

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
CANDİDA' LARIN KARAKTERİZASYONU
VE ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARI
Doktora Tezi**

Mine AYDIN KURÇ

Eskişehir, 2017

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA*' LARIN
KARAKTERİZASYONU VE ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARI**

Mine AYDIN KURÇ

DOKTORA TEZİ

**Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN
İkinci Danışman: Prof. Dr. Ayşe Demet KAYA**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Nisan, 2017**

Bu Tez Çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1110F168 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Mine AYDIN KURÇ' un "Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida*' ların Karakterizasyonu ve Antifungal Duyarlılıkları" başlıklı tezi 11/04/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN	
Üye	: Prof. Dr. Safiye Elif KORCAN	
Üye	: Doç. Dr. M. Burçin MUTLU	
Üye	: Doç. Dr. İlhami ÇELİK	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Sevim Feyza ERDOĞMUŞ	

Enstitü Müdürü

ÖZET

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA*'LARIN KARAKTERİZASYONU VE ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARI

Mine AYDIN KURÇ

Biyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nisan, 2017

Danışman: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

İkinci Danışman: Prof. Dr. Ayşe Demet KAYA

Klinik örneklerden izole edilen maya türlerinin tanımlanarak, antifungal duyarlılık profillerinin belirlenmesi, hızlı ve doğru tedavi için önemlidir. Bu çalışmanın amacı; vajinal sürüntü ve idrar örneklerinden izole edilen *Candida* cinsi maya türlerinin klasik yöntemler, kromojenik besiyerleri, otomatize sistemler kullanılarak tanımlanması; tanıda moleküler yöntemlerin yerinin araştırılması; ayrıca *Candida* infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan çeşitli ajanlara karşı antifungal duyarlılıkların izolatların minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) düzeylerinin saptanarak belirlenmesidir.

Çalışmamızda toplam 100 izolat; germ tüp oluşumu, mısır unlu (corn meal) - tween 80 agar morfolojisi; kromojenik besiyerlerinden CHROMagar *Candida*, *Candida* ID, Brilliance *Candida* Agar, BIGGY Agar ile tanımlanmış ve identifikasyonları VITEK 2-YST kart ile karşılaştırılmıştır. İzolatların fenotipik akrabalık ilişkileri yağ asidi metil esterleri (FAME) analizi ile cluster analizi yapılarak belirlenmiştir. Ayrıca farklı türlerin DNA dizi analiziyle türler arası yakınlık veya uzaklıkları izolatların ITS ve 26S D1/D2 bölgeleri PCR-Restriksiyon Enzim Analizi (REA) ile kesilerek oluşan farklı profillerden tespit edilmiş ve izolatlar; *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* ve *C. dubliniensis* olarak tanımlanmıştır.

İzolatların in vitro antifungal duyarlılık profilleri, Mikrodilüsyon Yöntemi (MDY) ve VITEK 2 AST-Y06 kart yöntemleri ile çalışılmış, sonuçlar karşılaştırılmıştır. Flukonazol dışındaki tüm antifungallerde %100 duyarlılık tespit edilmiş; ancak flukonazol için izolatlarda %5,1 oranında direnç belirlenmiştir. Ayrıca bazı antifungallerde MİK değerlerinin kullanılan yöntemle göre daha farklılık gösterdiği görülmüştür.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, moleküler yöntemlerin *Candida* türlerinin tanımlanmasında alternatif oluşturabileceğini göstermekle birlikte, bu konuda daha fazla çalışmaya gereksinim bulunmaktadır. İzolatların test edilen antifungal ajanlara çoğunlukla duyarlı olmasına rağmen, flukonazol direncinin saptanması mayaların tür düzeyinde tanımlanmasının ve antifungal duyarlılık testi yapılmasının önemini bir kez daha ortaya koymaktadır.

Anahtar Sözcükler: *Candida* sp., identifikasyon, FAME, dizi analizi, antifungal duyarlılık

ABSTRACT

CHARACTERIZATION AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITIES OF *CANDIDA* SPECIES ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES

Mine AYDIN KURÇ

Department of Biology

Anadolu University, Graduate School of Sciences, April, 2017

Supervisor: Prof. Dr. Kıymet GÜVEN

Co-Supervisor: Prof. Dr. Ayşe Demet KAYA

Identification of yeast isolates from clinical specimens and determination of antifungal susceptibilities are essential for rapid and accurate treatment. The aim of this study was, to identify *Candida* species isolated from vaginal swabs and urine samples by conventional methods, chromogenic media, automated systems and determine the role of molecular methods for diagnosis and to investigate antifungal susceptibilities of isolates against various agents by determining minimal inhibition concentration (MIC) levels.

A total of 100 isolates were isolated and identified by germ tube formation, corn meal - tween 80 agar morphology; CHROMagar *Candida*, *Candida* ID, Brilliance *Candida* Agar, BIGGY Agar as chromogenic media, VITEK 2-YST commercial kits were used for identification and the results were compared. Fatty Acid Methyl Esters (FAME) of isolates were analyzed to determine relationship of isolates in regard to fatty acids by cluster analysis. In addition, different profiles which were obtained from cutting of ITS and 26S D1/D2 regions of isolates by PCR- Restriction Enzyme Analysis were determined and the distance among species was examined by DNA sequence analysis. According to the results, isolates were identified as; *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* and *C. dubliniensis*.

