

T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***CANDIDA VE ASPERGILLUS* ENFEKSİYONLARININ  
REAL TIME PCR YÖNTEMİ İLE HIZLI TANISININ  
KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI VE  
ANTİFUNGAL DİRENCİN KOLORİMETRİK  
YÖNTEMLE TAYİNİ**

**İskender KARALTI**

**DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Günay Tülay ÇOLAKOĞLU**

**İSTANBUL 2011**

T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***CANDIDA VE ASPERGILLUS* ENFEKSİYONLARININ  
REAL TIME PCR YÖNTEMİ İLE HIZLI TANISININ  
KÜLTÜR YÖNTEMİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI VE  
ANTİFUNGAL DİRENCİN KOLORİMETRİK  
YÖNTEMLE TAYİNİ**

**İskender KARALTI**  
(141200620070148)

**DOKTORA TEZİ**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Günay Tülay ÇOLAKOĞLU**

**İSTANBUL 2011**

# TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca engin bilgi ve tecrübeleri ile sadece bilgi olarak değil, aynı zamanda akademik olarak da gelişmemde büyük katkıları olan, daima bana yol gösteren, gerek ders dönemimde gerekse tez dönemimde üstün gayret ve titizlik göstererek benimle ilgilenen, hakkını bir teşekkürle asla ödeyemeyeceğim danışman hocam, Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Bitki Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Günay Tülay ÇOLAKOĞLU'na en derin teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü problemimde yakın ilgi ve alaka gösteren, Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölüm başkanımız ve Fen Bilimleri Enstitüsü başkanımız Sayın Prof.Dr. Meral ÜNAL'a ve Öğretim Üyelerimizden Sayın Prof.Dr. Memduh Serin'e, tüm Anabilim Dalı öğretim üyelerimize ve asistanlarımıza;

Tez çalışmamı gerçekleştirmem için gerekli laboratuvar düzeneklerini kullanmama izin veren, tez izleme komite üyeliğini kabul eden, tez çalışmalarımı izleyen ve doktora öğrenimim süresince gerekli izinleri veren, çeşitli akademik faaliyetlere katılımımı teşvik eden Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Gülden ÇELİK'e ve her türlü desteği veren Yrd.Doç.Dr. Yeşim GÜROL'a, tezimin düzeltmelerini titizlikle yapan Arş.Gör.Dr. Zuhale TEKKANAT TAZEGÜN'e ve tüm çalışma arkadaşlarıma;

Malzemelerin temininde çok yaralarını gördüğüm Elips Sağlık Ürünleri'nden Tıbbi Biyolog Aykut Baykut ve tüm ekibine, Kaan Medikal'e, Deneysel Medikal'e, Biomerieux'ya ve Damla Kırtasiye'ye;

Bana eserlerini gönderen yerli ve yabancı tüm bilim adamlarına; tez çalışmam boyunca her türlü desteği gördüğüm arkadaşım Arş.Gör.Dr. Ahmet KAHRAMAN'a, bana maddi ve manevi olarak her zaman destek veren değerli aileme ve daima desteğini hissettiğim nişanlıma ilgi ve yakın alakalarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: FEN-C-DRP-080410-0090, 2010).

**Haziran, 2011**

**İskender KARALTI**

# İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
YENİLİK BEYANI.....	viii
SEMBOLLER.....	x
KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER.....	xii
TABLolar .....	xiv
GRAFİKLER.....	xvi
BÖLÜM I. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER.....	4
II.1.GİRİŞ.....	4
II.2. MANTARLARIN GENEL ÖZELLİKLER.....	5
II.3. MANTARLARIN HÜCRE YAPISI.....	5
II.4. MANTARLARDA ÜREME.....	7
II.4.1. Mantarlarda Spor Tipleri .....	7
II.4.1.1. Aseksüel Sporlar .....	7
II.4.1.2. Seksüel Sporlar .....	7
II.5. MANTARLARIN SİSTEMATİĞİ.....	8
II.6. <i>CANDIDA</i> ve <i>ASPERGILLUS</i> 'A AİT ÖZELLİKLER.....	8
II.6.1. <i>Candida</i> Türleri.....	8
II.6.2. <i>Aspergillus</i> Türleri.....	10

<b>II.7. MANTAR ENFEKSİYONLARININ TANISINDA KULLANILAN YÖNTEMLER.....</b>	<b>12</b>
II.7.1. Direkt Mikroskopik Değerlendirme.....	13
II.7.2. Kültür.....	13
II.7.3. Antijen Tayini.....	14
II.7.4. Moleküler Yöntemler.....	15
<b>II.8. ANTİFUNGALLER.....</b>	<b>15</b>
<b>II.9. LİTERATÜR ÖZETİ.....</b>	<b>16</b>
<b>BÖLÜM III: TEZ ÇALIŞMALARI.....</b>	<b>21</b>
<b>III.1. TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN MATERYALLER.....</b>	<b>21</b>
<b>III.2. TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER.....</b>	<b>26</b>
<b>III.2.1. KÜLTÜR YÖNTEMİ.....</b>	<b>27</b>
III.2.1.1. Kültür Yönteminde Kullanılan Yardımcı Testler.....	29
<b>III.2.2. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ.....</b>	<b>32</b>
<b>III.2.3. MOLEKÜLER YÖNTEMLER.....</b>	<b>35</b>
III.2.3.1. Nükleik Asit İzolasyon Yöntemleri.....	35
III.2.3.2. Nükleik Asit Çoğaltma Yöntemleri.....	35
<b>BÖLÜM IV. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>44</b>
<b>VI.1. KÜLTÜR SONUÇLARI.....</b>	<b>45</b>
<b>VI.2. PANFUNGAL PCR SONUÇLARI.....</b>	<b>60</b>
<b>VI.3. TAQMAN PCR SONUÇLARI.....</b>	<b>69</b>
<b>VI.4. ANTİFUNGAL DUYARLILIK SONUÇLARI.....</b>	<b>76</b>
<b>BÖLÜM V. SON DEĞERLENDİRMELER ve ÖNERİLER.....</b>	<b>83</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>87</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>101</b>

## ÖZET

### ***CANDIDA* ve *ASPERGILLUS* ENFEKSİYONLARININ REAL TIME PCR YÖNTEMİ ile HIZLI TANISININ KÜLTÜR YÖNTEMİ ile KARŞILAŞTIRILMASI ve ANTİFUNGAL DİRENCİN KOLORİMETRİK YÖNTEMLE TAYİNİ**

Bu çalışma 2009 - 2011 yılları arasında Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na başvuran hastalardan alınan örnekler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplamda 139 adet örnek çalışılmış ve 139 adet suş izole edilmiştir. Bu suşlar, hastalardan alınan abse, ağız sürüntüsü, balgam, BAL (Bronkoalveolar Lavaj), idrar ve idrar sondası, kan kültürü, kateter, kulak akıntısı ve sürüntüsü, trakeal aspirat, steril vücut sıvısı örneklerinden elde edilmiştir. Çalışmada kültür yöntemi ile tanımlanan *Candida* ve *Aspergillus* türleri, moleküler yöntemlerle tanımlanmıştır, bu iki yöntemin sonuçları karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda *Aspergillus* cinsine ait *Aspergillus flavus* (Link, 1809), *Aspergillus fumigatus* (Fresen, 1863), *Aspergillus niger* (Tiegh, 1867), *Aspergillus terreus* (Thom, 1918) ile *Candida* cinsine ait *Candida albicans* ((C.P. Robin) Berkhout 1923), *Candida glabrata* ((H.W. Anderson) S.A. Mey. & Yarrow, 1978), *Candida parapsilosis* ((Ashford) Langeron & Talice, 1932), *Candida tropicalis* ((Castell.) Berkhout, 1923), *Candida dubliniensis* (D.J. Sullivan, Western., K.A. Haynes, Dés.E. Benn. & D.C. Coleman, 1995), *Candida krusei* ((Castell.) Berkhout, 1923) türleri izole edilmiştir. Sybr green boyası ile panfungal PCR yapılarak öncelikle cins düzeyinde *Aspergillus* ve *Candida* ayrımı yapılmıştır. Daha sonra Taqman PCR ile 4 farklı *Candida* türü (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* ve *Candida parapsilosis*) tanımlanmıştır. Kültür yöntemi ile tanımlanan 57 adet *Candida albicans*; 12 adet *C. glabrata*; 21 adet *C. parapsilosis*; 17 adet *C. tropicalis* suşlarının tamamı Taqman PCR ile de doğrulanmıştır ve bu iki yöntem ile yapılan identifikasyon sonuçları arasındaki uyumun %100 olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca *Candida* türlerinin kolorimetrik bir yöntem ile 7 farklı antifungale (Flukonazol, Kaspofungin, Vorikonazol, Amfoterisin B, Posakonazol, İtrakonazol ve 5-Flusitosin) karşı duyarlılık deneyleri yapılmıştır. Kaspofungine dirençli bir suşa rastlanmazken, en fazla direnç azol grubu antifungallerde saptanmıştır.

**Haziran, 2011**

**İskender KARALTI**

## ABSTRACT

### REAL TIME PCR for RAPID DIAGNOSIS OF *CANDIDA* and *ASPERGILLUS* INFECTIONS with COMPARISON of CULTURE METHOD and DETERMINATION of ANTIFUNGAL RESISTANCE COLORIMETRIC METHOD

In this study, specimen, collected from the patients who applied to Medical Microbiology Laboratory of Yeditepe University Hospital between 2009-2011 were evaluated. 139 specimen were studied and 139 strains were isolated. These strains were isolated from abscesses, oral swabs, sputum, BAL (Bronchoalveolar lavage), urine, and urinary catheter, blood cultures, catheter, ear discharge and swabs, tracheal aspirates, sterile body fluid samples. In the study *Aspergillus flavus* (Link, 1809), *Aspergillus fumigatus* (Fresen, 1863), *Aspergillus niger* (Tiegh, 1867), *Aspergillus terreus* (Thom, 1918) species, which were belong to *Aspergillus* genus and *Candida albicans* ((C.P. Robin) Berkhout 1923), *Candida glabrata* ((H.W. Anderson) S.A. Mey. & Yarrow, 1978), *Candida parapsilosis* ((Ashford) Langeron & Talice, 1932), *Candida tropicalis* ((Castell.) Berkhout, 1923), *Candida dubliniensis* (D.J. Sullivan, Western., K.A. Haynes, Dés.E. Benn. & D.C. Coleman, 1995), *Candida krusei* ((Castell.) Berkhout, 1923) species which were belong to *Candida* genus were isolated. Primarily panfungal PCR was made by Sybr green dye to distinguish *Candida* and *Aspergillus* at species level. Then four different *Candida* species (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* ve *Candida parapsilosis*) have been identified by Taqman PCR. 57 *Candida albicans*, 12 *C. glabrata*, 21 *C. parapsilosis*, 17 *C. tropicalis*; which were defined by culture method confirmed by Taqman PCR. The results of identification with these two methods were found 100% compatible.

In addition, antifungal susceptibility of *Candida* species against 7 different antifungals (Fluconazole, Caspofungin, Voriconazole, Amphotericin B, Posaconazole, Itrakonazole ve 5-Flucytosine) determined by colorimetric method.

Caspofungin resistant strains were not found, the most resistance was determined to azole antifungals .

**June, 2011**

**İskender KARALTI**

# YENİLİK BEYANI

## ***CANDIDA* ve *ASPERGILLUS* ENFEKSİYONLARININ REAL TIME PCR YÖNTEMİ ile HIZLI TANISININ KÜLTÜR YÖNTEMİ ile KARŞILAŞTIRILMASI ve ANTİFUNGAL DİRENCİN KOLORİMETRİK YÖNTEMLE TAYİNİ**

Mantarlar doğada bolca bulunan fırsatçı mikroorganizmalardır. Son yıllarda fırsatçı fungal enfeksiyonlarda artış ile birlikte, fungal enfeksiyonlara bağlı ölümler artmaktadır. Bunun sebebi bağışıklık sistemi baskılanmış hasta grubu sayısındaki artış olarak görülmektedir. Fungal enfeksiyonlara sıklıkla *Candida* ve *Aspergillus* cinslerine ait türler neden olmaktadır. Bu tür enfeksiyonlarda tanı konulduğunda çoğu zaman tedavi için geç kalınmaktadır. Çünkü geleneksel yöntemlerle yapılan teşhisler zaman zaman bir ayı bulmaktadır. Zaten fungal enfeksiyonların tedavisi uzun zaman gerektirmektedir. Bu nedenle hızlı tanı çok önemlidir.

Günümüzde fungal enfeksiyonlarının tanısı için kullanılan tamamıyla optimize, PCR tabanlı bir yöntem bulunmamaktadır. Bununla birlikte geleneksel yöntemlerle yapılan teşhislerde zaman zaman hatalı sonuçlar alınabilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda kültür yöntemi ile elde edilen sonuçları moleküler yöntemlerin en son ve en geçerli teknolojisi olan real time PCR yöntemi ile karşılaştırdık. Rutin laboratuvarlarda sıklıkla uygulanan *C.albicans* tanısında sadece germ tüp testi kullanımının yetersiz olduğu belirlendi. Bunun yanında ek testler kullanımının gerekliliği saptandı. Mayalar için kullanılan ticari bir kit olan API ID 32 C (Biomérieux)'nin güvenilir bir şekilde kullanılabileceği sonucuna ulaşıldı. Bu kit ile çalışmamızda denenen suşlar için uygun sonuçlar elde edildi.

Aynı zamanda çalışmamızda *Candida* ve *Aspergillus* etkenlerini cins düzeyde saptamak için panfungal PCR yöntemi optimizasyonu yapıldı. İzolasyonu yapılan suşlar ile bu metod denendi. Sonuç olarak kültür yöntemi sonuçları, hem diziye özgül olmayan floresan boylar ile (Sybr green) hem de diziye özgül problr (Taqman prob) ile yapılan real time PCR yöntemleri ile karşılaştırıldı ve uyumlu sonuçlar elde edildi.

Ayrıca çalışmamızda izole edilen *Candida* türlerinin antifungal duyarlılık testleri yapılmıştır. Böylece mevcut suşlardaki direnç oranları belirlenmiştir.

**Haziran, 2011**

**Prof.Dr. Günay T. ÇOLAKOĞLU**

**İskender KARALTI**

## SEMBOLLER

<b><math>\mu</math></b>	: Mikron
<b><math>\mu\text{l}</math></b>	: Mikrolitre
<b>%</b>	: Yüzde
<b>g</b>	: Gram
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür
<b>°C</b>	: Santigrad derece
<b>T<sub>m</sub></b>	: Melting temperature (erime sıcaklığı)

## **KISALTMALAR**

**ATCC** : American Type Culture Collection.

**CBS** : The Centraalbureau voor Schimmelcultures.

**DNA** : Deoksiribonükleik Asit.

**DSMZ** : German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.

**HIV** : Human Immunodeficiency Virus.

**KUEN** : Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve uygulama Merkezi.

**McF** : Makfarland.

**NCCLS** : National Committee for Clinical Laboratory Standards.

**NRRL** : The ARS Culture Collection.

**PCR** : Polimerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).

**RNA** : Ribonükleik Asit.

**SDA** : Sabouraud Dekstroz Agar.

# ŞEKİLLER

	<u>SAYFA NO</u>
Şekil III.1 Tez akış şeması.....	26
Şekil III.2 Ekim yöntemi: Sayım plağı.....	27
Şekil III.3 Ekim yöntemi: Tek koloni.....	28
Şekil III.4 Balgam örneğinin Gram preparatında maya hücrelerinin görünümü.....	30
Şekil III.5 Koloniden hazırlanan Gram preparatında maya hücrelerinin görünümü.....	30
Şekil III.6 Rutin yöntemlerde <i>Candida</i> türlerinin teşhisinde izlenen yol.....	31
Şekil III.7 API ID 32 C stribinin görünümü.....	32
Şekil III.8 Sensititre plağındaki antifungallerin dağılımı.....	33
Şekil III.9 Sensititre plağında pozitif ve negatif kuyucukların görünüşü.....	34
Şekil III.10 Polimeraz zincir reaksiyonunda şematik olarak bir siklusun aşamaları.....	37
Şekil III.11 Çalışma esnasında görüntülenen real time PCR görüntüsü.....	38
Şekil III.12 Melting curve (erime eğrisi) analiz örneği.....	40
Şekil III.13 Fungal PCR’da kullanılan rRNA bölgeleri.....	41
Şekil IV.1 Germ tüp testi pozitif bir örneğin mikroskopik görünümü.....	45
Şekil IV.2 Germ tüp testi negatif bir örneğin mikroskopik görünümü.....	45
Şekil IV.3 Chromagar <i>Candida</i> besiyerinde <i>C. albicans</i> (ATCC 90028)’in oluşturduğu koloni.....	50
Şekil IV.4 Chromagar <i>Candida</i> besiyerinde <i>C. tropicalis</i> (KUEN 1025)’in oluşturduğu koloni.....	51
Şekil IV.5 Chromagar <i>Candida</i> besiyerinde <i>C. glabrata</i> (KUEN 1573)’nin oluşturduğu koloni.....	51
Şekil IV.6 Chromagar <i>Candida</i> besiyerinde <i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)’in oluşturduğu koloni.....	52
Şekil IV.7 Chromagar <i>Candida</i> besiyerinde karışık kolonilerin görünümü.....	52
Şekil IV.8 Pamuk mavili laktofenol çözletisi ile boyanmış <i>A. niger</i> ’in mikroskopik görünümü.....	58
Şekil IV.9 Panfungal <i>Candida</i> PCR optimizasyon çalışması PCR görüntüsü.....	61
Şekil IV.10 Panfungal <i>Aspergillus</i> PCR optimizasyon çalışması PCR görüntüsü.....	61

<b>Şekil IV.11.</b> Kontrol suşları ile çalışılan panfungal <i>Aspergillus</i> PCR görüntüsü.....	62
<b>Şekil IV.12.</b> Kontrol suşları ile çalışılan panfungal <i>Candida</i> PCR görüntüsü.....	63
<b>Şekil IV.13.</b> Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda fungal etkenlerin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemlerin akış şeması.....	68
<b>Şekil IV.14.</b> <i>C. albicans</i> suşlarının çalışıldığı Taqman PCR görüntüsü .....	70
<b>Şekil IV.15.</b> <i>C. glabrata</i> suşlarının çalışıldığı Taqman PCR görüntüsü.....	72
<b>Şekil IV.16.</b> <i>C. parapsilosis</i> suşlarının çalışıldığı Taqman PCR görüntüsü.....	73
<b>Şekil IV.17.</b> <i>C. tropicalis</i> suşlarının çalışıldığı Taqman PCR görüntüsü .....	74

# TABLOLAR

## SAYFA NO

<b>Tablo II.1</b> Mantar hücre duvarında yer alan polisakkaritler.....	6
<b>Tablo II.2</b> Bazı <i>Candida</i> türlerinin biyokimyasal özellikleri.....	9
<b>Tablo II.3</b> Enfeksiyon etkeni olan <i>Aspergillus</i> türleri.....	11
<b>Tablo II.4</b> <i>Candida</i> türlerinin sikloheksimid duyarlılıkları.....	14
<b>Tablo III.1</b> <i>Candida</i> suşlarının izole edildikleri örneklerin cinsleri.....	21
<b>Tablo III.2</b> <i>Aspergillus</i> suşlarının izole edildikleri örneklerin cinsleri.....	22
<b>Tablo III.3</b> <i>Candida</i> suşlarının izole edildikleri örneklerin listesi.....	22
<b>Tablo III.4</b> <i>Aspergillus</i> suşlarının izole edildikleri örneklerin listesi.....	24
<b>Tablo III.5</b> Örnek alınan hastaların cinsiyet dağılımı.....	25
<b>Tablo III.6</b> Mantar kültürü ekim, inkübasyon süreleri ve sıcaklıkları.....	28
<b>Tablo III.7.</b> <i>Candida</i> türleri için CLSI M27'e göre yorumlayıcı MİK değerleri.....	35
<b>Tablo III.8</b> Panfungal PCR için kullanılan primer dizileri.....	40
<b>Tablo III.9</b> Panfungal PCR Karışımı.....	41
<b>Tablo III.10</b> Panfungal PCR Şartları.....	42
<b>Tablo III.11</b> <i>Candida</i> türlerinin identifikasyonunda kullanılan taqman problemleri.....	43
<b>Tablo III.12</b> Taqman PCR Karışımı.....	43
<b>Tablo III.13</b> Taqman PCR Şartları.....	43
<b>Tablo IV.1</b> Germ tüp testi sonuçları.....	46
<b>Tablo IV.2</b> 45 °C'de üreme deneyi sonuçları.....	48
<b>Tablo IV.3</b> Çalışmada izole edilen <i>C. albicans</i> suşlarının listesi.....	53
<b>Tablo IV.4</b> API ID 32 C (Biomérieux) ile yapılan identifikasyon sonuçları.....	55
<b>Tablo IV.5</b> Teşhis edilen <i>Aspergillus</i> türlerinin listesi.....	59
<b>Tablo IV.6</b> Tez çalışmasında kullanılan standart suşların listesi.....	62
<b>Tablo IV.7</b> Panfungal PCR Validasyon sonuçları.....	64
<b>Tablo IV.8</b> Panfungal <i>Candida</i> PCR Sonuçları.....	65
<b>Tablo IV.9</b> Panfungal <i>Aspergillus</i> PCR Sonuçları.....	67
<b>Tablo IV.10</b> Taqman PCR ile tanımlanan <i>C. albicans</i> suşlarının listesi.....	70
<b>Tablo IV.11</b> Taqman PCR ile tanımlanan <i>C. glabrata</i> suşlarının listesi.....	72
<b>Tablo IV.12</b> Taqman PCR ile tanımlanan <i>C. parapsilosis</i> suşlarının listesi.....	73

<b>Tablo IV.13</b> Taqman PCR ile tanımlanan <i>C. tropicalis</i> suşlarının listesi.....	75
<b>Tablo IV.14</b> İzole edilen <i>C. albicans</i> suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları.....	76
<b>Tablo IV.15</b> İzole edilen <i>C. glabrata</i> suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları.....	79
<b>Tablo IV.16</b> İzole edilen <i>C. parapsilosis</i> suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları.80	
<b>Tablo IV.17</b> İzole edilen <i>C. tropicalis</i> suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları... 81	
<b>Tablo IV.18</b> İzole edilen <i>C. krusei</i> ve <i>C. dubliniensis</i> suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları.....	82
<b>Tablo V.1</b> İzole edilen <i>Candida</i> suşlarının türlere göre dağılımı.....	84
<b>Tablo V.2</b> İzole edilen <i>Aspergillus</i> suşlarının türlere göre dağılımı.....	85
<b>Tablo V.3</b> Antifungal duyarlılık testlerinde saptanan direncin % dağılımı.....	86

# GRAFİKLER

	<u>SAYFA NO</u>
<b>Grafik III.1</b> Hastaların cinsiyet dağılımlarının yüzde oranları.....	25
<b>Grafik IV.1</b> Germ tüp testi sonuçlarının % dağılım oranları.....	47
<b>Grafik IV.2</b> API ID 32 C (Biomerieux) kiti ile yapılan identifikasyonun türlere göre dağılım grafiği.....	57
<b>Grafik IV.3</b> Tanımlanan <i>Candida</i> suşlarının <i>C. albicans</i> ve Non- <i>albicans Candida</i> yüzde oranları grafiği.....	57
<b>Grafik IV.4</b> Tanımlanan <i>Aspergillus</i> türlerinin dağılımı.....	60

# BÖLÜM I

## GİRİŞ VE AMAÇ

Mantarlar doğada bolca bulunan fırsatçı mikroorganizmalardır. Son yıllarda fırsatçı fungal enfeksiyonlarda artış gözlemlenmekle [1] birlikte kullanılmakta olan antifungallere karşı direnç oranı da gittikçe artmaktadır [2]. En sık *Candida* [3] ve *Aspergillus* [4] enfeksiyonları görülmekte ve bu enfeksiyonların mortalitesi (ölüm oranı) yüksek düzeyde olmaktadır [5]. Mortalitenin yükselmesine, transplant hastalarının, nötropenik olguların, allerjik reaksiyonların, yüksek dozda kortikosteroid tedavisi alan hastaların ve diğer immunsupresif (bağışıklık sistemi baskılanmış) hasta gruplarının sayılarındaki artışın sebep olabileceği düşünülmektedir [4]. Çünkü immunsupresif hastalarda fırsatçı olan fungal enfeksiyonlara sıklıkla rastlanmaktadır. Özellikle HIV ile enfekte kişilerde sıklıkla görülmektedir. Mantarlar bu tip hastalarda nozokomiyal (hastane kaynaklı) enfeksiyonlara da sebep olmaktadır.

Fungal enfeksiyonlarda en önemli olan hızlı ve doğru tanı koymaktır. Çünkü riskli hasta gruplarında tanı konulmadan önce ampirik ya da profilaktik tedavi uygulanmaktadır. Antifungal tedavide en iyi başarı ise erken ve doğru tanı ile sağlanabilir. Geleneksel yöntemlerle mantar etkenlerinin saptanması günler, hatta haftalar alabilmektedir ve bu yöntemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü de düşüktür [5, 6]. Geleneksel bir yöntem olan kültür ile mantarların identifikasyonu zor olabilmektedir [6]. Hızlı bir yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) ise duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça yüksektir [7]. Bu yöntem istenen DNA parçasının uygun nükleik asit dizileri (primerler) kullanılarak çoğaltılması esasına dayanır. Aynı zamanda diziye özgün olmayan floresan boyalardan (Sybr Green) ya da diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir. Çalışma sonunda melting curve analizi yapılarak ürünlerin melting tepeleri (erime tepeleri) belirlenerek tür tanımlamaları yapılabilmektedir [8].

*Candida* enfeksiyonlarında, özellikle invazif kandidozda *Candida albicans* en fazla görülen türdür. Bunun yanında *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* ve *Candida krusei* de klinik örneklerden sıklıkla izole edilmektedir [8]. *Candida* türleri çeşitli biyokimyasal testlerle ve ticari kitlerle de tanımlanabilmektedir. Ticari kitlerin başarı oranı yüksektir. Ancak duyarlılıkları ve özgüllükleri PCR temelli testlere göre düşüktür. Ayrıca testin süresi 2-5 gün arasında olmaktadır [9]. Halbuki Non-*albicans Candida* türleri sıklıkla polyen ve azol grubu antifungallere karşı sıklıkla dirençlidirler. Bu nedenle doğru ve hızlı tanımlamaları çok önemlidir.

*Aspergillus* enfeksiyonları içinde özellikle invazif enfeksiyonlar ve aspergillosis major ölüm nedenlerindedir. *Aspergillus* türleri içinde en sık rastlanan türler; *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* ve *A. terreus*'tur. Bunların içinde en fazla *A. fumigatus* enfeksiyon etkeni olarak karşımızda çıkmaktadır. *Aspergillus* türlerinin belirlenmesinde kullanılan altın standart yöntem, kültürdür. Ancak invazif fungal enfeksiyon olgularında alınan kan kültürlerinden nadiren izole edilmektedirler. Akciğer aspergillosisli hastalardan alınan BAL (Bronkoalveolar lavaj) örneklerinde sıklıkla negatif sonuçlar elde edilmektedir [10]. Antijen testlerinden galaktomannan antijeni kültür yöntemine göre daha iyi sonuçlar vermektedir [11, 12]. Ancak en iyi sonuçlar PCR ile elde edilmektedir [13].

Antifungal duyarlılık testleri, saptanan etken için en uygun olan antifungal ilacın kullanılmasını sağlar. Antifungal duyarlılık için CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute) tarafından onaylı makro ve mikrodilüsyon metodları kullanılmaktadır. Makrodilüsyon metodlarından en sık kullanılan yöntem RPMI 1640 (% 2'lik glikoz) agar ile yapılan MİK (minimum inhibitör konsantrasyonu) değerinin saptanmasıdır. Bunun yanında, mikrodilüsyon tabanlı kolorimetrik yöntemlerin, referans metodlarla uygunluğu belirlenmiş ve uygulama kolaylığı nedeniyle kullanımı artmıştır [14]. Son yıllarda kolorimetrik yöntemin ticari bir şekli olan Sensititre kitinin kullanımı artmıştır. Bu yöntem renk değişimi esasına dayandığı için kullanımı ve değerlendirilmesi pratiktir [2]. Ayrıca aynı anda 7 adet antifungal sonucu da belirlenebilmektedir. Çalışmamızda elde edilen *Candida* suşlarının kolorimetrik bir yöntem olan Sensititre YeastOne ile antifungal duyarlılıkları saptanacak ve duyarlılık yüzdeleri hesaplanacaktır.

Rutin yöntemler ile elde edilen *Candida* suşlarından germ tüp meydana getirenler *Candida albicans* olarak tanımlanmaktadır. Ancak bazı *Candida dubliniensis* suşları da germ tüp meydana getirmektedirler. Bununla birlikte *Candida albicans* suşları hem 37 °C hem de 45 °C’de ürerken; *Candida dubliniensis* suşları sadece 37°C’de üreme gösterirler. Aynı zamanda Chromagar *Candida* besiyerinde de farklı renkte üreme gösteriler. Bu şekilde hızlı tanımlamaları da yapılabilmektedir [15, 16].

PCR yönteminin duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olması ve hızla sonuç vermesi nedeniyle çalışmalar bu yönde ilerlemeye başlamıştır. Günümüzde mantarların PCR tabanlı tiplendirilmesi ile ilgili çalışmalar olmasına rağmen halen standart bir fungal PCR yöntemi yoktur. Bu nedenle bu çalışmaya ihtiyaç duyulmuştur. Bu çalışma ile panfungal *Aspergillus* ve panfungal *Candida* PCR testleri optimize edilip, çalışılacaktır. Bunun yanında 4 farklı *Candida* türü (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* ve *Candida glabrata*) için Taqman probolar kullanılarak moleküler düzeyde tanımlamaları gerçekleştirilecek ve elde edilen sonuçların, rutin olarak kullanılan ticari bir kit olan API ID 32 C (Biomérieux) sonuçları ile karşılaştırma yapma imkanı doğacaktır. Yine klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarının Chromagar *Candida* (Salubris) besiyeri kullanarak renklenme durumlarına bakılacak ve farklı sıcaklıklarda üreme deneyleri yapılarak teşhisleri yapılacaktır. *Candida albicans* tanısı almış örneklerin *Candida dubliniensis* ile ayrımı da yine bu yöntemle yapılacaktır.

## **BÖLÜM II**

### **GENEL BİLGİLER**

#### **II.1. GİRİŞ**

Mantarlar doğada yaygın olarak bulunan, fotosentetik olmayan ökaryotik mikroorganizmalardır. Doğada yaygın olarak bulunan mantarlar arasında çok azı insanlarda patojendirler [17]. Ancak son yıllarda transplantasyon yapılan hasta sayısının artması, uygulanan ilaçların agresif hale gelmesi gibi birçok faktörden dolayı enfeksiyona yol açan mantarların sayısında artış görülmektedir. Mantarlarda meydana gelen hastalıklara mikoz denilmektedir. Mantarları ve mantar hastalıklarını inceleyen bilim dalına ise mikoloji adı verilmektedir.

Mantarlar çok farklı çevre şartlarında üreyebilirler. Fakültatif anaerop ya da zorunlu aereop canlılardır. Sıcaklık ve nem oranı mantarlar için en önemli çevre faktörlerindedir. Aynı ortamda sabah ve akşam arasında bile farklı konsantrasyonda bulunabilirler [18-20]. Mantarlar üç farklı yapı gösterirler:

1. Flamentsiz mikromantarlar (Mayalar)
2. Flamentli mikromantarlar (Küfler)
3. Makromantarlar

Bu farklı yapı tipleri tanımlamada çok önemlidir. Mantarlar makroskobik ve mikroskobik özellikleri bakımından oldukça farklılıklar göstermektedirler. Aynı tür içinde dahi üredikleri ortama ve kültürün inkübasyon süresine göre farklılıklar görülmektedir. Hatta aynı koloninin orta kısmı ile kenarlarından alınan örneklerde farklı şekil ve büyüklükte yapılar görülebilmektedirler [21].

