre maya süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan süspansiyondan C mediuma (Amonyum sülfat, monopotasyum fosfat, dipotasyum fosfat, disodyum fosfat, sodyum klorid, kalsiyum klorid, magnezyum sülfat, L-Histidin, L-Triptofan, L-Metionin, katılaştırıcı ajan, vitamin solüsyonu, eser elementler, demineralize su) 250 μ l aktarılarak vortekslendi. C mediumdan, şeker içeren 32 kuyucuğun herbirine 135 μ l dağıtılarak inoküle edildi. Plak daha sonra 30°C'de 48-72 saat inkübe edildi. Mayalar inoküle edildikleri mikro kuyucuktaki karbonhidratı, karbon kaynağı olarak kullanıyorsa, o kuyucukta üreme oldu, dolayısıyla pozitif kuyucuklarda negatif kontrol kuyucuğundan daha bulanık bir görüntü elde edildi. Test sonuçları Mini API (BioMérieux, France) cihazı ile otomatik olarak değerlendirildi.

Suşlar PZR ve antifungal duyarlılık testi yapılana kadar %20 gliserollu Brain Heart İnfüzyon besiyerinde -20°C de saklandı.

3.2. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

Çalışmaya alınan *Candida* kökenlerinin amfoterisin B ve flukonazole karşı antifungal duyarlılığı CLSI kriterlerine göre mikrodilüsyon yöntemi ile araştırıldı (80).

3.2.1. RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanması

900 ml distile suda 8,4 gr RPMI 1640 (L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız) (Sigma-Aldrich,USA) toz besiyeri ve 2 gr D-glikoz eritildi 34.53 gr MOPS tampon madde olarak eklendi. Besiyerinin homojenizasyonu sağlandıktan sonra 1M NaOH ile pH'sı 7'ye ayarlandı. Distile su ile son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Filtrasyon yöntemi ile besiyerinin sterilizasyonu sağlandı ve kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

3.2.2. Antifungal Dilüsyonlarının Hazırlanması

Amfoterisin B (MP Biomedicals, France) toz halde ticari olarak elde edildi. 4.8 mg antifungal toz 3 ml dimetil sulfoksid (DMSO,Merck) içinde sulandırılarak gereken konsantrasyon aralığının üst sınırının 100 katı olan 1600 µg/ml konsantrasyonda stok solüsyon elde edildi. Her biri üç tüpten oluşan ve içlerinde; 1. tüpte 0.5, 2. tüpte 1.5, 3.tüpte 3.5 ml DMSO olan üç seri tüp hazırlandı. Birinci serinin bütün tüplerine stok solusyondan 0.5 ml dağıtıldı. Böylece 1. tüpte 800 µg/ml, 2. tüpte 400 µg/ml, 3. tüpte 200 µg/ml konsantrasyonlar elde edildi. Birinci serinin 200 µg/ml konsantrasyonda olan son tüpünden ikici serinin tüplerine 0.5 ml dağıtıldı. Böylece 1. tüpte 100 µg/ml, 2. tüpte 50 µg/ml, 3. tüpte 25 µg/ml konsantrasyonlar elde edildi. İkinci serinin 25 µg/ml konsantrasyonda olan son tüpünden üçüncü serinin tüplerine 0.5 ml dağıtıldı. Böylece 1. tüpte 12.5 µg/ml, 2. tüpte 6.25 µg/ml, 3. tüpte 3.13 µg/ml konsantrasyonlar elde edildi. Sonuçta 3.13-1600 µg/ml konsantrasyon aralığında bir dilüsyon serisi hazırlanmış oldu. Daha sonra bu dilüsyon serisinin her birinden 0.2 ml alınıp üzerlerine 9.8 ml RPMI konularak RPMI'da 1:50 dilüe edildi. Bu son konsantrasyon testte kullanılacak olan final konsantrasyonunun 2 katı idi. Sonuçta 0.0625-32 µg/ml konsantrasyon aralığında bir dilüsyon serisi hazırlanmış oldu. Mikrodilüsyon pleytinin (96 kuyucuklu) 1.sıra

kuyucuklara stok tüpten, 2. sıra kuyucuklara birinci serinin ilk tüpünden olmak üzere sırayla onuncu kuyucuğa kadar her bir dilüsyondan 100'er µl dağıtıldı. Üzeri kapatılarak -70 °C de saklandı.

Flukonazol (Pfizer) toz halde ticari olarak elde edildi. 19.2 mg antifungal toz 3ml distile su içinde gereken konsantrasyon aralığının üst sınırının 100 katı olan 6400 µg/ml konsantrasyonda stok solüsyon elde edildi. Her biri üç tüpten oluşan ve içlerinde; 1. tüpte 0.5, 2. tüpte 1.5, 3. tüpte 3.5 ml distile su olan üç seri tüp hazırlandı. Birinci serinin bütün tüplerine stok solüsyonundan 0.5 ml dağıtıldı. Böylece 1. tüpte 3200 µg/ml, 2. tüpte 1600 µg/ml, 3. tüpte 800 µg/ml konsantrasyonlar elde edildi. Birinci serinin 800 µg/ml konsantrasyonda olan son tüpünden ikinci serinin tüplerine 0.5 ml dağıtıldı. Böylece 1. tüpte 400 µg/ml, 2. tüpte 200 µg/ml, 3. tüpte 100 µg/ml konsantrasyonlar elde edildi. İkinci serinin 100 µg/ml konsantrasyonda olan son tüpünden üçüncü serinin tüplerine 0.5 ml dağıtıldı. Böylece 1. tüpte 50 µg/ml, 2. tüpte 25 µg/ml, 3. tüpte 12.5 µg/ml konsantrasyonlar elde edildi. Sonuçta 12.5-6400 µg/ml konsantrasyon aralığında bir dilüsyon serisi hazırlanmış oldu. Daha sonra bu dilüsyon serisinin her birinden 0.2 ml alınıp üzerlerine 9.8 ml RPMI konularak RPMI'da 1:50 dilüe edildi. Bu son konsantrasyon testte kullanılacak olan final konsantrasyonunun 2 katı idi. Sonuçta 0.25-128µg/ml konsantrasyon aralığında bir dilüsyon serisi hazırlanmış oldu Mikrodilüsyon pleytinin (96 kuyucuklu) 1.sıra kuyucuklarına stok tüpten, 2. sıra kuyucuklarına birinci serinin ilk tüpünden olmak üzere sırayla onuncu kuyucuğa kadar her bir dilüsyon tüpünden 100'er µl dağıtıldı. Üzeri kapatılarak -70°C' de saklamaya alındı.

3.2.3. İnokulum Hazırlanması

Antifungal duyarlılık testleri çalışılacağı zaman -20°C'de stoklanan *Candida* suşlarının SDA'ya iki kez ardışık pasajı yapıldı. İnokulum, SDA'da 35°C'de üretilen 24 saatlik kolonilerden hazırlandı. Ucu yakılarak steril edilmiş olan halka öze ile kolonilerden süspansiyon hazırlandı, kapaklı steril tüpte 15 saniye vortekslendi. Bu karışımın bulanıklığı 530 nm'de %0.85 NaCl kullanılarak 0.5 Mc Farland olacak şekilde ayarlandıktan sonra 50 µl süspansiyon 2450 µl RPMI 1640 ile 1/50 dilüe edildi. 1/50 inokülüm dilüsyonundan 150 µl alınarak 2850 µl RPMI 1640 ile ikinci kez 1/20'lik bir dilüsyon daha yapıldı. Kontrol suşu olarak *Candida parapsilosis* ATCC 22019 kullanıldı.

Tablo 5: Amfoterisin B dilüsyonlarının hazırlanması

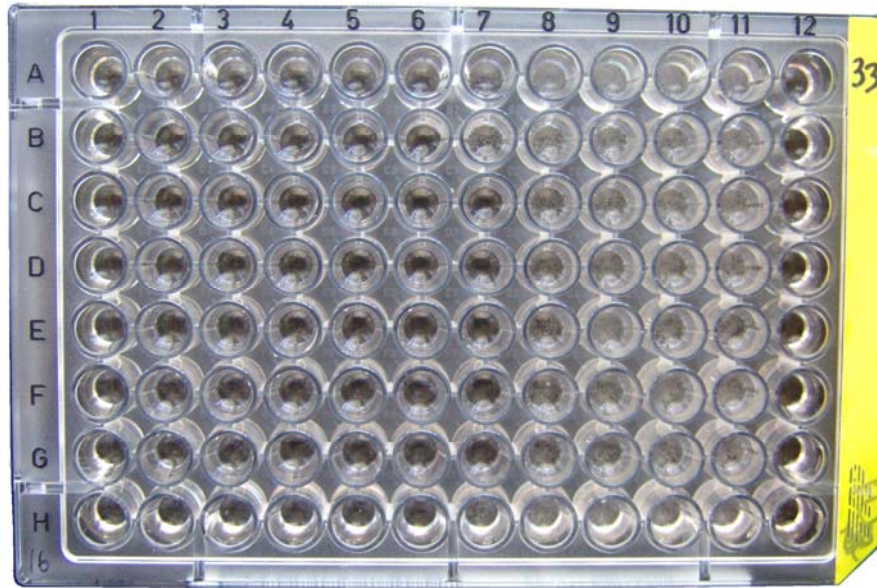
			$\mu\text{g/ml}$		$\mu\text{g/ml}$		Final konsantrasyon $\mu\text{g/ml}$
	<u>Stok tüp</u>	4.8(mg) + 3(ml) (antifungal) (DMSO)	<u>1600</u>	0.2ml+9.8ml RPMI	32	100 μl antifungal+100 μg inokulum	16
1.Seri	1.Tüp	0.5ml(DMSO)+0.5ml(stok)	800	0.2ml+9.8ml RPMI	16	100 μl antifungal+100 μl inokulum	8
	2.Tüp	1.5ml(DMSO)+0.5ml(stok)	400	0.2ml+9.8ml RPMI	8	100 μl antifungal+100 μl inokulum	4
	<u>1.3.Tüp</u>	3.5ml(DMSO)+0.5ml(stok)	200	0.2ml+9.8ml RPMI	4	100 μl antifungal+100 μl inokulum	2
2.Seri	1.Tüp	0.5ml(DMSO)+ 0.5ml(1.3.Tüp)	100	0.2ml+9.8ml RPMI	2	100 μl antifungal+100 μl inokulum	1
	2.Tüp	1.5ml(DMSO)+ 0.5ml(1.3.Tüp)	50	0.2ml+9.8ml RPMI	1	100 μl antifungal+100 μl inokulum	0.5
	<u>2.3.Tüp</u>	3.5ml(DMSO) + 0.5ml(1.3.Tüp)	25	0.2ml+9.8ml RPMI	0.5	100 μl antifungal+100 μl inokulum	0.25
3.Seri	1.Tüp	0.5ml(DMSO)+ 0.5ml(2.3.Tüp)	12.5	0.2ml+9.8ml RPMI	0.25	100 μl antifungal+100 μl inokulum	0.125
	2.Tüp	1.5ml(DMSO)+ 0.5ml(2.3.Tüp)	6.25	0.2ml+9.8ml RPMI	0.125	100 μl antifungal+100 μl inokulum	0.0625
	3.3:Tüp	3.5ml(DMSO)+ 0.5ml(2.3.Tüp)	3.13	0.2ml+9.8ml RPMI	0.0625	100 μl antifungal+100 μl inokulum	0.0313