In-vitro antifungal susceptibility profiles of isolates were studied by using Microdilution Method and VITEK 2 AST-Y06 card methods and the results were compared. 100 % sensitivity was detected for all antifungals except fluconazole; but 5.1 % of isolates were resistant to fluconazole. In addition, MIC values showed differences due to the method used, for some antifungals.

Our results demonstrated, molecular techniques to be an alternative for identification of *Candida* species, but more studies are needed. The majority of the isolates were found to be susceptible to the tested antifungal agents, but the presence of fluconazole resistance in some isolates showed the importance of identification of the yeasts to species level and determine antifungal susceptibility testing results, in daily practice.

Keywords: *Candida* sp., identification, FAME, sequence analysis, antifungal susceptibility

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam esnasında beni yönlendiren, bilgisini, yardımlarını ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Kıymet GÜVEN ve Prof. Dr. Ayşe Demet KAYA' ya, deneysel çalışmalarımın analizleri sırasında yardımlarından dolayı Doç. Dr. Rasime DEMİREL' e, yardım ve desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Dumrul GÜLEN, Yrd. Doç. Dr. Berna ERDAL YILDIRIM ve arkadaşım Arş. Gör. Arzu MALAK' a, mikrobiyoloji laboratuvarında çalışan tüm hocalarım ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tez izleme komitesinde bulunan hocalarım Doç. Dr. Mehmet Burçin MUTLU ve Doç.Dr. İlhami ÇELİK' e verdikleri destek nedeniyle teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazım sürecinde yardım ve desteklerinden dolayı eşim H. Cömert KURÇ' a teşekkür ederim.

Bu aşamaya gelirken her zaman yanımda yer alan, bana maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan değerli aileme tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Mine AYDIN KURÇ

Nisan, 2017

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Mine AYDIN KURÇ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Candida</i> ' ların Tarihçesi ve Sınıflandırılması	2
1.2. <i>Candida</i> ' ların Genel Özellikleri.....	3
1.3. Tıbbi Önemi Olan Bazı <i>Candida</i> ' ların Özellikleri.....	5
1.3.1. <i>Candida albicans</i>	5
1.3.2. <i>Candida glabrata</i>	6
1.3.3. <i>Candida tropicalis</i>	6
1.3.4. <i>Candida parapsilosis</i>	7
1.3.5. <i>Candida dubliniensis</i>	8
1.3.6. <i>Candida guilliermondii</i>	8

1.3.7. <i>Candida lusitaniae</i>	9
1.3.8. <i>Candida kefyr</i>	9
1.3.9. <i>Candida krusei</i>	9
1.4. <i>Candida</i> Türlerinin Virulans Faktörleri	10
1.5. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarının Patogenezi	12
1.6. <i>Candida</i> Türlerinin Neden Olduğu İnfeksiyonlar	13
1.6.1. Kutanöz ve mukozal kandidoz	13
1.6.2. Kronik mukokutanöz kandidoz	16
1.6.3. Sistemik kandidoz	16
1.6.4. Diğer <i>Candida</i> infeksiyonları	17
1.7. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi	18
1.8. <i>Candida</i> Türlerinin İdentifikasyonu	20
1.8.1. Geleneksel yöntemler	20
1.8.2. Germ tüp (Çimlenme borusu) testi	20
1.8.3. Hif, blastospor ve klamidospore yapımı	21
1.8.4. Kromojenik besiyerleri ile identifikasyon	22
1.8.4.1. CHROMagar <i>Candida</i>	22
1.8.4.2. <i>Candida</i> Ident agar	23
1.8.4.3. Bismuth Sulfite-Glucose-Glycine Yeast (BIGGY) agar	23
1.8.4.4. Brilliance <i>Candida</i> agar (OCCA)	23

1.8.5. Biyokimyasal identifikasyon	24
1.8.6. Hızlı identifikasyon testleri.....	24
1.8.6.1. VITEK 2 ID-YST Sistem.....	25
1.8.7. Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) analizi	25
1.8.8. Serolojik Testler.....	26
1.8.9. Moleküler yöntemler	27
1.8.9.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	29
1.8.9.1.1. Restriksiyon Enzim Analizi (REA).....	30
1.8.9.1.2. Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)	30
1.8.9.1.3. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD).	30
1.8.9.1.4. Elektroforetik Karyotipleme (EK).....	31
1.8.9.1.5. Multilokus Dizi Tiplendirmesi (MLST).....	31
1.8.9.1.6. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNPs)	31
1.8.9.1.7. DNA Microarray yöntemi	31
1.8.9.1.8. DNA Dizi Analizi	32
1.9. Antifungal İlaçlar.....	32
1.9.1. Poliyen antifungaller	33
1.9.1.2. Amfoterisin B ve lipid formülasyonları	34
1.9.2. Primidin sentezi inhibitörleri (Antimetabolitler).....	35