## II.2. MANTARLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ

Mantarlar vejetatif yapıları silindirik, tüpsü iplikçiklerden meydana gelmiş fotosentetik pigment ihtiva etmeyen, spor meydana getiren ökaryotik organizmalardır. Bu tüpsü iplikçiklere **hif**, hiflerin bir araya getirdikleri yapıya da **misel** adı verilir. Hifler bazen bölmeli bazen de bölmesiz olabilirler, bu bölmelere de **septum** adı verilir. Mantarların çeperlerinde genellikle kitin bulunur. Bazılarında ise selüloz, kitin, lignin, kalloz, mannan, glukan, galaktomannan ve diğer bazı organik maddeler bulunabilirler. Hücrelerinde genellikle ikiden fazla çekirdek ve her birinde mutlaka bir çekirdekçik bulunur. Klorofil içermedikleri için renksizdirler. Bazı türlerde melanin birikmesi nedeniyle koyu renk alırlar. Sporlar ise değişik renklerde [22].

Aynı koloni içinde bulunan hiflerden bazıları beslenmeyi sağlamak için, üzerinde yaşadığı substratların içine doğru uzanırlar. Genelde, beslenmeyi sağladıkları için bunlara **vejetatif hif** adı da verilmektedir. Diğer bir bölümü de dışarıda kalır (aerial hif). Bu son türdeki hifler arasında bazıları çoğalmada görev alır ve buna uygun olarak da kendilerinde özel organizasyonlar oluşur (reproduktif hif, fertil hifa). Hifler ayrıca şekillerine göre raket hif, nodüler hif, taraksı hif, spiral hif, köksü hif ya da favik hif olarak gruplandırılırlar [23].

Mayalar, makroskobik olarak bakteri kolonilerine benzeyen, krema kıvamındadırlar. Mikroskobik olarak incelendiklerinde Gram pozitif boyanma özelliği gösterirler. Mayalar tomurcuklanarak bölünürler. Bazen tomurcuklanan maya hücreleri ana hücreden kopmadan uzamaya devam ederler. Bu yapı küflerin oluşturduğu hif yapısına benzediği için yalancı hif (pseudohif) olarak adlandırılır. Hifte boğumlar bulunmaz. Ancak yalancı hifte boğumlar oluşur. Mayaların bir çoğu yalancı hif oluştururken, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* ve *Rhodotorula*'da bu yapı görülmez [24].

## II.3. MANTARLARIN HÜCRE YAPISI

Bazı mantarlarda polisakkarit yapısında kapsül bulunmaktadır ve önemli bir virülans faktörüdür. Çini mürekkebi ile ıslak preparat hazırlanarak kapsül varlığı tespit edilebilir. Kapsülü olan en önemli mantar, *Cryptococcus neoformans*'tır. Mantar hücre duvarının yapısında kitin, glukan, mannan, protein, glikoprotein ve

lipid bulunmaktadır (Tablo II.1). Hücre duvarı hücreye şeklini verir, osmatik şoktan korur ve antijenik özelliktedir [25].

**Tablo II.1:** Mantar hücre duvarında yer alan polisakkaritler [25].

<b>Polimer</b>	<b>Monomer</b>
Kitin	N-asetil D-glukozamin
Kitosan	D-glukozamin
Selüöz	D-glukoz
$\alpha$ -glukan	D-glukoz
$\beta$ -glukan	D-glukoz
Mannan	D-mannoz

Hücre zarı, memelilerdekine benzer bir şekilde fosfolipid, protein ve sterollerden oluşan iki tabakalı bir yapıdadır. Memeli zarından farklı olarak kolesterol yerine ergosterol ve zimosterol bulunur. Hücre zarının fonksiyonları arasında sitoplazmayı korumak, madde alış verişini düzenlemek ve kapsül ile duvar sentezine yardım etmek yer alır. Günümüzde kullanılan antifungal ilaçların çoğunun hedef bölgesi, hücre zarında bulunan ergosteroldür [25].

Bazı mantarlar oda ısında küf gelişimi gösterirken, 37 °C' de maya biçiminde ürerler. Bu mantarlara **Dimorfik (Çift evreli) Mantarlar** denir. Bazı dimorfik mantarların küf evreleri, bazı monoformik küflere çok benzediği için bu mantarların ayrımı maya evrelerine bakarak yapılabilir. Dimorfik mantarlara örnek; *Blastomyces dermatitis* ve *Sporothrix schenckii* örnek verilebilir [26]. Dimorfik mantarların tamamı patojendirler [27].

Mikromantarların koloni morfolojileri çok değişiklik gösterir. Kadifemsi, tüysü, pamuksu, keçemsi, mukoid olabilirler. Bu özellik sınıflandırılmakta kullanılır. Mantarlar beslenmeleri için organik bileşiklere ihtiyaç duyarlar ve heterotrof canlılardır. Karbon ve enerji kaynağı olarak organik bileşikleri kullanırlar. Hidrolitik enzimlerini dış ortama salarak besinleri sindirirler ve sindirilmiş besin maddelerini absorpsiyon yoluyla hücre içine alırlar [22].

## II.4. MANTARLARDA ÜREME

Mantarlar sporlanma (sporulasyon) ile eşeysiz (aseksüel) ve eşeyli (seksüel) olarak üreme yeteneğine sahiptirler. Mantarlarda eşeysiz üreme suda yaşayanlarda zoosporlarla, karada yaşayanlarda ise spor veya konidilerle olur. Sularda yaşayan mantarların sporlarında bulunan flagellumlar, bunları uygun ortamlara taşımakta ve hareketlerini sağlamaktadır. Sporlar renksiz, sarı, kırmızı, yeşil, siyah renklerde ve küresel, oval, silindirik, iplik, böbrek, iç gibi şekillerdedirler. Sporlar hifin ucunda veya **sporangium** adı verilen keselerde oluşur. Miselyumlar olgunlaşır ve yeterince gıda depo ederse veya çevresel koşullar sporulasyona uygun ise hiflerde çeşitli şekillerde sporlar gelişirler.

Sporlar olgunlaştıktan sonra hiflerden ayrılarak serbest hale gelir ve uygun ortam ve koşullarda çimlenerek kendi türüne özgü mantarı oluştururlar. Mantar sporları çok değişik biçim ve görünüme sahiptirler. Aynı zamanda, birçok tarzda da oluştururlar. Bu özellik, mantarların teşhisinde oldukça yardımcı olur. Mantar sporları, değişen çevre koşullarına karşı çok dayanıklıdır. Bu nedenle, doğada uzun yıllar canlı olarak kalabilirler [22].

### II.4.1 MANTARLARDA SPOR TİPLERİ

Mantarlarda sporlar üremeden sorumludur. Üreme eşeyli ya da eşeysiz yolla olmaktadır.

#### II.4.1.1. Aseksüel Sporlar

Mantarlarda başlıca 5 tür aseksüel spor oluşumuna rastlanmaktadır.

1. Artrosporlar
2. Blastosporlar
3. Klamidosporlar
4. Konidiosporlar
5. Sporangiosporlar

#### II.4.1.2. Seksüel Sporlar

Eşeyli üremede, seksüel sporlar ayrı cins veya karakterde olan iki gametin çekirdeklerinin redüksiyona uğrayarak haploid hale gelmesi ve bu haploid

kromozomların birleşmesi sonucu meydana gelirler. Mantarlarda seksüel sporlar başlıca 4 tarzda oluşur:

1. Askosporlar
2. Basidiosporlar
3. Oosporlar
4. Zigosporlar [22].

## II.5. MANTARLARIN SİSTEMATİĞİ

Mantarlar beş farklı sınıfa ayrılmışlardır.

1. *Myxomycetes* (= *Myxomycetae*): Cıvık Mantarlar.
2. *Phycomycetes* (= *Phycomycetae*): Algsi Mantarlar.
3. *Ascomycetes* (= *Ascomycetae*): Askuslu Mantarlar.
4. *Basidiomycetes* (= *Basidiomycetae*): Bazidiumlu Mantarlar.
5. *Deuteromycetes* (= *Deuteromycetae*): Fungi Imperfecti [22].

## II.6. *CANDIDA* ve *ASPERGILLUS*'A AİT ÖZELLİKLER

### II.6.1. *CANDIDA* TÜRLERİ

*Candida* türleri 3-6 µm büyüklüğünde, oval veya yuvarlağımsı, tomurcuklanma gösteren, beyazdan krem renge kadar değişen koloniler oluşturan (SDA besiyerine) ve yalancı hif (pseudohif) oluşturan mantarlardır. *Candida* cinsine ait türler 37°C'de 24 saatte yumuşak kıvamlı ve tipik olarak mayamsı kokulu koloniler meydana getiriler. En fazla kullanılan besiyeri Sabouraud dekstroz agar (SDA)'dır; %2 ya da %4 glikoz içeren formları kullanılmaktadır. Bu besiyeri asidik pH'ya (pH: 5.5) sahip olduğu için bakterilerin üremesi inhibe olmaktadır. Tween 80 agarda 25°C'de 72 saatte pseudohif ile geniş ve kalın duvarlı terminal klamidosporeler oluşturur. [40, 41].

*Candida* türleri bazı biyokimyasal aktivitelerine göre farklılıklar gösterdikleri için (Tablo II.2) çeşitli biyokimyasal testler sayesinde fenotipik olarak tür ayrımları yapılabilmektedir [28].

**Tablo II.2:** Bazı *Candida* türlerinin biyokimyasal özellikleri

	GLKÖZ	MALTOZ	SUKROZ	TREHALOZ	GALAKTOZ	SELOBİYOZ	KSİLÖZ	RAFİNOZ	LAKTOZ	DULSİTOL	MELİBİYOZ	ÜREAZ	KNO <sub>3</sub>
<i>C. albicans</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>C. kefyr</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-

*Candida* hücre duvarının predominant polisakkariti  $\beta$ -glukandır.  $\beta$ -glukan insanlarda enfeksiyon yapan tüm mantarlarda bulunur. Monosit ve T-lenfositlerde sitokin yapımı üzerine baskılayıcı etki göstererek, *Candida* enfeksiyonlarına karşı olan konak savunmasını bozduğu ileri sürülmüştür.  $\beta$ -glukan, *C. albicans*'ın akciğer, karaciğer ve dalakta blastosporlar ve germ tüp oluşumu patojenitesini belirler. Böbreklerde ise hızla uzun filamentler halini alarak patojenitesini güçlendirir [29].

*Candida* türleri normal floranın bir parçasıdır. İnsanlarda gastrointestinal kanalında, geçici ya da kalıcı olarak bulunurlar. Ayrıca ekspektore edilen balgamda, kadın genital yolunda ve kateter yerleştirilmiş hastaların idrarında bulunur. *Candida*, normalde yenidoğan döneminde ve doğumdan kısa bir süre sonra ağız, boğaz, bağırsaklar ve genitoüriner bölgeye kolonize olur. *Candida* türleri aynı zamanda, bütünlüğü bozulduğunda, bağırsak duvarını geçebilirler. Genellikle *Candida* enfeksiyonları endojen orjinli olsa da, insandan insana geçiş de mümkündür. Anne vajinasından bebeğe de geçebilir. Aynı zamanda *Candida* enfeksiyonları, hastane ortamından da kazanılabilir. Ancak, *Candida* suşlarının genotiplendirmesi esas alınarak yapılan çalışmalarda, pek çok ciddi kandidoz olgusunda, endojen kolonizasyonun sorumlu olduğu gösterilmiştir [30].

*Candida* türleri içinde en sık enfeksiyona neden olan tür *Candida albicans*'tır. Bunu *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* ve *Candida dubliniensis* izlemektedir [8].

*C. albicans* türleri krem renkli koloniler oluştururlar. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilirler. Türe ait suşların %95'i germ tüp oluştururlar. Klamidospor oluşturabilirler. *C. dubliniensis* suşları da germ

tüp oluşturduğu için rutin uygulamalarda sıklıkla tanımlamada hatalar yapılabilmektedir. Ancak *C. albicans* suşları 37 °C ve 45 °C'de (48 saatte) üremeleriyle *C. dubliniensis*'ten ayrılırlar. Ayrıca CHROMagar *Candida* besiyerinde oluşturdukları renk farkı ile de ayrımları yapılabilmektedir. Bu besiyerinde *C. albicans* mavimsi koyu yeşil renkte iken; *C. dubliniensis* suşları açık yeşil veya beyaz renkte koloniler oluştururlar. Mantar enfeksiyonları içinde en fazla, *C. albicans*'ın neden olduğu kandidiasise rastlanmaktadır. Vajinal kandidiasis en sık görülen kandidiasis tipidir. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda invazif kandidiasis ölümlerine sonuylanırken; yenidoğanlardaki mantar kaynaklı ölümlerin nedeni sıklıkla sistemik kandidiasise neden olan *C. albicans*'tır [15, 30].

*C. albicans* dışı türlerinin belirli pH derecelerini tercih etmeleri nedeniyle üriner sistem yerine, orofarinks ve vajina gibi diğer bölgelerde daha sık enfeksiyon etkeni oldukları bilinmektedir [29].

*C. dubliniensis* HIV ile enfekte kişilerde genellikle ağız içi mikoz etkenidir. Nadiren de vücudun çeşitli bölümlerinden izole edilir.

*C. glabrata* nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarına sebep olan önemli bir patojendir ve diyabetli hastalarda üriner sistem enfeksiyonlarında artmış bir risk söz konusudur. *C. glabrata* ile olan enfeksiyonların kateter kullanımının artması ve profilaktik olarak azol kullanımında sekonder enfeksiyon olarak oluştuğu düşünülmektedir.

*C. tropicalis* genellikle diyabette; deri lezyonlarından izole edilmektedir. *C. tropicalis* daha çok bağışıklık sistemi baskılanmış hastalardaki kandidoz nedeni olarak görülmektedir. Bu ajan yüksek mortalite ile seyreden dissemine enfeksiyona neden olur ve *C. albicans*'a göre daha şiddetli seyreder.

*C. parapsilosis* daha çok total parenteral nutrisyon veya intravasküler kateterlerle taşınan, endemik ve epidemik nozokomiyal enfeksiyonlara yol açar. Fungal endokarditte önemli etkidir [25, 27].

## **II.6.2. ASPERGİLLUS TÜRLERİ**

*Aspergillus* türleri doğada yaygın olarak bulunur, sporları sayesinde kolaylıkla hava ile taşınabilirler ve insanlar için patojendirler [31, 32]. *Aspergillus* türleri aspergillozis adı verilen enfeksiyona sebep olurlar. Bazı türleri de allerjik reaksiyonlara neden olmaktadır. *Aspergillus* türleri içinde insanlarda en fazla

patojen olarak *Aspergillus fumigatus* izole edilememektedir. Bunun yanında *A. flavus*, *A. niger* ve *A. terreus* da sıklıkla etken olarak izole edilmektedir. Bunlardan başka da enfeksiyon etkeni olan *Aspergillus* türleri mevcuttur (Tablo II.3). Kemoterapi alan, HIV ile enfekte olan AIDS olgularında bağışıklık yetmezliği nedeniyle ciddi enfeksiyonlara sebep olmaktadır [33-35].

**Tablo II.3:** Enfeksiyon etkeni olan *Aspergillus* türleri [35].

<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus glaucus</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus sydowi</i>
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus candidus</i>
<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Aspergillus restrictus</i>
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Aspergillus amstelodami</i>
<i>Aspergillus ustus</i>	<i>Aspergillus clavatus</i>

Akciğerlerdeki alveolar makrofajlar solunum yolu ile giren konidiaları yok eder. Ancak kortikosteroid tedavisi alan ya da bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda akciğerlerde kolonizasyon meydana getirirler [35].

*Aspergillus* türleri hızlı üreyen, havai misel oluşturan, genellikle uzun konidioforlara sahip, üzerinden fiyalidler oluşan veziküllere sahip olan mantarlardır. *Aspergillus* türlerinin morfolojik olarak identifikasyonunda koloninin renginden sporlarının çaplarına kadar bir çok parametrenin göz önünde bulundurulması gerekmektedir [24, 35].

*Aspergillus fumigatus* Czapek's agarı kültür ortamında oda sıcaklığında 7 günde 2.5 cm çapında koloni oluşturmaktadır. Koloni kadifemsidir. Koloni ortası yeşil, kenarları beyazdır. Petri kabına tersten bakıldığında, koloni sarı-yeşil görünmektedir. Konidioforların uzunlukları 150-300 µ arasında olup çapları 5-8 mikron arasındadır. Veziküllerin çapları 20-30 µ arasındadır. Sterigma tek serilidir. 6-8x2-3 µ ölçülerindedir. Konidia yeşildir ve ölçüleri 2.5-3x2-3.5 mikrondur [24].

*Aspergillus flavus* Czapek's agarı kültür ortamında oda sıcaklığında 7 günde 5 cm çapında koloni oluşturmaktadır. Koloni yüzeyi başlangıçta sarı olup zamanla sarı-yeşil olmaktadır. Petri kabına tersten bakıldığında, pembemsi ya da kırmızımsı kahverenginde görülmektedir. Konidioforlar 2-2.5 mm uzunluğunda, 10-20 µ çapındadırlar. Veziküller globoz veya subgloboz yapıda olup 10-60 µ çapındadır. Sterigma tek ya da iki serili olabilmektedir. Primer sterigma 6-10x4-5, sekonder

sterigma 6.5-10x3-5  $\mu$  ölçülerindedir. Konidia globoz veya subgloboz yapıda olup, ölçüleri 3-5x3-4  $\mu$  arasında değişmektedir [24].

*Aspergillus niger* kontaminant olarak bilinse de zaman zaman aspergillosise neden olur. Czapek's agarı kültür ortamında oda sıcaklığında 7 günde 2.2 cm çapında koloni oluşturmaktadır. Koloni yüzeyi kahverengimsi olup, orta kısım siyah noktalı görünmektedir. Petri kabına tersten bakıldığında koloni beyaz-gri renkte görünmektedir. Kokusu hafif küfümsüdür. Konidioforların uzunlukları 2-2.5 mm olup 15-21  $\mu$  çaplarındadır. Veziküllerin çapları 25-48  $\mu$  arasındadır. Sterigma iki serilidir. Primer sterigma 20-30x5.5-6, sekonder sterigma ise 6-10x2.5-3  $\mu$  ölçülere sahiptir. Konidiler küremsidir. Renkleri kahverengi olup çeperleri kalın dikenlidir. Çapları 2.5-4  $\mu$  arasındadır [24].

*Aspergillus terreus* allerjik ya da invazif aspergillosis etkenidir. Czapek's agarı kültür ortamında yeşilimsi kahverenginde koloniler oluşturmaktadır. Petri kabına tersten bakıldığında koyu kahverenginde görünmektedir. Veziküllerin çapları 10-20  $\mu$ , konidilerin çapları 1.5-2.5  $\mu$  arasındadır. Konidiler düzgün duvarlı ve elipsoidaldir [24, 30].

## II.7. MANTAR ENFEKSİYONLARININ TANISINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Son yıllarda mantar enfeksiyonlarında artış görülmektedir. Mantar enfeksiyonlarının %80'inden *Candida* ve *Aspergillus* cinslerine ait türler sorumludur. Mantar enfeksiyonlarının tanısında kullanılan yöntemler şunlardır:

- Direkt Mikroskopi
- Kültür
- Antijen ya da antikor tespiti
- Moleküler Yöntemler
- Histolojik Değerlendirme
- Radyolojik Değerlendirme

Günümüzde en çok hedeflenen nokta antijen tayini, mantara özgül immunoglobulin tespiti ve moleküler yöntemlerle mümkün olan en kısa zamanda doğru tanıyı sağlamaktır [25, 26].

Mantar enfeksiyonlarının tanısında laboratuvar değerlendirmesi çok önemlidir. Doğru bir tanının koyulabilmesi için klinik örnekler antifungal tedaviye başlamadan önce aseptik koşullarda alınmalı ve steril şartlarda laboratuvara gönderilmelidir.

### **II.7.1. Direkt Mikroskopik Değerlendirme**

Kültür işleminin uzun süre gerektirmesi nedeniyle direkt mikroskopik inceleme çok önemlidir. Özellikle steril bölgelerden alınan örneklerde mantar yapılarının görülmesi durumunda hemen klinisyene haber verilmesi gereklidir.

Mikroskopik incelemede genellikle maya ve kf varlığı açısından ilk veriler elde edilir. Tomurcuklanan maya hücreleri ve yalancı hif oluşumu çoğu *Candida* ve *Trichosporon* türü için karakteristiktir. Yalancı hif olmaksızın sadece tomurcuklanan maya hücrelerinin görülmesi, *Candida glabrata*, *Cryptococcus* türleri, *Rhodotorula* türleri ve *Histoplasma capsulatum* için ip ucu olabilir. Septalı ya da septasız, dikotom ya da dik açılı dallanan hif benzeri yapıların görülmesi durumunda kf enfeksiyonundan şphenilmelidir. Septalı ve dikotom dallanma gösteren hiflerin görülmesi durumunda ilk değerlendirmede *Aspergillus* türleri akla gelmelidir. Ancak bu görünüm *Aspergillus* türleri için karakteristik değildir. *Fusarium*, *Scedosporium*, *Paecilomyces* ve *Penicillium* gibi kf mantarlarında da görülebilmektedir. Hyalen mantarlar şeffaf ve renksiz hifler oluşturdukları halde esmer mantarlar kahverengi ya da siyah renkli septalı hifler oluştururlar [25, 26].

Direkt mikroskopik inceleme için Gram, %10-20'lik potasyum hidroksit, laktofenol pamuk mavisi, ini mreккеbi gibi boyalar kullanılır. Klinik örneklerde herhangi bir mantar yapısının görülmemesi mantar enfeksiyonu olmadığı anlamına gelmez. Direkt mikroskopi sonuçları mutlaka kültür ile doğrulanmalıdır [25, 26].

### **II.7.2. Kültür**

Kültür için kullanılan besiyerleri örneğe göre değişmektedir. Steril ortamlardan alınmış örnekler için SDA gibi antibiyotiksiz besiyerleri kullanılırken; steril olmayan bölgelerden alınan örnekler için antibiyotikli SDA kullanılabilir. Genellikle saprofit küflerin üremesini engellemek için sikloheksimid içeren besiyeri kullanılır. Ancak *Cryptococcus neoformans* gibi sikloheksimide duyarlı mantarları üretmek için hem antibiyotikli hem de antibiyotiksiz besiyeri aynı anda

kullanılmalıdır. Bazı *Candida* türlerinin sikloheksimid duyarlılıkları değişkendir (Tablo II.4) [25].

**Tablo II.4:** *Candida* türlerinin sikloheksimid duyarlılıkları [25].

Mikroorganizmalar	25°C'de sikloheksimid ile üreme
<i>Candida albicans</i>	+
<i>Candida tropicalis</i>	±
<i>Candida parapsilosis</i>	-
<i>Candida guilliermondii</i>	+
<i>Candida pseudotropicalis</i>	+
<i>Candida krusei</i>	-

Mayalar için optimal inkübasyon ısısı 37°C iken, küfler için 20-26°C'dir. Optimal pH mayalar için 3.0-7.5; küfler için 2.2-9.0 arasındadır [25].

Mayaların tanımlanması için çeşitli biyokimyasal testler yapmak gereklidir. Bunun için günümüzde özgülüğü ve duyarlılığı çok yüksek ticari kitler bulunmaktadır [26]. Küflerin tanımlanması için ise çeşitli teşhis kitaplarından yararlanılmaktadır [19, 21].

### II.7.3. Antijen Tayini

Fungal antijenlerin saptanması için çeşitli testler mevcuttur. Kapsül antijeninin saptanması için ELİSA yöntemleri kullanılmaktadır. İnvaziv aspergillozis tanısı için galaktomannan antijeni testi uygulanmaktadır. Galaktomannan, *Aspergillus* cinsi mantarlarda hücre duvarında bulunan, heteropolisakkarit yapıda majör bir antijendir. Bu test ELİSA yöntemi ile çalışılmaktadır ve ticari formu bulunmaktadır. Çocuklarda ve yeni doğanlarda bu testin özgülüğü düşüktür. Ayrıca piperasilin-tazobaktam kullanan hastalarda galaktomannan antijeni testinde yalancı pozitiflikler saptanmaktadır.

İnvazif kandidoz tanısında D-arabinitol biyokimyasal bir belirteç olarak kullanılmaktadır.

İnvazif mikoizların tanısında kullanılan bir başka ve önemli bir test de 1,3-β-D glukon antijeni saptanmasıdır. 1,3-β-D glukon *Zygomycetes* grubu mantarlar ve *Cryptococcus* türleri dışında, tüm mantarların hücre duvarında yer alan bir polisakkarittir. Serumda bu antijenin varlığının tespiti mantar enfeksiyonlarının tanısı için çok önemli bir yer tutmaktadır [25, 36].

## II.7.4. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemlerden en fazla PCR kullanılmaktadır. Testler genellikle panfungal olarak uygulanmaktadır. Halen tamamı optimize edilmiş çok iyi bir yöntem yoktur. Ancak bu alanda çok sayıda çalışma yapılmaktadır [37-41].

## II.8. ANTİFUNGALLER

Mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan çok sınırlı, ancak sayıları gün geçtikçe artan antifungal ilaç vardır. Antifungal ilaçların çoğunun kısıtlı antifungal etkilerinin oluşu, enfekte dokulara yeteri kadar nüfuz edememeleri, dirençli suşların gelişmesi, immünyetmezlik gibi etkenler antifungal tedaviyi güçleştirmektedir. Antifungal tedavinin başarısı doğru tanı ve uygun antifungal kullanılması ile doğru orantılıdır.

Antifungal direnç, üç başlık altında incelenir:

- primer (intrinsik),
- sekonder (kazanılmış),
- klinik.

Primer direnç antifungal temas öyküsü yokken kalıtımla gelen dirençtir. Sekonder direnç uzun süreli bir antifungal kullanım sonucu olarak, önceden duyarlı olan bir izolatın dirençli bir fenotip geliştirmesiyle ortaya çıkar. Klinik direnç laboratuvar testlerine göre hassas olduğu bilinen antifungal kulanıma rağmen hastalığın ilerleyici olması durumu olarak tanımlanmaktadır. Bu durum tipik olarak immün yetmezlik durumları (AIDS, nütropeni gibi) varlığında görülmektedir [26].

Antifungaller etki mekanizmalarına göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılır:

**1- Polyenler:** Bu grup antifungaller mantar hücresinin sterol halkasına bağlanıp, mebran özelliğini bozarlar.

- Amfoterisin B
- Nistatin

**2- Azoller:** Tüm azol bileşikleri, lanosterol demetilaz enzimini inhibe ederek antifungal etki gösterir. Bu enzim, lanosterolden ergosterol sentezinde rol alan bir enzimdir. Ergosterol sentezinin inhibisyonu mantar hücre membran sentezinin sonlanmasıyla sonuçlanır.

- Flukonazol

- İtrakonazol
- Vorikonazol
- Posakonazol
- Ravukonazol
- Ketokonazol

**3- Primidinler (Nükleozit Analogu):** Nükleik asit sentezini inhibe ederler. Bunlar primidin metabolizmasını bozar ve böylece mantar hücresindeki DNA, RNA ve protein sentezini engelleyerek antifungal etki gösterir.

- 5-Flusitozin

**4- Ekinokandinler:** Geniş etki spektrumuna sahip lipopeptit yapısındaki bileşiklerdir. Ekinokandinler glukan sentezini inhibe ederek mantarın hücre duvarı sentezini inhibe ederler.

- Caspofungin
- Anidulafungin
- Mikafungin [35].

## II.9. LİTERATÜR ÖZETİ

PCR ile ilgili çalışmalar, 1983 yılında Kary Mullis tarafından bulunması ile başlamıştır. Günümüzde moleküler biyolojinin temel tekniklerinden biri olmuştur ve geniş bir kullanım alanına sahiptir. Gıda mühendisliğinden tıbbı kadar bir çok alanda sıklıkla kullanılmaktadır. Tıpta hastalık tanısında ve çeşitli mikroorganizmaların identifikasyonunda kullanılmaktadır. Özellikle *Mycobacterium tuberculosis* gibi yavaş üreyen bakteriler, mantarlar ve viral etkenlerin belirlenmesinde PCR'in rolü çok büyüktür. Çünkü *M. tuberculosis* kültürde çok geç ürediğinden tedavi için geç kalınabilmektedir. Mantar etkenlerinden küfler ve dermatofitlerin de geleneksel yöntemlerle saptanması uzun zaman almaktadır. Virüsler ise sadece hücre kültüründe üretilebildiklerinden PCR ile saptanmaları tedavi açısından çok önemlidir [42].

Mantarların saptanmasında kullanılan tümüyle optimize bir protokol olmamakla birlikte bu alandaki çalışmalarda özellikle son yıllarda artış görülmektedir.

Yeni Zellanda'da (1994) kan örneklerinden konvensiyonel PCR ile *Candida albicans* taraması yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [43].

1994 yılında bir grup araştırıcı tarafından *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* tanısı için tek primer kullanılmış ve 27 örnekten 26 tanesinde kültür ile aynı sonuç bulunmuştur [44].

Hollanda'da (1994) immünesupresif hastalardan alınan alt solunum yolu örneklerinde konvensiyonel PCR ile *Aspergillus* taraması yapılmıştır. Çalışmada kültür ile uyumlu sonuçlar elde edilmiş ve PCR için gerekli laboratuvar ortamının oluşturulmasının gerekliliği ile deneyimli personel tarafından çalışılması gerektiği vurgulanmıştır. Ayrıca bu çalışmada PCR'ın mantar enfeksiyonlarında erken tanı için faydalı olduğu ve tedaviyi olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir. Yine 1997 yılında Almanya'da yapılan bir çalışmada özellikle immünesupresif hastalarda erken tanının tedaviye büyük oranda yardımcı olduğu belirtilmiştir [45, 46].

Amerika'da (1998) kemoterapi tedavisi gören hasta gruplarında yapılan bir çalışmada, *Candida* ve *Aspergillus* saptanması için panfungal PCR yapılmış ve üç hastaya akciğer aspergillosisi tanısı konulmuştur. PCR sonuçları ile diğer bulguların uyumlu olduğu belirtilmiştir [47].

1999 yılında Almanya'da yapılan çalışmada nested PCR ile *Aspergillus* taraması yapılmıştır. Kültür yöntemi ile üretilen 315 *Aspergillus* suşu, PCR ile de saptanmıştır [48].

1999 yılında Kanada'da kültür ile üretilen *Candida* ve *Aspergillus* suşlarının dizi analizleri yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda geleneksel yöntemlerle moleküler yöntemler arasında uyum olduğu belirtilmiştir [49].

2001 yılında kandidiyasis şüpheli hastalardan ve farelerden örnekler alınmış ve nested PCR ile *Candida* varlığı saptanmaya çalışılmıştır. Antijen titresi ile PCR sonuçları arasında uyumsuzluklar saptanmış ve PCR'ın daha güvenilir sonuçlar verdiği belirtilmiştir [50].

İngiltere'de (2001) Taqman prob kullanılarak 5 farklı *Candida* türü tiplendirilmeye çalışılmıştır. Çalışmada sadece germ tüp ile *Candida albicans* tanısının konulmasının zaman zaman hatalara neden olacağı belirtilmiş ve *Candida dubliniensis*'inde germ tüp pozitif olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca türe özgü Taqman problemlerinin kullanımının PCR verimini arttıracaağı belirtilmiştir [51].

2002 yılında Amerika'da invaziv aspergillosis tanısında kullanılan kültür yöntemi ve panfungal PCR sonuçları karşılaştırılmış ve PCR'ın kültür yöntemine göre 19.4 kat daha duyarlı olduğu saptanmıştır [52].

Amerika’da (2002) germ tüp yöntemi ile teşhis edilmiş 97 *Candida albicans*  rneği hibridizasyon prob yöntemi ile moleküler düzeyde tanımlanmıştır. 97 örnekten 69 tanesinin gerçekten *C. albicans* olduğu; ancak 28  rneğin *C. dubliniensis* olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada sadece germ tüp testi ile *C. albicans* tanımlamasının yanlıŐ olduğu belirtilmiş ve bu durumun özellikle HIV pozitif hastalarda flukonazole dirençli *C. dubliniensis* enfeksiyonlarında risk oluşturduğu vurgulanmıştır [53]. Bu durum benzer çalışmalarda da belirtilmiştir [54, 55].