Tablo 6: Flukonazol dilüsyonlarının hazırlanması

			$\mu\text{g/ml}$		$\mu\text{g/ml}$		Final konsantrasyon $\mu\text{g/ml}$
	<u>Stok tüp</u>	19.2(mg) + 3(ml) (antifungal) (su)	6400	0.2ml+9.8ml RPMI	128	100 μl antifungal+100 μg inokulum	64
1.Seri	1.Tüp	0.5ml (su)+0.5ml(stok)	3200	0.2ml+9.8ml RPMI	64	100 μl antifungal+100 μl inokulum	32
	2.Tüp	1.5ml (su)+0.5ml(stok)	1600	0.2ml+9.8ml RPMI	32	100 μl antifungal+100 μl inokulum	16
	<u>1.3.Tüp</u>	3.5ml (su)+0.5ml(stok)	800	0.2ml+9.8ml RPMI	16	100 μl antifungal+100 μl inokulum	8
2.Seri	1.Tüp	0.5ml(su)+ 0.5ml(1.3.Tüp)	400	0.2ml+9.8ml RPMI	8	100 μl antifungal+100 μl inokulum	4
	2.Tüp	1.5ml(su)+ 0.5ml(1.3.Tüp)	200	0.2ml+9.8ml RPMI	4	100 μl antifungal+100 μl inokulum	2
	<u>2.3.Tüp</u>	3.5ml(su)+ 0.5ml(1.3.Tüp)	100	0.2ml+9.8ml RPMI	2	100 μl antifungal+100 μl inokulum	1
3.Seri	1.Tüp	0.5ml(su)+ 0.5ml(2.3.Tüp)	50	0.2ml+9.8ml RPMI	1	100 μl antifungal+100 μl inokulum	0.5
	2.Tüp	1.5ml(su)+ 0.5ml(2.3.Tüp)	25	0.2ml+9.8ml RPMI	0.5	100 μl antifungal+100 μl inokulum	0.25
	3.3.Tüp	3.5ml(su)+ 0.5ml(2.3.Tüp)	12.5	0.2ml+9.8ml RPMI	0.25	100 μl antifungal+100 μl inokulum	0.125

3.2.4. Antifungal Duyarlılık Testinin Uygulanması

Antifungal duyarlılık testleri *Candida*'lar için CLSI M27A2 standartlarına uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi ile çalışıldı. Mikrodilüsyon plate'lerinin daha önce hazırlanan on farklı ilaç (100 µl) dilüsyonu içeren kuyucuklarına 100 µl dilüe inokulum süspansiyonu eklendi. Böylece ilacın 1/2 dilüsyonu sağlandı. Antifungal (final) test konsantrasyonları amfoterisin B için 0.0313-16 µg/ml, flukonazol için 0.125-64 µg/ml olarak ayarlandı. Her plate için bir sterilit kontrolü (yalnız 200 µl besiyeri-12 nolu sıra), bir üreme kontrolü (100 µl inokulum süspansiyonu ve 100 µl medium-11 nolu sıra) olmak üzere iki sıra ilaçsız kontrol kuyucuğu kullanıldı. Referans suş, diğer suşlar gibi her antifungal için test edildi.



Resim 1: Antifungal duyarlılık test mikroyeti (Çalışmamızdan)

3.2.5. İnkübasyon ve Sonuçların okunması

Mikrodilüsyon plate'leri 35 °C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrası gözle bakılarak, her bir kuyucuktaki üreme, üreme kontrol kuyucuğuyla karşılaştırıldı. Amfoterisin B için üremenin olmadığı en düşük antifungal konsantrasyonu, flukonazol için ise üremenin belirgin (~%50 azaldığı) olarak azaldığı antifungal konsantrasyonu minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak belirlendi. CLSI'nın M27 A2 dökümanında önerdiği gibi flukonazol için MİK ≤ 8 µg/ml duyarlı, 16-32 µg/ml arası doza bağımlı duyarlı, ≥ 64 µg/ml dirençli olarak değerlendirilirken, amfoterisin B için kesin olarak bir

MİK direnç sınır değeri belirlenmediği için MİK değerleri direnç durumu belirtilmeden rapor edildi.

3.3. RANDOM AMPLIFICATION OF POLYMORPHIC DNA (RAPD) TEKNİĞİNİN UYGULANMASI

Suşların klonal ilişkili olup olmadığını saptamak için epidemiyolojik tiplendirme amacıyla en çok başvurulan yöntemlerden biri olan RAPD yöntemi uygulandı. Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırıldı. Aynı bant profili gösteren izolatlar epidemiyolojik olarak ilişkili kabul edildi.

3.3.1. *Candida*' ların DNA İzolasyonunun Yapılması

Örneklerden DNA izolasyonu için Otlu ve Durmaz'ın (82) maya kolonilerinden DNA eldesini sağlayan protokolleri aşağıda gösterildiği gibi kullanıldı.

a. İzolatların hazırlanması

1- *Candida albicans* izolatlarının SDA besiyerlerine pasajları, 24 saat 35°C'de inkübe edildi.

2- Saf kültür halinde üreyen koloniler 1.5 ml % 1 lik SDS (sodyum dodesil sülfat) içerisinde süspanse edildi.

b. DNA nın izolasyonu ve saflaştırılması

1- 2 ml'lik ependorf tüpte, % 1'lik SDS içinde hazırlanan maya süspansiyonu en az 15 saniye vortekslendi.

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

3- Üst fazın 600 µl'si yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 600 µl fenol eklenip vortekslendi ve 13 000X g'de 5 dakika santrifüj edildi.

4- Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı. 600 µl kloroform eklenip, vortekslendi ve 13 000X g'de 5 dakika santrifüj edildi.

5- Üst faz yeni bir tüpe alınıp üzerine 1 ml %100'lük etanol eklenip -70°C'de 2 saat bekletildikten sonra, soğutmalı santrifüjde 13 000X g'de 15 dakika santrifüj edildi.

6- Üst sıvı atık kabına döküldükten sonra, dipte kalan DNA pelleti üzerine 1ml soğutulmuş %70'lik etanol eklenip 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısımdaki alkol tamamen boşaltıldı.

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

8- UV spektrofotometre kullanılarak 450 nm'de DNA konsantrasyonları ölçüldü. DNA konsantrasyonları 50ng/µl'ye ayarlandı.

3.3.2. PZR Karışımının Hazırlanması ve Amplifikasyon Programının Uygulanması

RAPD-RCR için Otlu ve Durmaz (82) tarafından daha önce bakteriler için standardize edilmiş olan protokol Ergon ve arkadaşlarının (65) önerdiği Cnd3 primeri kullanılarak yapıldı. 2X amplifikasyon karışımı tablo 7 de gösterildiği gibi hazırlandı.

Tablo 7: 2X amplifikasyon karışımı

10X Amplifikasyon tamponu	200 µl
dNTP miks (2 mM)	200 µl
MgCl ₂ (25 mM)	320 µl
Steril su	280 µl
Toplam hacim	1000 µl

Elde edilen 2X amplifikasyon karışımı kullanılarak her izolat için 50 µl PZR karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı

Tablo 8: Amplifikasyon karışımı

2X Amplifikasyon karışımı	25 µl
Cnd3 Primeri (100 pmol/µl)	1 µl
TaqDNA polimeraz (5 U/µl) (Fermentas Vilnius, Litvanya)	0.5 µl
Steril su	21.5 µl
Ekstraksiyon ürünü DNA	2 µl
Toplam hacim	50 µl

50 µl'lik her bir reaksiyon karışım örneği PZR tüplerine dağıtıldı. GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem; USA) cihazı ile aşağıdaki program uygulanarak amplifikasyon yapıldı.

Denatürasyon	94 C'de 5 dakika	}	2 siklus
Primer bağlanması	40 C'de 5 dakika		
Primer uzaması	72 C'de 1 dakika		
Denatürasyon	94 C'de 1 dakika	}	40 siklus
Primer bağlanması	40 C'de 1 dakika		
Primer uzaması	72 C'de 2 dakika		

3.3.3. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Elektroforez

1. 2 gr agaroz 100 ml 1X TBE (Tris-Borik asit-EDTA, pH 8.3) tamponu içerisinde çözüldü ve mikrodalga fırında ısıtılarak (4-6 dakika) agarozun tamamen erimesi sağlandı.

2. Agaroz eridikten sonra hafif soğumaya bırakıldı.

3. Hazırlanan agaroz çözeltisi, taraklar DNA'nın uygulanacağı kuyucukları oluşturmak için cam plakanın yüzeyinden 0.5-1 cm kadar yukarıya yerleştirildikten sonra jelin kalınlığı 3-5 mm olacak şekilde boşaltıldı. Oluşan hava kabarcıkları alındı ve oda sıcaklığında 30-45 dakika katılaşmaya bırakıldı.

4. Daha sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Jel alınarak içinde 1X TBE tampon bulunan elektroforez tankına yerleştirildi. Tamponun miktarı, jelin yüzeyini örtecek şekilde ayarlandı.

6. DNA örnekleri ve büyüklüğü bilinen marker DNA (6µl), bromfenol mavisi (2µl) ve etidyum bromid (1 µl) ile karıştırılarak jel içerisindeki çukurlara bir mikropipet yardımıyla yüklendi.

7. Elektroforez ünitesi kapatılıp ve güç kaynakları takıldıktan sonra 100 V'da 60 dakika ve daha sonra 50 V'da 800 dakika yürütüldü.

8. Süre sonunda, elektrik akımı kesildi ve kapak açıldı

9. Ethidyum bromid içeren 1X TBE içine alınarak 30 dakika boyamaya bırakıldı. Boya sonrası jel alınarak görüntüleme cihazında (Kodak Gel Logic 200 İmaging Sistem) incelendi. Jelde oluşan DNA bantları görüntülenip fotoğrafları çekildi.

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Her bir antifungal için elde edilen MİK değerlerinin türler arasındaki farkı elde etmek için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Bu test sonucu anlamlı çıktığı durumlarda aradaki farkın hangi türler arasında olduğunu belirlemek için ikincil test olarak Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney Testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testinde $P < 0.05$, Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testinde ise $P < 0.017$ değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 56 *Candida* suşunun, 22 tanesi *C.albicans*, 19 tanesi *C.glabrata*, 15 tanesi *C.tropicalis* olarak tanımlanmıştır. Bu suşların antifungal duyarlılık testleri mikrodilüsyon yöntemiyle yapıldı (Tablo 9).