1.9.2.1. Flusitozin (5-fluorositozin, 5FC)	35
1.9.3. Glukan sentez inhibitörleri	36
1.9.3.1. Kaspofungin	36
1.9.4. Azoller	37
1.9.4.1. Flukonazol	38
1.9.4.2. Vorikonazol	39
1.9.5. Alilaminler	40
1.10. Antifungal İlaçlara Direnç.....	41
1.11. Antifungal Duyarlılık Testleri	43
1.11.1. Makrodilüsyon yöntemi	43
1.11.2. Mikrodilüsyon yöntemi.....	44
1.11.3. Agar dilüsyon yöntemi.....	45
1.11.4. Disk difüzyon yöntemi	46
1.11.5. Flovsitometrik yöntemler	46
1.11.6. Kolorimetrik yöntemler.....	47
1.11.7. Spektrofotometrik yöntemler.....	47
1.11.8. Ticari olarak geliştirilen antifungal duyarlılık testleri.....	47
1.11.8.1. VITEK 2 antifungal testi (AST-YS kart).....	48
2. MATERYAL VE METOD.....	49
2.1. Materyal.....	49

	<u>Sayfa</u>
2.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri.....	49
2.1.1.1. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA).....	49
2.1.1.2. Mısır Unlu-Tween 80 Agar (Corn Meal Agar).....	49
2.1.1.3. CHROMagar Candida besiyeri	50
2.1.1.4. Candida Ident agar.....	50
2.1.1.5. BIGGY agar	51
2.1.1.6. Brilliance Candida agar	51
2.1.1.7. Yeast Ekstrakt Pepton Dekstroz (YPD) agar	52
2.1.1.8. Yeast Ekstrakt Pepton Dekstroz (YPD) broth	52
2.1.1.9. RPMI 1640 besiyerinin hazırlanışı	52
2.1.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler	53
2.1.2.1. Yağ asidi analizi çözeltileri	53
2.1.2.2. Moleküler identifikasyon için kullanılan çözeltiler	54
2.1.3. Antifungal duyarlılık testi için hazırlanan antifungal maddeler...	55
2.2. Metod.....	57
2.2.1. Örneklerin toplanması	57
2.2.2. Geleneksel yöntemlerle identifikasyon	57
2.2.2.1. Germ Tüp testi	57
2.2.2.2. Mısır Unlu-Tween 80 Agar'da morfolojik özelliklerin belirlenmesi	57
2.2.2.3. Kromojenik besiyerleriyle identifikasyon	58

	<u>Sayfa</u>
2.2.2.3.1. CHROMagar Candida.....	58
2.2.2.3.2. Candida Ident agar	58
2.2.2.3.3. BIGGY agar	58
2.2.2.3.4. Brilliance Candida agar	58
2.2.3. Hızlı identifikasyon testi ile tanımlama.....	59
2.2.3.1. VITEK 2 ID-YST Sistem	59
2.2.4. Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) analizi	60
2.2.5. Moleküler yöntemlerle identifikasyon	61
2.2.5.1. DNA izolasyonu	61
2.2.5.2. Gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu	62
2.2.5.3. Restriksiyon Enzim Analizi (REA).....	64
2.2.5.4. PCR ürünlerinin saflaştırılması	65
2.2.5.5. PCR ürünlerinden dizi analizi	65
2.2.5.6. Gen dizilerinin analizi	65
2.2.6. Çalışılan antifungal duyarlılık testleri	66
2.2.6.1. Mikrodilüsyon yöntemi	66
2.2.6.2. VITEK 2 Sistem ile antifungal duyarlılık	68
3. BULGULAR	69
3.1. Çalışmaya Alınan İzolatlar	69
3.2. İzolatların Geleneksel Yöntemlerle İdentifikasyonları	69
3.3. Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi	84

	<u>Sayfa</u>
3.4. Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyon	92
3.4.1. DNA izolasyonu.....	92
3.4.2. Gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu	93
3.4.3. Restriksiyon Enzim Analizi (REA).....	96
3.4.4. PCR ürünlerinden dizi analizi	105
3.4.5. Gen dizilerinin filogenetik analizi	108
3.5. Antifungal Duyarlılık Testleri Sonuçları	111
4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	117
KAYNAKÇA	143
ÖZGEÇMİŞ	171

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. CLSI Antifungal ilaç MİK değerleri	45
Tablo 2.1. YST kart test substratları	59
Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan primerler	62
Tablo 2.3. CAS, 5FC, FLU dilüsyonlarının hazırlanma şeması	66
Tablo 2.4. VOR ve AMB dilüsyonlarının hazırlanma şeması	67
Tablo 3.1. Geleneksel yöntemler ve VITEK 2 identifikasyonların karşılaştırılması..	77
Tablo 3.2. İzolatların FAME analizi sonuçları (%)	85
Tablo 3.3. İzolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri	105
Tablo 3.4. Antifungallere karşı izolatların MİK değerleri	112