2003 yılında onkoloji kliniğinde yapılan çalışmada real time PCR testinin kültür yöntemine göre daha duyarlı olduğu; kültürde üretilemeyen bazı suşların PCR’da saptandığı belirtilmiştir. Ayrıca real time PCR süresinin kısa olması konvensiyonel PCR’a göre bir avantaj olduğu rapor edilmiştir [56]. Yapılan başka çalışmalarda da real time PCR’ın diğer teŐhiŐ yöntemlerine göre daha duyarlı olduğu belirtilmiştir [57-61]. *Aspergillus* tanı amaçlı yapılan başka çalışmalarda (2005) da kültür ve mikroskopi yöntemlerinin de mutlaka destekleyici olarak yapılması gerektiği bildirilmiştir [62, 63].

2006 yılında yalancı PCR negatifliği problemini konu alan bir raporda,  rnekleredeki inhibitör nedeniyle zaman zaman yanlıŐ sonuçlar elde edilebileceği ve test sonuçlarının klinik bulgularla karşılaştırılması gerekliliği belirtilmiştir. Ayrıca klinik olarak enfeksiyon belirtileri varken elde edilen negatif sonuçlar için testlerin tekrarlanması gerektiği vurgulanmıştır [64].

Tunus’da (2007) *Candida* türlerinin identifikasyonu için 49 örnek incelenmiŐ. Bunların sadece 19 tanesi kültürde pozitif bulunurken; tamamı PCR ile saptanmıştır [65].

Doku  rneklereinden mantar identifikasyonu için yapılan bir çalışmada (2007) PCR’ın daha duyarlı olduğu; ancak bu testin sonuçlarının kültür ile doğrulanması gerektiği belirtilmiştir [66].

Daha  nceki çalışmaların çoğu konvensiyonel PCR temelli çalıŐmalardı. Ancak son birkaç yılda fungal etkenlerin saptanmasında ve tiplendirmesinde real time PCR uygulamaları sıklamıŐtır. Bu sistemlerin hızlı ve diziye özgül problemler kullanılarak duyarlılık ve özgüllüğünün arttırabilmesi, çalışmaların bu tarafa yönelmesini saĐlamıŐtır. Konvensiyonel PCR ile 4-6 saat arasında süren test süresi, real time PCR teknoloğisi ile 1-1.5 saate inmiŐtir. Bu sistemler sayesinde çalışmalar artmış, diğer yöntemlerle karşılaştırma çalışmaları baŐlamıŐ ve fungal PCR testlerinin duyarlılığı artmıştır [67-72]

Portekiz [73] ve İsveç'te [74] *Candida* türlerinin identifikasyonunda real time PCR yöntemi kullanılmış ve erime tepeleri (Tm) analizi ile tiplendirmeleri denenmiştir. Ancak erime sıcaklıklarının birbirine çok yakın oldukları saptanmıştır. Bu tür çalışmaların identifikasyonda değil, daha çok risk grubu hastaların erken tanısında kullanılabileceği belirtilmektedir [75]. Mantar genomlarında kullanılan ortak bölgelerdeki farklılıklar PCR temelli çalışmaların en büyük sorunu olmuştur [76].

Almanya'da (2009) yapılan bir çalışmada kan örneklerinden *Candida* tiplendirme çalışmaları yapılmış ve geleneksel yöntemlere göre real time PCR sistemi ile sonuç süresinin 3 gün azaltıldığı belirtilmiş, bunun da tedavinin seyrini değiştirdiği bildirilmiştir [77].

Japonya'da 2009 yılında real time PCR sistemi mantar enfeksiyonlarının tanısı ve kantitatif olarak izlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Ayrıca sonuçlar dizi analizi ile doğrulanmıştır. Bu iki yöntem arasında bir fark olmadığı belirtilmiştir [78]. Mantar enfeksiyonlarının kantitatif olarak izlenmesinin enfeksiyonun derecesini belirlemediği [79], otomatize nükleik asit izolasyon sistemlerin kullanılmasıyla standardize yöntemlerle birlikte kullanıldığında verimli olacağı belirtilmektedir [80].

Japonya'da (2009) yapılan başka bir çalışmada bazı *Candida* türlerinin geleneksel yöntemlerle saptanamadığı; bu nedenle PCR ile tiplendirme yapılması gerekliliği vurgulanmıştır [81]. Çoğunlukla *Candida albicans* ile *Candida dubliniensis* ayrımının yapılmasında hatalar olduğu belirtilmektedir [82].

Almanya'da (2010) real time PCR yöntemi ile *Candida* türlerinin identifikasyonu çalışmaları yapılmış, konvensiyonel PCR'a göre daha uygulanabilir ve pratik olduğu belirtilmiştir. Ayrıca *Candida* suşlarındaki azol grubu antifungallere karşı direnç artışı nedeniyle tiplendirme ve antifungal duyarlılık çalışmalarının gerekliliği vurgulanmıştır [83]. Özellikle de nötropenik hasta gruplarında ampirik tedavinin başarılı olması için hızla tanı konulması hayati önem taşımaktadır. Çünkü mantar enfeksiyonlarının tedavisi zordur ve bazen tanı postmortem örneklerden konulabilmektedir [84]. Ancak bu alanda yeterli düzeyde çalışma bulunmamaktadır [85]. *Aspegillus* enfeksiyonları *Candida* enfeksiyonlarına göre daha ciddi sorunlara yol açmaktadır. Bu nedenle, bu tip enfeksiyonların tedavisi bazen çok zor bazen de imkajsız olabilmektedir [86-88].

Ülkemizde mikoloji alanında morfolojik ve biyokimyasal yöntemlerle identifikasyon çalışmaları sıklıkla yapılmaktadır. Ancak PCR çalışmaları bir kaç merkez ile sınırlı olup, gün geçtikçe çalışmalar hız kazanmaktadır.

İstanbul'da (2010) kan kültürlerinden direkt PCR ile en fazla etken olarak görülen dört farklı *Candida* türü (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*) teşhis edilmiştir. Nested PCR ile yapılan çalışma sonucunda kültür ile uyumlu sonuçlar elde edilmiş, hız açısından PCR yönteminin avantajlı olduğu belirtilmiştir [89]. Kayseri'de (2010) yapılan başka bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir [90].

İstanbul'da (2011) nütropenik hasta gruplarında, fungal enfeksiyonlarının tanımlamasında kullanılan galaktomanan antijeni, kültür ve real time PCR yöntemleri karşılaştırılmıştır. Fungal enfeksiyonlarının tanısının konulması için birkaç testin birlikte yapılması gerekliliği vurgulanmıştır [91].

## BÖLÜM III

### TEZ ÇALIŞMALARI

#### III.1. TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN MATERYALLER

Tez çalışmasında 2009-2011 yılları arasında Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na başvuran hasta örnekleri ile bu örneklerden üreyen suşlar kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan suşlar; abse, ağız sürüntüsü, BAL (bronkoalveolar lavaj), balgam, batın içi mayi, idrar, idrar sondası, kan kültürü, kateter, kulak akıntısı, kulak sürüntüsü ve trakeal aspirat örneklerinden izole edilmişlerdir (Tablo III.1 ve III.2). Toplam 139 örnek çalışılmış ve 110 tanesinde *Candida*; 29 tanesinde ise *Aspergillus*'a ait türler izole edilmiştir.

**Tablo III.1:** *Candida* suşlarının izole edildikleri örneklerin cinsleri

Materyal Cinsi	Miktar
ABSE	7
AĞIZ SÜRÜNTÜSÜ	2
BALGAM	30
BATIN İÇİ MAYI	1
İDRAR	19
İDRAR SONDASI	1
KAN KÜLTÜRÜ	21
KATETER	2
TRAKEAL ASPİRAT	27
<b>TOPLAM</b>	<b>110</b>

**Tablo III.2:** *Aspergillus* suşlarının izole edildikleri örneklerin cinsleri

<b>Materyal Cinsi</b>	<b>Miktar</b>
ABSE	2
BAL	1
BALGAM	14
KULAK AKINTISI	3
KULAK SÜRÜNTÜSÜ	5
TRAKEAL ASPİRAT	4
<b>TOPLAM</b>	<b>29</b>

Mikolojik testler için laboratuvara ulaştırılan örnekler (Tablo III.3. ve III.4.) ekimi yapılmaya kadar buzdolabında (2-8 °C’de) muhafaza edilmişlerdir.

**Tablo III.3:** *Candida* suşlarının izole edildikleri örneklerin listesi

<b>Örnek No</b>	<b>Materyal</b>	<b>Örnek No</b>	<b>Materyal</b>
1	İDRAR	56	KAN KÜLTÜRÜ
2	TRAKEAL ASPİRAT	57	ABSE
3	ABSE	58	ABSE
4	TRAKEAL ASPİRAT	59	TRAKEAL ASPİRAT
5	BALGAM	60	BALGAM
6	TRAKEAL ASPİRAT	61	BALGAM
7	TRAKEAL ASPİRAT	62	TRAKEAL ASPİRAT
8	KATETER	63	KAN KÜLTÜRÜ
9	BALGAM	64	KAN KÜLTÜRÜ
10	BALGAM	65	KAN KÜLTÜRÜ
11	BALGAM	66	KAN KÜLTÜRÜ
12	TRAKEAL ASPİRAT	67	AĞIZ SÜRÜNTÜSÜ
13	TRAKEAL ASPİRAT	68	İDRAR
14	İDRAR	69	İDRAR
15	İDRAR SONDASI	70	BALGAM
16	KAN KÜLTÜRÜ	71	BALGAM
17	KAN KÜLTÜRÜ	72	BALGAM
18	İDRAR	73	BALGAM
19	BALGAM	74	BATIN İÇİ MAYI
20	TRAKEAL ASPİRAT	75	İDRAR
21	TRAKEAL ASPİRAT	76	BALGAM

<b>Örnek No</b>	<b>Materyal</b>	<b>Örnek No</b>	<b>Materyal</b>
22	BALGAM	77	İDRAR
23	BALGAM	78	TRAKEAL ASPİRAT
24	TRAKEAL ASPİRAT	79	TRAKEAL ASPİRAT
25	BALGAM	80	İDRAR
26	TRAKEAL ASPİRAT	81	İDRAR
27	BALGAM	82	TRAKEAL ASPİRAT
28	TRAKEAL ASPİRAT	83	TRAKEAL ASPİRAT
29	BALGAM	84	AĞIZ SÜRÜNTÜSÜ
30	İDRAR	85	ABSE
31	İDRAR	86	ABSE
32	İDRAR	87	BALGAM
33	TRAKEAL ASPİRAT	88	BALGAM
34	KATETER	89	BALGAM
35	BALGAM	90	BALGAM
36	BALGAM	91	BALGAM
37	İDRAR	92	TRAKEAL ASPİRAT
38	İDRAR	93	TRAKEAL ASPİRAT
39	KAN KÜLTÜRÜ	94	TRAKEAL ASPİRAT
40	ABSE	95	BALGAM
41	KAN KÜLTÜRÜ	96	BALGAM
42	KAN KÜLTÜRÜ	97	TRAKEAL ASPİRAT
43	TRAKEAL ASPİRAT	98	TRAKEAL ASPİRAT
44	BALGAM	99	TRAKEAL ASPİRAT
45	TRAKEAL ASPİRAT	100	KAN KÜLTÜRÜ
46	BALGAM	101	KAN KÜLTÜRÜ
47	KAN KÜLTÜRÜ	102	KAN KÜLTÜRÜ
48	İDRAR	103	İDRAR
49	TRAKEAL ASPİRAT	104	İDRAR
50	KAN KÜLTÜRÜ	105	BALGAM
51	KAN KÜLTÜRÜ	106	İDRAR
52	KAN KÜLTÜRÜ	107	BALGAM
53	KAN KÜLTÜRÜ	108	KAN KÜLTÜRÜ
54	KAN KÜLTÜRÜ	109	ABSE
55	KAN KÜLTÜRÜ	110	İDRAR

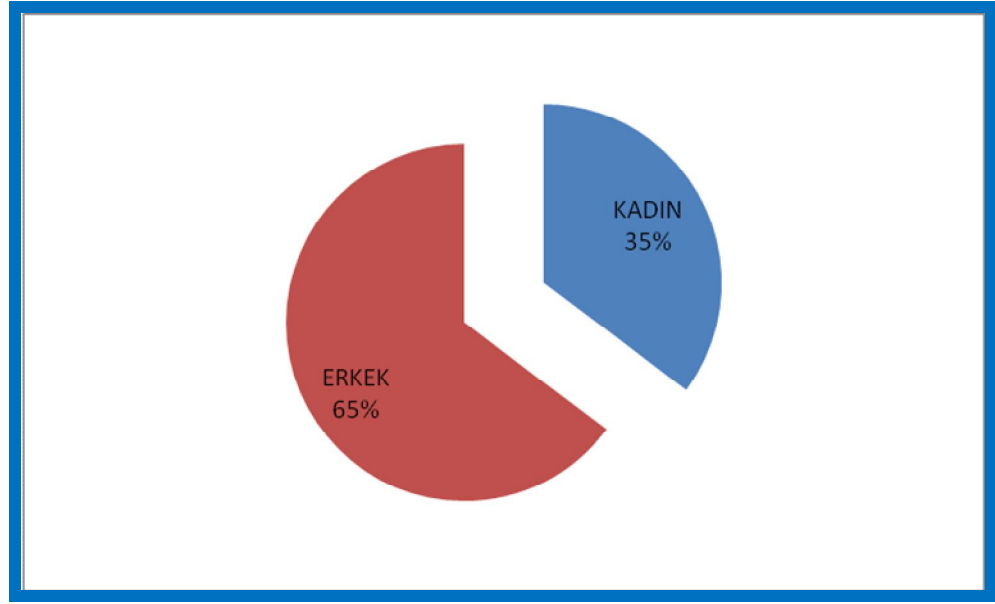
**Tablo III.4:** *Aspergillus* suşlarının izole edildikleri örneklerin listesi

<b>Örnek No</b>	<b>Materyal</b>
1	BALGAM
2	ABSE (KALP KAPAKÇIĞI)
3	TRAKEAL ASPİRAT
4	TRAKEAL ASPİRAT
5	KULAK AKINTISI
6	KULAK AKINTISI
7	KULAK SÜRÜNTÜSÜ
8	KULAK SÜRÜNTÜSÜ
9	BALGAM
10	BAL
11	BALGAM
12	BALGAM
13	BALGAM
14	BALGAM
15	BALGAM
16	BALGAM
17	BALGAM
18	ABSE (KALP KAPAKÇIĞI)
19	TRAKEAL ASPİRAT
20	TRAKEAL ASPİRAT
21	KULAK SÜRÜNTÜSÜ
22	KULAK SÜRÜNTÜSÜ
23	KULAK SÜRÜNTÜSÜ
24	KULAK AKINTISI
25	BALGAM
26	BALGAM
27	BALGAM
28	BALGAM
29	BALGAM

139 suştan 49 tanesi kadın hastalardan izole edilirken; 90 tanesi ise erkek hastalardan izole edilmiştir (Tablo III.5 ve Şekil III.1.). Cinsiyet farkının üremeye etkisinin olup olmadığına dair bir kaynağa rastlanmamıştır.

**Tablo III.5:** Örnek alınan hastaların cinsiyet dağılımı

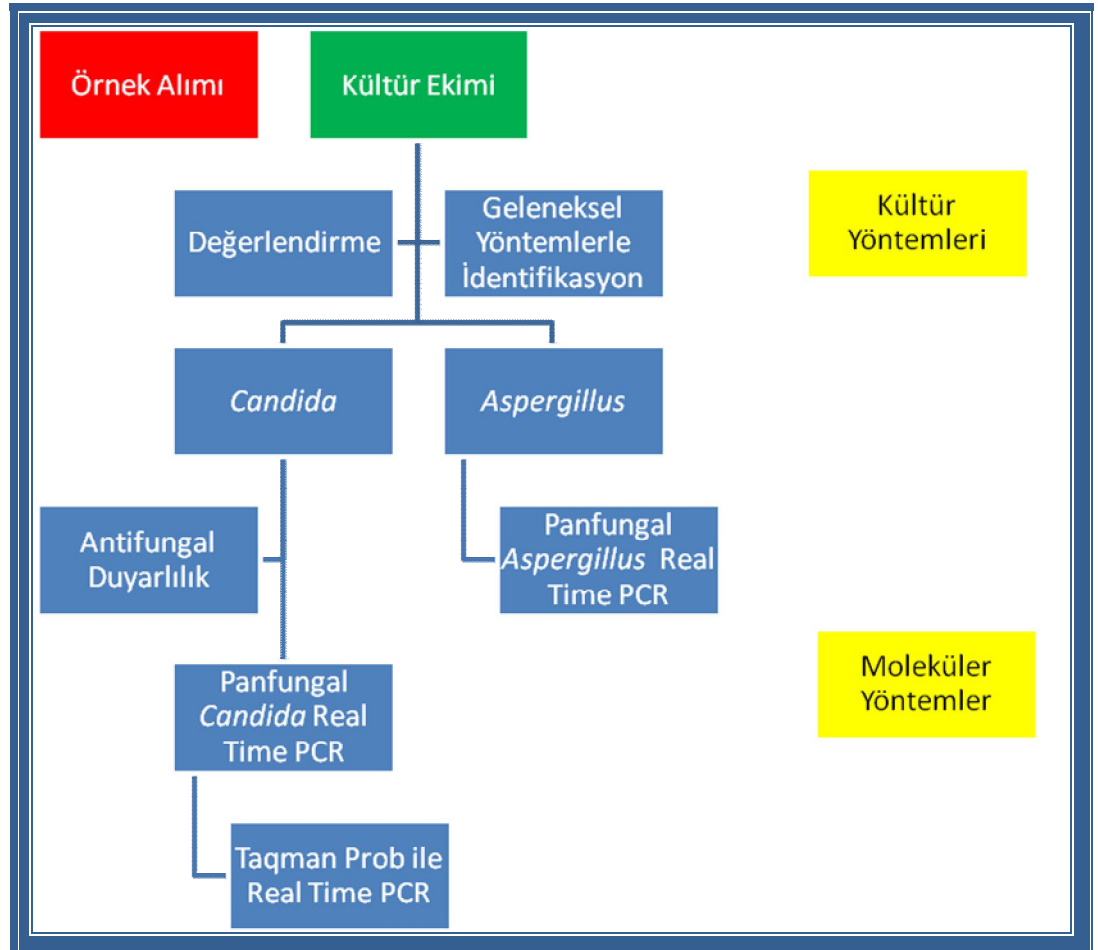
CİNSİYET	MİKTAR
KADIN	49
ERKEK	90
<b>TOPLAM</b>	<b>139</b>



**Grafik III.1:** Hastaların cinsiyet dağılımlarının yüzde oranları

## III.2. TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Tez çalışmasında öncelikle örneklerin kültür ekimleri yapıldı. Kültürde üretilen örnekler daha sonra fenotipik yöntemlerle teşhis edildi. Saf kolonilerden DNA izolasyonları yapıldı ve PCR için gerekli materyaller hazırlanmış oldu. Daha sonra bu örnekler panfungal PCR testleri uygulandı. Bu yöntem Sybr Green boyası içeren kitlerle gerçekleştirildi. *Candida* suşlarının ayrıca Taqman probları ile moleküler düzeyde tiplendirmeleri yapıldı. Son olarak yine *Candida* suşlarının mikrodilüsyon yönteminin bir modifikasyonu olan kolorimetrik temelli bir kit (Sensititre) ile antifungal duyarlılıkları saptandı. Şekil III.1.'de tez akış şeması görülmektedir.

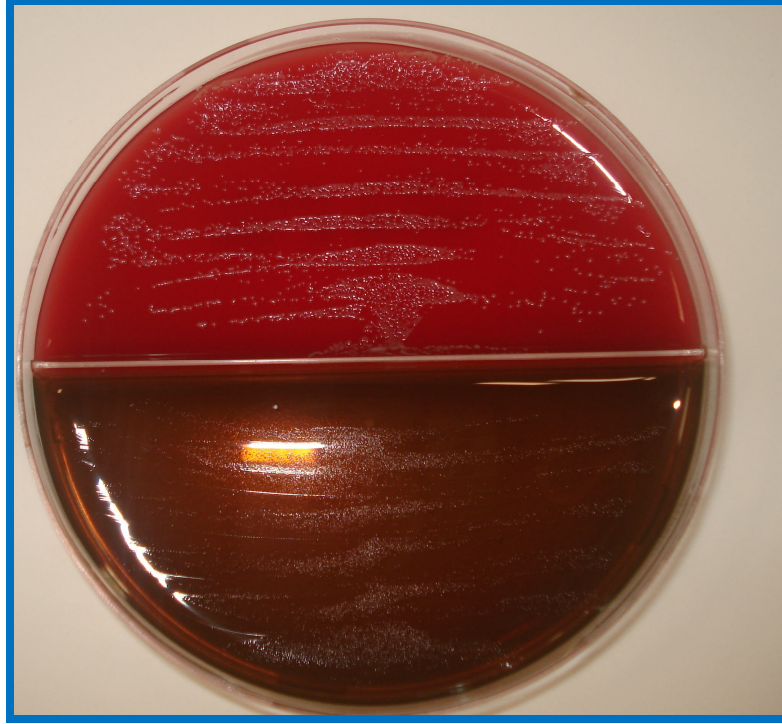


Şekil III.1: Tez akış şeması

### III.2.1. KÜLTÜR YÖNTEMİ

Bu yöntem istenen mikroorganizmanın uygun besiyerinde üretilmesi esasına dayanır. Üremenin sağlanabilmesi için üretilmek istenen mikroorganizmanın uygun koşullarda inkübe edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada antibiyotikli (Anti-SDA, Salubris) ve antibiyotiksiz sabouraud dekstroz agar (SDA, Merck) kullanılmıştır. İdrar örneklerinin ekimleri sayım plağı şeklinde (Şekil III.2.); diğer örneklerin ise ekimleri tek koloni ekim yöntemi (Şekil III.3.) ile yapılmış ve ekimi yapılan Petri kapları uygun koşullarda inkübe edilmiştir (Tablo III.6). Optimum inkübasyon şartları *Candida* için 37 °C, *Aspergillus* suşları için 22-26 °C'dir [26].



Şekil III.2: Ekim yöntemi: Sayım plağı



Şekil III.3: Ekim yöntemi: Tek koloni

Tablo III.6: Mantar kültürü ekim, inkübasyon süreleri ve sıcaklıkları

Materyal	Besiyerleri			Süre	Yöntem
	SDA	SDA	Anti-SDA		
İdrar	37 °C	26 °C	37 °C	1 hafta	Sayım plağı
Balgam	37 °C	26 °C	37 °C	10 gün	Tek koloni
BAL, DTA	37 °C	26 °C	37 °C	10 gün	Tek koloni
Boğaz, ağız sürüntüleri	37 °C	26 °C	37 °C	1 hafta	Tek koloni
Steril vücut sıvıları	37 °C	26 °C	37 °C	2 hafta	Tek koloni
Doku	37 °C	26 °C	37 °C	3 hafta	Tek koloni
Yara (yüzeysel)	37 °C	26 °C	37 °C	10 gün	Tek koloni
Yara (Derin), Abse	37 °C	26 °C	37 °C	2 hafta	Tek koloni
Kornea, kulak gibi kazıntı örnekleri	37 °C	26 °C	37 °C	2 hafta	Tek koloni

### III.2.1.1. Kültür Yönteminde Kullanılan Yardımcı Testler

İnkübasyon sonunda üreyen koloniler değerlendirilmiş ve maya şüpheli olan koloniler Gram boyama yöntemi ile doğrulanmıştır.

**Gram boyama yöntemi:** Bu yöntem ilk kez Hans Christian Joachim Gram tarafından uygulanmış ve bakterilerin Gram olumlu (pozitif) ve Gram olumsuzluk (negatif) boyanma özelliği olduğunu göstermiştir. Gram pozitiflik özelliği mikroorganizmaların hücre çeper yapısına bağlı bir özelliktir. Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakası gram negatiflere göre daha kalındır, ayrıca Gram negatiflerde bulunmayan teikoik asit bulunur. Bu yöntem aşağıdaki şekilde uygulanmaktadır:

- Bir damla serum fizyolojik üzerine koloniden bir miktar konur, preparat kurutulur ve alevde tespit edilir.
- Preparat üzerine kristal viyole dökülür ve 1 dakika bekletilir.
- Preparat üzerindeki boya dökülür ve su ile yıkanır. Preparat üzerine lügol solüsyonu ilave edilir ve 1 dakika bekletilir.
- Preparat üzerindeki boya dökülür ve su ile yıkanır. Preparat üzerine aseton-alkol dökülür. Üzerinden boya akıncaya kadar beklenir (10-15 sn).
- Preparat su ile yıkanır.
- Preparat sulu fuksin boyası ile 1 dakika boyanır.
- Preparat su ile yıkanır, kurutulur ve mikroskopta incelenir.

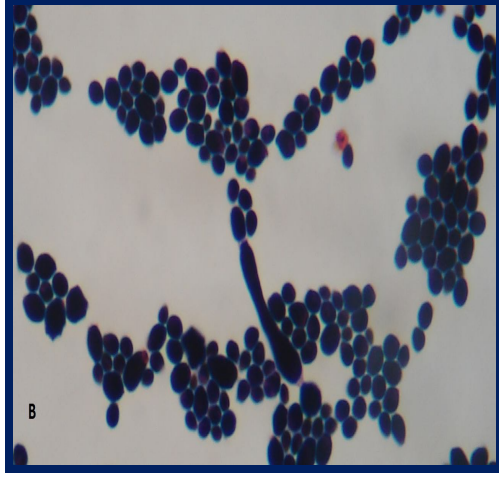
Gram pozitif mikroorganizmalar mor, Gram negatifler ise pembe-kırmızı renkte boyanır [26].

Gram boyama yönteminde mayalar, Gram pozitif özellik gösterirler. Mayalar tomurcuklanmış şekilde görülmektedir. Zaman zaman da yalancı hifler görülebilmektedir (Şekil III.4. ve 5.) [26].

Gram boyama ile maya olduğu anlaşıldığı zaman germ tüp testi yapılır. Son yıllara kadar germ tüp pozitif örnekler, *C. albicans* olarak isimlendirilmekteydi. Ancak *C. albicans*'a genotipik olarak çok yakın, germ tüp pozitif olan *C. dubliniensis* türü tanımlandıktan sonra bu yaklaşım yavaş yavaş ortadan kalkmaya başlamıştır.



**Şekil III.4:** Balgam örneğinin Gram preparatında maya hücrelerinin görünümü

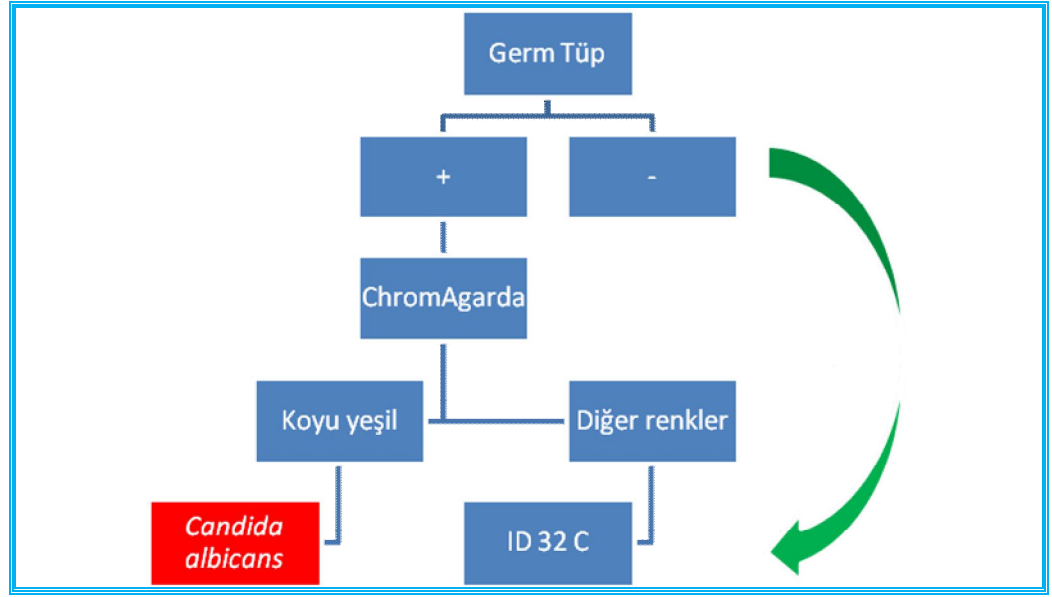


**Şekil III.5:** Koloniden hazırlanan Gram preparatında maya hücrelerinin görünümü

**Germ tüp testi:** Bu testte hücrelerden germ tüpü oluşumu aranır. Aşağıdaki şekilde yapılır:

- Maya kolonisinden bir öze kadar alınır, 0.5-1.0 ml steril serum içinde bir suspansiyon yapılır ve vortekslenir.
- Süspansiyon 37°C'de 2 saat inkübe edilir.
- Karışımdan bir damla lama konur ve üzeri lamelle kapatılır.

• Mikroskop altında maya hücrelerinin germ tüp oluşturup oluşturmadıkları araştırılır. Germ tüp oluşturan mayalar, germ tüp pozitif; germ tüp oluşturmayanlar ise germ tüp negatif olarak isimlendirilirler. Germ tüp pozitif olanlar *C. albicans* iken, germ tüp negatif olanlar ise Non-*albicans Candida* olarak isimlendirilirler ve çeşitli yöntemlerle tiplendirilirler (Şekil III.6.) [25].



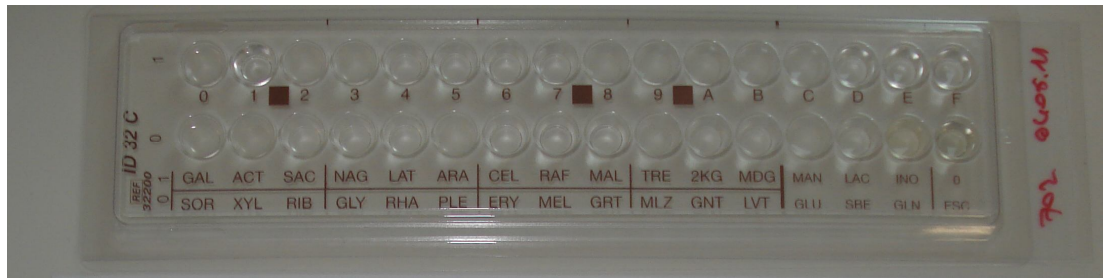
Şekil III.6: Rutin yöntemlerde *Candida* türlerinin teşhisinde izlenen yol

**ChromAgar *Candida* (Salubris) besiyeri,** *C. albicans* ile *albicans* dışı *Candida* türlerinin saptanmasında kullanılmaktadır. Bu besiyerinde *C. albicans* koyu yeşil renkte koloniler oluştururken, diğer *Candida* türleri değişik renklerde koloniler oluşturmaktadırlar. Bilindiği gibi *C. dubliniensis* türlerinin de germ tüp testi pozitifdir ve rutinde sıklıkla *C. albicans* ile karıştırılmaktadır. *C. dubliniensis* türleri bu besiyerinde açık yeşil veya beyaz renkte koloniler oluşturmaktadır. Besiyerinin bu özelliği pratik olarak tür ayırımına yardımcı olmaktadır [92].

**45°C’de üreme testi:** Bu test *C. albicans* suşlarının teşhislerinin doğrulanması için yapılmaktadır. Çünkü *C. albicans* türlerinin çoğu hem 37°C’de hem de 45°C’de ürerler. Bu yöntem için germ tüp pozitif olan ve *C. albicans* tanısı konmuş suşlar iki

ayrı petriye pasaj alınır, bir tanesi 37°C’de, diğeri ise 45°C’de 48 saat inkübe edilir. Her iki Petride de üreme olanlar *C. albicans* olarak tanımlanır [92].

**API ID 32 C testi:** Biomerieux (Fransa) tarafından üretilen bu test, germ tüp testi negatif olan suşlara ve ChromAgar *Candida* besiyerinde *C. albicans* görüntüsü vermeyen suşlara uygulanmıştır. Bu kit ile bir çok maya türü teşhis edilmektedir. Bu kit 32 adet asimilasyon testlerinin ve bir veritabanının kullanılarak mayalar için standart bir identifikasyon sistemidir. API ID 32 C stribi, 32 kuyucuk ve bu kuyucukların herbirinde dehidrate karbonhidrat substratı içermektedir (Şekil III.7.)