Tablo 9: İzole edilen suşların türlere göre dağılımı

<i>Candida</i> türü	Sayı (n)	Yüzde (%)
<i>C.albicans</i>	22	(39)
<i>C.glabrata</i>	19	(34)
<i>C.tropicalis</i>	15	(27)

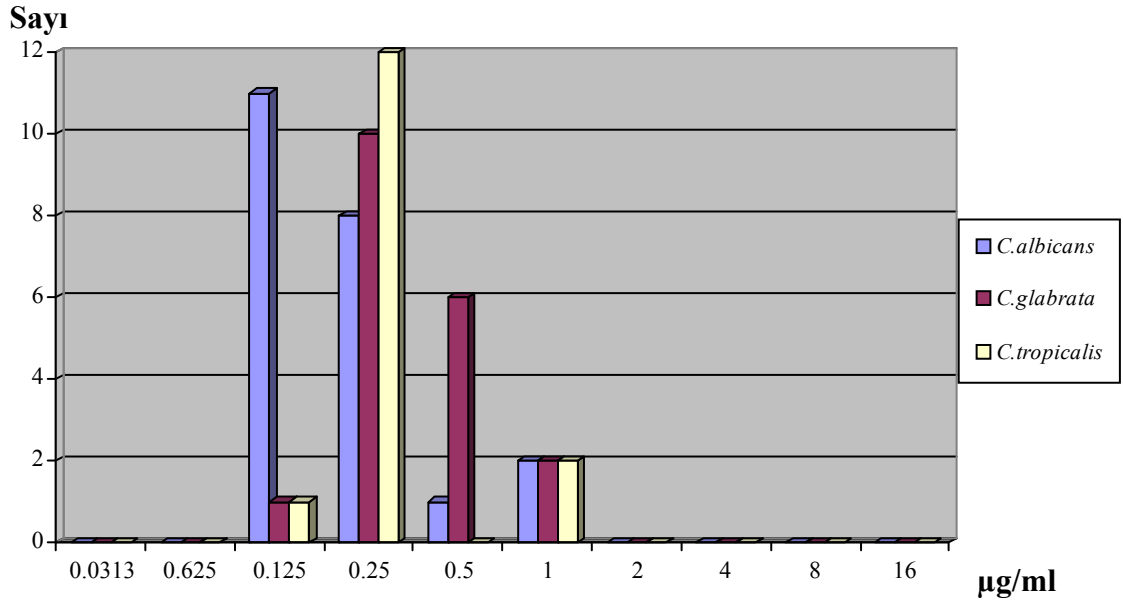
Amfoterisin B'ye karşı saptanan MİK değerleri, *C.albicans* suşlarının 11'inde 0.125 µg/ml, 8'inde 0.25 µg/ml, 1'inde 0.5 µg/ml, 2'sinde 1 µg/ml, *C.tropicalis* suşlarının 11'inde 0.125 µg/ml, 8'inde 0.25 µg/ml, 1'inde 0.5 µg/ml, 2'sinde 1 µg/ml, *C.glabrata* suşlarının; 1'inde 0.125 µg/ml, 10'unda 0.25 µg/ml, 6'sında 0.5 µg/ml, 2'sinde 1 µg/ml, olarak tespit edildi. Amfoterisin B'ye karşı saptanan MİK değerlerinin dağılımı Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10: Türler göre amfoterisin B MİK (µg/ml) dağılımı

	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.625	0.0313	toplam
<i>C.albicans</i>					2	1	8	11			22
<i>C.glabrata</i>					2	6	10	1			19
<i>C.tropicalis</i>					2		12	1			15
Toplam					6	7	30	13			56

Amfoterisin B için *Candida* suşlarının mikrodilüsyon yöntemi ile MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla, *C.albicans*'ta 0.125-1µg/ml, 0.125 ve 0.5µg/ml, *C.tropicalis*'te 0.125-1µg/ml, 0.25 ve 1µg/ml, *C.glabrata*'da 0.125-1µg/ml, 0.25

ve 1 µg/ml olarak bulundu. Bu değerlerle yapılan istatistiksel değerlendirmede, ilacın MİK değerlerinde türler arasında önemli fark olduğu saptandı (p<0.05). Bu farkın *C.glabrata* ile *C.albicans* arasındaki farktan kaynaklandığı tespit edildi (p<0.017). Antifungaller için *Candida* türlerinde saptanan MİK değerlerinin ortalaması Tablo 14’de gösterilmiştir.



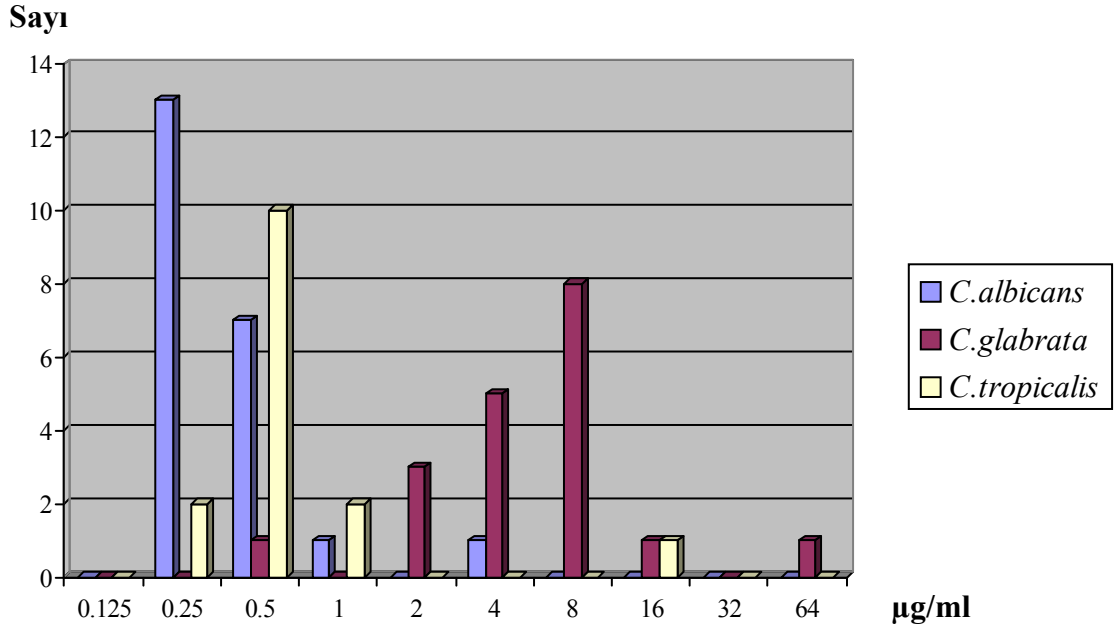
Grafik 1: Türler göre amfoterisin B MİK (µg/ml) dağılımı

Flukonazole karşı saptanan MİK değerleri, *C.albicans*’ların; 13’ünde 0.25 µg/ml, 7’sinde 0.5 µg/ml, 1’inde 1 µg/ml, 1’inde 4µg/ml, *C.tropicalis*’lerin; 2’sinde 0.25 µg/ml, 10’unda 0.5 µg/ml, 2’sinde 1 µg/ml, 1’inde 16 µg/ml, *C.glabrata*’ların; 1’inde 0.5µg/ml, 3’ünde 2 µg/ml, 5’inde 4 µg/ml, 8’inde 8 µg/ml, 1’inde 16 µg/ml, 1’inde 64µg/ml olarak bulundu. Flukonazole karşı saptanan MİK değerlerinin dağılımı Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 11: Türler göre flukonazol MİK (µg/ml) dağılımı

	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	n
<i>C.albicans</i>					1		1	7	13		22
<i>C.glabrata</i>	1		1	8	5	3		1			19
<i>C.tropicalis</i>			1				2	10	2		15
Toplam	1		2	8	6	3	3	18	15		56

Flukonazol için *Candida* suşlarının mikrodilüsyon yöntemi ile MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla; *C. albicans*'ta 0.25-4µg/ml, 0.25 ve 0.5µg/ml, *C.tropicalis*'te 0.25-16µg/ml, 0.5 ve 1µg/ml, *C. glabrata*'da 0.5-64µg/ml, 8 ve 16µg/ml olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, ilacın MİK değerlerinde türler arasında önemli fark olduğu saptandı (p<0.05). Bu farkın *C.glabrata* ile diğer türler arasındaki farktan kaynaklandığı tespit edildi (p<0.017). Antifungaller için *Candida* türlerinde saptanan MİK değerlerinin ortalaması Tablo 14'de gösterilmiştir.



Grafik 2: Türlerine göre flukonazol MİK (µg/ml) dağılımı

Flukonazol için; 22 *C. albicans* suşunun 22'si duyarlı (%100), 19 *C. glabrata* suşunun 16'sı duyarlı (%84.2), 2'si doza bağımlı duyarlı (%10.5), 1'i dirençli (%5.2), 15 *C. tropicalis* suşunun 14'ü duyarlı (%93.3), 1'i doza bağımlı duyarlı (%6,7) olarak tespit edildi. Dolayısıyla flukonazol için 1'i *C. tropicalis*, 2'si *C. glabrata* olan 3 *Candida* suşu doza bağımlı duyarlı (MİK değeri 16-32µg/ml), bir *C. glabrata* suşu dirençli (MİK değeri ≥64 µg/ml) bulundu.

Tablo 12: *Candida* türlerinin flukanazol duyarlılıkları

<i>Candida</i> türü	Sayı	MİK değerleri (µg/ml)		
		≤ 8	16-32	≥ 64
<i>C.albicans</i>	22	22		
<i>C.glabrata</i>	19	16	2	1
<i>C.tropicalis</i>	15	14	1	

Tablo 13: Türlerin antifungal MİK aralığı, MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri

Antifungal	Suşlar	MİK aralığı µg/ml	MİK ₅₀ µg/ml	MİK ₉₀ µg/ml
Amfoterisin B	<i>C.albicans</i>	0.125-1	0.125	0.5
	<i>C.glabrata</i>	0.125-1	0.25	0.5
	<i>C.tropicalis</i>	0.125-1	0.25	1
Flukonazol	<i>C.albicans</i>	0.25-4	0.25	0.5
	<i>C.glabrata</i>	0.5-64	8	8
	<i>C.tropicalis</i>	0.25-16	0,5	1

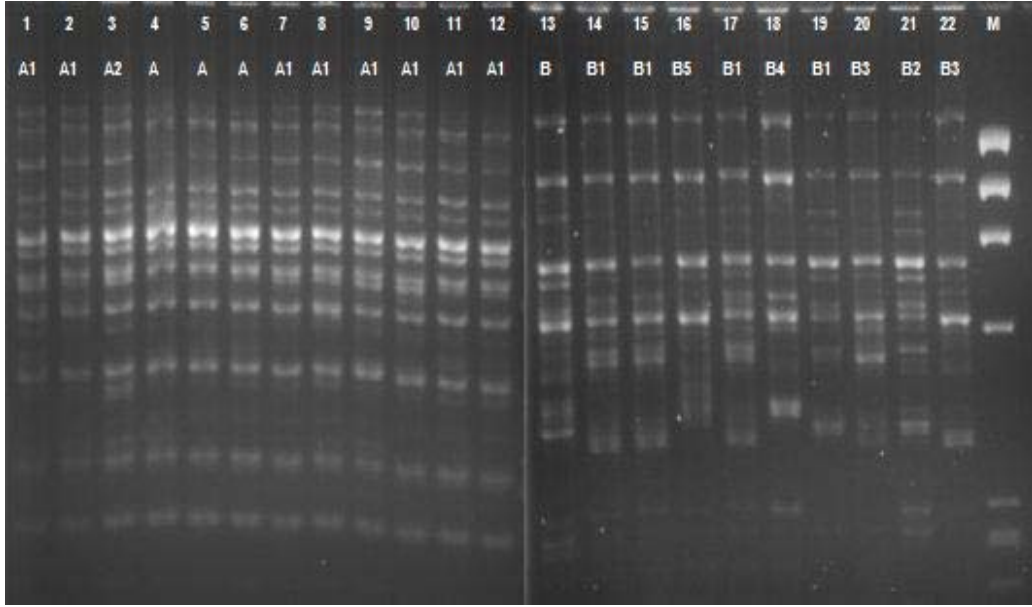
Tablo 14: *Candida* Türlerinin MİK Değerlerinin Ortalaması.