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Fungal rDNA Bölgesi	28
Şekil 1.2. Amfoterisin B' nin kimyasal formülü	35
Şekil 1.3. Flusitozin' in kimyasal formülü	36
Şekil 1.4. Kaspofungin' in kimyasal formülü	37
Şekil 1.5. Flukonazol' un kimyasal formülü	39
Şekil 1.6. Vorikonazol' un kimyasal formülü	40
Şekil 2.1. Hedef genlere primerlerin bağlanma bölgeleri	63
Şekil 3.1. Germ tüp oluşumu	69
Şekil 3.2. Y-3 ve Y-16 izolatlarının mısır unlu tween 80 agar'da görünümü	70
Şekil 3.3. Y-49 ve Y-60 izolatlarının mısır unlu tween 80 agar'da görünümü	71
Şekil 3.4. Y-75 ve Y-85 izolatlarının mısır unlu tween 80 agar'da görünümü	71
Şekil 3.5. Y-3 ve Y-5 izolatlarının BIGGY Agar koloni morfolojisi ve rengi	72
Şekil 3.6. Y-49 ve Y-71 izolatlarının Biggy Agar koloni morfolojisi ve rengi	72
Şekil 3.7. Y-25, Y-38 ve Y-91 (altta) izolatının Brilliance Candida Agar koloni morfolojisi ve rengi	73
Şekil 3.8. Y-20, Y-58 ve Y-79 (altta) izolatlarının Candida Ident Agar koloni morfolojisi ve rengi	74
Şekil 3.9. Y-85, Y-86, Y-87 ve Y-88 izolatlarının CHROMagar koloni morfolojisi ve rengi	75
Şekil 3.10. Yağ asitleri profillerine göre izolatlar ve standart suşlar arasındaki benzerlik dendrogramı	90
Şekil 3.11. İzolatların DNA izolasyonuna ait jel görüntüsü	93

Şekil 3.12. İzolatların ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin amplifikasyon ürünlerine ait jel görüntüsü	94
Şekil 3.13. İzolatların D1/D2 bölgesinin amplifikasyon ürünlerine ait jel görüntüsü..	95
Şekil 3.14. İzolatların ITS bölgesi <i>Hinf</i> I enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası	97
Şekil 3.15. Bazı izolatların ITS bölgesi <i>Hinf</i> I enzim ile kesimi	97
Şekil 3.16. İzolatların ITS bölgesi <i>Hae</i> III enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası	98
Şekil 3.17. Bazı izolatların ITS bölgesi <i>Hae</i> III enzim ile kesimi	98
Şekil 3.18. İzolatların ITS bölgesi <i>Dde</i> I enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası	99
Şekil 3.19. Bazı izolatların ITS bölgesi <i>Dde</i> I enzim ile kesimi	99
Şekil 3.20. İzolatların ITS bölgesi <i>Bfa</i> I enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası	100
Şekil 3.21. Bazı izolatların ITS bölgesi <i>Bfa</i> I enzim ile kesimi	100
Şekil 3.22. İzolatların D1/D2 bölgesi <i>Hinf</i> I enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası	101
Şekil 3.23. Bazı izolatların D1/D2 bölgesi <i>Hinf</i> I enzim ile kesimi	101
Şekil 3.24. İzolatların D1/D2 bölgesi <i>Hae</i> III enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası	102
Şekil 3.25. Bazı izolatların D1/D2 bölgesi <i>Hae</i> III enzim ile kesimi	102
Şekil 3.26. İzolatların D1/D2 bölgesi <i>Dde</i> I enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası	103
Şekil 3.27. Bazı izolatların D1/D2 bölgesi <i>Dde</i> I enzim ile kesimi ve profil numarası	103

Şekil 3.28. İzolatların D1/D2 bölgesi <i>Bfa</i> I enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası	104
Şekil 3.29. Bazı izolatların D1/D2 bölgesi <i>Bfa</i> I enzim ile kesimi ve profil numarası	104
Şekil 3.30. İzolatların ITS bölgesi dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi	109
Şekil 3.31. İzolatların D1/D2 bölgesi dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerinin Belirlenmesi	110

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
g	: Gram
M	: Molar
BLAST	: Basic Local Aligment Search Tool
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FAME	: Yağ Asidi Metil Esterleri
FDA	: U.S. Food and Drug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi)
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RE	: Restriksiyon Endonükleaz
rDNA	: Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit

1. GİRİŞ

Candida’ lar, insan vücudunda normal flora üyesi olarak bulunmaktadır. *Candida* türleri, insanlarda özellikle oral ve vajinal infeksiyonlara neden olan fırsatçı ajanlardır. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda en sık rastlanan ve en önemli fungal patojenler mayalar olup; bunlar arasında da en sık *Candida* türlerinin izlendiği bildirilmektedir. Klinik örneklerden soyutlanan *Candida* türünün belirlenmesi, antifungal ilaçlara duyarlılık hakkında bilgi vererek ampirik tedavi seçimine de ışık tutabilmesi nedeniyle, soyutlanan suşların hızlı, güvenilir ve doğru identifikasyonu büyük önem taşımaktadır.

Araştırmamızın konusunu, Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarına kadın doğum ve diğer polikliniklerden gelen vajinal ve üriner örneklerden izole edilen *Candida* cinsi maya türlerinin klasik yöntemlerle, hızlı ve güvenilir identifikasyonu amacıyla moleküler yöntemlerin kullanılması, ayrıca *Candida* infeksiyonlarının tedavisinde kullanılan çeşitli ajanlara karşı antifungal duyarlılıkların araştırılarak MİK düzeylerini belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda hem geleneksel standart yöntemler, hem de moleküler identifikasyon yöntemleri kullanılmıştır. Geleneksel yöntemlerde; germ tüp oluşumu, mısır unlu (corn meal) - tween 80 agar morfolojisi, hızlı tanıyı sağlayan kromojenik besiyerlerinden CHROMagar *Candida*, *Candida* ID, Brilliance *Candida* Agar, BIGGY agar ve ticari kitlerden VITEK 2-YST kart ile identifiye edilerek, geleneksel yöntemler ile otomatize sistemlerde elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. FAME analizinin yapılarak yağ asitlerine göre örneklerin tanımlanmaları değerlendirilmiştir. Ayrıca moleküler yöntemlerden PCR-REA analizinin farklı primerler kullanılarak profiller değerlendirilmiş ve sonuçlara göre çıkan farklı türlerin DNA dizi analiziyle türler arası yakınlık veya uzaklıkları belirlenmiştir. İzolatların in vitro antifungal duyarlılık profilleri mikrodilüsyon yöntemi ve VITEK 2 AST-Y06 kart yöntemleri ile çalışılarak, sonuçlar karşılaştırılmıştır.