**Şekil III.7:** API ID 32 C stribinin görünümü

**Hazırlanışı:** Tiplendirilecek maya kolonisinden, tek koloni yöntemi ile pasaj alınır ve saf kültür elde edilir. Bu test için mutlaka taze kültür kullanılmalıdır. Bir veya birkaç tane koloni alınarak API suspension medium (2 ml) içinde karıştırılır ve 2 McF olacak şekilde hazırlanır. Bu karışımdan 250 µl API C medium’a aktarılır. Bu süspansiyon hazırlandıktan hemen sonra kullanılmalıdır. API ID 32 C stribinin her bir küpülüne 135 µl API C medium içeriğinden eklenir ve striplerinin kurumasını önlemek için nemli bir ortamda 29 °C’de ( $\pm 2$ ) 24-48 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda MiniApi (Biomerieux) cihazında değerlendirilir.

Bu testin kalite kontrolü için standart maya suşları kullanılmıştır. Tez süresince her ay bu suşlar ile API ID 32 C kiti kontrol edilmiştir [93].

### III.2.2. ANTİFUNGAL DUYARLILIK TESTLERİ

*Candida* suşlarının antifungal duyarlılık testleri için CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute, eski adıyla NCCLS-National Committee for Clinical Laboratory Standarts, ABD) tarafından da onaylı iki tane metod bulunmaktadır. Bunlar makro

ve mikrodilüsyon testlerdir. Bu referans yöntemlerin modifikasyonları ile oluşturulmuş bazı yöntemler, klinik laboratuvarların bu konuda gereksinimlerini karşılamak üzere geliştirmiştir. Çalışmamızda bu yeni standart modifikasyonlardan biri olan kolorimetrik yöntemi kullanarak, çalışmamızda izole edilen *Candida* türlerinin antifungal duyarlılıklarının saptanması hedeflenmiştir. Bu amaçla MİK’i saptamada kolorimetrik indikatör olarak alamar mavisi kullanan, standart ticari “Sensititre YeastOne” kiti kullanılmıştır.

Sensititre antifungal duyarlılık sistemi, bir kolorimetrik mikrodilüsyon testi olup; *Candida* ve *Cryptococcus* türlerinin antifungal duyarlılık testlerinin tayini için kullanılmaktadır. Kalitatif ve kantitatif Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MIC) kurutulmuş bir plak formatında (Şekil III.8.) tayin edildiği yöntemdir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	POS	AND 0.015	AND 0.03	AND 0.06	AND 0.12	AND 0.25	AND 0.5	AND 1	AND 2	AND 4	AND 8	AB 0.12
B	MF 0.008	MF 0.015	MF 0.03	MF 0.06	MF 0.12	MF 0.25	MF 0.5	MF 1	MF 2	MF 4	MF 8	AB 0.25
C	CAS 0.008	CAS 0.015	CAS 0.03	CAS 0.06	CAS 0.12	CAS 0.25	CAS 0.5	CAS 1	CAS 2	CAS 4	CAS 8	AB 0.5
D	FC 0.06	FC 0.12	FC 0.25	FC 0.5	FC 1	FC 2	FC 4	FC 8	FC 16	FC 32	FC 64	AB 1
E	PZ 0.008	PZ 0.015	PZ 0.03	PZ 0.06	PZ 0.12	PZ 0.25	PZ 0.5	PZ 1	PZ 2	PZ 4	PZ 8	AB 2
F	VOR 0.008	VOR 0.015	VOR 0.03	VOR 0.06	VOR 0.12	VOR 0.25	VOR 0.5	VOR 1	VOR 2	VOR 4	VOR 8	AB 4
G	IZ 0.015	IZ 0.03	IZ 0.06	IZ 0.12	IZ 0.25	IZ 0.5	IZ 1	IZ 2	IZ 4	IZ 8	IZ 16	AB 8
H	FZ 0.12	FZ 0.25	FZ 0.5	FZ 1	FZ 2	FZ 4	FZ 8	FZ 16	FZ 32	FZ 64	FZ 128	FZ 256

**Şekil III.8:** Sensititre plağındaki antifungallerin dağılımı [94].

(POS: Pozitif Kontrol, MF: Micafungin, CAS: Caspofungin, FC: 5-Flucytosine, VOR: Voriconazole, IZ: Itraconazole, FZ: Fluconazole, AND: Anidulafungin, AB: Amphotericin B)

**Hazırlanışı:** Testin doğru çalışması için saf kültürden çalışılmalıdır. Maya türleri için 24 saatlik kültür kullanılır.

- *Candida* kolonileri steril su içersine, 0.5 McFarland olacak şekilde eklenir.
- Süspansiyondan 20µ YeastONE Broth içine aktarılır ve karıştırılır. Son konsantrasyonun  $1.5 - 8 \times 10^3$  CFU/ml olması önerilir. Bu ilk iki aşamanın 15 dakika içerisinde tamamlanması gerekir.

- YeastONE Broth süspansiyonundan 100µl YeastONE plağına dağıtılır. Bu işlem de 15 dakika içinde tamamlanmalıdır.
- Kontrol için; YeastONE Broth süspansiyonundan 10µl Sabouraud Dekstroz Agara ekim yapılır. Doğru yapılan ekimlerde 15-80 koloni üremesi beklenir. Eğer üreme gerçekleşmemişse test tekrarlanmalıdır.
- YeastONE plağının üzeri koruyucu bantla kapatılır ve 35°C de *Candida* türleri için; 24-25 saat, *Cryptococcus* türleri için 72 saat inkübe edilir.

**Testin Değerlendirilmesi:** Kırmızı renk, üreme olduğunu (dirençli); mavi renk ise üreme olmadığını (duyarlı) gösterir. Spektrofotometrede ölçüm yapılmaz. Sadece renk değişimi göz ile değerlendirilir.

Öncelikle kontrol kuyucuğunda üreme olup olmadığına bakılır. Eğer üreme olmuşsa (kırmızı) değerlendirilir, üreme olmamışsa (mavi ya da zayıf mor) ya test tekrarlanır ya da 24 saatlik ek inkübasyona bırakılır. *Candida* türleri için 24 saat inkübasyon yeterli olmadığı takdirde 24 saat daha inkübe edildikten sonra daha iyi sonuç elde edilir. Oluşan renk yoğunluğunun salt okunur olmasına dikkat edilmelidir. Plaktaki pozitif kontrol kuyucuğu ile testin renk yoğunlukları dengeli olmalıdır. Plakta üreme olmadığında mavi renk oluşur ve antifungal duyarlılığının göstergesidir (Şekil III.9.). Üreme olduğu sırada renk yoğunluğu iyi takip edilmeli inkübasyon süresine dikkat edilmelidir. Antifungallerin duyarlı veya dirençli olarak değerlendirmeleri için CLSI tarafından belirlenen MIK değerleri esas alınmıştır (Tablo III.7). Bu şekilde tez çalışmasında izole edilen *Candida* türlerinin antifungal duyarlılık testleri yapılmıştır [2, 94].



**Şekil III.9:** Sensititre plağında pozitif ve negatif kuyucukların görünüşü

**Tablo III.7.** *Candida* türleri için CLSI M27'e göre yorumlayıcı MIK değerleri [94].

<b>Antifungal Adı</b>	<b>Duyarlı</b>	<b>Orta Duyarlı</b>	<b>Dirençli</b>
Amfoterisin B	$\leq 1$		$\geq 1$
Kaspofungin	$\leq 2$		$> 2$
Flukonazol	$\leq 8$		$\geq 64$
5-Flusitosin	$\leq 4$	8 - 16	$\geq 32$
Itrakonazol	$\leq 0.125$		$\geq 1$
Vorikonazol	$\leq 1$	2	$> 4$

### **III.2.3. MOLEKÜLER YÖNTEMLER**

#### **III.2.3.1. NÜKLEİK ASİT İZOLASYON YÖNTEMLERİ**

Çalışmamızda örneklerden DNA izolasyonları, MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I ile MagNA Pure Compact (Roche, Almanya) cihazında yapılmıştır. Bunun için öncelikle saf kültürden bir koloni alındı ve steril bir eppendorf içinde, 500 µl litikaz lizisiz buffer (50 mM Tris (pH: 7.6), 1mM EDTA (pH: 8.0), %2'lik 2-merkaptotanol, 10 U litikaz (Sigma)) ile süspanse edildi ve 37 °C'de 1 saat bekletildi. Daha sonra eppendorftaki sıvının üst kısmından 500 µl alındı ve otomatik DNA izolasyon cihazında, elüsyon hacmi 100 µl olacak şekilde izole edildi [8, 67, 72].

#### **III.2.3.2. NÜKLEİK ASİT ÇOĞALTMA YÖNTEMLERİ**

Nükleik asit çoğaltma ve tesbit yöntemleri genel olarak iki grupta incelenmektedir.

- 1- Nükleik asit prob hibridizasyon yöntemleri
- 2- Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri (NAA).

Nükleik asit prob hibridizasyon yöntemleri, moleküler yöntemlerin en eski ve en basit olanıdır. Örnekteki hedef nükleik asit dizisi, komplementeri olan işaretli bir prob ile hibritlenmekte ve tanı konmaktadır. DNA'nın kendini eşlemesi esasına dayanır. Kültür yöntemi ile üretilmeyen ya da identifikasyonu zor olan mikroorganizmaların genomlarının tespit edilerek, teşhis edilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Gerekli ön işlemlerin fazla olması ve kullanım alanının kısıtlı olması nedeniyle çok fazla kullanılmayan bir yöntemdir.

Nükleik asit amplifikasyon yöntemleri ise son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden en önemlileri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dur. Bu yöntem de DNA'nın kendini eşlemesi esasına dayanır. Hedef bölgeye uygun baz dizileri kullanılarak istenen DNA parçasının çoğaltılması amaçlanır. Gıdadan sağlığa kadar bir çok alanda kullanılmaktadır. Özellikle tıbbi araştırmalarda kullanılmaktadır [95].

## **POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)**

PCR, hedef DNA/RNA'nın selektif olarak amplifikasyonuna olanak verir.

Bunlar:

- Hedef diziyi taşıyan kalıp DNA
- Kalıp DNA ile eşleşebilen 2 tür oligonükleotid primeri
- Dört tür dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- MgCl<sub>2</sub>

PCR üç aşamalı bir yöntemdir. Bunlar; denatürasyon, bağlanma (annealing) ve uzama (extension) olup, birbirini izlerler.

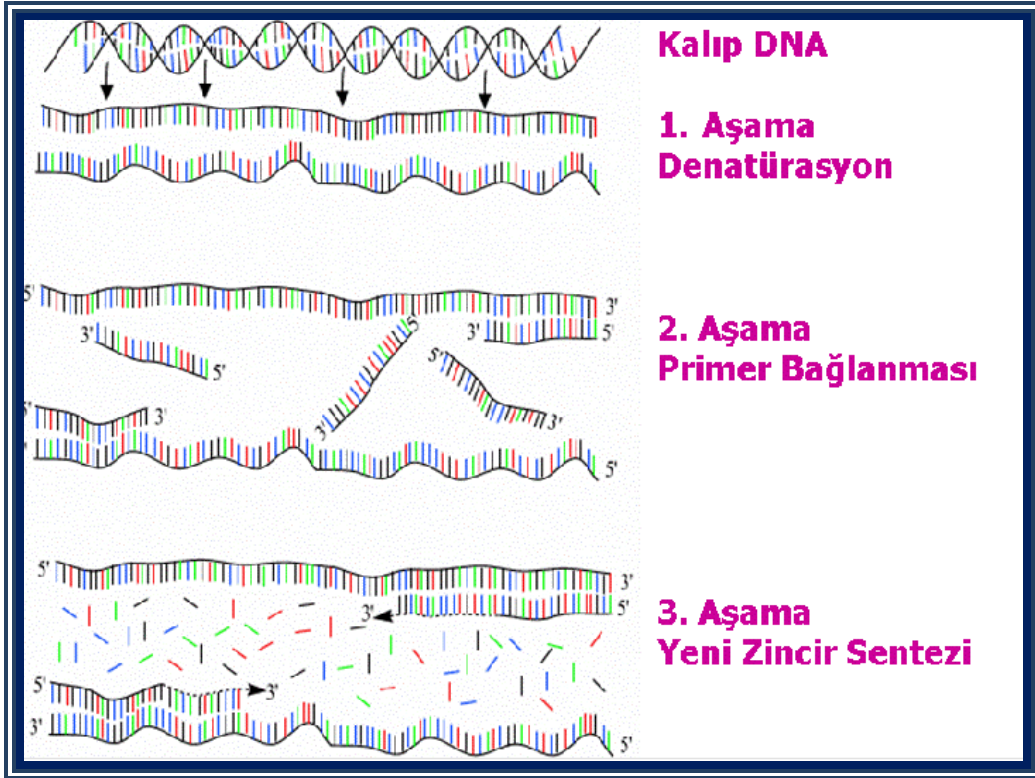
**Denatürasyon**, çift iplikli DNA'nın birkaç saniye 94-96°C'de ısı ile tek zincirli DNA şekline dönüşmesidir.

**Bağlanma**, örneğin 30-60 °C'de tutularak, primerin hedef bölgeye bağlanmasıdır.

**Uzama** ise polimeraz enzimi yardımıyla tek zincirli DNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5'→3' yönünde uzatılmasıdır. Uzama genellikle 65-72 °C'de gerçekleşmektedir.

Bu üç aşama PCR'da bir siklusu oluşturur (Şekil III.10.) ve bir PCR'da ortalama 30-45 siklus arasında olmaktadır. PCR, ısı döngülerini sağlayan ve thermal cycler adı

verilen cihazlarda gerçekleşir. Bu cihazlar, PCR örneğini programlanan ısı derecelerinde ve istenen sürelerde tutmaya yararlar.



**Şekil III.10:** Polimeraz zincir reaksiyonunda şematik olarak bir siklusun aşamaları [95].

## POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ÇEŞİTLERİ

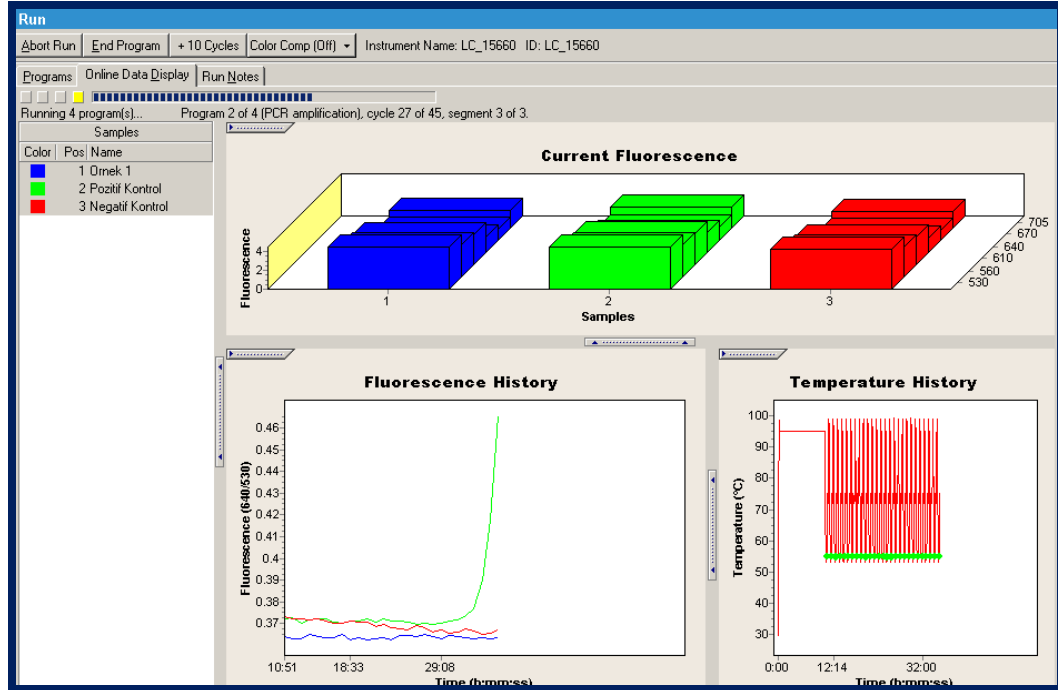
- 1- İvers (Tersine Dönmüş) PCR
- 2- Homopolimerli PCR
- 3- İn situ PCR
- 4- Hot start PCR
- 5- Multipleks PCR
- 6- Kantitatif PCR
- 7- Nested, seminested PCR
- 8- RT (Revers transcriptase) PCR
- 9- Touch down PCR
- 10- Consensus PCR
- 11- Real time PCR

Bu PCR çeşitlerinden amaca en uygun olanı seçilmelidir. Çalışmamızda son yıllarda kullanımı sıklıkla artan real time PCR yöntemi kullanılmıştır [94].

## REAL TIME PCR

PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngülerini sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, real time PCR olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Real time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır.

Real time PCR, reaksiyon esnasında her bir PCR siklusunda yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışıp, reaksiyonu aşama aşama izleyen, işlemin sonuna kadar oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir. Yani sonuçların çalışma anında, eş zamanlı olarak görülebildiği sistemlerdir (Şekil III.11.).



Şekil III.11: Çalışma esnasında görüntülenen real time PCR görüntüsü

Real time PCR sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnekle son derece düşük kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir. 25 bç'den 10.000 bç'ne kadar olan spesifik DNA dizileri bu yöntemle amplifiye edilebilir. Çok hızlı olmasının yanı sıra duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir. Özellikle Taqman problemleri gibi diziyeye özgül olan problemler kullanıldığında duyarlılık ve özgüllük de artmaktadır.

Real time PCR'da çeşitli prob sistemleri ve boyalar kullanılmaktadır. Bunlar:

#### **Özgül floresan işaretli boyalar**

- FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
- Taqman prob
- Scorpion primerleri
- Hibridizasyon problemleri

#### **Özgül olmayan floresan işaretli problemler**

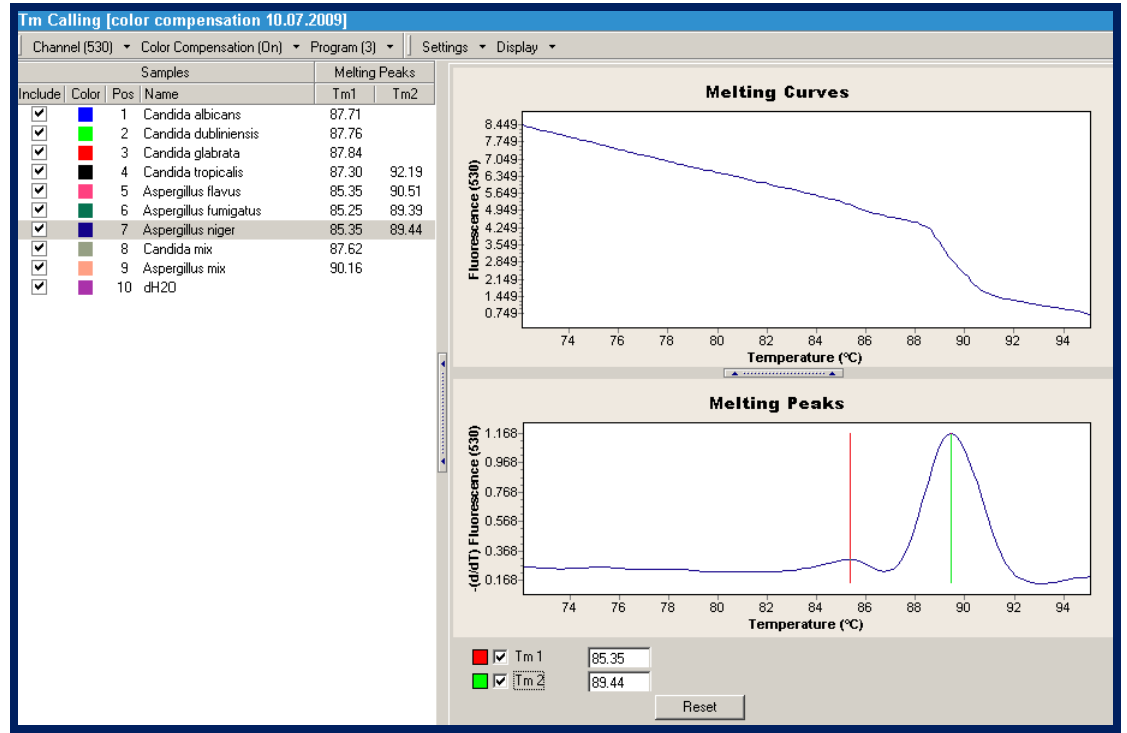
- Sybr Green
- Etidyum Bromür

Çalışmamızda PCR testleri iki aşamada uygulanmıştır. Birinci aşamada Sybr green boyaları kullanılarak cins düzeyinde *Candida* ve *Aspergillus* varlığını saptamak amacıyla panfungal PCR testleri çalışıldı. İkinci aşamada ise dört farklı *Candida* türünün (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*) tiplendirilmesi için türe özgül Taqman problemleri kullanılmıştır [95, 96].

#### **PANFUNGAL *CANDIDA* ve *ASPERGILLUS* PCR**

Sybr green yalnızca çift zincire bağlandığı zaman floresans verir. Amplifikasyona bağlı DNA artışı ortaya çıkan floresans miktarı ile ölçülür. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleşen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan green miktarı artar. Buna bağlı olarak da yayılan floresansın miktarında artış gözlenir. Floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal DNA'ya entegre olan Sybr green, ortamda hedef moleküller olmadığı zamanlarda primerlerin kendi aralarında

gerçekleşecek bağlanmalar (primer dimerleri) sonucunda yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilir. Bu olumsuz durumu önlemek için amplifikasyon ürünlerinin melting curve (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her çift sarmal kendine özgü melting temperature (erime sıcaklığı)  $T_m$  değerine sahiptir.  $T_m$ , çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklıktır (Şekil III.12).

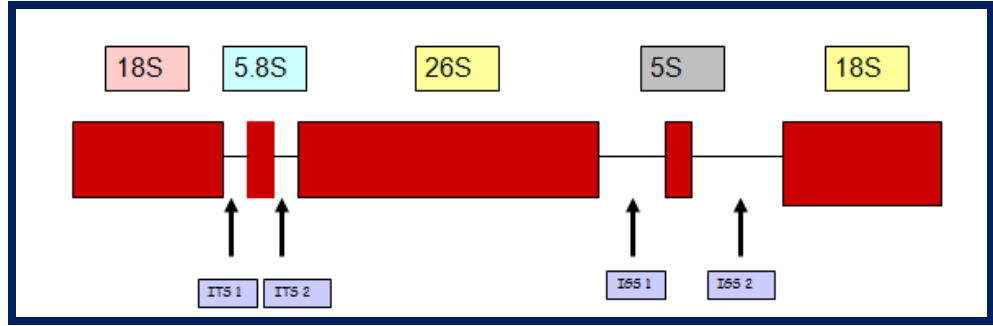


Şekil III.12: Melting curve (erime eğrisi) analiz örneği

Panfungal PCR'da kullanılmak üzere *Candida* ve *Aspergillus*'un ITS (internal transcribed spacer) 2 bölge sekanslarından dizayn edilen primerler kullanıldı (Tablo III.8). ITS rRNA (Şekil III.13) üzerinde bir bölge olup, mutasyona uğramaması nedeniyle fungal tiplendirmelerde sıklıkla kullanılmaktadır [95, 96].

Tablo III.8: Panfungal PCR için kullanılan primer dizileri

<i>Candida</i> -specific primers	Primer Dizisi
<i>Cand-F</i>	CCTGTTTGAGCGTCRRTT
<i>ITS-R</i>	TCCTCCGCTTATTGATAT
<i>Aspergillus</i> -specific primers	Primer Dizisi
<i>Asp-F</i>	CTGTCCGAGCGTCATTG
<i>ITS-R</i>	TCCTCCGCTTATTGATAT



**Şekil III.13:** Fungal PCR’da kullanılan rRNA bölgeleri [95].

ITS bölgelerinden dizayn edilen primerler gen bankasında kontrol edildi (GenBank: AY382338). PCR sonrası erime eğrisi analizi sayesinde cins düzeyinde tanımlamalar yapıldı [8, 96]. Panfungal PCR çalışmalarında LC FastStart DNA Master Sybr Green I kiti ve Light cycler 2.0 (Roche, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Tablo III.9 ve 10.’da PCR karışımları ve şartları bulunmaktadır.

**Tablo III.9:** Panfungal PCR Karışımı

Bileşen	Miktar
Su	11.6 µl
MgCl <sub>2</sub>	1.4 µl
Forward Primer (Asp-F, Cand-F)	1.0 µl
Revers Primer (ITS-R)	1.0 µl
Fast Start Master Mix	2.0 µl
DNA	3.0 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20.0 µl</b>

**Tablo III.10: Panfungal PCR Şartları**

Analiz Modu	Segment	Döngü	Sıcaklık (°C)	Hold Time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition Mode
<b>İnitial denaturation</b>						
None	1	1	95	00:10:00	20	None
<b>Amplifikasyon</b>						
Amplifikasyon	Denaturation	45	95	00:00:08	20	None
	Annealing		45* -49**	00:00:10	20	None
	Extension		72	00:00:10	20	Single
<b>Melting Curve</b>						
Melting Curve	1	1	95	00:00:30	20	None
		2	35	00:01:00	20	Continuous
		3	98	00:00:01	0,2	None
<b>Cooling Step</b>						
None	1	1	40	00:00:30	20	None

\*: *Candida* PCR için annealing sıcaklığı; \*\*: *Aspergillus* PCR için annealing sıcaklığı

### TAQMAN PCR ile *CANDIDA* TÜRLERİNİN SAPTANMASI

Taqman sisteminde 5' ve 3' uçları florokrom maddelerle işaretli prob lar kullanılır. Probun 5' ucunda raportör florokrom FAM (6-carboxyfluorescein), 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rodamine) bulunur. Hidroliz prob da denilen Taqman prob lar, tek sarmak hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanırlar. Prob ile hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' ucundaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik aside bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması, primerin bağlandığı noktaya geldiğinde sentezin devam edebilmesi için taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak; probu 5' ucundan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen amplikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de değişir [95, 96].

Çalışmamızın amaçlarından biri de klinik örneklerden en fazla üretilen *Candida* türlerinin (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*) Taqman problemleri yardımıyla identifikasyonuydu. Bu amaçla türe özgü problemler dizayn edildi (Tablo III.11) ve Light Cycler TaqMan Master kiti yardımıyla Taqman problemleri kullanılarak türlerin tanısı yapıldı (Tablo III.12 ve 13).

**Tablo III.11:** *Candida* türlerinin identifikasyonunda kullanılan Taqman problemleri

Tür Adı	Tagman Prob Dizisi
<i>Candida albicans</i>	FAM-CATTGCTTGCGGCGGTA-TAMRA (0.2 M)
<i>Candida tropicalis</i>	FAM-GGCCACCACAATTTATTTCA-TAMRA (0.2 M)
<i>Candida parapsilosis</i>	FAM-GAAAGGCGGAGTATAAAC-TAMRA (0.2 M)
<i>Candida glabrata</i>	FAM-GTTTTACCAACTCGGTGTTGAT-TAMRA (0.2 M)

**Tablo III.12:** Taqman PCR Karışımı

Bileşen	Miktar
Su	8.9 µl
Forward Primer (Cand-F)	1.0 µl
Revers Primer (ITS-R)	1.0 µl
Taqman Master Mix	4.0 µl
Probe	0.1 µl
DNA	5.0 µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20.0 µl</b>

**Tablo III.13:** Taqman PCR Şartları

Analiz Modu	Segment	Döngü	Sıcaklık (°C)	Hold Time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition Mode
<b>İnitial denaturation</b>						
None	1	1	95	00:10:00	20	None
<b>Amplifikasyon</b>						
Quantification	Denaturation	45	95	00:00:10	20	None
	Annealing		41-50-53	00:00:20	20	None
	Extension		72	00:00:01	20	Single
<b>Cooling Step</b>						
None	1	1	40	00:00:30	20	None

## BÖLÜM IV

### SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Çalışmamızda kültür yöntemi ile yapılan identifikasyon sonuçları, real time PCR yöntemi sonuçları ile karşılaştırıldı ve uyumlu sonuçlar elde edildi. Ayrıca *Candida* türlerinin antifungal duyarlılık testleri yapılarak mevcut suşlardaki direnç durumu saptandı.

#### VI.1. KÜLTÜR SONUÇLARI

Kültür yöntemi bir çok etken için en geçerli yöntemdir. Özellikle antifungal duyarlılık deneyleri için etken olan mikroorganizmanın üretilmesi gerektiği için kültür yöntemi kullanılmalıdır. Ancak materyal cinsine ve üremesi muhtemel olan etkenin tipine uygun olan yöntemlerin seçilmesi gereklidir [72].

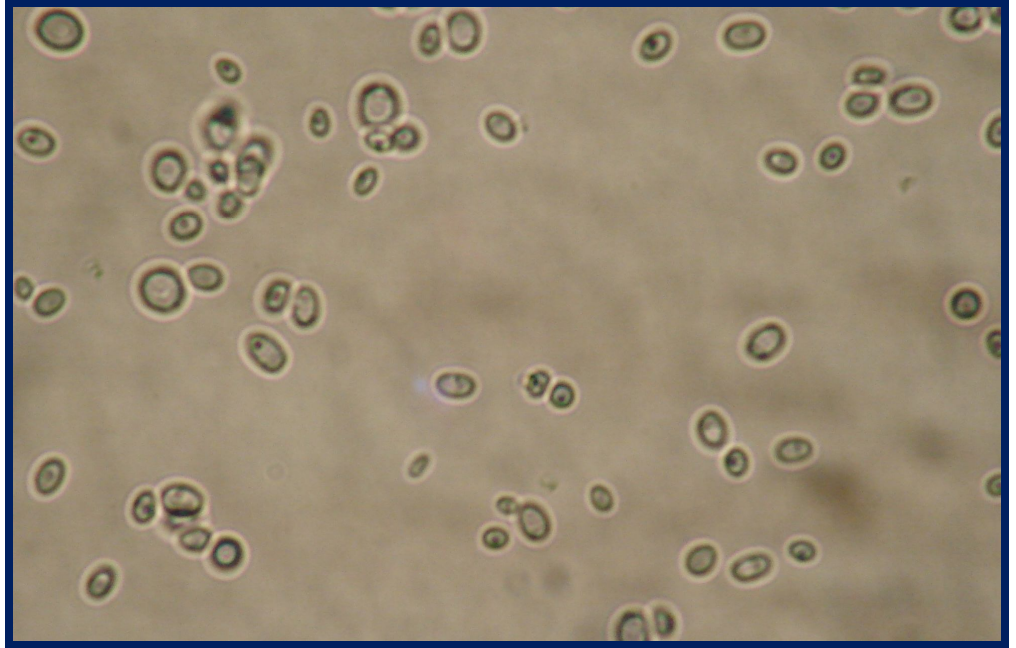
Çalışmamızda kültür testleri bölüm III'de açıklandığı gibi çalışılmıştır. Öncelikle üreyen maya kolonilerinin Gram boyama yöntemi ile kontrolleri yapıldı. Maya olduğu kesinleşen kolonilere germ tüp testi uygulandı.

Germ tüp testinin değerlendirilmesi için yapılan deney sonucunda mikroskop altında hücrelerden germ tüpünün meydana gelip gelmediği araştırıldı. Germ tüp oluşturan mayalar, germ tüp pozitif (Şekil IV.1); germ tüp oluşturmayanlar ise germ tüp negatif (Şekil IV.1) olarak isimlendirilirler [54, 55].

Rutin uygulamalarda germ tüp testi pozitif olan *Candida* suşları, *C. albicans* olarak değerlendirilmekteydi. Çünkü bu suşların %90'ından fazlasının germ tüp testinin pozitif oldukları bilinmektedir. Ancak, *C. albicans* dışı bazı suşların da germ tüp testi pozitif olduğu için, günümüzde ek testlerin ya da otomatize sistemlerle identifikasyon yapılması gerekliliği vurgulanmaktadır [30].



**Şekil IV.1:** Germ tüp testi pozitif bir örneğin mikroskopik görünümü



**Şekil IV.2:** Germ tüp testi negatif bir örneğin mikroskopik görünümü

Çalışmamızda yapılan germ tüp testi sonunda 110 suştan 58 tanesi pozitif; 52 tanesi de negatif bulunmuştur (Tablo IV.1).