	<i>Amfoterisin B</i>	<i>Flukonazol</i>
<i>C.albicans</i>	0.267±0.254	0.534±0.795
<i>C.glabrata</i>	0.401±0.245	8.974±13.797
<i>C.tropicalis</i>	0.342±0.269	1.567±3.998

RAPD sonucunda her bir suş için oluşan bantlar; diğer izolatlara ait bantlar ile karşılaştırılarak paternleri belirlenmiştir. Farklı paternler farklı harflerle (A,B..) gösterilmiştir. Alt grup paternler ise paterne ait harfin numaralandırılması şeklinde ifade edilmiştir. Adnan Menderes Üniversitesi BİLTEM Epidemiyoloji Biriminde görev yapan Doç.Dr. Bülent Bozdoğan tarafından değerlendirilip doğrulanmıştır.

C.albicans izolatlarında A ve B olmak üzere 2 adet ana patern belirlendi. A paterni A (3), A1 (8) ve A2 (1) şeklinde toplam 12 suшта tespit edildi. B paterninde ise B (1), B1 (4), B2 (1), B3 (2), B4 (1) ve B5 (1) olmak üzere 6 varyant saptandı. *C. albicans* suşları arasında iki yaygın klon ve varyantları belirlendi. Diğer tiplendirme yöntemleri ile konfirmasyonu gerekmele birlikte RAPD sonucuna göre iki klonun egemenliği gözlemlendi.

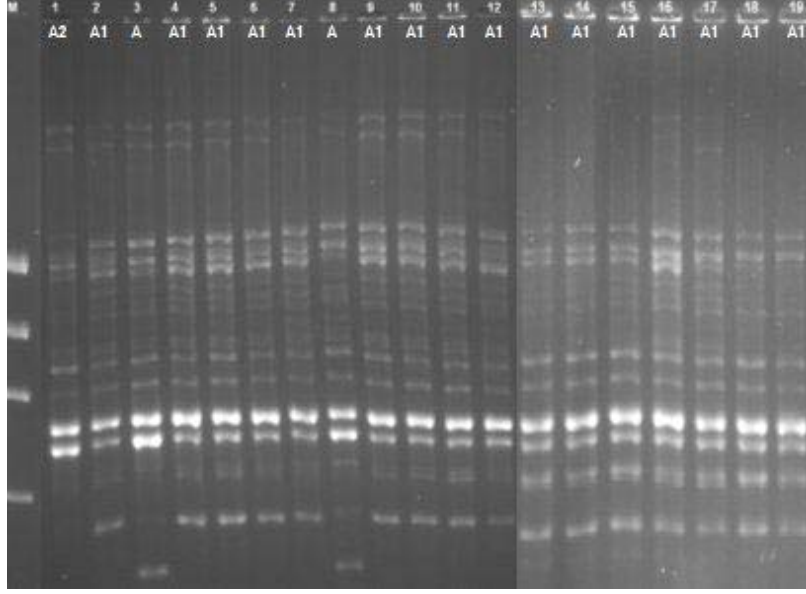
Candida glabrata suşlarında A (2), A1 (16), A2 (1) olmak üzere üç varyanta sahip tek bir RAPD paterninin örnekler arasında bulunduğu gözlemlendi. Bunlar arasında A1 profili en yaygın olandı. *C.tropicalis* suşları için de yine yaygın bir RAPD paterninin ve varyantlarının bulunduğu bu çalışmayla gösterildi. A (1), A1 (12), A2 (2) olmak üzere üç alt grup paterni tespit edildi. *C.glabrata* ve *C.tropicalis* türlerinde de yaygın bir klonun varyantlarının bulunduğu gösterildi.



Resim 2: *C. albicans* suşlarının Cnd3 primeri ile elde edilen RAPD paternleri

Tablo 15: *C. albicans* suşlarının izolasyon tarihi, RAPD paternleri ve MİK değerleri

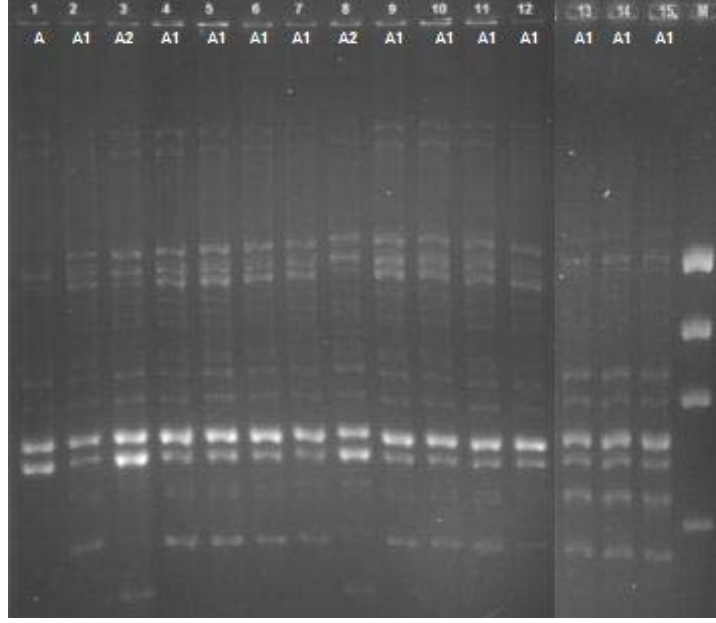
İzolasyon tarihi	Hasta no	Patern	Cinsiyet	Amfoterisin B MİK	Flukonazol MİK
17.07.2006	5	A1	E	0,125	0,25
31.07.2006	7	A1	K	0,25	0,5
28.08.2006	10	A2	E	1	1
13.11.2006	13	A	K	0,25	0,25
27.11.2006	14	A	E	0,125	0,25
27.11.2006	15	A	K	0,125	0,25
26.02.2007	17	A1	K	0,125	0,25
28.03.2007	18	A1	E	0,125	0,25
13.04.2007	19	A1	E	0,125	0,25
25.04.2007	20	A1	E	0,25	4
29.05.2007	23	A1	E	0,25	0,5
17.06.2007	25	A1	K	0,125	0,25
20.08.2007	27-a	B	K	0,25	0,5
15.10.2007	30-a	B1	E	0,5	0,5
05.11.2007	30-b	B1	E	0,25	0,5
26.11.2007	32	B5	E	1	0,25
07.01.2008	36-a	B1	E	0,125	0,25
21.01.2008	37	B4	E	0,125	0,25
04.02.2008	26-c	B1	K	0,25	0,5
28.04.2008	39-b	B3	K	0,125	0,25
02.06.2008	44	B2	E	0,125	0,25
02.06.2008	45	B3	K	0,25	0,5



Resim 3: *C. glabrata* suşlarının Cnd3 primeri ile elde edilen RAPD paternleri

Tablo 16: *C. glabrata* suşlarının izolasyon tarihi, MİK değerleri ve RAPD paternleri

İzolasyon tarihi	Hasta no	Patern	Cinsiyet	Amfoterisin B MİK	Flukonazol MİK
03.07.2006	2	A2	E	0,25	2
17.07.2006	4	A1	K	0,5	4
31.07.2006	6	A	K	0,5	8
07.08.2006	8	A1	K	0,25	4
09.10.2006	11	A1	E	0,25	8
09.10.2006	12	A1	E	0,25	8
03.05.2007	21	A1	E	0,25	4
27.06.2007	24-a	A	E	0,25	8
20.08.2007	26-a	A1	K	0,5	8
20.08.2007	28-a	A1	K	0,5	2
03.09.2007	28-b	A1	K	0,5	2
22.10.2007	27-b	A1	K	0,125	0,5
03.12.2007	26-b	A1	K	0,25	8
03.12.2007	33	A1	E	0,25	8
31.12.2007	35	A1	K	0,5	4
11.02.2008	36-b	A1	E	0,25	64
25.02.2008	39-a	A1	K	0,25	16
31.03.2008	40	A1	K	1	4
14.04.2008	42	A1	K	1	8



Resim 4: *C.tropicalis* suşlarının Cnd3 primeri ile elde edilen RAPD paternleri

Tablo 17: *C.tropicalis* suşlarının izolasyon tarihi, MİK değerleri ve RAPD paternleri

İzolasyon tarihi	Hasta no	Patern	Cinsiyet	Amfoterisin B MİK	Flukonazol MİK
03.07.2006	1	A	K	0,25	0,5
17.07.2006	3-a	A1	E	0,25	0,5
14.08.2006	3-b	A2	E	0,25	0,5
28.08.2006	9	A1	E	0,25	0,5
26.02.2007	16	A1	E	0,125	0,25
08.05.2007	22	A1	E	0,25	0,25
03.09.2007	29	A1	E	0,25	0,5
17.09.2007	24-b	A2	E	1	1
22.10.2007	31	A1	K	1	1
10.12.2007	34	A1	K	0,25	0,5
25.02.2008	38	A1	E	0,25	0,5
07.04.2008	26-d	A1	K	0,25	0,5
14.04.2008	41-a	A1	K	0,25	16
12.05.2008	43	A1	K	0,25	0,5
12.05.2008	41-b	A1	K	0,25	0,5

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Candida türleri doğada yaygın olarak bulunan fırsatçı patojenler olup insanlarda yüzeysel ve derin mikozlara neden olabilmektedirler. Kanser kemoterapisi, radyoterapi, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı, steroid ilaçların kullanımı ve kateterizasyon uygulamaları gibi tedavi yöntemleri, normal mikrobiyal floranın yapısını değiştirerek nonpatojen olarak nitelendirilen bazı mayaların, fırsatçı patojen olarak infeksiyon etkeni olmasına yol açarlar (83). İmmün sistemi baskılanan hastalarda konak savunmasında oluşan önemli değişiklikler, infeksiyonlara duyarlılığı artırırken, hastalıkların tanı ve tedavisine yönelik invazif tıbbi girişimler nozokomiyal infeksiyonların gelişmesini kolaylaştırmaktadır (84).

Günümüzde *Candida* türlerinin klinik örneklerden sıklıkla izole edilen en önemli fırsatçı patojenlerden birisi olduğu bilinmektedir. *Candida* türleri nozokomiyal kan infeksiyonları arasında dördüncü sırada iken, yoğun bakım ünitesinde nozokomiyal kan infeksiyonları arasında üçüncü sıradadır (59). İnsanlarda görülen fırsatçı mantar infeksiyonlarına neden olan mantar türlerinin çeşitliliğinde artış olmasına karşın hala en sık etken *C.albicans*' tır (84). Son zamanlarda non-*albicans Candida* türleri yoğun bakım ünitesindeki hastalar için önemli patojen olarak artmaktadır (55, 58). En sık izole edilenler *C.tropicalis*, *C.glabrata* ve *C.parapsilosis* olarak sayılabilir (58). Arslan ve ark. (85) 2002-2005 yılları arasında hastanemizde görülen 136 kandidemi epizotunu değerlendirmişlerdir. Olguların çoğunun yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatan pediatri hastalarının oluşturduğu çalışmada izole edilen etkenler sırasıyla *C.albicans* (%51.5), *C.sake* (%12.5), *C.inconspicua/norvegensis* (%8), *C.tropicalis* (%6.6) *C.parapsilosis* (%5.1) olmuştur. Bu çalışmadaki *C.sake* ve *C.inconspicua/norvegensis* 'e bağlı kandidemi oranlarının diğer non-*albicans Candida*'lardan daha yüksek olmasında, hastanenin yenidoğan ünitesinde görülen küçük çaplı hastane infeksiyonlarının etkili olduğu düşünülmüştür (85).

Yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalar, uzun süreli antibiyotik kullanımı, altta yatan önemli hastalıkların bulunması, invaziv tedavi girişimleri ve ileri yaşam desteğinin sunulması gibi nedenlerle hastane infeksiyonları yönünden risk taşımaktadırlar. Hastane infeksiyonlarının sıklığının artışı ile birlikte fungal etkenlerin yoğun bakım ünitelerinde izlenen hastalardan izole edilme sıklığı da artmaktadır (86).

İdrardan *Candida* türlerinin izole edilmesi, tedavi gerektirmeyen basit bir kolonizasyon olabileceği gibi tedavi gerektiren alt üriner sistem infeksiyonu, pyelonefrit ve renal kandidiyazis gibi üst üriner sistem infeksiyonunu gösterebileceği için klinik olarak önemlidir (83). Kolonizasyonu infeksiyondan ayırt edebilecek güvenilir bir yöntem henüz yoktur (28, 49, 50, 51). Kandidüri ile ilgili diğer bir önemli sorun akut ve kronik ciddi hastalığı olanlarda kandidüri, sistemik kandidiyaz için risk oluşturabilir (46, 52, 54, 55). Hatta ciddi hastalığı olanlarda kandideminin önemli bir belirteci olabilir (51, 56, 57). Kandidüriye bağlı kandidemi gelişme riski % 0-10.5 oranları arasında bildirilmiştir (44). Sıklıkla idrardan izole edilen tür *C.albicans* 'dır. Farklı çalışmaların sonuçlarına göre ikinci sırada *C.glabrata* veya *C.tropicalis* gibi non-*albicans Candida* türleri izole edilmektedir (87, 51). Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların idrarlarından izole edilen türlerin sıralaması ise non-*albicans Candida* türlerinin sıklığı artmakla birlikte *C.albicans* hala en sık görülen türdür. Morera ve ark. (88) ile Alvarez-Lerma ve ark. (89) yaptıkları çalışmalarda yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların idrarlarından en sık *C.albicans* 'ı olmak üzere ikinci ve üçüncü sıklıkta, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* 'i izole etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da *C.albicans* en sık, *C.glabrata* ikinci sıklıkta, *C.tropicalis* üçüncü sıklıkta bulundu.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, çeşitli mikroorganizmalara bağlı gelişen infeksiyonların tedavisini yönlendirmek, yeni geliştirilen ilaçların in vitro aktivite spektrumlarını saptamak ve direnç oranları konusunda epidemiyolojik veriler elde etmek amacıyla uygulanan in vitro testlerdir. Antimikrobiyal duyarlılık testleri ile asıl ulaşılmak istenen hedef, infeksiyon tedavisinde kullanılan ilacın klinik başarı sağlayabilme oranını önceden tahmin edebilmektir (90).

Son yıllarda mantar hastalıklarının sıklığının giderek artması ve ampirik antifungal kullanımının yaygınlaşması, dirençli mantar suşlarının ortaya çıkmasına ve direnç oranlarının artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle uygun ve etkin antifungal tedavinin seçiminde in vitro antifungal duyarlılık testlerine gereksinim artmaktadır.

İnfeksiyonlarda etken olarak saptanan mantarların antifungal ilaçlara duyarlılıklarını belirlemek amacıyla standart yöntemlerin geliştirilmesi, mikoloji alanındaki önemli ilerlemelerden biri olmuştur. Şu anda mayalar için mevcut olan referans yöntemler, CLSI tarafından geliştirilen mikrodilüsyon yöntemi (M27-A2), yine CLSI tarafından *Candida* (flukonazol, vorikonazol) için geliştirilen disk difüzyon yöntemi ile EUCAST (European

Confederation of Antifungal Susceptibility Testing) tarafından CLSI yöntemi modifiye edilerek mayalar için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemidir. Referans mikrodilüsyon yöntemlerinin, uzun sürede sonuç verme ve bazı *Candida* suşları ve azoller için minimum inhibitör konsantrasyon sonuçlarının okunmasının zor olması gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunun dışında, MİK direnç sınır değerleri, henüz sadece *Candida*-flukonazol, itrakonazol, vorikonazol ve flusitozin için belirlenmiş olup, diğer mantar-ilaç kombinasyonları için direnç sınırlarının ne olduğu kesin bilinmemektedir. *In vitro* amfoterisin B direncinin saptanmasındaki zorluklar ve mevcut yöntemlerle amfoterisin B için elde edilen *in vitro* sonuçlarla *in vivo* yanıt arasında korelasyon kurulamayışı, konu ile ilgili diğer sorunları oluşturmaktadır (91).

E test, flow sitometri, kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemleriyle güvenilir ve standart yöntemle korelasyon gösteren sonuçlar elde etmek mümkündür. Ancak E test pahalı oluşu, kolorimetrik mikrodilüsyonun mevcut yöntemin zorluklarını ortadan kaldıramayışı, flow sitometri ise her mikoloji laboratuvarında uygulamasının mümkün olmayışı nedeniyle pratikte yaygın uygulama alanı bulamamaktadır (79). Antifungal duyarlılık testleri alanında, hem mevcut referans yöntemlerin *in vivo* yanıt ile korelasyonunu araştıran, hem de yeni, pratik ve/veya hızlı yöntemlerin referans yöntemler ile uyum oranlarını inceleyen çalışmalar devam etmektedir (91).

Çalışmamızda amfoterisin B ve flukonazol için antifungal duyarlılık testleri mayalar için mevcut olan referans yöntemlerden, CLSI tarafından önerilen mikrodilüsyon yöntemi (M27-A2) kullanılarak yapıldı.

Sistemik kandidiazis ile aspergillozis, mukormikozis, kriptokokkozis, koksidiomikozis, dissemine histoplazmozis tedavisinde en sık tercih edilen ilaç olan amfoterisin B için her ne kadar kesin bir direnç sınırı belirlenememişse de, yüksek MİK düzeyi genellikle *C.guilliermondii*, *C.krusei*, *C.lusitaniae* *C.glabrata* gibi *Candida* suşlarında görülmüştür (75, 90). Amfoterisin B'ye karşı itrensek direnç, bazı *C.lusitaniae* suşlarında, sekonder direnç ise *C.albicans*, *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis* türlerinde bildirilmiş olmasına karşın nadirdir (74). Kırk yıldan daha fazla süredir kullanılıyor olmasına rağmen, sekonder direnç gelişiminin sorun olmaması ilacın fungisitik aktivitesine bağlıdır (75). *Candida*'lar bu direnci membran ergosterol içeriğini azaltarak ya da ergosterol bağlanma noktasını değiştirerek geliştirebilirler (76). Çalışmamızda *C.tropicalis* ve *C.glabrata* için

C.albicans'a göre yüksek MİK değerleri tespit edildi. Ancak *C.glabrata* ile *C.albicans* arasında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı.

Amfoterisin B için *Candida* türlerinin hepsinde elde edilen MİK değerleri benzer ve MİK aralığı dar olduğu için in vitro referans duyarlılık testleri ile suşların direncinin belirlenmesi zordur (90). Çalışmamızda da *C.albicans* suşlarında 0.125 ile 1µg/ml değerleri arasında dar bir MİK aralığı tespit edildi. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların idrarlarından izole edilen *C.albicans*'ların antifungal duyarlılığının değerlendirildiği iki çalışmada çalışmamızla aynı MİK aralığı bulunmuştur (65, 86). Baran ve ark. (87) ise idrardan izole ettikleri 80 *Candida* suşuna yaptıkları antifungal duyarlılık çalışmasında; 1994 ve 1998 yıllarında izole edilen *C.albicans* suşlarında her iki grup için de MİK aralığını 0.5-1 µg/ml olarak rapor etmişlerdir.

Yapılan farklı çalışmalarda; (65,86) idrardan en sık izole edilen tür olan *C.albicans*'ta amfoterisin B için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0.5 ve 1 µg/ml olarak rapor edilirken, çalışmamızda 0.125 ve 0.5µg/ml olmak üzere daha düşük değerler elde edildi. Febre ve ark. (92) ise kan ve idrardan izole ettikleri *C.albicans* suşlarında MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini 0.25 ve 1 µg/ml şeklinde bildirmişlerdir. Baran ve ark. (87) 1994'te 21 *Candida* suşunda yaptıkları antifungal duyarlılık çalışmasında MİK₅₀ değerini 0.5 µg/ml, 1998'de 30 *Candida* suşu için 1 µg/ml olarak rapor etmişlerdir.

Bu çalışmada amfoterisin B için *C.albicans*'a göre daha yüksek MİK değerleri veren *C.tropicalis* suşlarında MİK aralığı 0.125-1µg/ml olarak tespit edildi. Ergon ve ark. (65) bizim değerlerimize yakın (0.125-0.5µg/ml) sonuçlar alırken, Baran ve ark.(87) 1-2 µg/ml MİK aralığı ile daha yüksek değerleri elde etmişlerdir. Çalışmamızda *C.tropicalis*'lerde MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 0.25 ve 1µg/ml olarak saptandı. Brezilya'da yapılan bir çalışmada (92) bizim sonuçlarımızla aynı MİK₉₀ değerleri elde edilirken, daha düşük MİK₉₀ değeri (0.5 µg/ml) elde edilen çalışmalar da vardır (65). Benzer şekilde MİK₅₀ değerleri için de 0.5 µg/ml (65) ve 1µg/ml (87) gibi farklı sonuçlar bulunmuştur.

İzolatlarımızın %34'ünü oluşturan *C.glabrata* suşlarında amfoterisin B için MİK aralığı 0.125-1µg/ml, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 0.25 ve 1µg/ml olarak tespit edildi. Ergon ve ark. (65) ise *C.glabrata* için MİK aralığını 0.125-0.5 µg/ml şeklinde rapor etmişlerdir. Yapılan iki farklı çalışmada; MİK₅₀ ve MİK₉₀ için 0.25 ve 0.5 µg/ml değerleri ile bizim sonuçlarımıza benzer (92), 0.125 ve 0.25 µg/ml değerleri ile daha düşük (65) sonuçlar bildirilmiştir.

Lanosterolün ergosterole dönüşümünden sorumlu olan 14 α -demetilazı inhibe ederek etki eden azollerin en önemli sorunu direnç gelişimidir (76). Flukonazol sık kullanılan bir ilaç olduğundan, direnç gelişimi görülen bir ajandır (75). Direnç mekanizmaları efluks pompası ile ilacın dışa atılması yanında, 14- α demetilazın değişimi ya da artmasıdır (76).

Candida izolatlarının flukonazole duyarlılığı ile ilgili bilinmesi gereken önemli bir nokta her bir *Candida* türünün flukonazole in vitro duyarlılık profilinin belirli bir dağılım göstermesidir. Dolayısıyla tür tanımlaması yapıldığı takdirde flukonazole duyarlılık durumu büyük ölçüde tahmin edilebilmektedir. Ancak hemen her tür içerisinde bu dağılım profili dışında kalan suşlar da bulunabilir (90).

C.albicans'da ve non-*albicans Candida*'larda flukonazol direnci gelişebilmektedir. Non-*albicans Candida*'lar intrensek olarak flukonazole daha direçlidirler (76). *C.krusei* suşlarında flukonazole intrensek olarak bir direncin olduğu saptanmıştır. *C.glabrata* da genellikle yüksek MİK değerlerine sahiptir (77). Bu ilaca kazanılmış direnç ise *C.albicans* olmak üzere *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.kefyr*, gibi çeşitli *Candida* türlerinde gözlenmiştir (74). Çalışmamızda flukonazol için 1 *C.tropicalis*, 2 *C.glabrata* suşu doza bağımlı duyarlı (MİK değeri 16-32 μ g/ml), bir *C.glabrata* suşunu dirençli (MİK değeri \geq 64 μ g/ml) buldu. *C.glabrata*'da diğer türlere göre daha yüksek MİK değerleri elde edildi.