1.1. *Candida*' ların Tarihçesi ve Sınıflandırılması

Candida' lar ile ilgili ilk bilgiler, M.Ö IV. yüzyılda Hippocrates'in ağızdaki pamukçuğu tanımlamasına kadar uzanmaktadır. Rosen von Rosenstein 1771 yılında, ağızdaki pamukçuğun invazif olarak akciğerlere yerleşebildiğini bildirmiştir. Bernard Langenbeck 1839 yılında, tifo nedeniyle ölmüş bir hastanın özefageal mukozasından soyutladığı *Candida* türü fungusu bir parazit olarak tanımlayarak tifoyla ilişkili olduğunu ileri sürmüştür. Langenbeck' in soyutladığı bu organizma Gruby tarafından 1842' de *Sporotrichum* türü olarak tanımlanmıştır. Aynı yıllarda Berg tarafından deneysel olarak oral aft modeli oluşturulması bu konudaki ilk ve en önemli adım olmuştur (Edwards 2010; Calderone 2002).

Mantar, Robin tarafından *Oidium albicans* olarak (1847) sınıflandırılmış, 1849'da Frank ve Wilkinson ağızdaki lezyonun genital organlarda olabileceğini ortaya koymuşlardır. Roth Berkhout 1923' te pamukçuk etkeni olan mikroorganizmaya isim olarak *Candida*' yı önermiştir. 1940 yılı ve sonrasında *Candida* infeksiyonlarının artmasıyla bu konudaki çalışmalar hızlanmıştır (Edwards 2010; Calderone 2002).

Candida' lar eşeyli ve eşeysiz üreme şekilleri temel alınarak sınıflandırılırlar. Eşeysiz üreme gösteren tüm *Candida* türleri; fungusların *Deuteromycota* (Fungi Imperfecti) bölümünde, *Blastomycetes* sınıfının *Cryptococcales* takımında *Cryptococcaceae* ailesinde, eşeyli üreme gösteren türler *Ascomycotina* bölümü, *Ascomycetes* sınıfı, *Saccharomycetales* takımı içinde sınıflandırılmaktadır (Yücel ve Kantarcıoğlu 1999; Murray ve ark. 2007).

Cryptococcaceae ailesinin *Candida* cinsinde yaklaşık 200 tür olduğu düşünülmektedir. Bu türler arasındaki taksonomik ilişkiler tam olarak belirlenememiştir. Bu cins içerisinde en fazla karşılaşılan etken *C. albicans*' tır. Tıbbi önemi olan diğer türler; *C. catenulata*, *C. ciferrii*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. haemulonii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. pulcherrima*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. viswanathii*, *C. zeylanoides*'dir. *Clavispora*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Stephanoascus*, *Metschnikowia*, *Zyzoascus*, *Arxiozyma*, *Yarrowia*, *Kuyveromyces*, *Pichia* cinsleri ise *Candida* türleri arasında farklı teleomorfik cinsler olarak tanımlanmıştır (de Hoog ve ark. 2000; Hazen ve Howell 2009).

1.2.Candida' ların Genel Özellikleri

Candida türleri insan vücudunda normal flora üyesi olmakla birlikte, doğada da yaygın olarak bulunan maya fungusları olup klinik mikrobiyolojide mantar olarak adlandırılmaktadır. Birçok bitkide bulunabildikleri gibi, özellikle memelilerde gastrointestinal sistem başta olmak üzere mukokutanöz membranlarda bulunurlar. *Candida*' lar normal flora üyesi olmalarına karşın, immun sistemi zayıflamış kişilerde ciddi sistemik infeksiyonlara yol açmaktadırlar (Ener 2011).

Candida' lar; tek hücreli, ökaryotik, tomurcuklanarak çoğalan, 3-6 µm boyutlarında, kapsülsüz, yuvarlak veya oval mayalardır. Tomurcuklanan hücrelere blastokonidya (blastospor) adı verilir. *Candida*' ların üremesi sırasında oluşan blastokonidyumlar ana hücreden ayrılmayarak 5-10 µm boyutlarında yalancı hif oluşturabilirler. *Candida*' lar bir hifin ucunda veya arasında bulunan, tek hücreli, kalın duvarlı, geniş oval yapılı klamidospor oluşturabilirler. *Candida*' ların diğer türlerinden farklı olarak *C. albicans* dimorfiktir; maya hücresi ve yalancı hiflere ek olarak gerçek hifler oluşturmaktadırlar (Tümbay 1999; Mitchell 2010).