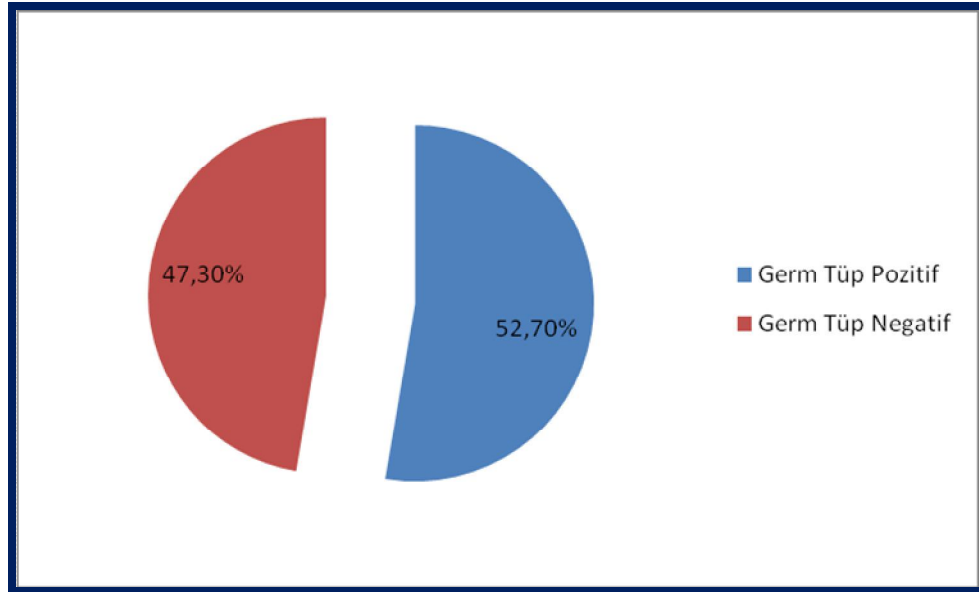
**Tablo IV.1:** Germ tüp testi sonuçları

<b>ÖRNEK NO</b>	<b>SONUÇ</b>	<b>ÖRNEK NO</b>	<b>SONUÇ</b>
1	NEGATİF	56	NEGATİF
2	NEGATİF	57	NEGATİF
3	NEGATİF	58	POZİTİF
4	POZİTİF	59	POZİTİF
5	POZİTİF	60	POZİTİF
6	NEGATİF	61	POZİTİF
7	NEGATİF	62	POZİTİF
8	NEGATİF	63	NEGATİF
9	POZİTİF	64	NEGATİF
10	NEGATİF	65	NEGATİF
11	POZİTİF	66	NEGATİF
12	NEGATİF	67	POZİTİF
13	NEGATİF	68	NEGATİF
14	POZİTİF	69	NEGATİF
15	POZİTİF	70	POZİTİF
16	NEGATİF	71	NEGATİF
17	NEGATİF	72	NEGATİF
18	NEGATİF	73	POZİTİF
19	POZİTİF	74	POZİTİF
20	POZİTİF	75	POZİTİF
21	POZİTİF	76	NEGATİF
22	POZİTİF	77	NEGATİF
23	POZİTİF	78	NEGATİF
24	POZİTİF	79	NEGATİF
25	POZİTİF	80	NEGATİF
26	POZİTİF	81	POZİTİF
27	POZİTİF	82	POZİTİF
28	POZİTİF	83	NEGATİF
29	POZİTİF	84	POZİTİF
30	NEGATİF	85	NEGATİF
31	NEGATİF	86	NEGATİF
32	POZİTİF	87	POZİTİF
33	POZİTİF	88	POZİTİF
34	POZİTİF	89	POZİTİF
35	NEGATİF	90	NEGATİF
36	POZİTİF	91	POZİTİF
37	NEGATİF	92	POZİTİF
38	POZİTİF	93	POZİTİF
39	NEGATİF	94	POZİTİF

**Tablo IV.1:** Devam

ÖRNEK NO	SONUÇ	ÖRNEK NO	SONUÇ
40	NEGATİF	95	POZİTİF
41	NEGATİF	96	POZİTİF
42	NEGATİF	97	NEGATİF
43	POZİTİF	98	POZİTİF
44	POZİTİF	99	NEGATİF
45	POZİTİF	100	NEGATİF
46	POZİTİF	101	NEGATİF
47	NEGATİF	102	NEGATİF
48	POZİTİF	103	POZİTİF
49	POZİTİF	104	POZİTİF
50	NEGATİF	105	NEGATİF
51	NEGATİF	106	POZİTİF
52	NEGATİF	107	POZİTİF
53	NEGATİF	108	POZİTİF
54	NEGATİF	109	POZİTİF
55	NEGATİF	110	POZİTİF

Elde edilen germ tüp testi sonuçlarına göre suşların %52,7'si germ tüp pozitifken, % 47,3'ü de negatiftir (Grafik IV.1).



**Grafik IV.1:** Germ tüp testi sonuçlarının % dağılım oranları

Germ tüp testi pozitif olan örneklerin kesin olarak *C. albicans* olup-olmadıklarını anlamak için 45 °C'de üreme deneyleri yapıldı. 45 °C'de üreyen

suşlar *C. albicans* olarak değerlendirilirken, üreme olmayan suşların germ tüp testleri tekrarlandı. Yine pozitif suşların API ID 32 C kiti ile tiplendirme testleri gerçekleştirildi. 58 germ tüp pozitif olan suşlardan sadece bir tanesi (59 no'lu örnek) 45 °C'de üreme göstermedi ve bu durum, bu suşun *C. dubliniensis* olabileceğini düşündürmektedir. Geriye kalan 57 suş ise 45°C'de üreme gösterdikleri için *C. albicans* olarak tanımlandı (Tablo IV.2). *C. dubliniensis*, *C. albicans*'a çok yakın tür olduğu için rutin uygulamalarda sıklıkla *C. albicans* olarak tiplendirilmektedir. Çalışmamızda bir tane bile olsa sadece germ tüp testi ile tanı konulmayacağı tespit edilmiştir. Bu durum benzer çalışmalarda da doğrulanmıştır [54, 97].

**Tablo IV.2:** 45 °C'de üreme deneyi sonuçları

Örnek No	37°C'de üreme	45 °C'de üreme
4	+	+
5	+	+
9	+	+
11	+	+
14	+	+
15	+	+
19	+	+
20	+	+
21	+	+
22	+	+
23	+	+
24	+	+
25	+	+
26	+	+
27	+	+
28	+	+
29	+	+
32	+	+
33	+	+
34	+	+
36	+	+
38	+	+
43	+	+
44	+	+
45	+	+

**Tablo IV.2:** Devam

<b>Örnek No</b>	<b>37°C'de üreme</b>	<b>45 °C'de üreme</b>
46	+	+
48	+	+
49	+	+
58	+	+
<b>59</b>	+	-
60	+	+
61	+	+
62	+	+
67	+	+
70	+	+
73	+	+
74	+	+
75	+	+
81	+	+
82	+	+
84	+	+
87	+	+
88	+	+
89	+	+
91	+	+
92	+	+
93	+	+
94	+	+
95	+	+
96	+	+
98	+	+
103	+	+
104	+	+
106	+	+
107	+	+
108	+	+
109	+	+
110	+	+

Günümüzde bazı ayırıcı besiyerleri de *Candida* türlerinin ayrılmasında yardımcı olmaktadır. Bunlardan en sık kullanılanı ChromAgar *Candida* (Salubris) besiyeridir. ChromAgar *Candida* besiyerinde, *C. albicans* suşları koyu yeşil üreme gösterirken; *C. dubliniensis* açık yeşil veya beyaz, diğer *Candida* türleri ise değişik renklerde olmaktadır. Çalışmamızda izole edilen tüm *Candida* suşları bu besiyerine pasaj alınarak oluşturdukları koloni renkleri gözlenmiştir [55]. Tüm *C. albicans* suşları koyu yeşil renkte koloniler oluşturmuşlardır. Bunun yanında 45°C üreme deneyinde üremeyen *C. dubliniensis* suşu, bu besiyerinde açık yeşil renkte koloni oluşturmuş ve *C. albicans* olmadığı bir kez daha doğrulanmıştır. Bunların dışında kalan suşlar da değişik renklerde koloniler oluşturmuşlardır. *Albicans* dışı *Candida* suşlarının ChromAgar *Candida* besiyerinde oluşturdukları renklerle ilgili kesin veriler olmamakla birlikte *C. krusei* türlerinin bu besiyerinde kadife pembesi renginde; *C. tropicalis* türlerinin ise metalik mavisi renginde koloniler oluşturduğu çeşitli yayınlarda belirtilmiştir (Şekil IV.3-6) [98, 99].



**Şekil IV.3:** Chromagar *Candida* besiyerinde *C. albicans* (ATCC 90028)'ın oluşturduğu koloni



Şekil IV.4: Chromagar *Candida* besiyerinde *C. tropicalis* (KUEN 1025)'in oluşturduğu koloni

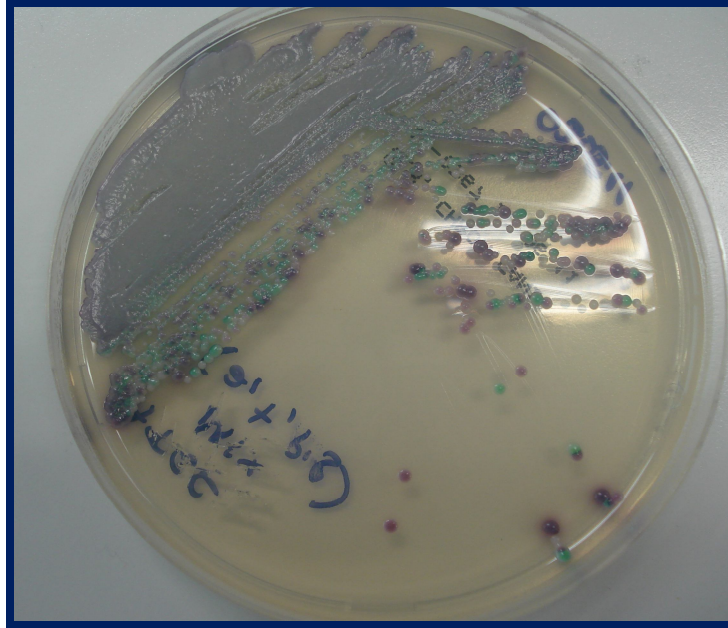


Şekil IV.5: Chromagar *Candida* besiyerinde *C. glabrata* (KUEN 1573)'nin oluşturduğu koloni



Şekil IV.6: Chromagar *Candida* besiyerinde *C. parapsilosis* (ATCC 22019)'in oluşturduğu koloni

ChromAgar *Candida* besiyeri genellikle *C. albicans* ayırımında kullanılsa da karışık üreyen suşların ayrılarak saf kültürlerinin elde edilmesinde de sıklıkla kullanılmaktadır ve rutin kullanımlarda pratiklik sağlamaktadır. Çünkü genel olarak kullanılan besiyerlerinde koloniler aynı renkte ve sıklıkla aynı görüntüde olduğu için koloniler birbirinden ayıramamaktadır. Oysa bu besiyeri ile ayrılması zor olan koloniler kolaylıkla birbirinden ayrılabilir (Şekil IV.7) [82].



Şekil IV.7: Chromagar *Candida* besiyerinde karışık kolonilerin görünümü

Germ tüp testi pozitif olan, ChromAgar *Candida* besiyerinde koyu yeşil koloniler oluşturan ve 45  C’de üreme gösteren *Candida* suşları *C. albicans* olarak tanımlandı. Bu suşların listesi Tablo IV.3.’te görülmektedir.

**Tablo IV.3:**  alıŐmada izole edilen *C. albicans* suşlarının listesi

<b>�rnek No</b>	<b>Materyal</b>	<b>Mikroorganizma Adı</b>
4	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
5	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
9	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
11	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
14	İDRAR	<i>Candida albicans</i>
15	İDRAR SONDASI	<i>Candida albicans</i>
19	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
20	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
21	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
22	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
23	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
24	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
25	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
26	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
27	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
28	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
29	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
32	İDRAR	<i>Candida albicans</i>
33	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
34	KATETER	<i>Candida albicans</i>
36	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
38	İDRAR	<i>Candida albicans</i>
43	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
44	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
45	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
46	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
48	İDRAR	<i>Candida albicans</i>
49	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
58	ABSE	<i>Candida albicans</i>
60	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
61	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
62	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
67	AĞIZ S�R�NT�S�	<i>Candida albicans</i>

**Tablo IV.3:** Devam

<b>Örnek No</b>	<b>Materyal</b>	<b>Mikroorganizma Adı</b>
70	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
73	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
74	BATIN İÇİ MAYI	<i>Candida albicans</i>
75	İDRAR	<i>Candida albicans</i>
81	İDRAR	<i>Candida albicans</i>
82	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
84	AĞIZ SÜRÜNTÜSÜ	<i>Candida albicans</i>
87	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
88	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
89	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
91	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
92	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
93	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
94	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
95	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
96	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
98	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida albicans</i>
103	İDRAR	<i>Candida albicans</i>
104	İDRAR	<i>Candida albicans</i>
106	İDRAR	<i>Candida albicans</i>
107	BALGAM	<i>Candida albicans</i>
108	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida albicans</i>
109	ABSE	<i>Candida albicans</i>
110	İDRAR	<i>Candida albicans</i>

İzmir’de yapılan bir çalışmada (2004) rutin labotuvarda sadece germ tüp testi pozitifliği ile *C. albicans* olarak tanımlanmış 195 suş için 45 °C’de üreme deneyleri yapılmış ve bu suşların 167 tanesinde üreme olmadığı, dolayısıyla *C. dubliniensis* olabileceği belirtilmiştir. Ancak moleküler testlerle desteklenmesi gerekliliği bildirilmiştir [16].

Germ tüp, 45°C’de üreme testleri ile ChromAgar *Candida* besiyerinde renklenme durumlarına göre tanımladığımız 58 suştan 57 tanesi *C. albicans* olarak saptanmış, sadece bir tanesi *C. dubliniensis* olabileceği düşünülmüştür. İstanbul’da (2009) yapılan bir çalışmada, yine sadece germ tüp testi pozitifliği ile *C. albicans* olarak tanımlanmış 300 örnekten sadece iki tanesinin *C. dubliniensis* olduğu, bir identifikasyon kiti olan API ID 32 C (Biomerieux) ile belirlenmiştir. Bu sonuçlar PCR ile de desteklenmiştir [15].

Bahsi geçen yöntemlerle tanımlanamayan suşlar, API ID 32 C (Biomerieux) kiti ile tiplendirilmişlerdir (Tablo IV.4). Bu kit duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olduğu için mayaların identifikasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmamızda da 59 numaralı örnek bu kit ile *C. dubliniensis* olarak saptanmış ve bu durum germ tüp, 45 °C’de üreme testleri ile ChromAgar *Candida* besiyerlerindeki renk değişiklikleri ile *Candida* suşlarını genel olarak ayırmada; hatta *C. albicans*’ın tür tayininde kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

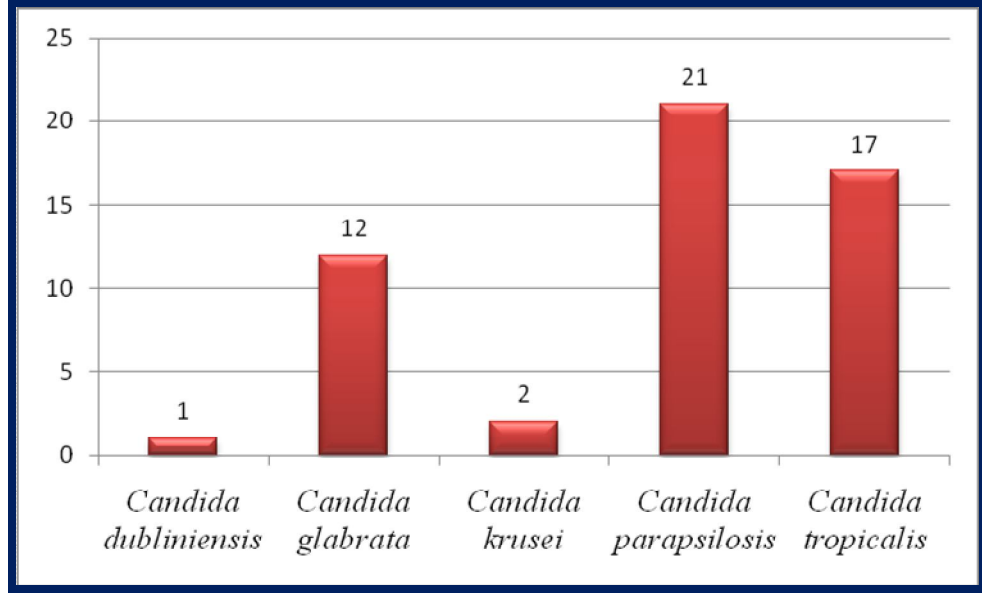
**Tablo IV.4:** API ID 32 C (Biomerieux) ile yapılan identifikasyon sonuçları

Örnek No	Materyal	Mikroorganizma Adı
1	İDRAR	<i>Candida parapsilosis</i>
2	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida parapsilosis</i>
3	ABSE	<i>Candida parapsilosis</i>
6	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida glabrata</i>
7	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida glabrata</i>
8	KATETER	<i>Candida glabrata</i>
10	BALGAM	<i>Candida tropicalis</i>
12	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida glabrata</i>
13	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida glabrata</i>
16	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
17	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
18	İDRAR	<i>Candida glabrata</i>
30	İDRAR	<i>Candida tropicalis</i>
31	İDRAR	<i>Candida glabrata</i>
35	BALGAM	<i>Candida glabrata</i>
37	İDRAR	<i>Candida glabrata</i>
39	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
40	ABSE	<i>Candida tropicalis</i>
41	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
42	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
47	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
50	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
51	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
52	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
53	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
54	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
55	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>

**Tablo IV.4:** Devam

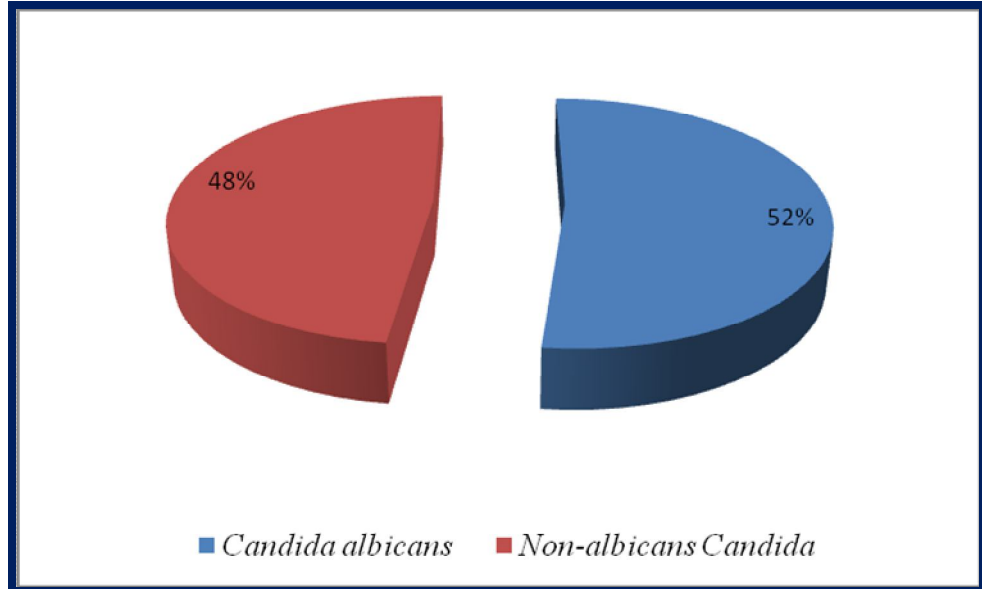
<b>Örnek No</b>	<b>Materyal</b>	<b>Mikroorganizma Adı</b>
56	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
57	ABSE	<i>Candida glabrata</i>
59	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida dubliniensis</i>
63	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
64	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
65	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
66	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida parapsilosis</i>
68	İDRAR	<i>Candida tropicalis</i>
69	İDRAR	<i>Candida tropicalis</i>
71	BALGAM	<i>Candida tropicalis</i>
72	BALGAM	<i>Candida tropicalis</i>
76	BALGAM	<i>Candida tropicalis</i>
77	İDRAR	<i>Candida tropicalis</i>
78	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida tropicalis</i>
79	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida parapsilosis</i>
80	İDRAR	<i>Candida tropicalis</i>
83	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida tropicalis</i>
85	ABSE	<i>Candida glabrata</i>
86	ABSE	<i>Candida tropicalis</i>
90	BALGAM	<i>Candida krusei</i>
97	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida glabrata</i>
99	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Candida krusei</i>
100	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida tropicalis</i>
101	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida tropicalis</i>
102	KAN KÜLTÜRÜ	<i>Candida tropicalis</i>
105	BALGAM	<i>Candida tropicalis</i>

API ID 32 C kiti ile yapılan tiplendirme sonucunda çalışılan 53 *Candida* suşundan 1 tanesi, *C. dubliniensis*; 12 tanesi, *C. glabrata*; 2 tanesi, *C. krusei*; 21 tanesi, *C. parapsilosis* ve 17 tanesi de *C. tropicalis* olarak belirlenmiştir (Grafik IV.2).



**Grafik IV.2:** API ID 32 C (Biomerieux) kiti ile yapılan identifikasyonun türlere göre dağılım grafiği

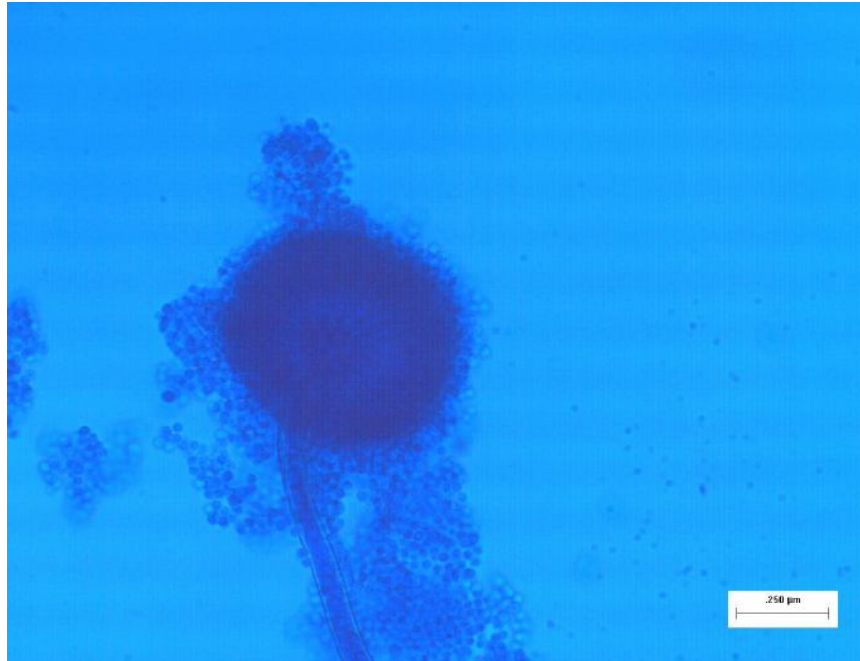
Bu sonuçlara göre toplam 110 tane *Candida* suşu izole edilmiştir. İzole edilen *Candida* suşlarının 57 tanesi (%52) *C. albicans* olarak tiplendirilirken; 53 tanesi (%48) de Non-*albicans Candida* olarak belirlenmiştir (Grafik IV.3).



**Grafik IV.3:** Tanımlanan *Candida* suşlarının *C. albicans* ve Non-*albicans Candida* yüzde oranları grafiği

API ID 32 C sistemi maya suşlarının identifikasyonunda kullanılan standart bir yöntemdir. Yüksek duyarlılık ve özgüllüğü bir çok çalışmada doğrulanmıştır [100]. Kullanımda olan bir çok identifikasyon sistemleri bulunmaktadır. Ancak API ID 32 C sistemi bu sistemler arasında optimize edilmiş en iyi yöntemlerdendir [101]. Çalışmamızda da kullanıma uygunluğu, standardize olması ve cihaz bazlı değerlendirme özelliği olduğundan dolayı kullanılmıştır. Özellikle gözle değerlendirilmediği için sonuçları güvenilirdir. Çünkü gözle değerlendirme yapılan sistemlerde, kişiden kişiye değişiklik olabileceği için hatalı sonuçlar elde edilebilmektedir.

Mikromantarların mikroskobik yapılarının incelenmesi için pikrik asitle boyanmış laktofenol çözeltisi ve pamuk mavili laktofenol çözeltisi kullanıldı. Pamuk mavili laktofenol çözeltisi cins teşişlerinin yapılmasında; pikrik asitle boyanmış laktofenol çözeltisi ise tür tayinlerinin yapılmasında kullanıldı [21]. Bu çözeltilerden lam üzerine bir damla damlatıldı ve ortam içine steril öze ile alınan mikromantarların fruktifikasyon organları, miselleri aktarıldı, üzeri lamelle kapatıldı ve mikroskopta incelendi (Şekil IV.8). *Aspergillus* türlerinin teşişinde “The Genus *Aspergillus*” (Raper ve Fennell, 1965) adlı eserden yararlanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo IV.5’te görülmektedir.



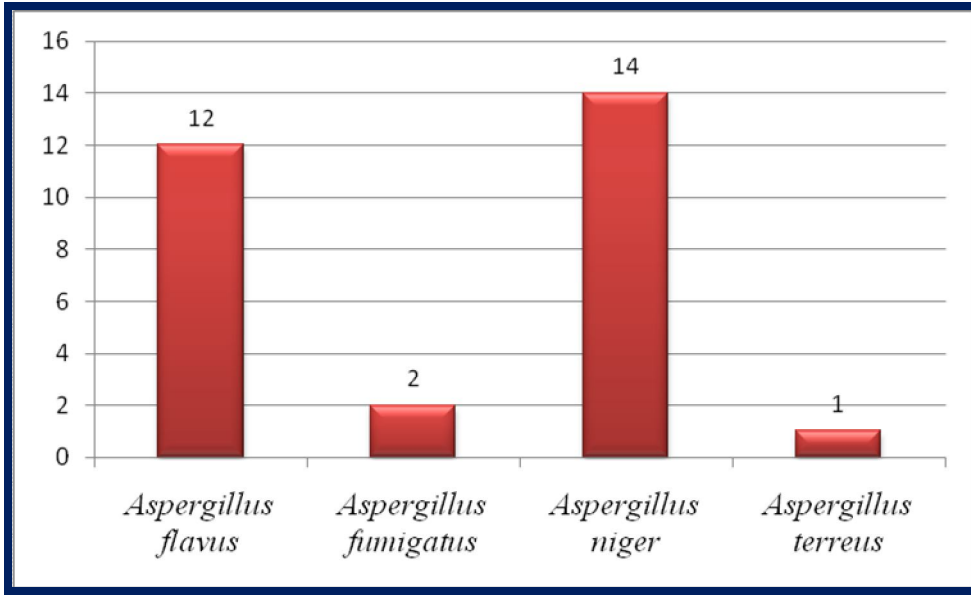
**Şekil IV.8:** Pamuk mavili laktofenol çözeltisi ile boyanmış *A. niger*'in mikroskobik görünümü.

**Tablo IV.5:** Teşhis edilen *Aspergillus* türlerinin listesi

Örnek No	Materyal	Mikroorganizma Adı
1	BALGAM	<i>Aspergillus flavus</i>
2	ABSE (KALP KAPAKÇIĞI)	<i>Aspergillus flavus</i>
3	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Aspergillus flavus</i>
4	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Aspergillus flavus</i>
5	KULAK AKINTISI	<i>Aspergillus niger</i>
6	KULAK AKINTISI	<i>Aspergillus niger</i>
7	KULAK SÜRÜNTÜSÜ	<i>Aspergillus niger</i>
8	KULAK SÜRÜNTÜSÜ	<i>Aspergillus niger</i>
9	BALGAM	<i>Aspergillus niger</i>
10	BAL	<i>Aspergillus terreus</i>
11	BALGAM	<i>Aspergillus fumigatus</i>
12	BALGAM	<i>Aspergillus flavus</i>
13	BALGAM	<i>Aspergillus niger</i>
14	BALGAM	<i>Aspergillus niger</i>
15	BALGAM	<i>Aspergillus flavus</i>
16	BALGAM	<i>Aspergillus niger</i>
17	BALGAM	<i>Aspergillus flavus</i>
18	ABSE (KALP KAPAKÇIĞI)	<i>Aspergillus flavus</i>
19	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Aspergillus flavus</i>
20	TRAKEAL ASPİRAT	<i>Aspergillus flavus</i>
21	KULAK SÜRÜNTÜSÜ	<i>Aspergillus niger</i>
22	KULAK SÜRÜNTÜSÜ	<i>Aspergillus niger</i>
23	KULAK SÜRÜNTÜSÜ	<i>Aspergillus niger</i>
24	KULAK AKINTISI	<i>Aspergillus niger</i>
25	BALGAM	<i>Aspergillus niger</i>
26	BALGAM	<i>Aspergillus fumigatus</i>
27	BALGAM	<i>Aspergillus flavus</i>
28	BALGAM	<i>Aspergillus flavus</i>
29	BALGAM	<i>Aspergillus niger</i>

Çalışmamızda toplam 29 tane *Aspergillus* türü izole edilmiştir. Bunların 12 tanesi *Aspergillus flavus*; 2 tanesi *Aspergillus fumigatus*; 14 tanesi *Aspergillus niger* ve 1 tanesi de *Aspergillus terreus* olarak tanımlanmıştır (Grafik IV.4). Yurt içinde ve dışında yapılan bir çok çalışmada, klinik örneklerden sıklıkla *Aspergillus fumigatus*'un izole edildiği bildirilmektedir. Bunu *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* ve *Aspergillus terreus* takip etmektedir [34]. Ancak pulmoner aspergillozis olgularında en çok *Aspergillus flavus*'un izole edildiği de bilinmektedir [4].

Çalışmamızda da alt solunum yolu örneklerinden sıklıkla *Aspergillus flavus* izole edilmiştir.