Candida suşları için saptanan flukonazol MİK değerleri, amfoterisin B'nin aksine geniş bir aralıkta dağılmakta ve dirençli-duyarlı suşların birbirinden ayırımına olanak sağlamaktadır (90). Flukonazol için *C.albicans* suşlarının MİK aralığını 0.25-4 μ g/ml bulduk. Bazı araştırmacılar (92) 0.5-1 μ g/ml değerleri ile daha dar MİK aralığı tespit ederken, bazıları da (65, 86) 0.25-16 μ g/ml ile (87) 0.125->64 ve 0.25->64 değerleriyle daha geniş MİK aralığı tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada *C.albicans*'ta MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0.25 ve 0.5 μ g/ml olarak tespit edildi. Baran ve ark. (87) 1994 yılında bizimle aynı MİK₅₀ değerini tespit ederken, 1998 yılında ise MİK₅₀ değerini 0.5 μ g/ml olarak bulmuşlardır. Yapılan çalışmalarda MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri için 1 ve 8 μ g/ml (65, 86) ile 0.5 ve 1 μ g/ml (92) gibi farklı sonuçlar da rapor edilmiştir.

Non-*albicans Candida*'lar intrensek olarak flukonazole daha dirençlidirler (76). İdrardan üçüncü sıklıkta izole ettiğimiz *C.tropicalis* suşlarında MİK aralığı 0.25-16 μ g/ml olarak bulundu. ABD'de yapılan bir çalışmada (87) *C.tropicalis* suşlarında 1994 yılında

MİK aralığı 0.5-4µg/ml şeklinde rapor edilirken, dört yıl sonra 1->64µg/ml gibi daha yüksek MİK aralığı rapor edilmiştir. İzmir’de yapılan diğer bir çalışmada ise MİK aralığı 1-8µg/ml olarak bildirilmiş (65). *C. tropicalis* suşlarında MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerini 0.5 ve 1µg/ml olarak saptadık. Yapılan farklı çalışmalarda MİK₅₀ değeri için 2µg/ml (65, 87), 1µg/ml (87, 92). MİK₉₀ değerleri için ise 4µg/ml (65), 1µg/ml (92) gibi farklı sonuçlar rapor edilmiştir.

Flukonazol için genellikle yüksek MİK değerlerine sahip *C.glabrata* suşlarında; 2->64µg/ml (84), 4->64µg/ml ve 4-32µg/ml (87) 1->64µg/ml (93) gibi diğer türlere göre oldukça geniş MİK aralıkları tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da 0.5-64µg/ml şeklinde geniş bir MİK aralığı bulundu. MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise 8 ve 16µg/ml olarak bulundu. MİK₅₀ değerini 16µg/ml olarak bizim sonuçlarımızdan daha yüksek (86, 87) ve 1µg/ml olarak daha düşük sonuçlar bildiren yayınlar vardır (92). *C.glabrata* suşlarında Schwap ve ark (93) %26 gibi oldukça yüksek oranda direnç bulmuşlardır. Çalışmamızda ise direnç oranı %5.2 olarak bulundu.

MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri için çalışmalar arasındaki farkın iki nedeni olabileceği düşünüldü.

1-Antifungal kullanımında ve infeksiyon kontrol stratejilerindeki farklılıklara bağlı olarak ortaya çıkan, ülkeler ve hastaneler arasında farklılık

2-Çalışmalardaki farklı örnek sayısı

Tablo 18: Amfoterisin B için yapılan antifungal duyarlılık test sonuçları

Yıl	Araştırmacı	Şehir	C.albicans			C.tropicalis			C.glabrata		
			MİK aralığı µg/ml	MİK 50 µg/ml	MİK 90 µg/ml	MİK aralığı µg/ml	MİK 50 µg/ml	MİK 90 µg/ml	MİK aralığı µg/ml	MİK 50 µg/ml	MİK 90 µg/ml
1999	Febre ark(92)	Brezilya		0.25	1		1	1		0.25	0.5
2000	Baran ark(87)	ABD	0.5-1	0.5		1	1		1	1	
		ABD	0.5-1	1		1-2	1		1	1	
2002	Gülay ark(86)	İzmir	0.25 -1	0.5	1	-	-	-	-	-	-
2006	Ergon ark(65)	İzmir	0.25-1	0.5	1	0.125-0.5	0.5	0.5	0.125-0.25	0.125	0.25
2008	Çalışmamız	Konya	0.125-1	0.125	0.5	0.125-1	0.25	1	0.125-1	0.25	1

Tablo 19: Flukonazol için yapılan antifungal duyarlılık test sonuçları

Yıl	Araştırmacı	Şehir	C.albicans			C.tropicalis			C.glabrata		
			MİK aralığı µg/ml	MİK 50 µg/ml	MİK 90 µg/ml	MİK aralığı µg/ml	MİK 50 µg/ml	MİK 90 µg/ml	MİK aralığı µg/ml	MİK 50 µg/ml	MİK 90 µg/ml
1997	Schwab ark(93)	ABD							1->64		
1999	Febre ark(92)	Brezilya		0.5	1		1	1		1	1
2000	Baran ark(87)	ABD	0.125->64	0.25		0.5-4	1		4->64	16	
		ABD	0.25->64	0.5		1->64	2		4-32	16	
2002	Gülay ark(86)	İzmir	0.25-16	1	8						
2006	Ergon ark(65)	İzmir	0.25-16	1	8	1-8	2	4	2-64	16	64
2008	Çalışmamız	Konya	0.25-4	0.25	0.5	0.25-16	0.5	1	0.5-64	8	16

Hastane infeksiyonlarında izolatların ve kaynağının epidemiyolojik olarak tanımlanması infeksiyonları önlemek ve kontrol stratejileri geliştirmek için önemlidir. Genotipik düzeyde tiplendiren yöntemler, *Candida* gibi fenotipik yöntemlerle epidemiyolojik olarak değerlendirmesi zor olan mikroorganizmalar için önemli avantajlar sağlar. Fenotipik bir yöntem olan antifungallere karşı duyarlılık paternlerinin karşılaştırılması nozokomiyal *Candida* infeksiyonlarının değerlendirilmesinde sınırlı bir fonksiyona sahiptir. Etkili bir moleküler yöntem, aynı suşu bağımsız izolatlar içerisinde tanıyabilmeli, ilişkili izolatları kümeleştirmeli ve tamamen ilişkisiz izolatları ayırt edebilmelidir. Bütün bu kriterleri sağlayan günümüzde mevcut bir yöntem yoktur. Fungal infeksiyonların moleküler epidemiyolojik analizi için RFGE, RAPD, MLST, mikrosatellit analizi, gibi yöntemler kullanılabilir (94). Bu yöntemlerden RAPD analizi, kolay uygulanabilir olması ve kısa sürede sonuç vermesi gibi özellikleri nedeniyle diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır. Ancak bu yöntemin de, sadece laboratuvarlar arası değil, aynı laboratuvar içinde dahi tekrarlanabilirliğin düşük olması gibi bir de dezavantajı vardır (86, 94). Standardizasyonu sağlamak için, standardize edilmiş amplifikasyon karışımı, aynı thermocycler'da standart bir amplifikasyon protokolüyle uygulanmalı, tüm izolatlar aynı anda çalışılmalıdır (69). Bu dezavantajına rağmen çalışmalarda RAPD analizinin *Candida* türlerine ait izolatlarda ayırım gücü ve tiplendirme etkinliği yüksektir (65,86, 94).

Endojen *Candida* infeksiyonları hastanın gastrointestinal sistem, vajen ve deri gibi floralı bölgelerinde fizyolojik koşullarının farklılaşması nedeniyle mantarların kolonize olması ile gelişir (1, 94). Son zamanlarda genotipik yöntemlerin kullanımının artmasıyla eksojen infeksiyonlar da dikkat çekmeye başlamıştır. Fakat hala endojen infeksiyonlardan daha az yaygındır (94). Yapılan çalışmalarda yoğun bakım hastalarında da, mikozların sadece endojen kaynaklı olmadığı, hastadan hastaya veya sağlık personelinden hastaya geçebildiği epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir (46).

Ergon ve ark. (65) yaptıkları çalışmada, *C.albicans*' ın sıklıkla endojen kaynaklı olduğunu saptamışlar, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* izolatlarında ise yetersiz bant elde ettikleri için suşların yayılımı konusunda yorum yapamamışlardır. Bir başka çalışmada bir yıllık sürede idrardan izole edilen *C. glabrata* suşları genetik olarak farklı bulunmuş ve sonuç olarak endojen kazanımın çapraz infeksiyondan daha yaygın olduğu belirtilmiştir(93).

İzmir’de yapılan bir çalışmada *C.albicans* suşlarının RAPD analizinde tespit edilen paternlerinin incelenmesi sonucunda izolatların çoğunlukla endojen kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Ancak klonal ilişkili bazı suşların farklı hastalardan ve yakın tarihlerde izole edilmesi nedeniyle eksojen bir yayılım olasılığının da göz ardı edilmemesi gerektiği vurgulanmıştır (86). *C.tropicalis*’in etken olduğu idrar yolu infeksiyonu salgınının moleküler epidemiyolojisi Han ve ark. (95) tarafından RAPD analizi kullanılarak araştırılmıştır. Yoğun bakım ünitesindeki hastalardan izole edilen bütün *C.tropicalis* suşlarında aynı bant paternleri tespit edilmiş ve bütün suşların aynı klondan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda hastanemiz Reanimasyon yoğun bakım ünitesinde yatan 46 hastanın idrar kültürlerinden izole edilen *C.albicans*, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* suşlarının, RAPD analizi ile moleküler epidemiyolojik incelemesi yapıldı. *C. albicans* izolatlarında A ve B olmak üzere 2 adet ana patern belirlendi. A paterni A (3), A1 (8) ve A2 (1) şeklinde toplam 12 suшта tespit edildi. B paterninde ise B (1), B1 (4), B2 (1), B3 (2), B4 (1) ve B5 (1) olmak üzere 6 varyant saptandı. *C.albicans* suşları arasında iki yaygın klon ve varyantları belirlendi. Diğer tiplendirme yöntemleri ile konfirmasyonu gerekmele birlikte RAPD sonucuna göre iki klonun egemenliği gözlemlendi. Bir RAPD tipinin farklı varyantlarının bulunması ise klonların uzun süredir var olduğunu ve zaman içinde farklılaştığını gösteren bir bulgu olarak kabul edilebilir.

C. albicans suşları arasında Amfoterisin B duyarlılıklarında en fazla 4 dilüsyon farklılık görülmesine karşın flukonazol duyarlılıklarında 256 kat farklılık görülebilmektedir. Bu farklılık aynı varyantar için de görülebilmektedir.

Candida glabrata suşlarında 3 varyanta sahip tek bir RAPD tipinin örnekler arasında bulunduğu gözlemlendi. Bu patern, A (2), A1 (16), A2 (1) olmak üzere üç varyanta sahiptir. Bunlar arasında A1 profili en yaygın olundu. *C.tropicalis* suşları için de yine yaygın bir RAPD tipinin varlığını ve bu tipin varyantlarının bulunduğu bu çalışmayla gösterildi. A (1), A1 (12), A2 (2) olmak üzere üç alt grup paterni tespit edildi. *C.glabrata* ve *C. tropicalis* türlerinde de yaygın bir klonun varyantlarının bulunduğu gösterildi.