Mayalar ökaryotik hücreler olmalarından dolayı membranla çevrili bir çekirdek içerirler. Çekirdeklerinin içinde, bir çekirdekçik ile lineer kromozomlar bulunmaktadır. Sitoplazmalarında; mitokondri, golgi aygıtı, vakuoller, çeşitli veziküller ve 80-S ribozomlar yer almaktadır. Ayrıca sitoplazmada hücre duvarı ve hücre membranı ile bağlantılı hücre iskeleti bulunmaktadır (Lehmann 1998).

Candida' lar sert yapıda hücre duvarına sahiptirler. Hücre duvarı; mantar hücresine şeklini verir, bununla birlikte moleküllerin hücre içi ve dışına geçişinde, mantar-konak etkileşiminde ve virulansta rol oynamaktadır. Çok katlı hücre duvarında temel olarak; %80-90 oranında karbonhidratlar, %6-25 oranında proteinler ve %1-7 oranında lipidler bulunmaktadır (Calderone ve Braun 1991; Martinez ve ark. 1998; Kantarcıoğlu ve Yücel 2004). Karbonhidratların yapısı mannoproteinlerden (%20-30), betaglukanlardan (%50-60) ve kitinden (%0.6-2.7) oluşmaktadır. Mannoproteinlerdeki farklılıklar *Candida* türlerinin ayrılmasında kullanılmaktadır. Hücre duvarında bulunan lipidler ise serbest sterol (ergosterol), sterol esterleri (zimosterol), trigliseridler ve fosfolipidlerden oluşmaktadır (Goodway 1995).

Candida türleri gram pozitif boyanma özelliğindedirler. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) gibi rutin besiyerinde aerop koşullarda beyaz-krem renkli koloniler oluştururlar. Koloniler; düzgün veya buruşuk kenarlı, nemli, krem görünümünde ve tipik olarak maya kokulu olabilirler. Koloniler genellikle oda ısısında veya 37°C’ de 24 saatte gelişebilmesine rağmen, belirgin üremeleri genellikle 48-72 saat arasında olmaktadır. Patojen olan türler 25-37°C’ de, saprofit türler ise daha düşük ısıda üreme özelliklerine sahiptirler. Besiyeri pH’ ının 2-8 arasında olması, glukoz, amonyum tuzu, fosfat, biotin ve serbest metallerin (Fe, Zn, Ca gibi) bulunması yeterlidir. Kemoheterotrof olduklarından, organik azot ve karbon kaynağına ihtiyaç duyarlar (Segal and Elad 1998; Shea 2009).

Candida türlerinin çok sayıda olması tür tanımlama şeklinden kaynaklanmaktadır. *Candida* cins adı aşağıda yazılan özelliklerden herhangi birini göstermeyen ve eşeysiz üreyen maya türleri için kullanılmaktadır:

- I- Asetik asit oluşturma;
- II- Gözle görülebilen kırmızı, pembe veya turuncu pigment;
- III- Artrokonidyumlar;
- IV- Geniş bir tabanda tek kutuplu veya çift kutuplu tomurcuklanma;
- V- Simpodula üzerinde oluşan blastokonidyumlar;
- VI- Saplar üzerinde oluşan tomurcuklar;
- VII- İğne şekilli terminal konidyumlar;
- VIII- Üçgen hücreler;
- IX- Çoğunlukla mukoid kolonilerde olmak üzere, enteroblastik-bazipetal tomurcuklanma ve inozitolü tek karbon kaynağı olarak kullanabilme;
- X- Ballistokonidyumlar (Hazen ve Howell 2009).

Bazı *Candida* türleri; mısır unlu- tween 80 agar gibi besince fakir bir ortamda iyi yedek besin depolayan, gerçek ya da yalancı hifin ucunda veya arasında bulunan, tek hücreli, kalın duvarlı, geniş oval yapılı klamidospore oluşturmaktadır. Bunlar oluşurken hifin veya yalancı hifin bir yerinde sitoplazma yoğunlaşarak, hifin çapından daha geniş olacak tarzda şişer ve duvarı kalınlaşır. *C. albicans*’ ı diğer türlerden ayırmak için germ tüp testi yapılmaktadır. Germ tüp (çimlenme borusu); bir blastokonidyanın kenarından başlayarak büyüyen, blastokonidyaya bağlanan bölgelerinde boğumlanma görülmeyen,

silindirik filamentöz yapılar olarak bilinmektedir (Yücel ve Kantarcıoğlu 1999; Hilmioğlu ve ark. 2007).

1.3. Tıbbi Önemi Olan Bazı *Candida*' ların Özellikleri

1.3.1. *Candida albicans*

Candida cinsi içerisinde en sık karşılaşılan patojen tür *Candida albicans*' tır. *C. albicans* insanda hem kommensal hem de patojen olarak bulunabilen bir mantardır. Sindirim sistemi, ağız ve vajinal boşlukların mukozal yüzeylerine kolonize olarak çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır (Molero ve ark. 1998).

Moleküler identifikasyonlarda *Candida clausenii* ve *Candida langeronii* türleri *C. albicans* ile birleştirilmiştir. Ayrıca *Candida stellatoidea* türünde tartışmalı olarak *C.albicans*' ın sinonimi olarak düşünülmektedir (Hazen ve Howell 2009).