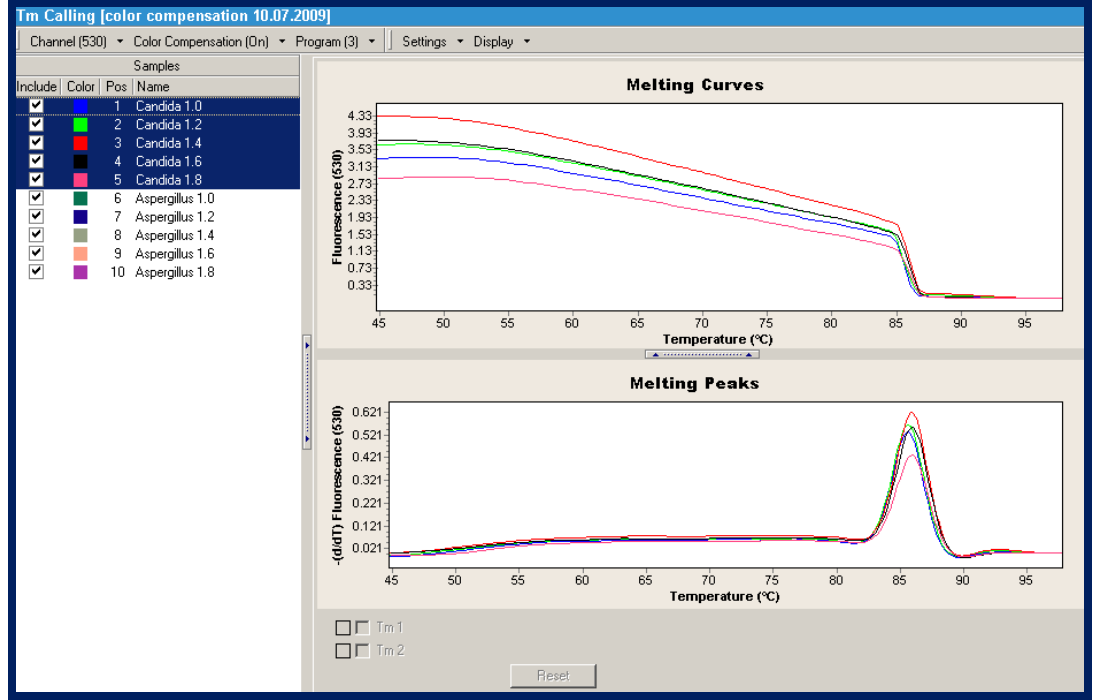


**Grafik IV.4:** Tanımlanan *Aspergillus* türlerinin dağılımı

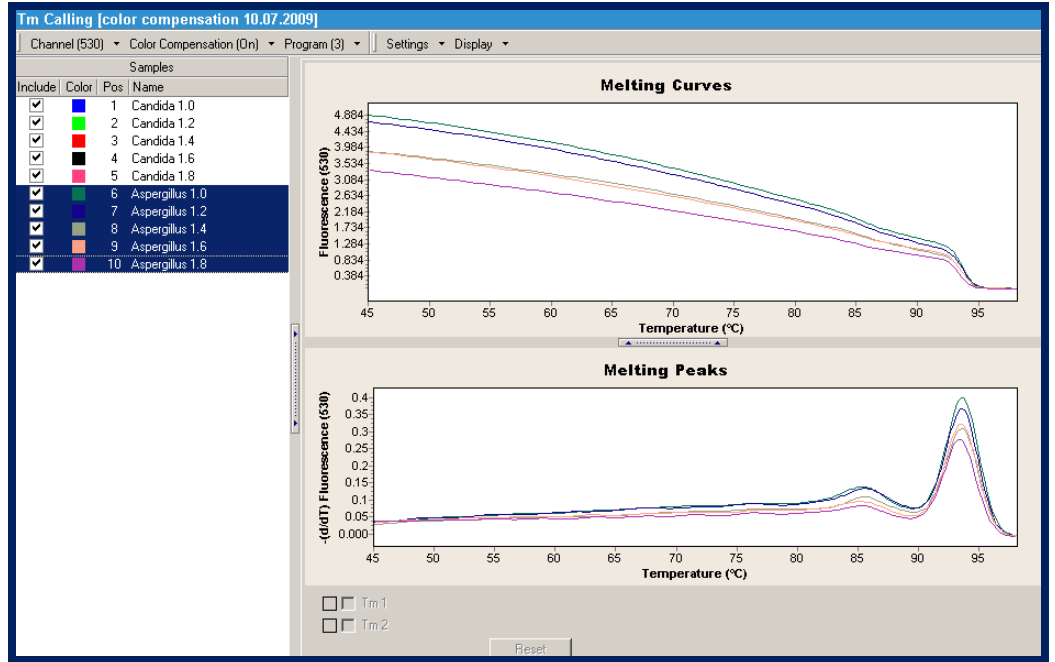
Kulak içinden alınan sürüntü veya abse örneklerinden genellikle *A. niger* üretilmektedir. *A. niger* doğada çok fazla bulunmaktadır. Ancak patojenitesi diğer *Aspergillus* türlerine göre daha azdır ve daha az enfeksiyon etkeni olarak saptanmaktadır. Kültürlerde genellikle kontaminat olarak kabul edilirler. Ancak bağışıklık sistemi baskılanmış hastalardan izole edilmektedir [102-104]. *A. terreus* ise diğer türlere göre daha az sayıda enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır [105-106]. Çalışmamızda bir adet izole edilmiştir.

## VI.2. PANFUNGAL PCR SONUÇLARI

Çalışmamızda *Candida* ve *Aspergillus* cinslerine ait türlerin ortak bölgelerinden (ITS) dizayn edilen primerler sayesinde panfungal PCR testleri ile cins düzeyinde tanımlama yapılmıştır. Öncelikle PCR şartları belirlenmiş, annealing sıcaklığı ve  $Mg^{+2}$  konsantasyonu için deneme çalışmaları yapılmıştır (Şekil IV.9 ve 10).



Şekil IV.9: Panfungal *Candida* PCR optimizasyon çalışması PCR görüntüsü



Şekil IV.10: Panfungal *Aspergillus* PCR optimizasyon çalışması PCR görüntüsü

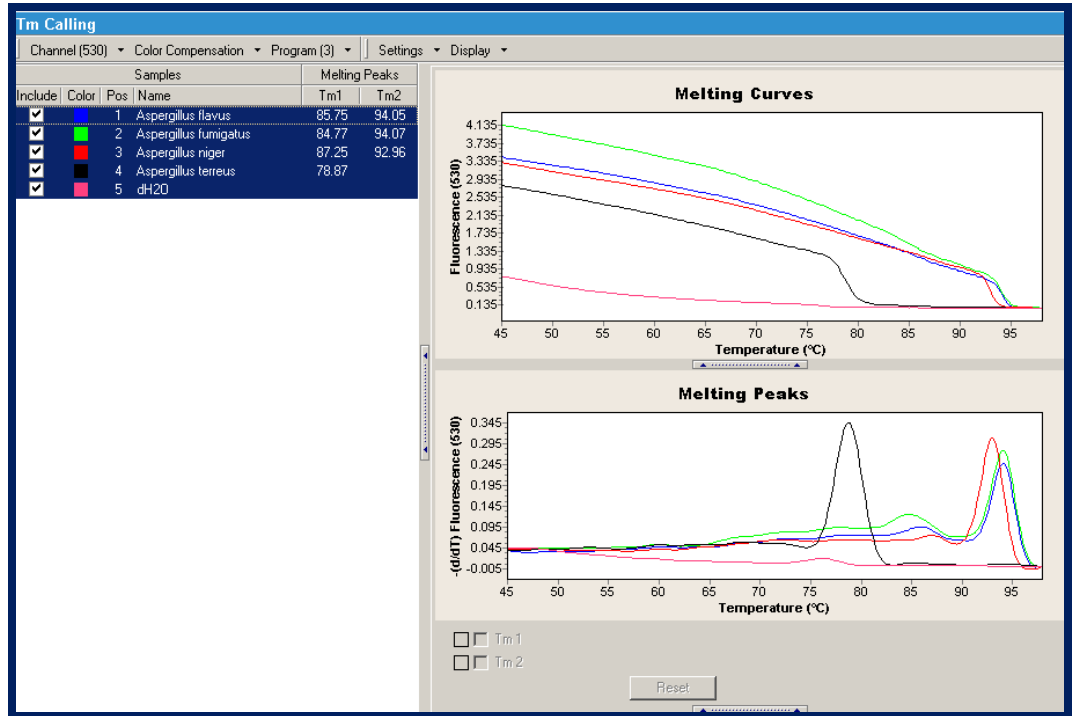
Optimizasyon tamamlandıktan sonra uygun standart suşlar (Tablo IV.6) ile deneme çalışmaları yapılmıştır. *A. terreus* için yurt dışından temin edilen ve

doğrulaması yapılan dış kalite kontrol örneği (Accutest, İngiltere)'nden izole edilen suş kullanılmıştır.

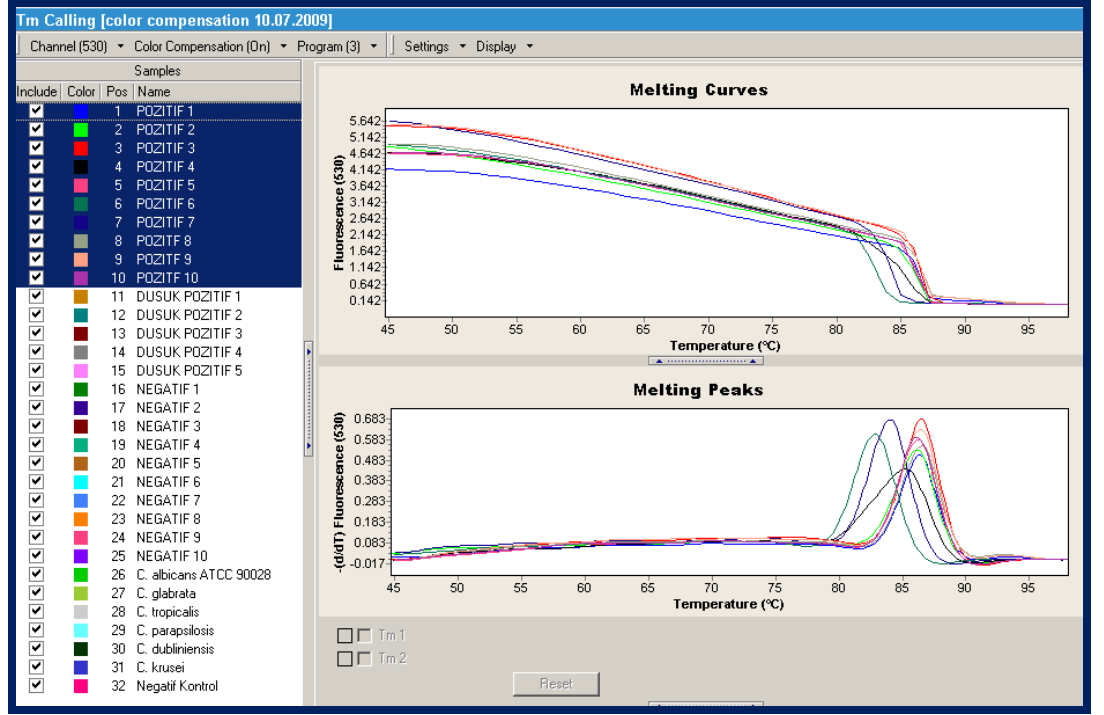
**Tablo IV.6:** Tez çalışmasında kullanılan standart suşların listesi

Standart Suş Adı	Standart Adı ve Numarası
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019
<i>Candida glabrata</i>	KUEN 1573
<i>Candida tropicalis</i>	KUEN 1025
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258
<i>Candida dubliniensis</i>	CBS 7987
<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC 9807
<i>Aspergillus fumigatus</i>	NRRL 163
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 10549

Şekil IV.11 ve 12'de kontrol suşları ile yapılan çalışmaların PCR grafikleri görülmektedir.



**Şekil IV.11.** Kontrol suşları ile çalışılan panfungal *Aspergillus* PCR görüntüsü



Şekil IV.12: Kontrol suşları ile çalışılan panfungal *Candida* PCR görüntüsü

Dizayn edilen primerlerin Rabenau ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada belirtildiği gibi validasyonları yapıldı. Bunun için morfolojik yöntemlerle tanımlanmış *Candida* ve *Aspergillus* suşları kullanılmıştır. Validasyon için bilinmesi gereken bazı terimler:

**Validasyon:** Bir ölçüm metodunun ilgili alanda kullanımının yeterli doğrulukta olup olmadığını ve karar vermede kullanılıp kullanılmayacağını kontrolünün yapılmasıdır.

**Kesinlik (Precision):** Analizin kesinliğini saptamak için deney içi (intraassay) ve deneyler arası (interassay) olmak üzere iki şekilde yapılır.

**Doğruluk (Accuracy):** Analitik metod ile kontrol örneklerinin önceden verilmiş hedef değerlerine (gerçek değer) ulaşılmasının kontrolüdür.

**Özgüllük:** Bir metod örnekteki diğer maddeler içinden istenen maddeyi hatasız olarak ayırabiliyorsa spesifiktir [107].

Çalışmamızda doğruluk için 3'er adet pozitif, düşük pozitif ve negatif örnek; duyarlılık için 10'ar adet pozitif ve düşük pozitif örnek; özgüllük için ise 20 adet negatif örnek çalışılmıştır. Intraassay kesinlik için 1 pozitif ve 1 düşük pozitif örnek aynı çalışmada üçer kez; interassay kesinlik için ise yine 1 pozitif ve 1 düşük pozitif örnek farklı üç çalışmada test edilmiştir (Tablo IV.6).

**Tablo IV.7:** Panfungal PCR Validasyon sonuçları

<b>Doğruluk</b>	<b>Örnek Sayısı</b>	<b>Bilinen Değeri</b>	<b>Elde Edilen Sonuçlar</b>
Pozitif	1	POZİTİF	POZİTİF
	2	POZİTİF	POZİTİF
	3	POZİTİF	POZİTİF
Düşük Pozitif	1	POZİTİF	POZİTİF
	2	POZİTİF	POZİTİF
	3	POZİTİF	POZİTİF
Negatif	1	NEGATİF	NEGATİF
	2	NEGATİF	NEGATİF
	3	NEGATİF	NEGATİF

<b>Duyarlılık</b>	<b>Örnek Sayısı</b>	<b>Bilinen Değeri</b>	<b>Sonuç</b>	<b>Örnek Sayısı</b>	<b>Bilinen Değeri</b>	<b>Sonuç</b>
Pozitif	1	POZİTİF	POZİTİF	6	POZİTİF	POZİTİF
	2	POZİTİF	POZİTİF	7	POZİTİF	POZİTİF
	3	POZİTİF	POZİTİF	8	POZİTİF	POZİTİF
	4	POZİTİF	POZİTİF	9	POZİTİF	POZİTİF
	5	POZİTİF	POZİTİF	10	POZİTİF	POZİTİF
Düşük Pozitif	1	POZİTİF	POZİTİF	6	POZİTİF	POZİTİF
	2	POZİTİF	POZİTİF	7	POZİTİF	POZİTİF
	3	POZİTİF	POZİTİF	8	POZİTİF	POZİTİF
	4	POZİTİF	POZİTİF	9	POZİTİF	POZİTİF
	5	POZİTİF	POZİTİF	10	POZİTİF	POZİTİF

<b>Özgüllük</b>	<b>Örnek Sayısı</b>	<b>Bilinen Değeri</b>	<b>Sonuç</b>	<b>Örnek Sayısı</b>	<b>Bilinen Değeri</b>	<b>Sonuç</b>
Negatif	1	NEGATİF	NEGATİF	11	NEGATİF	NEGATİF
	2	NEGATİF	NEGATİF	12	NEGATİF	NEGATİF
	3	NEGATİF	NEGATİF	13	NEGATİF	NEGATİF
	4	NEGATİF	NEGATİF	14	NEGATİF	NEGATİF
	5	NEGATİF	NEGATİF	15	NEGATİF	NEGATİF
	6	NEGATİF	NEGATİF	16	NEGATİF	NEGATİF
	7	NEGATİF	NEGATİF	17	NEGATİF	NEGATİF
	8	NEGATİF	NEGATİF	18	NEGATİF	NEGATİF
	9	NEGATİF	NEGATİF	19	NEGATİF	NEGATİF
	10	NEGATİF	NEGATİF	20	NEGATİF	NEGATİF

<b>Intraassay Kesinlik</b>	<b>Örnek Sayısı</b>	<b>Bilinen Değeri</b>	<b>1. Tekrar</b>	<b>2. Tekrar</b>	<b>3. Tekrar</b>
Pozitif	1	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
Düşük Pozitif	1	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF

<b>Interassay Kesinlik</b>	<b>Örnek Sayısı</b>	<b>Bilinen Değeri</b>	<b>1. Tekrar</b>	<b>2. Tekrar</b>	<b>3. Tekrar</b>
Pozitif	1	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF
Düşük Pozitif	1	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF	POZİTİF

Yapılan bu validasyon çalışması neticesinde yöntemin güvenilirliği test edilmiştir ve % 100 uyumlu olduğu belirlenmiştir. PCR çalışmalarında özellikle yalancı pozitifliği önlemek amacıyla validasyon çalışmaları yapılmalıdır.

Validasyonu tamamlandıktan sonra PCR çalışmalarına başlanmıştır. 110 *Candida* suşu ile panfungal PCR çalışılmış ve tamamında pozitif sonuç elde edilmiştir (Tablo IV.7).

**Tablo IV.8:** Panfungal *Candida* PCR Sonuçları

Örnek No	Sonuç	Örnek No	Sonuç
1	POZİTİF	56	POZİTİF
2	POZİTİF	57	POZİTİF
3	POZİTİF	58	POZİTİF
4	POZİTİF	59	POZİTİF
5	POZİTİF	60	POZİTİF
6	POZİTİF	61	POZİTİF
7	POZİTİF	62	POZİTİF
8	POZİTİF	63	POZİTİF
9	POZİTİF	64	POZİTİF
10	POZİTİF	65	POZİTİF
11	POZİTİF	66	POZİTİF
12	POZİTİF	67	POZİTİF
13	POZİTİF	68	POZİTİF
14	POZİTİF	69	POZİTİF
15	POZİTİF	70	POZİTİF
16	POZİTİF	71	POZİTİF
17	POZİTİF	72	POZİTİF
18	POZİTİF	73	POZİTİF
19	POZİTİF	74	POZİTİF
20	POZİTİF	75	POZİTİF
21	POZİTİF	76	POZİTİF
22	POZİTİF	77	POZİTİF
23	POZİTİF	78	POZİTİF
24	POZİTİF	79	POZİTİF
25	POZİTİF	80	POZİTİF
26	POZİTİF	81	POZİTİF
27	POZİTİF	82	POZİTİF

**Tablo IV.8:** Devam

<b>Örnek No</b>	<b>Sonuç</b>	<b>Örnek No</b>	<b>Sonuç</b>
28	POZİTİF	83	POZİTİF
29	POZİTİF	84	POZİTİF
30	POZİTİF	85	POZİTİF
31	POZİTİF	86	POZİTİF
32	POZİTİF	87	POZİTİF
33	POZİTİF	88	POZİTİF
34	POZİTİF	89	POZİTİF
35	POZİTİF	90	POZİTİF
36	POZİTİF	91	POZİTİF
37	POZİTİF	92	POZİTİF
38	POZİTİF	93	POZİTİF
39	POZİTİF	94	POZİTİF
40	POZİTİF	95	POZİTİF
41	POZİTİF	96	POZİTİF
42	POZİTİF	97	POZİTİF
43	POZİTİF	98	POZİTİF
44	POZİTİF	99	POZİTİF
45	POZİTİF	100	POZİTİF
46	POZİTİF	101	POZİTİF
47	POZİTİF	102	POZİTİF
48	POZİTİF	103	POZİTİF
49	POZİTİF	104	POZİTİF
50	POZİTİF	105	POZİTİF
51	POZİTİF	106	POZİTİF
52	POZİTİF	107	POZİTİF
53	POZİTİF	108	POZİTİF
54	POZİTİF	109	POZİTİF
55	POZİTİF	110	POZİTİF

Yine 29 adet *Aspergillus* suşu da panfungal PCR ile test edilmiş ve tamamında pozitif sonuç elde edilmiştir (Tablo IV.8). Bu durum kültür yöntemi ile panfungal PCR arasında % 100 uyum olduğunu göstermektedir.

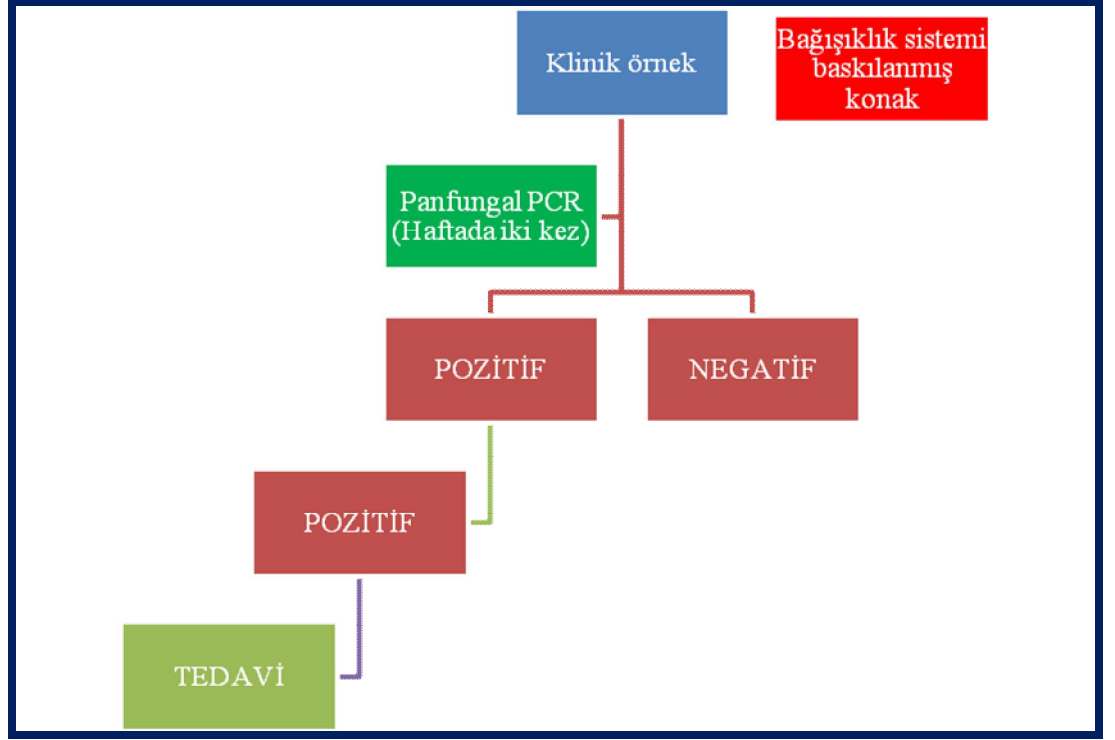
**Tablo IV.9:** Panfungal *Aspergillus* PCR Sonuçları

Örnek No	Sonuç
1	POZİTİF
2	POZİTİF
3	POZİTİF
4	POZİTİF
5	POZİTİF
6	POZİTİF
7	POZİTİF
8	POZİTİF
9	POZİTİF
10	POZİTİF
11	POZİTİF
12	POZİTİF
13	POZİTİF
14	POZİTİF
15	POZİTİF
16	POZİTİF
17	POZİTİF
18	POZİTİF
19	POZİTİF
20	POZİTİF
21	POZİTİF
22	POZİTİF
23	POZİTİF
24	POZİTİF
25	POZİTİF
26	POZİTİF
27	POZİTİF
28	POZİTİF
29	POZİTİF

Panfungal PCR çalışmaları ile *Candida* ve *Aspergillus* PCR yöntemleri standardize edilmiştir. Real time PCR yöntemi kullanıldığı için, sonuçlar eş zamanlı olarak alınmış, kontaminasyon riski en aza düşürülmüştür.

Klinik örneklerden direkt panfungal PCR yöntemi ile kısa bir sürede cins seviyesinde tanımlama yapılabilmektedir. Bu durum antifungal tedaviye hemen başlanması ve bu sayede tedavinin başarısının artırılmasında önem teşkil etmektedir. Özellikle kültürde üretilmeyen suşlar için PCR yöntemleri mutlaka gereklidir [83]. Bağışıklık sistemi baskılanmış hasta gruplarında panfungal PCR testleri haftada iki

kez çalışılarak, fungal enfeksiyon varlığı araştırılmaktadır [95]. Çünkü bu tip hastalarda, immun yetmezlik nedeni ile fungal etkenler daha kolay enfeksiyon oluşturmakta ve hayati risk taşımaktadırlar [108]. Pozitif çıkan sonuçlar bir kez daha tekrarlanarak sonuç verilmektedir.



**Şekil IV.13.** Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda fungal etkenlerin saptanmasında kullanılan moleküler yöntemlerin akış şeması.

Derin doku örneklerindeki mantar enfeksiyonlarının saptanmasında, kültür yöntemlerinin başarısı %50 civarındadır. Direkt mikroskopi, histopatoloji veya seroloji gibi yöntemler ile tanı konulmaya çalışılmaktadır. Bu nedenle pek çok olguda tür, hatta cins tanımı yapılamamaktadır. Her etkenin antifungallere karşı etkisi farklıdır. Tür tayini yapılamasa bile, cins düzeyinde de olsa etkenlerin saptanması çok önemlidir. Rutin laboratuvarlarda klinik örneklerden sıklıkla *Candida* ve *Aspergillus* cinslerine ait türler izole edilmektedir. Bu nedenle bu mikroorganizmaları saptayan ve hızla sonuç veren yöntemlerin kullanılması gereklidir. Moleküler yöntemler, diğer yöntemlerin yetersiz kaldığı yerde, bu duruma çözüm bulmaktadır. Panfungal PCR ile cins düzeyinde ve real time PCR

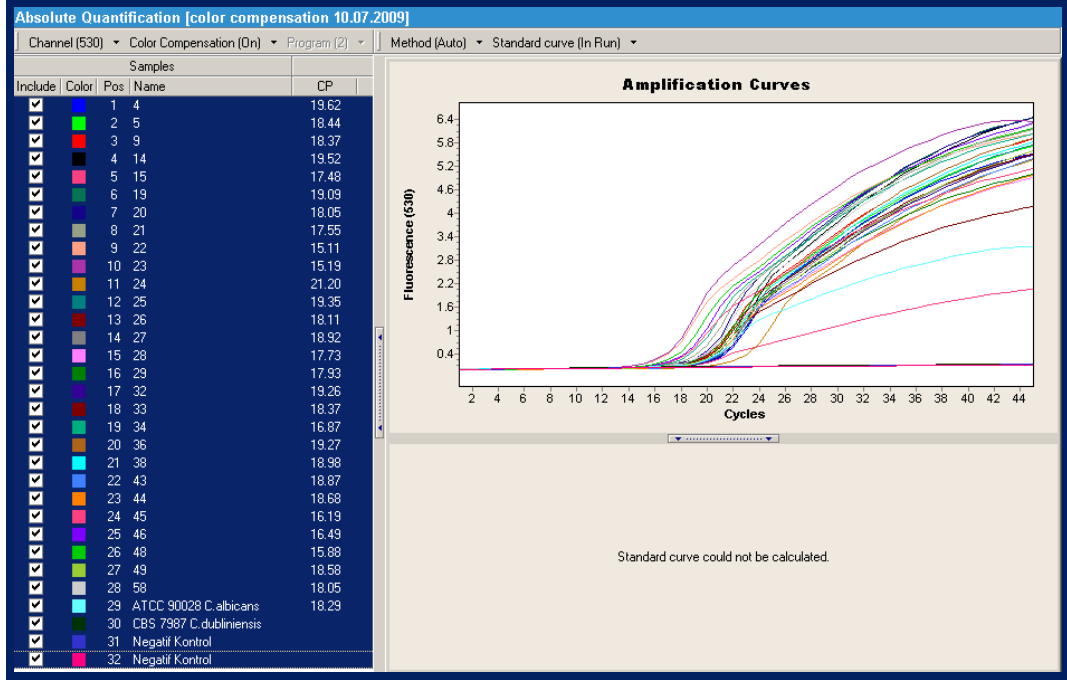
sayesinde hızla sonuç alınabilmektedir. Bu da moleküler yöntemlerin vazgeçilmez olduğunu göstermektedir [95].

### VI.3. TAQMAN PCR SONUÇLARI

Sybr Green boyası ile yapılan panfungal PCR tanı için çok önemli bir yer teşkil etmektedir. Ancak tür tayini için yetersiz kalabilmektedir. Diziyeye özgün olmayan problemler kullanıldığı için duyarlılığı ve özgüllüğü, diziyeye özgül olan problemler kullanılarak yapılan çalışmalara göre daha düşüktür. Bu nedenle çalışmamızda türeyen özgü Taqman problemler kullanarak 4 farklı *Candida* suşlarını (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* ve *Candida parapsilosis*) tanımladık. Bu metod syber green boyası kullanılarak yapılan PCR ve geleneksel metodlardan daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Real time PCR ile kullanıldığında güvenilir sonuçlar elde edilmektedir [109].

Panfungal PCR ile *Candida* olduğu kesinleşen suşlar için Taqman PCR çalışmaları yapıldı. Bu çalışma kapsamında fenotipik olarak *C. albicans* olarak tanımlanan 57 adet suş Taqman PCR yöntemi ile çalışılmış (Şekil IV.14) ve tamamının *C. albicans* olduğu belirlenmiştir.

Böylece fenotipik testlerle (germ tüp, 45 °C’de üreme deneyi, ChromAgar *Candida* besiyerinde renklenme durumu) saptanan 57 adet *C. albicans* suşlarının tamamının doğru olarak tanımlandığı belirlendi. Yapılan bir çok çalışmada sadece germ tüp testi pozitifliği ile *C. albicans* tanısı konulduğu için kültür ile PCR arasındaki uyumun, çalışmamızdaki kadar iyi olmadığı belirtilmektedir [40, 44, 51].



Şekil IV.14. *C. albicans* suşlarının çalışıldığı Taqman PCR görüntüsü

Tablo IV.10'da Taqman PCR yöntemi ile çalışılan ve *C. albicans* olarak tanımlanan örneklerin listesi bulunmaktadır.

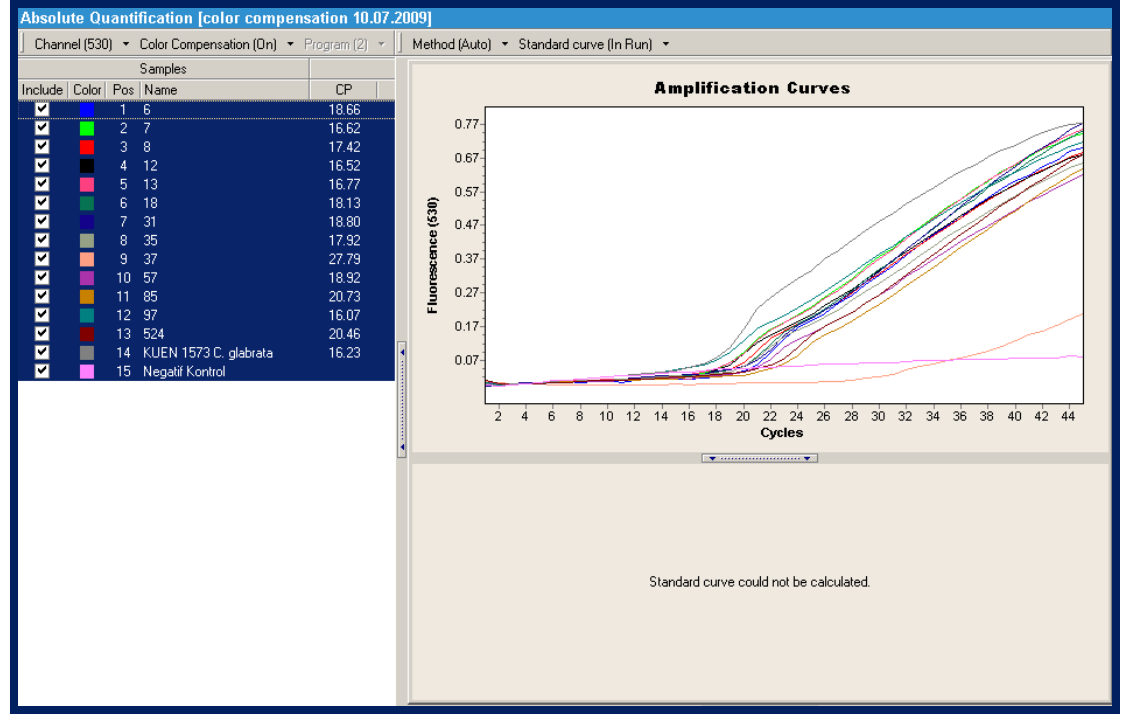
Tablo IV.10: Taqman PCR ile tanımlanan *C. albicans* suşlarının listesi

Örnek No	Kültür Sonucu	Taqman PCR Sonucu
4	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
5	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
9	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
11	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
14	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
15	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
19	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
20	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
21	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
22	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
23	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
24	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
25	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
26	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
27	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
28	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
29	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>

**Tablo IV.10:** Devam

<b>Örnek No</b>	<b>Kültür Sonucu</b>	<b>Taqman PCR Sonucu</b>
32	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
33	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
34	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
36	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
38	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
43	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
44	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
45	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
46	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
48	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
49	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
58	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
60	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
61	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
62	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
67	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
70	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
73	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
74	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
75	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
81	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
82	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
84	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
87	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
88	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
89	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
91	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
92	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
93	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
94	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
95	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
96	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
98	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
103	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
104	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
106	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
107	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
108	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
109	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
110	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>

Kültür yöntemleri ile tanımlanan 12 adet *C. glabrata* suşu da Taqman PCR yöntemi ile çalışılmış (Şekil IV.15) ve tamamının doğru olarak tanımlandığı belirlenmiştir (Tablo IV.11).