Paternlerin incelemesi sonucunda *C.albicans* için iki klondan, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* için ise tek bir klondan eksojen bir yayılım olduğu düşünüldü. Hastalardan alınan çeşitli klinik örneklerle birlikte çevresel örneklerin de epidemiyolojik analizi yapılarak eksojen odağın tespit edildiği daha ileri çalışmalar yapılmalıdır. Eksojen

kaynağın tespiti ile infeksiyon yayılım zinciri kırılarak hastane infeksiyonlarını önlemede önemli bir adım atılmış olacaktır.

Eksojen kaynak olarak sağlık personelinin eli, kirli tıbbi araç-gereçler ve kirli çevresel yüzeydeki mikroorganizmalar sayılabilir. Bu hastane patojenlerinin hasta florasına kolonizasyonunu etkileyen faktörler olarak; normal flora dengesinin bozulması, hastanede uzun yatış süresi, antibiyotik ve invaziv tıbbi araç kullanımı sayılabilir.

El yıkama ve eldiven kullanımı hastane infeksiyonlarını önlemede atılacak en önemli adımdır. Eldiven kullanımı, personelden hastaya, hastadan personele veya bir hastadan diğer bir hastaya infeksiyon bulaş riskini azaltan önemli bir bariyer olmakla birlikte, ellerin yıkanmasının yerini tutmaz. Eldivenler de küçük, görünmeyen yırtıkların olabilmesi, kullanım sırasında yırtılabilmeleri nedeniyle infeksiyon riskini tamamen ortadan kaldıramaz. Eldivenlerin çıkartılması sırasında da eller kontamine olabilir. Bu yüzden eldiven giyilmeden önce ve çıkartıldıktan sonra eller yıkanmalıdır.

Hastane infeksiyonları için çok yüksek riskli yerler olarak tanımlanan yoğun bakım ünitelerinde istenen temizlik standartları kritik önem taşımaktadır. Bu alanlarda sık ve etkin temizlik yapılmalıdır.

Hastalara zorunlu olmadıkça aletli girişimler (sonda, kateter ve benzeri) uygulanmamalı, eğer uygulanacaksa steril şartlarda yapılmalı, kullanım süreleri kısa tutulmalı, bakımları iyi yapılmalı ve girişimler deneyimli kişiler tarafından yapılmalıdır.

6. ÖZET

Amaç: Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların idrar kültürlerinden izole edilen *C. albicans*, *C. glabrata*, *C.tropicalis* suşlarının moleküler epidemiyolojik analizi, amfoterisin B ve flukonazole karşı antifungal duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır.

Gereç-yöntem: *Candida* izolatlarının identifikasyonu germ tüp testi, cornmeal agar besiyerindeki mikroskopik morfoloji (klamidospor, blastospor, artrospor, yalancı hif ve gerçek hif) ve karbonhidrat asimilasyon testleri (API ID 32C -BioMérieux, France) kullanılarak yapıldı. Suşların amfoterisin B ve flukonazole karşı antifungal duyarlılığı CLSI kriterlerine göre mikrodilüsyon yöntemi ile araştırıldı. Suşlar arasındaki klonal ilişkiyi araştırmak için Cnd3 primeri kullanılarak RAPD analizi uygulandı.

Bulgular: Amfoterisin B için 56 *Candida* suşunun mikrodilüsyon yöntemi ile MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla, *C. albicans*'da 0.125-1µg/ml, 0.125 ve 0.5µg/ml, *C.tropicalis*'te 0.125-1µg/ml, 0.25 ve 1µg/ml, *C.glabrata*'da 0.125-1µg/ml, 0.25 ve 1µg/ml olarak bulundu. Flukonazol için MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla; *C.albicans*'ta 0.25-4µg/ml, 0.25 ve 0.5µg/ml, *C.tropicalis*'te 0.25-16µg/ml, 0.5 ve 1µg/ml, *C.glabrata*'da 0.5-64µg/ml, 8 ve 16µg/ml olarak saptandı. RAPD analizi sonuçlarına göre; *C.albicans* için iki, *C.tropicalis* ve *C.glabrata* için bir ana patern varlığı tespit edildi.

Sonuç: İzolatların hiçbiri amfoterisin B için yüksek (MİK>1µg/ml) MİK değerlerine sahip değildi. Bir *C.glabrata* izolatu flukonazole dirençli (MİK≥64µg/ml) iken bir *C.tropicalis* ve iki *C.glabrata* izolatu doz bağımlı duyarlı (MİK 16-32µg/ml) idi. RAPD analizi sonuçları *C.albicans* için iki klondan, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* için ise tek bir klondan ekzojen yayılım olduğunu göstermektedir. Hastalardan alınan örneklerin ve çevresel örneklerin birlikte epidemiyolojik analizi yapılarak ekzojen odağın tespit edildiği daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar kelimeler: *Candida*, antifungal duyarlılık, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

7. ABSTRACT

Molecular epidemiology and antifungal agent sensitivity of *Candida* species isolated in the urine of patients from intensive care unit

Objective: In this study it is aimed to investigate the molecular epidemiological analysis and antifungal sensitivity for amphotericin B and fluconazole of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata* isolated in the urine of patients hospitalized in the intensive care unit of Selcuk University Meram Medical School Hospital, Konya/Turkey.

Methods: Identification of *Candida* isolates was performed by investigating germ tube formation, microscopic morphology (chlamydo spor, blasto spor, pseudohyphae and true hyphae) on corn meal agar and carbohydrate assimilation patterns (API ID 32C - BioMérieux, France). Antifungal sensitivities of the isolates to amphotericin B and fluconazole were determined by in vitro broth microdilution method following the recommendations of CLSI. To investigate the clonal relationship of the isolates Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis was performed by using the primer Cnd3.

Results: Of the 56 *Candida* isolates MIC ranges, MIC₅₀ and MIC₉₀ values against amphotericin B were 0.125-1µg/ml, 0.125 and 0.5µg/ml for *C.albicans*, 0.125-1µg/ml, 0.25 and 1µg/ml for *C.tropicalis* and 0.125-1µg/ml, 0.25 and 1µg/ml for *C.glabrata*, respectively. Against fluconazole; MIC ranges, MIC₅₀ and MIC₉₀ values were 0.25-4µg/ml, 0.25 and 0.5µg/ml for *C.albicans*, 0.25-16µg/ml, 0.5 and 1µg/ml for *C.tropicalis* and 0.5-64µg/ml, 8 and 16µg/ml for *C.glabrata*, respectively. According to the results of RAPD analysis two patterns were identified for *C.albicans* and one pattern for *C.tropicalis* and one pattern for *C.glabrata*.

Conclusion: For amphotericin B non of the isolates had high (MIC >1µg/ml) MIC values. While one of the *Candida glabrata* isolate was resistant to fluconazole (MIC ≥64µg/ml) one *C.tropicalis* and two *C.glabrata* isolates were susceptible-dose-dependent (MIC 16-32µg/ml). The results of RAPD analysis indicated an exogenous spread from two clones for *C.albicans*, one clone for *C. glabrata* and one clone for *C.tropicalis*. Further studies are needed to determine the exogenous reservoirs.

Key words: *Candida*, antifungal sensitivity, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

8. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca benden yardımlarını esirgemeyen ve çalışmalarımnda destek olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Duygu FINDIK'a, asistanlık süresince bilgi ve deneyimlerini bizimle paylaşarak katkı sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Bülent BAYSAL'a, bilgileriyle bana yön veren Sayın Prof. Dr. İnci TUNCER'e, Sayın Prof. Dr. Mahmut BAYKAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR'e, ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Uğur ARSLAN'a, yanlarında Nükleer Tıp rotasyonunu yaptığım hocalarım Sayın Doç. Dr. Oktay SARI ve Sayın Yard. Doç. Dr. Güngör TAŞTEKİN'e, tez çalışmamda yardım eden hocalarım Sayın Prof. Dr. Tahir Kemal ŞAHİN'e, Sayın Doç. Dr. Alper YOSUNKAYA'ya, Sayın Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, beraber çalıştığımız asistan arkadaşlarıma, tüm mikrobiyoloji laboratuvarı teknisyen ve personeline, hayatım boyunca hep yanımda olan anneme ve babama, bana her zaman destek olan sevgili eşime ve çocuklarıma teşekkür ederim.

9. KAYNAKLAR

1. Saniç A. Mantarlar: Genel mikrobiyolojik özellikler ve sınıflandırma. Ulusoy S.(ed), Önemli ve Sorunlu Fungal İnfeksiyonlar, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2006;9-20.
2. Çerikoğlu N. *Candida*'ların ince yapısı. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir, 2002; 47-54.
3. Willke Topçu A, Çerikoğlu N. *Candida* türleri. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M(ed). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri 2002; 1797-1808.
4. Boyd RF, Hoerl BG. The pathogenic fungi. In: Basic Medical Microbiology.4th ed USA.1991;749-94.
5. Yücel A. *Candida*'ların dünü. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir, 2002; 3-28.
6. Warren NG, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed USA, ASM Press 1995; 723-37.
7. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida albicans*'ın Taksonomisindeki önemli bazı değişiklikler. Cerrahpaşa J Med 1999;30:236-46.
8. Braude AI. *Candida* and *Torulopsis*. In: Braude AI, Davis CE, Fierer J, editors. Microbiology. USA. 1982;643-9.
9. Dixon MD, Fromtling RA. Morphology, Taxonomy and Classification of the Fungi In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. USA. ASM Press. 1995; 609-708.
10. Ener B. Fırsatçı mantarlardan *Candida* türleri. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Aydın, 2004; 18-9.
11. Koç A.N. Tıbbi bakımdan önemi olan *Candida* türlerinin mikolojik özellikleri. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir,2002; 37-45.
12. Tümbay E. *Candida* türleri. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş (ed), Güneş Kitabevi, Ankara 1999;1081-6.
13. Akan E. *Candida*'lar. Tıbbi Mikrobiyoloji. Oba Kitabevi, Konya ,1986;609-24.
14. Yeğenoğlu Y. İnvaziv mantar hastalıklarının mikolojik tanısı. İst. Tıp. Fak. Derg. 2007;70:23-8.
15. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida*'ların patojenlik belirtgenleri. Cerrahpaşa J Med 2000; 31: 172-86.
16. Hilmioğlu S. *Candida* infeksiyonlarının laboratuvar tanısı: klasik tanıda izlenecek yol ne olmalı? *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir, 2002; 125-31.
17. İnci R. *Candida* infeksiyonlarının patogeneğinde konağın rolü. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir, 2002; 71-83.