C.albicans, antijenik yapılarına göre A ve B olmak üzere iki serotipe ayrılmaktadır. Mannan yapısal farklarına göre ayrılan serotiplerden *C. tropicalis* mannanı serotip A' ya yakındır. Bağışıklığı bozulmuş hastalarda serotip B prevalansı daha yüksektir. Serotip B kökenleri 5-florositozine karşı direnç geliştirmeye daha eğilimli olmalarıyla, A kökenlerinden fizyolojik olarak farklılık göstermektedir (Yücel ve Kantarcıoğlu 1999; Tümbay 1999).

C.albicans mısır unlu- tween 80 besiyerinde dört değişik şekil oluşturarak üremektedir:

- 1- Yalancı misel,
- 2- Blastosporlar,
- 3- Klamidosporlar,
- 4- Çok seyrek olarak gerçek misel.

Mısır unlu besiyeri besince fakir bir ortamdır bu yüzden maya hücrelerinin yedek besin depolayan klamidosporları oluşturmaya yol açmaktadır (Yücel ve Kantarcıoğlu 1999).

Serumda germ tüp oluşunu ve klamidosporelerin görülmesi *C. albicans* identifikasyonuna yardımcı olmaktadır. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)' da krem rengi koloniler, kanlı agarda ise ayaklı koloniler oluşturabilmektedirler (Hazen ve Howell 2009).

1.3.2. *Candida glabrata*

Candida glabrata daha önceleri *Torulopsis glabrata* olarak bilinmektedir. *C. glabrata* sağlıklı bireylerin normal floralarında bulunan ve nadiren ciddi infeksiyonlara neden olan saprofitler olarak düşünülmektedir. Ancak geniş spektrumlu antimikotik tedavi ile birlikte bağışıklık baskılayıcı uygulamaların yaygın ve artan bir biçimde kullanımıyla, *C. glabrata*' nın neden olduğu mukozal ve sistemik infeksiyonların sıklığı önemli ölçüde artmıştır (Fidel ve ark. 1999). Günümüzde, kandidozda *C. albicans*' tan sonra en sık görülen ikinci veya üçüncü tür *C. glabrata*' dır (Sardi ve ark. 2013).

C. glabrata, insanların çoğunda; ağız boşluğu, genitoüriner yol, gastrointestinal kanal ve solunum yollarından izole edilebilmektedir. İdrar örneklerinden sıklıkla izole edilmekte ve idrarda saptanan mayaların %21' ni oluşurmaktadır (Murray ve ark. 2014).

C. glabrata diğer *Candida* türlerinin aksine dimorfik değildir; sadece blastonidiyal morfolojide bulunmaktadır. *C. glabrata* sıklıkla azol grubu ( zellikle flukonazol) antifungal ajanlara karşı direnç geliştirmekte ve infeksiyonlarının tedavisi oldukça zor olmaktadır (Fidel ve ark. 1999).

Candida türlerinden 37  C üzerinde pseudohif üretmeyen tek türdür. *C. glabrata* blastokonidyaları (1-4  m), *C. albicans*' a (4-6  m) göre oldukça k  kt r. Sabouraud Dekstrozu Agar (SDA)'da krem renginde veya yumuşak krem gibi düzgün koloniler oluşturan; k  k, oval ve tek tomurcuklu mayalardır (Rodrigues ve ark. 2014).

1.3.3. *Candida tropicalis*

İlk defa 1910 yılında *Oidium tropicale* olarak isimlendirilen *Candida tropicalis*' e daha sonra *Monilia tropicalis*, *Candida vulgaris*, *Mycotorula dimorpha*, *Candida paratropicalis* gibi isimler verilmiştir. Son olarak Berkhout 1923' te bugünkü ismi olan *C. tropicalis* olarak adlandırmıştır (Kwon-Chung ve Bennet 1992).

Sağlıklı insanların cilt ve sindirim sisteminde yaygın olarak bulunabilen *C. tropicalis* diploit bir mayadır. *C. tropicalis*' in %4-24 oranında kandidoza neden olduğu bildirilmiştir. Özellikle hematolojik maligniteli hastalarda önemli infeksiyon etkenleri arasında yer almaktadır (Desnos-Ollivier ve ark. 2008).

Candida tropicalis mısır unlu-tween 80 agarda ve 25°C' de 72 saatte; oval sporlar, yalancı ve gerçek hifler üretmektedir. SDA' da düzgün yüzeyli krem renkli koloniler oluşturmaktadır (Calderone 2002; Silva ve ark. 2012). Blastokonidyalı 4-8 µm büyüklüğündedir. *C. tropicalis* germ tüp ve klamidospore oluşturmaz (Kurtzman ve Fell 1998).

1.3.4. *Candida parapsilosis*

Bu tür Ashford tarafından 1928 yılında *Monilia*' nın bir türü olarak dışkı örneklerinden izole edilmiştir. Diploid bir maya türü olan *Candida parapsilosis* adı Langeron ve Talice tarafından 1932'de verilmiştir. *C. parapsilosis* 1940 yılına kadar patojen olmayan bir mikroorganizma olarak kabul edilmiştir (Weems 1992; Guarro ve ark 1999).