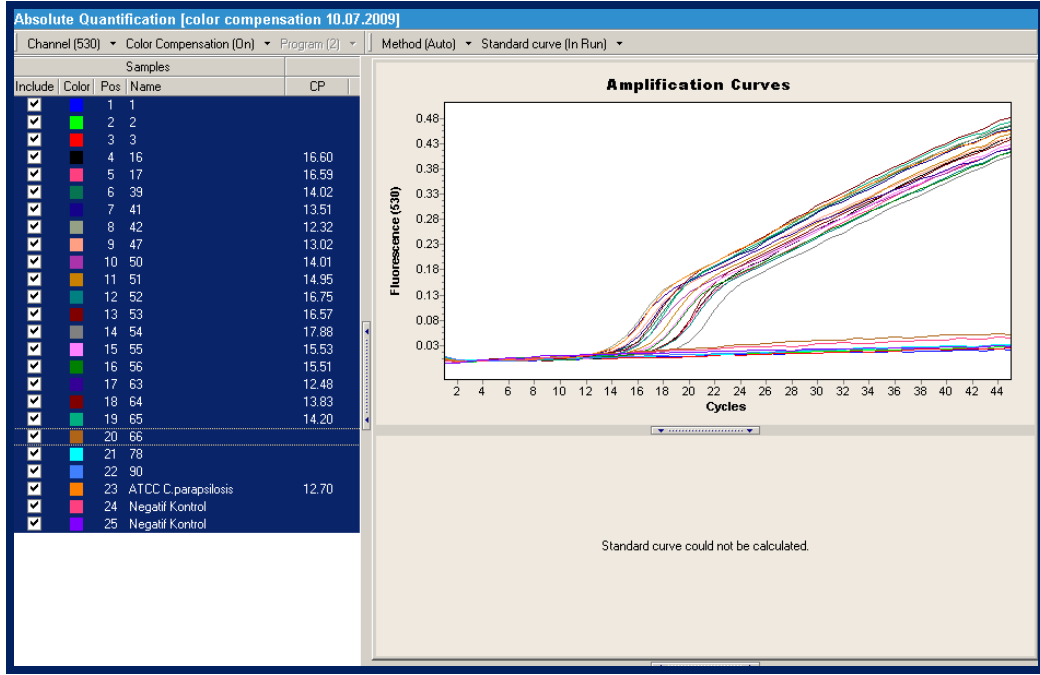


Şekil IV.15. *C. glabrata* suşlarının çalışıldığı Taqman PCR görüntüsü

Tablo IV.11: Taqman PCR ile tanımlanan *C. glabrata* suşlarının listesi

Örnek No	Kültür Sonucu	Taqman PCR Sonucu
6	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
7	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
8	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
12	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
13	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
18	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
31	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
35	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
37	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
57	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
85	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
97	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>

21 adet *C. parapsilosis* suşu da Taqman PCR yöntemi ile çalışılmış (Şekil IV.16) ve yine tamamının doğru olarak teşhis edildiği belirlenmiştir (Tablo IV.12). İlk çalışmada negatif olarak saptanan 1, 2 ve 3 numaralı örneklerden izole edilen suşların nükleik asit izolasyonları tekrar edilmiş ve PCR testleri tekrarlanmıştır. Yapılan bu ikinci PCR’da *C. parapsilosis* olarak saptanmışlardır.



Şekil IV.16. *C. parapsilosis* suşlarının çalışıldığı Taqman PCR görüntüsü

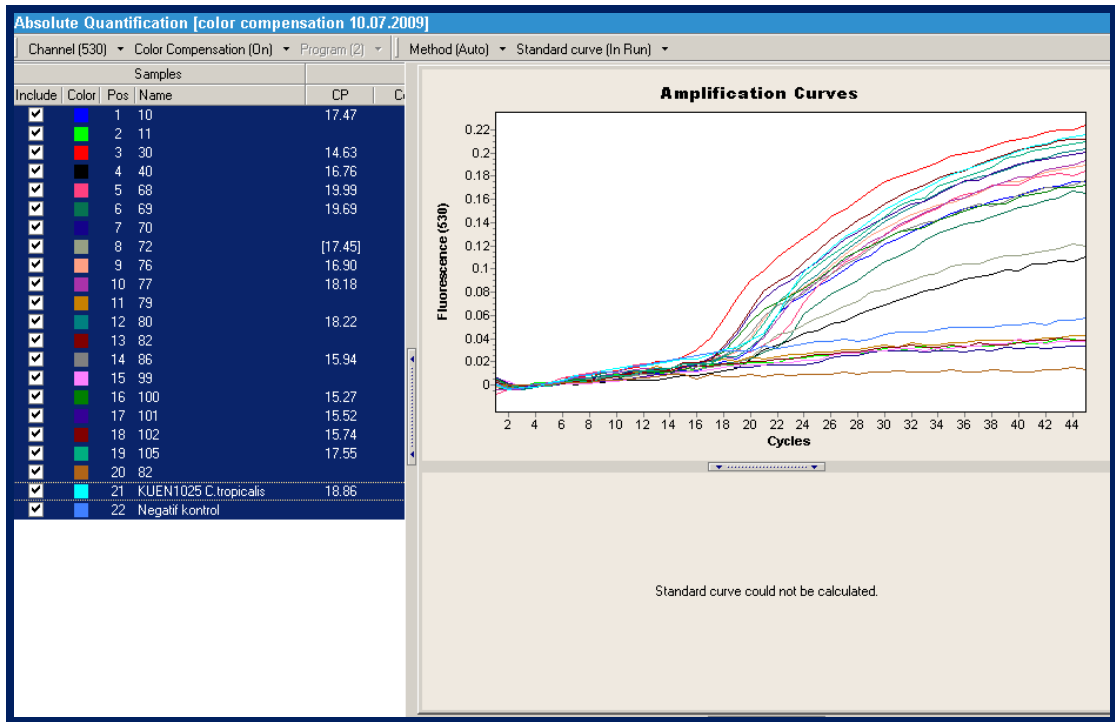
Tablo IV.12: Taqman PCR ile tanımlanan *C. parapsilosis* suşlarının listesi

Örnek No	Kültür Sonucu	Taqman PCR Sonucu
1	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
2	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
3	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
16	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
17	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
39	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
41	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
42	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
47	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
50	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
51	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
52	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>

**Tablo IV.12: Devam**

Örnek No	Kültür Sonucu	Taqman PCR Sonucu
53	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
54	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
55	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
56	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
63	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
64	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
65	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
66	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
79	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>

Kültür yöntemi ile teşhis edilen 17 adet *C. tropicalis* suşu Taqman PCR yöntemi ile çalışılmış (Şekil IV.17) ve tamamının *C. tropicalis* olduğu belirlenmiştir (Tablo IV.13).



**Şekil IV.17. *C. tropicalis* suşlarının çalışıldığı Taqman PCR görüntüsü**

**Tablo IV.13:** Taqman PCR ile tanımlanan *C. tropicalis* suşlarının listesi

<b>Örnek No</b>	<b>Kültür Sonucu</b>	<b>Taqman PCR Sonucu</b>
10	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
30	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
40	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
68	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
69	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
71	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
72	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
76	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
77	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
78	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
80	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
83	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
86	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
100	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
101	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
102	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
105	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>

Çalışmamızda kültür yöntemi ile tanımlanan 107 *Candida* suşu Taqman probolar kullanılarak teşhis edilmiştir ve iki yöntem arasındaki uyumun %100 olduğu belirlenmiştir. Böylece *C. albicans* ayırımında germ tüp testinin tek başına kullanılmayacağı belirlenmiştir. Bu testin yanında 45 °C’de üreme deneyi ya da ChromAgar *Candida* besiyerinde renk farkı ile ayırma testleri de ek olarak yapıldığında daha doğru sonuçlar elde edilebileceği belirlenmiştir.

API ID 32 C kiti ile yapılan *Candida* tiplendirme sonuçları, Taqman PCR yöntemi ile doğrulanmış ve çalışılan dört farklı *Candida* türü için hataya rastlanmamıştır. Bu durum birkaç araştırmacı tarafından da saptanmıştır ve fenotipik yöntemlerle yapılan identifikasyon sonuçlarının, PCR yöntemi ile yapılan identifikasyon sonuçları ile uyumlu olduğu [65] ve PCR yönteminin daha güvenilir olduğu belirtilmiştir [51]. Aynı zamanda yapılan çalışmalarda, Taqman PCR yönteminin klasik PCR yöntemine göre daha duyarlı olduğu ve PCR ile sonuçların daima hızlı ve güvenilir bir şekilde alı nabileceği kanıtı vurgulanmıştır [110].

#### VI.4. *CANDIDA* SUŞLARININ ANTİFUNGAL DUYARLILIK SONUÇLARI

Mantarlar çok değişik mekanizmalarla antifungal ilaçlara karşı direnç geliştirebilirler. Günümüzde çok fazla olmamakla birlikte çeşitli etki mekanizmalarına sahip antifungal ilaçlar bulunmaktadır. Tedavinin başarısını arttırmak için doğru antifungalın seçilmesi çok önemlidir. Çünkü bazı *Candida* türleri, bazı antifungallere karşı doğal dirence sahiptirler. Örneğin *C. glabrata* türlerinin birkaç tanesi azol grubu antifungal ilaçlara karşı doğal dirence sahiptirler. Bunun için antifungal duyarlılık testlerinin yapılması gereklidir [25]. Bu amaçla çalışmamızda kolorimetrik bir yöntemle sahip olan Sensititre YeastOne kiti ile izole edilen *Candida* suşlarının 7 farklı antifungale (Flukonazol, Kaspofungin, Vorikonazol, Amfoterisin B, Posakonazol, İtrakonazol ve 5-Flusitosin) karşı duyarlılık deneyleri yapılmıştır.

Son yıllarda *C. albicans* suşlarının flukonazol başta olmak üzere azollere karşı direnç geliştirdikleri gözlenmiştir [111]. Çalışmamızda da izole edilen *C. albicans* suşları genellikle azol grubu antifungallere karşı dirençli olarak saptanmıştır. 10 tane flukonazol ve vorikonazol; 8 tane posakonazol; 9 tane itrakonazol; 1 tane 5-Flusitosin; 2 tane de amfoterisin B direnci saptanırken kaspofungine dirençli *C. albicans* suşuna rastlanmamıştır (Tablo IV.14).

**Tablo IV.14:** İzole edilen *C. albicans* suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları

N o	Flukonazol	Vorikonazol	Posakonazol	İtrakonazol	5-Flusitosin	Amfoterisin B	Kaspofungin
4	4	0.06	0.5	0.25	<0.03	0.5	0.06
5	256	0.06	0.06	0.12	0.25	0.12	0.06
9	0.5	<0.008	0.03	0.06	<0.06	0.25	0.03
11	64	>4	>8	>16	0.12	0.25	0.03
14	0.25	<0.008	<0.008	<0.015	<0.06	0.25	0.015
15	0.25	<0.008	<0.008	<0.015	<0.06	0.25	0.015
19	0.12	<0.008	0.06	0.08	0.03	0.25	0.03
20	0.25	<0.008	0.015	0.008	0.03	0.12	0.06
21	0.25	>16	0.015	0.03	1	0.5	0.06
22	0.5	<0.008	0.03	0.03	0.12	0.5	0.12
23	>256	>16	>8	>16	0.12	2	0.12

**Tablo IV.14:** Devam

<b>N o</b>	<b>Flukona zol</b>	<b>Vorikona zol</b>	<b>Posakona zol</b>	<b>İtrakona zol</b>	<b>5- Flusitos in</b>	<b>Amfoteri sin B</b>	<b>Kaspofun gin</b>
24	>256	>16	>8	>16	0.12	2	0.12
25	>256	>16	0.5	>16	0.12	0.5	0.125
26	0.5	0.015	0.03	0.03	0.06	0.5	0.12
27	0.5	0.015	0.03	0.03	0.06	0.5	0.12
28	1	<0.008	0.06	0.03	0.06	0.015	0.25
29	0.5	<0.008	0.015	0.03	0.6	1	0.12
32	0.5	0.015	0.06	0.15	0.06	1	0.06
33	0.25	< 0.008	0.03	0.06	< 0.03	0.25	0.0015
34	1	0.06	0.25	0.12	1	0.5	0.03
36	4	0.03	0.5	0.25	0.03	1	0.03
38	>256	>16	>8	>16	0.06	1	0.06
43	0.5	<0.008	0.12	0.12	<0.003	1	0.12
44	0.5	0.015	0.06	0.06	0.06	1	0.015
45	0.5	<0.008	0.12	0.12	<0.003	1	0.12
46	0.5	<0.008	0.06	0.12	0.06	1	0.12
48	0.5	<0.008	0.06	0.12	0.06	1	0.03
49	0.5	<0.008	0.12	0.12	0.06	1	0.06
58	>256	>16	>8	>16	0.06	1	0.12
60	0.25	0.008	0.06	0.06	0.06	1	0.12
61	0.5	<0.008	0.06	0.12	0.06	1	0.03
62	0.5	0.015	0.06	0.06	0.06	1	0.015
67	0.25	<0.008	0.06	0.12	0.06	0.5	0.06
70	0.5	0.06	0.12	0.12	<0.03	0.25	0.015
73	0.25	<0.008	0.008	0.12	<0.06	0.5	0.06
74	>256	>8	>8	>16	<0.06	1	0.12
75	0.5	<0.008	0.06	0.12	<0.06	0.25	0.12
81	0.25	<0.008	0.06	0.06	<0.06	0.25	0.12
82	0.5	0.03	0.12	0.12	>64	0.5	0.03
84	0.25	<0.008	0.06	0.12	<0.06	0.25	0.03
87	<0.12	<0.008	0.06	0.12	<0.06	0.5	0.12
88	0.25	<0.008	0.12	0.06	<0.06	0.25	0.06
89	0.5	<0.008	0.06	0.12	<0.06	0.25	0.06
91	0.25	<0.008	0.06	0.12	<0.06	0.5	0.03
92	0.25	<0.008	0.015	0.06	<0.06	0.25	0.06
93	0.5	<0.008	0.015	0.06	2	1	0.06
94	0.5	0.015	0.015	0.12	0.5	1	0.06
95	>256	>8	>8	>16	<0.06	0.5	0.06

**Tablo IV.14:** Devam

No	Flukonazol	Vorikonazol	Posakonazol	İtrakonazol	5-Flusitosin	Amfoterisin B	Kaspofungin
96	0.25	<0.008	0.06	0.12	<0.06	0.25	0.03
98	>256	>8	>8	>16	<0.06	0.5	0.06
103	0.5	<0.008	0.03	0.06	<0.06	0.25	0.03
104	0.5	<0.008	0.03	0.06	<0.06	0.25	0.03
106	0.5	0.03	0.015	0.06	0.12	0.25	0.06
107	0.5	<0.008	0.06	0.12	0.06	1	0.03
108	0.5	<0.008	0.06	0.12	<0.06	0.25	0.12
109	0.5	<0.008	0.015	0.03	0.6	1	0.12
110	0.25	<0.008	0.06	0.06	<0.06	0.25	0.12

Çalışmamızda bir azol grubu antifungale dirençli olan bir suş, hemen hemen gruptaki diğer antifungallere de dirençli olarak saptanmıştır. Azollere karşı artan dirence ve sistemik antifungal tedaviye cevapsız kandidiyasislerin görülmesine, azollerin tekrarlanan kullanımı neden olarak düşünülmektedir [25]. *C. albicans* suşları, azol grubu dışındaki antifungallere yüksek oranda duyarlı olarak saptanmışlardır. Bu durum benzer çalışmalar da belirtilmektedir [112]. Bu tür, klinik örneklerden en sık izole edilen *Candida* türü olduğu için antifungal duyarlılıklarının bilinmesi ayrıca önem taşımaktadır. Özellikle yoğun bakım servislerinde yatan hastalarda ve bayanlarda sıklıkla enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır [113, 114]. Bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda fırsatçı enfeksiyonlara neden olan mantar türlerinin başında gelmektedir. Yüzeysel ya da derin; akut ya da kronik mantar enfeksiyonlarının; solunum yolları enfeksiyonlarının ya da sistemik fungal enfeksiyonların başlıca etkeni olan *C. albicans* türü [9], çalışmamızda da sıklıkla izole edilmiştir.

*C. glabrata* suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları incelendiğinde; düşük oranlarda direnç saptandığı görülmektedir (Tablo IV.15). En fazla direnç 31 numaralı örnekten izole edilen suшта görülmüştür. Bu suş azol grubundan 3 antifungale ve amfoterisin B'ye dirençli olarak saptanmıştır. Vorikonazole ve kaspofungine karşı direnç tespit edilmemiştir. Bir adet suş da 5-flusitosine dirençli

olarak belirlenmiştir. *C. glabrata* suşlarında flukonazol direncine, yaşlı hastalarda rastlanmaktadır. Son yıllarda azollere karşı direnç artarken; tedavide doz artışı zaman zaman etkili sonuçlar vermiştir [115]. Çalışmamızda bu türde flukonazol direncine üç tane suşta rastanmıştır ve bu suşlar 65 üstü yaşa sahip olan hastalardan izole edilmiştir.

**Tablo IV.15:** İzole edilen *C. glabrata* suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları

No	Flukonazol	Vorikonazol	Posakonazol	İtrakonazol	5-Flusitosin	Amfoterisin B	Kaspofungin
6	8	0.12	0.5	0.5	<0.03	0.5	0.06
7	4	0.06	0.5	0.25	<0.03	0.5	0.06
8	4	0.06	0.5	0.25	<0.03	0.5	0.06
12	2	0.03	0.25	0.12	<0.06	0.12	0.03
13	2	0.03	0.25	0.12	<0.06	0.12	0.03
18	8	0.12	0.5	0.25	8	0.25	0.06
31	16	0.5	2	1	< 0.03	2	0.06
35	8	0.12	0.5	0.5	<0.03	1	0.03
37	2	<0.008	0.25	0.12	<0.03	1	<0.008
57	16	0.25	1	1	<0.03	2	0.03
85	4	0.06	0.5	0.25	<0.06	0.25	0.06
97	16	0.06	1	0.5	<0.06	0.5	0.06

*C. parapsilosis* kan örneklerinden sıklıkla izole edilen nozokomiyal enfeksiyonların başında gelmektedir. Sadece onkoloji ve trasplant hastalarında değil, aynı zamanda yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda da sıklıkla görülmektedir. Bunun nedeni çeşitli cerrahi girişimler ve hastanede uzun kalış sürelerinin neden olduğu ileri sürülmektedir [116]. Son yıllarda *C. parapsilosis* enfeksiyonlarının artışı dikkati çekmektedir [117]. Çalışmamızda da *C. albicans*'tan sonra en fazla izole edilen tür *C. parapsilosis*'tir. Ayrıca izole edilen 22 türden 17 tanesi kan kültüründen izole edilmiştir ve bu türün izole edildiği hastalar, hastanede uzun süre yatmak zorunda kalan yoğun bakım hastaları ya da onkoloji tedavisi gören hasta gruplarıdır. Çalışmamızda olduğu gibi, bir çok çalışmada da Avrupa ve Latin Amerika'da Non-*albicans Candida* suşları içinde en fazla bu türün izole edildiği bildirilmektedir [118-120].

*C. parapsilosis* suşlarında yüksek oranlarda duyarlı sonuçlar alınmıştır. Sadece bir tür azollere dirençli olarak saptanmıştır (Tablo IV.16). Bu durum başka araştırmacılar tarafından da saptanmıştır [116].

Bu mayaya bağlı infeksiyonlar; el hijyeni, kateter kullanımı ve bakımında dikkatli olunması ile kontrol altına alınabilir.

**Tablo IV.16:** İzole edilen *C. parapsilosis* suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları

No	Fluko nazol	Vorikona zol	Posakona zol	İtrakona zol	5-Flusitos in	Amfoteri sin B	Kaspofun gin
1	1	0.06	0.06	0.12	<0.06	0.25	0.03
2	1	0.06	0.06	0.12	<0.06	0.25	0.03
3	1	0.06	0.06	0.12	<0.06	0.25	0.03
16	0.5	0.008	0.015	0.06	0.06	0.25	0.5
17	0.5	0.008	0.015	0.06	0.06	0.25	0.5
39	1	0,015	0.12	0.12	0,12	1	0,5
41	1	0,015	0.12	0,12	0,12	1	0,5
42	1	0,015	0.12	0,12	0,06	1	0,5
47	1	0,03	0.12	0,12	0,12	1	0,5
50	1	0,015	0.12	0,12	0,12	1	0,5
51	1	0,015	0.12	0,12	0,12	1	0,5
52	1	0,015	0.12	0,12	0,12	1	0,5
53	1	0,015	0.12	0,12	0,12	1	0,5
54	1	0,015	0.12	0,12	0,12	1	0,5
55	8	0,12	1	0,5	0,12	1	0,5
56	1	0,015	0.12	0,12	0,12	1	0,5
63	1	0,015	0.12	0,12	0,12	1	0,5
64	1	0,015	0.12	0,12	0,12	1	0,5
65	1	0,015	0.12	0,12	0,12	1	0,5
66	1	0,015	0.12	0,12	0,12	1	0,5
79	>256	>8	>8	>16	<0.06	1	0.12

*C. glabrata* ABD’de ikinci en sık kandidemi etkenidir. Ancak Avrupa ülkelerinde *C. tropicalis* veya *C. parapsilosis* ikinci sırayı almaktadır. *C. glabrata* flukonazolün profilakside kullanıldığı hastalarda ve yaşlılarda giderek artan sıklıkta görülmektedir ve bu türe bağlı infeksiyonlar daha ağır ve ölümcül seyretmektedir. Avrupa ülkelerinde ve Türkiye’de ise *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*, *C. albicans*’tan sonra en sık kandidemi yapan türlerdir. *C. tropicalis* kandidemileri

daha çok nötropenisi ve mukoziti olan, özellikle flukonazol profilaksisi almamış olan hastalarda görülmektedir [121].

Çalışmamızda da *C. tropicalis*, *C. albicans*'tan sonra en fazla izole edilen iki türden birisidir ve 5 suшта azollere karşı direnç saptanmıştır (Tablo IV.17).

**Tablo IV.17:** İzole edilen *C. tropicalis* suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları

No	Flukonazol	Vorikonazol	Posakonazol	İtrakonazol	5-Flusitosin	Amfoterisin B	Kaspofungin
10	64	>4	>4	>16	0.12	0.25	0.03
30	2	0.25	>8	0.25	<0.03	1	0.12
40	2	0.12	0.25	0.12	0.03	2	0.25
68	8	1	<0.06	0.5	<0.03	1	0.06
69	2	0.5	0.5	0.25	<0.03	16	0.06
71	0.5	<0.008	0.03	0.06	0.06	0.5	0.06
72	1	0.06	0.25	0.25	<0.06	0.25	0.06
76	>256	>8	>8	>16	<0.06	1	0.12
77	>256	>8	>8	>16	<0.006	1	0.12
78	>256	>8	>8	>16	<0.06	1	0.06
80	>256	>8	>8	>16	>0.06	1	0.06
83	0.25	<0.008	0.06	0.12	<0.06	0.25	0.015
86	4	0.5	1	0.5	<0.06	1	0.06
100	2	0.12	0.12	0.25	>64	0.5	0.03
101	2	0.12	0.12	0.25	>64	0.5	0.03
102	2	0.12	0.12	0.25	>64	0.5	0.03
105	16	0.06	0.12	0.25	8	1	0.12

Kandidemiler ve invazif kandidiyazda tanı ve tedavi güçlüklerinin çok fazla olması nedeniyle bu hastalıkların önlenmesi ve kontrolü daha da önem kazanmaktadır. Bu yönden etkin, kolay ve ucuz olan üç yöntem vardır:

- 1) El hijyeni,
- 2) Kateter bakımı,
- 3) Antifungallerin sağduyulu ve dikkatli kullanılması.

Sonuç olarak, kandida infeksiyonlarında Non-*albicans* türlerin artış gösterdiği ve bu türlerin antifungal ilaçlara direncinin yüksek olduğu, bu nedenle *Candida*

infeksiyonlarında etkenin tür düzeyinde saptanıp antifungal duyarlılığının araştırılmasının tedavinin etkinliği ve direnç gelişiminin önlenmesi açısından yararlılığı tartışılmazdır [122].

*C. krusei*'ye bağlı kandidemiler daha çok hematolojik malignitesi olanlarda, kemik iliği ve kan alıcılarında, özellikle flukonazol profilaksisi uygulanan hastalarda görülür. *C. dubliniensis* ise daha çok HIV ile enfekte kişilerden sıklıkla izole edilen bir *Candida* türüdür. Tablo IV.18'da *C. krusei* ve *C. dubliniensis* suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları yer almaktadır.

**Tablo IV.18:** İzole edilen *C. krusei* ve *C. dubliniensis* suşlarının antifungal duyarlılık sonuçları

No	Flukonazol	Vorikonazol	Posakonazol	İtrakonazol	5-Flusiton	Amfoterisin B	Kaspofungin
59	<0.12	<0.008	0.03	0.03	0.06	0.5	0.12
90	<0.06	0.015	0.12	0.12	<0.06	1	0.12
99	>256	1	>8	>16	>0.06	0.5	0.06

## BÖLÜM V

### SON DEĞERLENDİRMELER ve ÖNERİLER

Çalışmamızda fungal enfeksiyonların tanısında, geleneksel yöntemlerin en önemlisi, hatta altın standardı olan kültür yönteminin, moleküler yöntemlerin en son teknolojilerinden biri olan real time PCR ile karşılaştırılması yapıldı.

Kültür yönteminde *Candida* türlerinin ayrımında; germ tüp testinin yanında 45°C’de üreme deneyi ve ChromAgar *Candida* besiyerinde renk ayrımı gibi ek testler yapılarak; bu yöntemlerin güvenilirliği artırıldı. Non-*albicans Candida* olarak saptanan suşların API ID 32 C ile tiplendirilmeleri yapıldı. Ayrıca bu yöntem ile *Aspergillus* türleri üretildi ve morfolojik olarak tanımlamaları yapıldı.

Panfungal PCR yöntemi ile *Candida* ve *Aspergillus* türlerinin cins düzeyinde ve moleküler bir yöntem ile tanımlamaları yapıldı. Bu yöntem, diziyeye özgül olmayan Sybr green boyası ile çift zincirli DNA’nın saptanması esasına dayanır. Bu yöntemin avantajı ucuz ve hızlı olması; dezavantajı ise diziyeye özgül olmayan boya maddeleri kullanılmasıdır. Ancak real time PCR şartlarında kontaminasyon riski en aza indirildiği için, bu dezavantaj kısmen de olsa yok edilmiştir. Real time PCR yöntemlerinin en önemli özelliği hızla sonuç alınarak; birkaç saatte tedaviye başlanabilmesidir. Bunun yanında elektroforez gibi ek testlere de ihtiyaç kalmadığı için kontaminasyon riski minimuma indirilmektedir. Bu yöntemler diziyeye özgül olan probalar kullanıldığında daha güvenilir sonuçlar vermektedir.

PCR çalışmalarında öncelikle optimizasyonlar yapıldı ve primerlerin uygun bağlanma dereceleri ile PCR karışımlarının en uygun konsantrasyonları belirlendi. Ayrıca çeşitli suşlar ile dizayn edilen primerlerin validasyonları yapıldı. Bu sayede testin güvenilirliği test edilmiş oldu.

Çalışmamızda ayrıca 4 farklı *Candida* türünün (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*) diziyeye özgül probalar olan Taqman probalar yardımıyla moleküler düzeyde teşhisleri yapıldı. Böylece fenotipik olarak belirlenen dört farklı *Candida* türünün moleküler yöntemlerle karşılaştırılmaları yapıldı. Bu sayede rutin uygulamalarda kullanılan metodların geçerliliği test edildi.

Yine bu çalışmada izole edilen *Candida* suşlarının antifungal duyarlılık testleri yeni bir yöntem olan ve kolorimetrik tabanlı ticari bir kit ile yapılmıştır. Bu şekilde ülkemizdeki direnç durumu 7 antifungal için ve İstanbul ilindeki 110 hasta izolatu için belirlenmiştir.

Tüm bu deneylerin yapılmasında standart suşlar kullanılarak ve kalite kontrol kurallarına uyularak, çalışmaların güvenilirliği yüksek düzeyde tutulmuştur.

Çalışmamızda birkaç farklı metod birarada kullanıldığı için ayrıca bir önemi bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir.

- *C. albicans* türlerinin tanısında sadece germ tüp yönteminin yeterli olmadığı belirlenmiştir. Bunun yanında 45°C’de üreme deneyinin mutlaka yapılması gerekliliği saptanmıştır.

- Bu deneyin yapılamadığı durumlarda Non-*albicans Candida* türlerinin *C. albicans* türlerinden ayrılmasında, ChromAgar *Candida* besiyerinde farklı renklerde üremelerin gözlenmesi ve bu şekilde türlerin genel bir ayrımının yapılmasının uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

- Rutin besiyerlerinde birbiri ile aynı görünüşe sahip, ancak farklı olan ve birbirinden ayrılamayan kolonilerin ayrımında ChromAgar *Candida* besiyerinin kullanımının pratik ve faydalı olduğu belirlenmiştir.

- Çalışmamızda izole edilen ve geleneksel yöntemlerle teşhis edilen *Candida* ve *Aspergillus* cinslerine ait türler Tablo V.1 ve V.2 ‘de gösterilmektedir.

**Tablo V.1:** İzole edilen *Candida* suşlarının türlere göre dağılımı

<b>Mikroorganizma Adı</b>	<b>Miktar</b>
<i>Candida albicans</i>	57
<i>Candida dubliniensis</i>	1
<i>Candida glabrata</i>	12
<i>Candida krusei</i>	2
<i>Candida parapsilosis</i>	21
<i>Candida tropicalis</i>	17

**Tablo V.2:** İzole edilen *Aspergillus* suşlarının türlere göre dağılımı

Mikroorganizma Adı	Miktar
<i>Aspergillus flavus</i>	12
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2
<i>Aspergillus niger</i>	14
<i>Aspergillus terreus</i>	1

• İzolasyonu yapılan *Candida* ve *Aspergillus* türlerinin dağılım oranları ülkemizde veya aynı coğrafik özelliklere sahip olan ülkelerde yapılan çalışmaların sonuçları ile uyum içindedir.

• Yapılan diğer çalışmalarda da belirtildiği gibi, *C. parapsilosis* izolasyonunun daha çok kan kültüründen yapılması, risk grubu hastaların katater bakımının çok iyi yapılması; tedavi uygulayan personelin ise el hijyenine çok dikkat etmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu önlemler, tüm enfeksiyonlardan korunmada temel ve en basit yöntemler olup, mutlaka uygulanmalıdır. Bu şekilde nozokomiyal enfeksiyonların önüne geçilerek, hastanede kalış süreleri azaltılabilir.

• Çalışmamızda izole edilen suşların yarısından fazlasının balgam, trakeal aspirat ve BAL gibi alt solunun yolu örneklerinden izole edildikleri saptanmıştır.

• Otomatik nükleik asit izolasyon sistemlerinden olan ve nükleik asiti mknatıs metodu ile tutan ve bu şekilde izolasyonun yapılmasını sağlayan Magna Pure Compact cihazı ile kültür kolonilerinden nükleik asit izolasyonu yapılabilceği belirlendi. Bu cihaz sayesinde örnekler arası kontaminasyon riski ortadan kaldırılmış ve çalışan sağlığı açısından risk azaltılmıştır. Ayrıca nükleik asit izolasyonu standardize edilmiştir.

• Panfungal *Candida* ve *Aspergillus* PCR sonuçları ile kültür yöntemleri sonuçlarının uyumlu olduğu belirlenmiştir. Ancak panfungal PCR ile tür ayrımının yapılmasının zor olduğu saptanmıştır.

• Geleneksel yöntemler ile saptanan;

- 57 tane *C. albicans* suşunun tamamı Taqman PCR ile *C. albicans* olarak,
- 21 tane *C. parapsilosis* suşunun tamamı Taqman PCR ile *C. parapsilosis* olarak,

- 17 tane *C.tropicalis* suşunun tamamı Taqman PCR ile *C. tropicalis* olarak,
- 12 tane *C. glabrata* suşunun tamamı Taqman PCR ile *C. glabrata* olarak, saptanmıştır.

• Taqman PCR sonuçları ile kültür sonuçlarının tutarlı olması, geleneksel yöntemlerle doğru bir şekilde tanımlama yapılabildiğini göstermiştir. Yine ID 32 C kitinin bu dört suş için güvenilir bir şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir.

• Kolorimetrik bir yöntem olan sensititre ile 7 farklı antifungal için MIK değerleri belirlenmiştir. Hiçbir suşta kaspofungine karşı direnç saptanmamıştır. En fazla direnç azol grubu antifungallerde görülmüştür. Azol grubu antifungallerden flukonazol, tüm antifungaller içinde en fazla direnç saptanan antifungal olarak belirlenmiştir (Tablo V.3).