18. Kuştimur S. Fungal infeksiyonlarda virülans faktörleri. X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi 2001;197-9.
19. Gülenç S, Karadenizli A, Kolaylı F, Bingöl R. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen maya türlerinde slime faktörü ve proteinaz aktivitelerinin araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cem Derg 2002;32: 235-8.
20. Ener B. *Candida* infeksiyonlarının patogenezi: Etkenin rolü. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir, 2002; 65-70.
21. Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. J Gen Microbiol 1985; 131: 1217-21.
22. Yakupoğulları Y, Aşçı Toraman Z. Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Candida* kökenlerinde slime faktörü üretiminin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004;34:178-181
23. Arslan U. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virülans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in-vitro araştırılması (Uzmanlık Tezi). Konya: S.Ü.Tıp Fakültesi,2003
24. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Hastane kaynaklı (nozokomiyal) mantar infeksiyonlarının epidemiyolojisi. Cerrahpaşa J Med, 2001; 32: 259-269.
25. Ryan KJ. *Candida, Aspergillus, and Other Opportunistic Fungi*. In:Sherris Medical Microbiology.4th ed USA.1994;591-9.
26. Kuştimur S. *Candida*'da virülans faktörleri. I. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, İzmir, 1999; 145-50.
27. Ögünç D. Mantarlarda virülans faktörleri. VI. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Konya, 2005; 11-14.
28. Ener B. Mantar infeksiyonlarında klinikten laboratuvara: Tanı sorunları. Ankem Derg, 1998;12:248-52
29. İnal S. Mantar İnfeksiyonlarının Tanısı ve Antifungal Duyarlılık Testleri. Ulusoy S.(ed). Önemli ve Sorunlu Fungal İnfeksiyonlar, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2006;27-54.
30. Ener B. Fungal İnfeksiyonların Tanı ve İzlemindeki Yenilikler Ankem Derg 2006;20(Ek 2):28-32.
31. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Laboratory Methods in Basic Mycology. Diagnostic Microbiology .12th ed, China, 2007;629-716.
32. Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. The Laboratory Identification of Yeasts. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed USA, 2006; 1216-33.
33. Yıldırım, S.T. Mantar infeksiyonlarında laboratuvar tanı. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ustaçelebi S.(ed), Günes Kitabevi, Ankara 1999; 1129-44.
34. Ellepola ANB and Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis The Journal of Microbiology,2005;43:65-80.

35. Hilmioğlu Polat S. Sık görölen sistemik mikozlarda serolojik tanı. V. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Çanakkale, 2007;63-67.
36. Kalkancı A. Mikozların serolojik tanısında yenilikler. VI. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Konya, 2005; 21-32.
37. Ener B. Fırsatçı mikozların tanısında yeni gelişmeler. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, 2006;9-12.
38. Saraçlı MA. Mikozların moleküler tanısı: neredeyiz? VI. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Konya, 2005; 33-45.
39. Koç N. Mikozların laboratuvar tanısı, etken mantarın tür tanısı ve antifungal direnç analizinde moleküler yöntemlerin yeri. V. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Çanakkale, 2007; 165-172.
40. Crislip MA, Edwards EJ *Candida albicans* and related species. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, editors. Infectious Diseases. USA.1992;1887-95.
41. Edwards JE. *Candida* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Infectious Diseases. 4th ed. USA.1995;2289-2303.
42. Hoepelman A. Candidiasis. In: Cohen J, Powderly W, editors. Infectious Diseases 2th ed. Spain 2004;2341-8.
43. Erturan Z. Genital mikozlar. VI. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Konya, 2005;116-22.
44. Akalın H. Kandidemilerde risk faktörleri ve risk değerlendirmesi. Ankem Derg 2008;22(Ek 2):270-4.
45. Kandemir Ö. Santral Sinir Sisteminin Mantar İnfeksiyonları. Ulusoy S.(ed). Önemli ve Sorunlu Fungal infeksiyonlar, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara 2006;63-115.
46. Ener S, Ener B, Akalın H. uzun süren operasyonlardan sonra yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda gelişen invaziv kandida enfeksiyonları. Ege Tıp Dergisi, 2001; 40 (3): 185-9.
47. Tümbay E, Metin DY. Ürogenital kandidozlar. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir, 2002; 101-9.
48. Ural O. İdrar yolu mikozları. VI. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Konya, 2005; 104-7.
49. Arısoy A. İdrar yolu kandidozları: Tanı sorunları, V. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Çanakkale, 2007; 123-5.
50. X.S. Passos, W.S. Sales and P.J. Maciel *et al.* *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine, Mem Inst Oswaldo Cruz, 2005;925–8.
51. Çerikoğlu N. İdrar yolu mikozları, mikolojik değerlendirme. VI. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Konya, 2005; 108-15.
52. Köksal Ü. Nozokomiyal üriner sistem infeksiyonlarının tedavisi. Klimik Dergisi, 2000;13:21-2
53. Kauffman CA. Candiduria. Clin Infect Dis, 2005; 41:371–6.

55. D.Peres-Bota, H.Rodriguez-Villalobos, G.Dimopoulos, C.Melot and L.Vincent. Potential risk factors infection with *Candida* spp. in critically ill patients. Clin Microbiol Infect, 2004;10:550-5.
54. Toya SP, Schraufnagel DE, Tzelepis GE. Candiduria in intensive care units:association with heavy colonization and candidaemia. Journal of Hospital Infection, 2007;66:201-6.
56. Weinberger M, Sweet S, Leibovici L, Pitlik SD and Samrat Z. Correlation between candiduria and departmental antibiotic use. Journal of Hospital Infection,2003;53:183-6.
57. O. Ayeni, Kathleen M. Riederer, F. M. Wilson and R. Khatib. Clinicians' reaction to positive urine culture for *Candida* organisms. Mycoses 1999;42:285–289.
58. P.G. Flanagan and R. A. Barnes Fungal infection in the intensive care unit. Journal of Hospital Infection 1998; 38: 163-177.
59. Kauffman CA. Fungal Infections. Proceedings Of The American Thoracic Society 2006; 3: 35-40.
60. Hoşoğlu S. Moleküler epidemiyolojide temel yöntemler. III. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 2004; 60-2.
61. Durmaz R. Moleküler tiplendirmenin temel ilkeleri. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu 2007;27-38.
62. Saraçlı MA. İnvaziv mantar infeksiyonlarında moleküler epidemiyolojinin yeri. IV. Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 2006; 144-49.
63. Saraçlı MA. Mantarlara yönelik moleküler epidemiyolojik çalışmalar. III. Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 2004;76-82.
64. Durmaz R.İnfeksiyon kontrolünde moleküler yöntemlerin yeri nedir? XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Aydın, 2004; 77-9.
65. Ergon MC, Gülay Z. Molecular epidemiology of *Candida* spesies isolated from urine at an intensive care unit. Mycoses, 2005;48:126-31.
66. Öztürk R. Hastane infeksiyonları kontrolünde moleküler mikrobiyoloji metotlarının önemi. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, Malatya, 2007; 64-75.
67. Durmaz R. Mikozların epidemiyolojik analizinde moleküler yöntemlerin yeri ve MLST yöntemine özet bir bakış. V. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Çanakkale, 2007; 173-9.
68. Kalkancı A.Etken mantarların klinik örnekte moleküler yöntemlerle gösterilmesi ve tanımlanması. IV. Ulusal Moleküler Mikrobiyoloji ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 2006;132-143.
69. Yağcı A. Restriction fragment length polymorfizm ve Polimeraz zincir reaksiyon bazlı tipleme yöntemleri. Durmaz R(ed) Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel tıp Kitabevleri, Ankara, 2001;149-160.

70. Ener B. *Candida* infeksiyonlarında epidemiyoloji ve laboratuvar tanı.23.Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi, İzmir, 2008; 264-69.
71. Yapar N, Uysal U, Yücesoy M et al; Nosocomial bloodstream infections associated with *Candida* species in a Turkish University Hospital. *Mycoses*, 2006;49(2):134-8.
72. Ener B, Heper Y, Akçağlar S, Akalın H, Özakın C, Sınırtaş M ve ark. Bir üniversite hastanesinde beş yıllık süreç içinde gelişen funguslar. *Flora* 2003;8(2):138-43.
73. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Antifungallerin Sistemik Mantar İnfeksiyonlarında Kullanımı ve Duyarlılık Deneyleri: Genel Yönlendirme. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 2002; 33: 261-280.
74. Yücesoy M. *Candida* türlerinde antifungal direnç mekanizmaları. VI. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Konya, 2005; 46-58.
75. Koç N. Antifungal direnç mekanizmaları. XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, 2006;179-86.
76. Usluer G. Antifungal İlaçlar. Ulusoy S.(ed). Önemli ve Sorunlu Fungal İnfeksiyonlar, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2006;147-157.
77. İnci R. Antifungal ilaçlar. Ustaçelebi Ş (ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 1999;1155-8.
78. Kuştimur S. Antifungal duyarlılık testleri. Ustaçelebi Ş (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 1999; 1159-66.
79. Arıkan S. Antifungal duyarlılık testlerini nasıl ve ne zaman yapalım. XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, 2000;243-6.
80. National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved standard second edition. NCCLS Document M27-A2, Wayne, Pennsylvania, USA, 2002
81. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Ingroff AE, Ghannoum G et al Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges. *Clinical Microbiology Review*. 2001;643-58.
82. Otlu B, Durmaz R. Farklı bakteri ve mantar türlerinin alt tiplendirmesi için ortak bir ‘Arbitrarıy Primed ‘ polimeraz zincirleme reaksiyonu protokolü. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 2007;208-13.
83. Lundstrom T and Sobel J. Nosocomial candiduria: A review. *Healthcare Epidemiology*, 2001;32:1602-7.
84. Kiraz N, Erturan Z, Uzun M, Durmaz G, Uslu T, Akgün Y, Anđ Ö. Üçyüz *Candida albicans* suşunun amfoterisin B, flusitozin, flukonazol ve mikonazole duyarlılıklarının araştırılması. *Klinik Dergisi*, 1998;11:116-8.
85. Arslan U, Uysal EB, Işık F, Tuncer İ, Fındık D. 2002-2005 yılları arasında kan örneklerinden soyutlanan *Candida* türleri, *İnfeksiyon Dergisi*, 2006;20(3):177-181.

86. Gülay Z, Ergon C, Özkütük A, Yücesoy M, Biçmen M. Anestezi yoğun bakım ünitesi hastalarından izole edilen *Candida albicans* suşlarının antifungal ajanlara duyarlılığı ve moleküler epidemiyolojik izlemi. Mikrobiyoloji Bülteni, 2002;36:309-16.
87. Baran J, Klauber E, Barczak J, Riederer K and Khatib R. Trends in antifungal susceptibility among *Candida* sp. Urinary isolates from 1994 and 1998. Journal of Clinical Microbiology 2000;38:870-1.
88. Morera Y, Torres-Roriguez JM, Catalan I, Granadero A, Josic Z, Alvarez-Lerma F et al. Candiduria in patients with urethral catheter admitted in intensive care units. Etiology and in vitro susceptibility to fluconazole. Med Clin, 2002;118:580-2.
89. Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, Leon C, Palomar M, Jorda R, Carrasco N. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. Intensive Care Med. 2003;29:1067-76
90. Arıkan S. *Candida* infeksiyonlarının tedavisinde duyarlılık testlerinin önemi. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir, 2002; 161-7.
91. Arıkan S. Antifungal duyarlılık testlerinde neredeyiz. V. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Çanakkale, 2007; 69-70.
92. Febre N, Silva V, Medeiros EAS, Wey SB, Colombo AL and Fischman O. Microbiological characteristics of yeasts isolated from urinary tracts of intensive care unit patients undergoing urinary catheterization. Journal of Clinical Microbiology, 1999;37: 1584-6.
93. Schwab U, Chernomas F, Larcom L, Weems J. Molecular typing and fluconazole susceptibility of urinary candida glabrata isoletes from hospitalized patients. Diagn Microbol Infect Dis, 1997;28:11-7.
94. Marol S, Yücesoy M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit. Mycoses, 2007;51: 40-9.
95. Han SH, Huh HJ, Lee M and Chung WS. Molecular epidemiologic study using randomly amplified polymorphic DNA and risk factor analysis for an outbreak of *Candida tropicalis* urinary tract infection. Korean J Clin Pathol, 2002;22: 15-20.