**Tablo V.3:** Antifungal duyarlılık testlerinde saptanan direncin % dağılımı

<b>Antifungaller</b>	<b>Duyarlı</b>	<b>Dirençli</b>	<b>Direnç Oranı (%)</b>
<b>Flukonazol</b>	89	21	19,1
<b>Vorikonazol</b>	94	16	14,5
<b>Posakonazol</b>	93	17	15,5
<b>İtrakonazol</b>	92	18	16,4
<b>5-Flusitosin</b>	104	6	5,5
<b>Amfoterisin B</b>	104	6	5,5
<b>Kaspofungin</b>	110	0	0,0

## KAYNAKLAR

- [1] Iyer R.S.; Pal R.B.; Patel R.Y.; Banker D.D.: “Polymerase chain reaction based diagnosis of systemic fungal infections and sensitivity testing of the fungal isolates”, *Indian J. Med Microbiol.*, 20 (2002) 132-136.
- [2] Gürol, Y.; Karaltı, İ.; Öztürk Y.; Tazegün, T.T.; Yılmaz, G.: “Onkoloji servisinde yatan hastalardan izole edilen *Candida* türlerinin kolorimetrik yöntem ile antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi”, 24. *Ankem Kongresi*, Fethiye, Mayıs, (2009) 106.
- [3] Kuo-Wei, C.; Hsiu-Jung, L.; Yu-Hui, L.; Shu-Ying, L.: “Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan”, *Journal of Medical Microbiology*, 54 (2005) 249–258.
- [4] Pasqualotto, A.C.: “Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*”, *Medical Mycology* 47 (2009) 1-10.
- [5] Gharizadeh, B.; Norberg, E.; Löffler, J.; Jalal, S.; Tollemar, J.; Einsele, H.; Klingspor, L.; Nyrén, P.: “Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology”, *Mycoses*, 47 (2004) 29-33.
- [6] Gurpreet, S.S.; Bruce, C.K.; Leslie, S.; Glenn, D.R.: “Molecular probes for diagnosis of fungal infections” *Journal of Clinical Microbiology*, 33 (1995) 2913–2919.
- [7] Simon D.A.; Clark, I.M.: “Fungal molecular diagnostics: a mini review”, *J. Appl. Genet.*, 45 (2004) 3-15.
- [8] Schabereiter-Gurtner, C.; Selitsch, B.; Rotter, M.L.; Hirschl, A.M.; Willinger, B.: “Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens”, *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (2007) 906–914.

- [9] Tarini, N.M.A.; Wahid, M.H.; Fera, I.; Yasmon, A.; Djauzi, S.: “Development of multiplex-PCR assay for rapid detection of *Candida* spp.”, *Medical Journal of Indonesia*, 19 (2010) 83-87.
- [10] Joerg, F.; Nikola, M.; Nicole, H.; Fred, Z.; Markus, K.: “Rapid detection of common pathogenic *Aspergillus* species by a novel real-time PCR approach”, *Mycoses* 52 (2008) 228-233.
- [11] Suarez, F.; Lortholary, O.; Buland, S.; Rubio, M.T.; Ghez, D.; Mahe, V.; Quesne, G.; Poire'e, S.; Buzyn, A.; Varet, B.; Berche, P.; Bougnoux, M.E.: “Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance” *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (2008) 3772–3777.
- [12] Gürol, Y.; Karaltı, İ.; Kipritçi, Z.; Kocagöz T.: “Efficiency of galactomannan antigen test and real-time PCR for the diagnosis of fungemia and aspergillosis”, XII. *International Congress of Mycology*, İstanbul, August, (2008) 90.
- [13] Westh, H.; Lisby, G.; Breyse, F.; Böddinghaus, B.; Chomarat, M.; Gant, V.; Goglio, A.; Raglio, A.; Schuster, H.; Stuber, F.; Wissing, H.; Hoeft, A.: “Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis”, *Clinical Microbiology Infection*, 15 (2009) 544–551.
- [14] Carrillo-Muñoz, A.J.; Quindós, G.; Ruesga, M.; Del Valle, O.; Pemán, J.; Cantón, E.; Hernández-Molina, J.M.; Santos, P.: “In vitro antifungal susceptibility testing of filamentous fungi with Sensititre Yeast One”, *Mycoses*. 49 (2006) 293-7.
- [15] Akgül, Ö.; Çerikçioğlu, N.: “Hypertonic sabouraud dextrose agar as a substrate for differentiation of *Candida dubliniensis*”, *Mycopathologia*, 167 (2009) 357-359.
- [16] Esen, N.; Şengönül, A.; Yuluğ, N.: “Rutin laboratuvarında *Candida albicans* tanısı almış izolatlarda üç farklı yöntemle *Candida dubliniensis* araştırılması”, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 34 (2004) 46-50.
- [17] Bilgehan, H.: “*Klinik Mikrobiyolojik Tanı*”, 3. Baskı, Barış Yayınları, Fakülteler Kitapevi, İzmir, Türkiye, (2002) 94-95.

- [18] Çolakoğlu, G.: “The variability of fungal flora in the air during morning and evening in 1994”, *Journal of Basic Microbiology*, 36 (1996) 393-398.
- [19] Çolakoğlu, G.: “Fungal spore concentrations in the atmosphere at the Anatolia Quarter of İstanbul, Turkey”, *Journal of Basic Microbiology*, 36 (1996) 155-162.
- [20] Çolakoğlu, G.: “Indoor and outdoor mycoflora in the different districts of the city of İstanbul (Turkey)”, *Indoor and Built Environment*, 13 (2004) 91-100.
- [21] Karalti, İ.: “İstanbul ilinde hastanelerin içinde ve dışında hava ile taşınan funguslar üzerine araştırmalar”, *Yüksek Lisans Tezi*, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, (2006) 1-129.
- [22] Çolakoğlu, G.: “*Tohumuz Bitkiler Sistematigi (Bacteriophyta, Cyanophyta, Phycophyta, Mycophyta, Lichenes)*”, Marmara Üniv. Yay. No. 648, Fen-Edebiyat Fak. Yay. No. 37, Teknik Eğitim Fak. Döner Sermaye İşletmesi Matbaa Birimi, İstanbul, Türkiye, (1999) 136-380.
- [23] Arda, M.: “*Temel Mikrobiyoloji*”, Medisan Yayın Serisi, No. 46, Genişletilmiş 2. Baskı, Ankara, Türkiye, (2000) 1-548.
- [24] Raper, K. B.; Fennell, D. I.: “*The Genus Aspergillus*”, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA, (1965) 1-686.
- [25] Wilke, T.A.; Güner, S.; Doğanay, M.: “*Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*”, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, (2008) 115-176.
- [26] Tümbay, E.: “*Pratik Tıp Mikolojisi*”, Bilgehan Basımevi, I. Baskı, Bornova, İzmir, Türkiye, (1983) 119-146.
- [27] Larone, D. H.: “*Medically Important Fungi, A Guide to Identification*” 3 rd Ed., ASM Press, Washington, D.C., (1994) 1-206.
- [28] Ustaçelebi, Ş.; Mutlu, G.; İmir, T.; Cengiz, T.A.; Tümay, E., Mete, E.: “*Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Birinci Baskı, Güneş Kitapevi, Ankara (1999) 1081.
- [29] Aysan Akçam, E.: “Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde izlenen candidaemi olgularının epidemiyolojik, klinik ve antifungal duyarlılık yönünden incelenmesi”, *Uzmanlık Tezi*, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, Türkiye, (2009) 3-8.
- [30] De Hoog, G.S.; Guarro, J.; Gene, J.; Figueras, M.J.: “*Atlas of Clinical Fungi*”, ASM press, Netherlands, (2001) 1-1000.

- [31] Çolakoğlu, G.: “Mould counts in the atmosphere at the Europe Quarter of İstanbul, Turkey”, *Journal of Basic Microbiology*, 36 (1996) 389-392.
- [32] Klich, M.A.: “*Identification of Common Aspergillus Species*”, Amer Society for Microbiology, California, United States, (2002) 1-116
- [33] Latgé, J-P.: “*Aspergillus fumigatus* and aspergillosis”, *Clinical Micr. Rev.*, 12 (1999) 310-350.
- [34] Yuriko, Y.; Atsuro, H.; Issei, T.; Masaru N.: “PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis”, *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (1996) 2464–2468.
- [35] Brooks, G.F.; Morse, S.A.: “*Jawetz, Melnick&Adelberg’s Medical Microbiology*”, Publishing Division, 20. Edition, New York, (1995) 530-560.
- [36] Çolakoğlu, G.: “Airborne fungal spores at the Belgrad Forest near the city of İstanbul (Turkey) in the year 2001 and their relation to allergic diseases”, *Journal of Basic Microbiology*, 43 (2003) 376-384.
- [37] Masahiro, K.; Takafumi, F.; Seishi O.; Yukimasa, K.; Utako, M.; Yuji, T.; Yoshinobu, K.; Takeshi, K.; Yasuaki, Y.; Tamae, H.; Shin-ichiro, M.; Hideki, A.; Yoshitomo, M.; Hisashi, S.; Kazuoki, O.; Satoshi, K.; Hisamaru, H.: “Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis”, *Clinical Infectious Diseases*, 33 (2001) 1504–12.
- [38] Wallet, F.; Nseir, S.; Baumann, L.; Herwegh, S.; Sendid, B.; Boulo, M.; Roussel-Delvallez, M.; Durocher, A.V.; Courcol, R.J.: “Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood”, *Clinical Microbiology Infection*, 18 (2009) 1-6.
- [39] Rong, B.; Rajeev, K.S.; Muna, M.I.; Ibrahim, A.M.; Edna, A.; Marina, I.G.; Kishor, B.: “Monochrome LightCycler PCR assay for detection and quantification of five common species of *Candida* and *Aspergillus*”, *Journal of Medical Microbiology*, 54 (2005) 243–248.
- [40] Klingspor, L.; Jala, S.: “Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR” *Clinical Microbiology Infection* 12 (2006) 745–753.
- [41] Emma, E.M.J.; Nora M.C.; Choudhury, S.; Dunlop, A.A.S.; Towler, H.M.A.; Matheson, M.M.; Adamson, P.; Okhravi, N.; Lightman, S.: “Rapid

- detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR”, *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (2000) 2902-2908.
- [42] Türkoğlu, S.; Badur, S.: “İnfeksiyon hastalıkları tanısında PCR”, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını*, 22 (1995) 1-9.
- [43] Holmes, R.H.; Cannon, R.D.; Shepherd, M.G.; Jenkinson, H.F.: “Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR”, *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (1994) 228-231.
- [44] Jordan, J.A.: “PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair”, *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (1994) 2962-2967.
- [45] Melchers, W.J.G.; Verweij, P.E.; Hurk, P.; Belkum, A.; Pauw B.E.; Hoogkamp-Korstanje, J.A.A.; Meis, J.F.G.: “General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species”, *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (1994) 1710-1717.
- [46] Einsele, H.; Hebart, H.; Roller, G.; Löffler, J.; Rothenhöfer, I.; Müller, C.A.; Bowden, R.: “Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes”, *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (1997) 1353-1360.
- [47] Burik, J.; Myerson, D.; Schreckhise, R.W.; Bowden, R.A.: “Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens”, *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (1998) 1169-1175.
- [48] Sklandny, H.; Buchheidt, D.; Baust, C.; Schneider, F.; Seifarth, W.; Leib-Mösch, C.; Hehlmann, R.: “Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolarlavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR”, *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (1999) 3865-3871.
- [49] Turenne, C.; Sanche, S.E.; Hoban, D.J.; Karlowsky, J.A.; Kabani, A.M.: “Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system”, *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (1999) 1846-1851.
- [50] Khan, Z.U.; Mustafa, A.S.: “Detection of *Candida* species by polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and

- patients with suspected candidemia”, *Microbiological Research*, 156 (2001) 95-102.
- [51] Guiver, M.; Oppenheim, B.A.: “Rapid identification of *Candida* species by Taqman PCR”, *Journal Clinical Pathology*, 54 (2001) 362-366.
- [52] Loeffler, J.; Kloepfer, K.; Hebart, H.; Najvar, L.; Graybill, J.R.; Kirkpatrick, W.R.; Patterson, T.F.; Dietz, K.; Bialek, R.; Einsele, H.: “Polymerase chain reaction detection of *Aspergillus* DNA in experimental models of invasive aspergillosis”, *The Journal of Infections Diseases*, 185 (2002) 1203-1206.
- [53] Selverangan, R.; Limaye, A.P.; Cokkson, B.T.: “Rapid identification and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by capillary-based amplification and fluorescent probe hybridization”, *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (2002) 4308-4312.
- [54] Munoz, C.B.; Boldo, X.M.; Villa-Tanaca, L.; Rodriguez, C.H.: “Identification of *Candida* spp. by randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR methods”, *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (2003) 414-420.
- [55] Ellepola, A.N.B.; Hurst, S.F.; Elie, C.M.; Morrison, C.J.: “Rapid and unequivocal differentiation of *Candida dubliniensis* from other *Candida* species using species-specific DNA probes: Comparison with phenotypic identification methods”, *Oral Microbiology and Immunology*, 18 (2003) 379-388.
- [56] Imhof, A.; Schaer, C.; Schoedon, G.; Schaer, D.J.; Schaffner, A.; Schneemann, M.: “Rapid detection of pathogenic fungi from clinical specimens using LightCycler real-time fluorescence PCR”, *Clinical Microbiology Infection*, 22 (2003) 558-560.
- [57] Spiess, B.; Buchheidt, D.; Baust, C.; Skladny, H.; Seifarth, W.; Zeilfelder, U.; Leib-Mösch, C.; Mörz, H.; Hehlmann, R.: “Development of a LightCycler PCR assay for detection and quantification of *Aspergillus fumigatus* DNA in clinical samples from neutropenic patients”, *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (2003) 1811-1818.
- [58] Pryce, T.M.; Kay, I.D.; Palladino, S.; Heath, C.H.: “Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and

- Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients”, *Mycology*, 47 (2003) 487-496.
- [59] Challier, S.; Boyer, S.; Abachin, E.; Berche, P.: “Development of a serum-based Taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis”, *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (2004) 844-846.
- [60] Maaroufi, Y.; Ahariz, N.; Husson, M.; Crokaert, F.: “Comparison of different methods of isolation of DNA of commonly encountered *Candida* species and its quantitation by using a real-time PCR-based assay”, *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (2004) 3159-3163.
- [61] Millon, L.; Piarroux, R.; Deconinck, E.; Bulabois, C.; Grenouillet, F.; Rohrlich, P.; Costa, J.; Bretagn, S.: “Use of real-time PCR to process the first galactomannan-positive serum sample in diagnosing invasive aspergillosis”, *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (2005) 5097-5101.
- [62] Lass-Flörl, C.; Gunsilius, E.; Gastl, G.; Freund, M.; Dierich, M.P.; Petzer, A.: “Clinical evaluation of *Aspergillus*-PCR for detection of invasive aspergillosis in immunosuppressed patients”, *Mycoses*, 48 (2005) 12-17.
- [63] Klingspor, L.; Jajal, S.: “Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR”, *Clinical Microbiology Infection*, 12 (2006) 745-753.
- [64] Kontanis, E.J.; Reed, F.A.: “Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors”, *Journal of Forensic Science*, 51 (2006) 795-804.
- [65] Khlif, M.; Sellami, H.; Makni, F.; Cheikhrouhou, F.; Chelly, H.; Bouaziz, M.; Ayadi, A.: “Detection and identification of *Candida* sp. by PCR in candidemia diagnosis”, *Journal of Medical Mycology*, 17 (2007) 256-260.
- [66] Lau, A.; Chen, S.; Sorrell, T.; Carter, D.; Malik, R.; Martin, P.; Halliday, C.: “Development and clinical application of a panfungal per assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens”, *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (2007) 380-385.
- [67] Baskova, L.; Landlinger, C.; Preuner, S.; Lion, T.: “The pan-AC assay: A single-reaction real-time PCR test for quantitative detection of a broad range of *Aspergillus* and *Candida* species”, *Journal of Medical Mycology*, 56 (2007) 1167-1173.

- [68] Lau, A.; Chen, S.; Sorrell, T.; Chen, S.; Stanley, K.; Iredell, J.; Halliday, C.: “Multiplex tandem PCR: A novel platform for rapid detection and identification of fungal pathogens from blood culture specimens”, *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (2008) 3021-3027.
- [69] Pasqualotto, A.C.: “Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*”, *Medical Mycology*, 1 (2008) 1-10.
- [70] Vollmer, T.; Störmer, M.; Kleesiek, K.; Dreier, J.: “Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens”, *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (2008) 1919-1926.
- [71] Lau, A.; Sorrell, C.T.; Lee, O.; Stanley, K.; Halliday, C.: “Colony multiplex-tandem PCR for rapid, accurate identification of fungal cultures”, *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (2008) 4058-4060.
- [72] Dunyacha, C.; Bertouta, S.; Phelipeaub, C.; Drakulovskia, P.; Reynesc, J.; Mallié, M.: “Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler<sup>®</sup> real-time polymerase chain reaction”, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60 (2008) 263–271.
- [73] Carvalho, A.; Costa-De-Oliveira, S.; Martins, M.L.; Pina-Vaz.; Rodrigues, A.G.; Ludovico, P.; Rodrigues, F.: “Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species” *Medical Mycology*, 45 (2007) 619-627.
- [74] Bergman, A.; Fernandez, F.; Holmström, K.O.; Claesson, B.E.B.; Enroth, H.: “Rapid identification of pathogenic yeast isolates by real-time PCR and two-dimensional melting-point analysis”, *Journal of Clinical Microbiology Infection Diseases*, 26 (2007) 813-818.
- [75] Khan, Z.; Mustafa, A.S.; Alam, F.F.: “Real-time LightCycler polymerase chain reaction and melting temperature analysis for identification of clinically important *Candida* spp.”, *Journal of Microbiol Immunology Infection*, 42 (2009) 290-295.
- [76] Borman, A.M.; Linton, C.J.; Miles, S.J.; Johnson, E.M.: “Molecular identification of pathogenic fungi”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (2008) 7-12.

- [77] Wellinghausen, N.; Siegel, D.; Winter, J.; Gebert, S.: “Rapid diagnosis of candidaemia by real-time PCR detection of *Candida* DNA in blood samples”, *Journal of Medical Microbiology* 58 (2009) 1106–1111.
- [78] Soeta, N.; Terashima, M.; Gotoh, M.; Mori, S.; Nishiyama, K.; Ishioka, K.; Kaneko, H.; Suzutani, T.: “ An improved rapid quantitative detection and identification method for a wide range of fungi”, *Journal of Medical Microbiology* 58 (2009) 1037-1044.
- [79] Scheuller, M.C.; Murr, A.H.; Goldberg, A.N.; Mhatre, A.N.; Lalwani, A.K.: “Quantitative analysis of fungal DNA in chronic rhinosinusitis”, *Pubmed*, 114 (2004) 467-471.
- [80] Bretagne, S.: “Molecular diagnostics in clinical parasitology and mycology: Limits of the current polymerase chain reaction (PCR) assays and interest of the real-time PCR assays”, *Clinical Microbiology Infection*, 9 (2003) 505-511.
- [81] Yamamura, M.; Makimura, K.; Fujisaki, R.; Satoh, K.; Kawakami, S.; Nishiya, H.; Ota, Y.: “ Polymerase chain reaction assay for specific identification of *Candida guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*)”, *Journal of Infection Chemotherapy*, 15 (2009) 214-218.
- [82] Marinho1, S.A.; Teixeira, A.B.; Santos, O.S.; Cazanova, R.F.; Ferreira, C.A.S.; Oliveira, S.D.: “Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR”, *Brazilian Journal of Microbiology*, 41 (2010) 286-294.
- [83] Fricke1, S.; Fricke, C.; Schimmelpfennig, C.; Oelkrug, C.; Schönfelder, U.; Blatz, R.; Rodloff, A.C.: “ A real-time PCR assay for the differentiation of *Candida* species”, *Journal of Applied Microbiology*, 109 (2010) 1150-1158.
- [84] Nakamura, A.; Sugimoto, Y.; Ohishi, K.; Sugawara, Y.; Fujieda, A.; Monma, F.; Suzuki, K.; Masuya, M.; Nakase, K.; Matsushima, Y.; Wada, H.; Katayama, N.; Nobori, T.: “Diagnostic value of PCR analysis of bacteria and fungi from blood in empiric-therapy-resistant febrile neutropenia”, *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (2010) 2030-2036.
- [85] Mandviwala, T.; Shinde, R.; Kalra, A.; Sobel, J.D.; Akins, R.A.: “High-throughput identification and quantification of *Candida* species using high resolution derivative melt analysis of panfungal amplicons”, *Journal of Molecular Diagnostics*, 12 (2010) 91-101.

- [86] Hummel, M.; Spiess, B.; Cornely, O.A.; Dittmer, M.; Mörz, H.; Buchheidt, D.: “*Aspergillus* PCR testing: Results from a prospective PCR study within the AmBiLoad trial” , *European Journal of Haematology*, 85 (2010) 164–169.
- [87] White, P.L.; Perry, M.D.; Loeffler, J.; Melchers, W.; Klingspor, L.; Bretagne, S.; McCulloch, E.; Cuenca-Estrella, M.; Finnstrom, N.; Donnelly, J.P.; Barnes, R.A.: “ Critical stages of extracting DNA from *Aspergillus fumigatus* in whole-blood specimens”, *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (2010) 3753-3755.
- [88] White, P.L.; Bretagne, S.; Klingspor, L.; Melchers, W.; McCulloch, E.; Schulz, B.; Finnstrom, N.; Mengoli, C.; Barnes, R.A.; Donnelly, J.P.; Loeffler, J.: “*Aspergillus* PCR: One step closer to standardization”, *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (2010) 1231-1240.
- [89] Çerikçioğlu, N.; Aksu, B.; Demirel Dallı, T.; Deniz, U.; Bilgen H.S.; Özek, E.; Söyletir, G.: “Seminested PCR for detection and identification of *Candida* species directly from blood culture bottles”, *New Microbiologica*, 33 (2010) 57-62.
- [90] Börekçi, G.; Ersöz, G.; Otağ, F.; Öztürhan, H.; Şen, S.; Söylemez, F.; Akalın, H.; Özkul, Y.; Emekdaş, G.: “ Identification of *Candida* species from blood cultures with fluorescent in situ hybridization (FISH), polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and conventional methods”, *Trakya Universitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 27 (2010) 183-191
- [91] Gürol, Y.; Koç, Y.; Karaltı, İ.; Kipritçi, Z.; Tekkanat Tazegün, Z.; Kocagöz, S.; Kocagöz, T.; Çelik, G.: “ Galactomannan antigen test and real time PCR in diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic bone marrow transplant patients”, *Yeditepe Medical Journal*, 17 (2011) 343-348.
- [92] Yiğit, N.; Aktaş, A.E.; Uslu, H.: “ *Candida* suşlarının identifikasyonunda farklı yöntemlerin karşılaştırılması”, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 38 (2008) 83-86.
- [93] ID 32 C Kit Prospektüsü (Identification System for Yeasts), Biomerieux, Fransa, (2011) 1-3.
- [94] Sensititre YeastOne Antifungal Duyarlılık Test Kiti Prospektüsü, TREK Diagnostic Systems, UK, (2010) 1-10.

- [95] Kuştimur, S.: “Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tanısal Moleküler Mikrobiyoloji Teorik ve Uygulamalı Kursu”, G.Ü. İletişim Fakültesi Basımevi, Ankara, (2010) 1-160.
- [96] “Integrated Device Technology”, www.idt.com (01.05.2011).
- [97] Torosantucci, A.; Romagnoli, G.; Chiani, P.; Stringaro, A.; Crateri, P.; Mariotti, S.; Teloni, R.; Arancia, G.; Cassone, A.; Nisini, R.: “*Candida albicans* yeast and germ tube forms interfere differently with human monocyte differentiation into dendritic cells: A novel dimorphism-dependent mechanism to escape the host’s immune response”, *American Society for Microbiology*, 72 (2004) 833–843.
- [98] Murray, C.K.; Beckius, M.L.; Green, J.A.; Hospenthal, D.R.: “Use of chromogenic medium in the isolation of yeasts from clinical specimens”, *Journal of Medical Microbiology*, 54 (2005) 981-985.
- [99] Sahand, I.H.; Maza, J.L.; Eraso, E.; Montejo, M.; Moragues, M.D.; Aguirre, J.M.; Quindo, G.; Ponton, J.: “Evaluation of CHROM-Pal medium for the isolation and direct identification of *Candida dubliniensis* in primary cultures from the oral cavity”, *Journal of Medical Microbiology*, 58 (2009) 1437–1442.
- [100] Kaçmaz, B.; Sipahi, A.B.; Aksoy, A.: “*Candida* türlerinin tanımlamasında “API ID 32C” ve “Rapid Yeast Plus” sistemlerinin karşılaştırılması”, *Ankem Dergisi*, 20 (2006) 214-216.
- [101] Linton, C.J.; Borman, A.M.; Cheung, G.; Holmes, A.D.; Szekely, A.; Palmer, M.D.; Bridge, P.D.; Campbell, C.K.; Johnson, E.M.: “Molecular identification of unusual pathogenic yeast isolates by large ribosomal subunit gene sequencing: 2 years of experience at the United Kingdom Mycology Reference Laboratory”, *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (2007) 1152-1158.
- [102] Vennewald, I.; Schönlebe, J.; Klemm, E.: “Mycological and histological investigations in humans with middle ear infections”, *Mycoses*, 46 (2003) 12-18.
- [103] Osazuwa, F.; Nwofor, Q.; Ibeh, I.N.: “Aetiologic agents of otitis media in Benin City, Nigeria”, *Research Journal of Medical Sciences*, 5 (2011) 112-115.

- [104] Gautam, A.K.; Sharma, S.; Avasthi, S.; Bhadauria, R.: “Diversity, pathogenicity and toxicology of *A. niger*: An important spoilage fungi”, *Research Journal of Microbiology*, 6 (2011) 270-280.
- [105] Castón, J.; Linares, M.J.; Gallego, C.; Font, P.; Solís, F.; Casal, M.; Torre-Cisneros, J.; “Risk factors for pulmonary *Aspergillus terreus* infection in patients with positive culture for filamentous fungi”, *Chest*, 131 (2007) 230-236.
- [106] Salas, V.; Pastor, F.J.; Rodriguez, M.M.; Calvo, E.; Mayayo, E.; Guarro, J.: “In vitro activity and in vivo efficacy of posaconazole in the treatment of murine infections by different isolates of the *Aspergillus terreus* complex”, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55 (2011) 676-679.
- [107] Rabenau, H.F.; Kessler, H.; Kortenbusch, M.; Steinhorst, A.; Raggamb, R.B.; Berger, A.: “Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology”, *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (2007) 93-98.
- [108] Iwen, P.C.; Freifeld, A.G.; Bruening, T.A.; Hinrichs, S.H.: “Use of a panfungal PCR Assay for detection of fungal pathogens in a commercial blood culture system”, *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (2004) 2292–2293.
- [109] Maaroufi, Y.; Heymans, C.; De Bruyne, J.; Duchateau, V.; Rodriguez-Villalobos, H.; Aoun, M.; Crokaert, F.: “Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a Taqman-based PCR assay”, *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (2003) 3293–3298.
- [110] Arancia, S.; Carattoli, A.; La Valle, R.; Cassone, A.; De Bernardis, F.: “Use of 65 kDa mannoprotein gene primers in real time PCR identification of *Candida albicans* in biological samples”, *Molecular and Cellular probes*, 23 (2009) 218-226.
- [111] Chryssanthou, E.: “Trends in antifungal susceptibility among Swedish *Candida* species bloodstream isolates from 1994 to 1998: Comparison of the E-test and the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A reference method”, *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (2001) 4181–4183.
- [112] Espinel-Ingroff, A.; Pfaller, M.; Messer, A.S.; Knapp, C.C.; Killian, S.; Norris, H.A.; Ghannoum, M.A.: “Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the National Committee for

- Clinical Laboratory Standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and other yeasts and yeast-like organisms”, *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (1999) 591–595.
- [113] Martina, R.; Wächtler, B.; Schaller, M.; Wilson, D.; Hube, B.: “Host–pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections”, *International Journal of Medical Microbiology*, 301 (2011) 417–422.
- [114] Wächtler, B.; Wilson, D.; Haedicke, K.; Dalle, F.; Hube, B.: “From attachment to damage: Defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells”, *Plos One*, 23 (2011) 1–14.
- [115] Balkan, I.I.; Savaş, A.; Geduk, A.; Yemisen, M.; Mete, B.; Ozaras.: “*Candida glabrata* perinephric abscess”, *The Eurasian Journal of Medicine*, 43 (2011) 63–65.
- [116] de Toro, M.; Torres, M.J.; Maite, R.; Aznar, J.: “Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates”, *Clinical Microbiology and Infection*, 17 (2011) 418–424.
- [117] Borghi, E.; Sciota, R.; Iatta, R.; Biassoni, C.; Montagna, M.T.; Morace, G.: “Characterization of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from invasive fungal infections”, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30 (2011) 1–5.
- [118] Tortorano, A.M.; Biraghi, E.; Astolfi, A.; Ossi, C.; Tejada, M.; Farina, C.; Perin, S.; Bonaccorso, C.; Cavanna, C.; Raballo, A.; Grossi, A.: “European Confederation of Medical Mycology (ECMM) prospective survey of candidaemia: report from one Italian region”, *Journal of Hospital Infection*, 51 (2002) 297–304.
- [119] Almirante, B.; Rodríguez, D.; Cuenca-Estrella, M.; Almela, M.; Sanchez, F.; Ayats, J.; Alonso-Tarres, C.; Rodríguez-Tudela, J.L.; Pahissa, A.: “Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: Case–control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003”, *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (2006) 4181–4183.

- [120] Pfaller, M.A.; Diekema, D.J.: “Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem”, *Clinical Microbiology Reviews*, 20 (2007) 133–163.
- [121] Willke, A.: “Kandidemi: Nasıl değerlendirilmeli ne yapılmalı?”, *Turkish Journal of Infection*, 21 (2007) 117-122.
- [122] Koçoğlu, E.; Bayram, A.; Balcı, İ.: “Klinik örneklerden izole edilen kandida türleri ve antifungal duyarlılıkları”, *Van Tıp Dergisi*, 12 (2005) 195-200.

## ÖZGEÇMİŞ

12.10.1981 tarihinde Zonguldak'ta doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Zonguldak'ta tamamladım. Liseyi İstanbul Kartal Fatin Rüştü Zorlu Lisesi'nde 1998 yılında bitirdim. Aynı yıl Dumlupınar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü' nü kazandım. 2002 yılında üniversiteden mezun oldum. 2003 yılında Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım ve 2006 yılında tamamladım. 2005 yılında Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalışmaya başladım. 2007 yılında Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimime başladım. Halen aynı anabilim dalında doktora eğitimime devam etmekteyim ve Yeditepe Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Sorumlu Biyolog olarak çalışmaktayım.

## EK II-5 Kabul ve Onay Belgesi

**T.C.**  
**MARMARA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

### **KABUL ve ONAY BELGESİ**

İSKENDER KARALTI'nın *CANDIDA* ve *ASPERGILLUS* ENFEKSİYONLARININ REAL TIME PCR YÖNTEMİ ile HIZLI TANISININ KÜLTÜR YÖNTEMİ ile KARŞILAŞTIRILMASI ve ANTİFUNGAL DİRENCİN KOLORİMETRİK YÖNTEMLE TAYİNİ başlıklı Lisansüstü tez çalışması, M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 06.06.2011 tarih ve 2011/11-10 sayılı kararı ile oluşturulan jüri tarafından BİYOLOJİ Anabilim Dalı ...*Biyoloji* Programında ~~YÜKSEK LİSANS~~/DOKTORA Tezi olarak Kabul edilmiştir.

Danışman : (Prof.Dr. Günay T. ÇOLAKOĞLU)(Marmara Ü.)

1. Üye : (Prof.Dr. Memduh SERİN)( Marmara Ü.)

2. Üye : (Prof.Dr. Gülden ÇELİK)( Yeditepe Ü.)

3. Üye : (Prof.Dr. Meral ÜNAL)( Marmara Ü.)

4. Üye : (Prof.Dr. Muammer ÜNAL)( İstanbul Ü.)

Tezin Savunulduğu Tarih : 20.06.2011

### **ONAY**

M.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun *06/07/2011* tarih ve *2011/13-03* sayılı kararı ile *İskender KARALTI* .....'nın *BİYOLOJİ* ..... Anabilim Dalı *BİYOLOJİ* Programında ~~Y.~~Lisans ~~(MSc.)~~ / Doktora (Dr, PhD.) derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü  
Prof. Dr. Meral ÜNAL