Günümüzde *C. parapsilosis*, *C.albicans*' tan sonra ikinci veya üçüncü sıklıkta kandidoz etkeni olarak düşünülmektedir. Bu türün kandidoz olgularında sıklığının gittikçe artmasının nedeni, plastik yüzeylere adhezyon yeteneği ile ilgilidir (van Asbeck ve ark. 2009; Anđ 2014). Bu sebeple daha çok deri ve mukozadan kaynaklanan kandidoza yol açmaktadır. *C. parapsilosis* kateter ve implantlarda biyofilm oluşturma ve hastane ortamında kalıcılığı yanında; özellikle yeni doğan servisleri, cerrahi yoğun bakım ünitelerinde bulunan hastalarda, sepsis olgularında sıklıkla infeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Branchini ve ark. 1994; Pfaller 1995; Wilke 2007).

C. parapsilosis, SDA besiyerinde, 37°C' de 24 saatte üreyerek genellikle kirli beyaz, krem rengi, yumuşak kıvamlı, tipik olarak mayamsı kokulu koloniler oluşturlar. Mısır unlu- tween 80 agarda yalancı hif boyunca tek tek veya bazen küçük kümeler halinde blastokonidyumlar oluşmaktadır. En önemli mikroskopik özelliği hiflerin arasında dev hücreler (iri hifler) bulunmasıdır (Tümbay 1999; Fromtling ve ark. 2003).

1.3.5. *Candida dubliniensis*

C. dubliniensis ilk kez 1995 yılında Sullivan ve arkadaşları tarafından HIV pozitif bir hastanın ağız boşluğundan izole edilmiştir (Sullivan ve ark. 1995). *C. dubliniensis*' in normal ağız flora üyesi olduğu ve özellikle bağışıklık sistemi bozuk olan hastalarda ağız lezyonlarına yol açtığı düşünülmektedir. Bununla birlikte diğer vücut bölgelerinden de düşük oranda izole edildiği bildirilmiştir (Esen ve ark. 2004; Anđ 2014).

C. albicans ile fenotipik olarak oldukça benzerlik göstermektedir. *C. dubliniensis*' in klamidosporları çok daha bol ve sıklıkla çiftler halinde veya üçlü, hatta bazen psödohifin ucundaki aynı bir taşıyıcı (süspansör) hücreye yapışmış kalın duvarlı birkaç oluşan kümeler veya salkımlar oluşturarak olağandışı düzen oluşturmaktadırlar (Yücel ve Kantarcıoğlu 1999). *C. dubliniensis*' in koloni morfolojisi ve mikroskopik görünümü *C. albicans* ile aynıdır, ancak *C. albicans*' dan farklı olarak 45°C' de üreyememektedir. Mısır unlu-tween 80 agarda; 25-27 °C' de, 48-72 saatte dallanmış kısa yalancı hifler ve bol miktarda ince duvarlı klamidosporlar oluşturmaktadır (Sullivan ve ark. 2003).

1.3.6. *Candida guilliermondii*

C. guilliermondii' nin telemorfu *Pichia guilliermondii* olarak bilinmektedir. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda çeşitli infeksiyonlara neden olan, ancak yaygın olarak görülmeyen bir patojendir. *C. guilliermondii* insan derisi ve mukoza yüzeylerinin normal flora üyesidir, bazen kronik onikomikoz, akut osteomiyelit, septik artritis, endokardit, fungemi ve yaygın invaziv infeksiyonlara neden olabilmektedir (Girmenia ve ark. 2006).

C. guilliermondii SDA' da; düzgün yüzeyli, parlak, genellikle krem- sarı renkli, bazen yaşlandıkça koyulaşan veya pembeleşen koloniler oluşturmaktadırlar. Mısır unlu-tween 80 agarda 25°C' de, 72 saatte yalancı hiflerin çevresinde sıklıkla küçük blastospor kümelerine sahiptirler, yalancı hifleri ise oldukça kısa ve az sayıda bulunmaktadır (Larone 2011).

1.3.7. *Candida lusitaniae*

C. lusitaniae; van Uden et do Carmo-Sousa tarafından 1959 yılında ilk kez sıcakkanlı hayvanların sindirim sisteminden izole edilmiştir. Bu tür, 1979 yılından beri insanda fırsatçı patojen olarak rapor edilmektedir (Viudes ve ark. 2002). Günümüzde *Clavispora lusitaniae*, *Candida lusitaniae*' nin telemorfu (eşeyli üreme yapılarının gözlemlendiği evre) olarak bilinmektedir (Gargeya ve ark. 1990).

İnsan gastrointestinal sisteminde normal flora üyesi olarak bulunan *C. lusitaniae*, özellikle maligniteli hastalarda fungemi (mantarların kan dolaşımında bulunması) etkeni olabilmektedir. *C. lusitaniae* genellikle düşük virulanslı bir mikroorganizma olup, amfoterisin B' ye klinik direnç gösterebilmektedir. (Hazen ve Howell 2009).

C. lusitaniae kolonileri beyaz-krem renk tonlarında, düzgün ve parlaktır. Mısır unlu-tween 80 agarda yalancı hifler; ince, dallanmış kısa zincirler halinde blastokonidyumlar gözlenebilmektedir (Fromtling ve ark. 2003; Larone 2011).

1.3.8. *Candida kefyr*

C. kefyr daha önce *Candida pseudotropicalis* olarak tanımlanan ve *Candida* enfeksiyonlarında nadir rastlanılan bir türdür. İlk defa 1969 yılında sistit olan bir hastadan izole edildiği rapor edilmiştir (Corpus ve ark. 2004).

Vücudun her yerinde akut, subakut ve kronik enfeksiyona neden olabilmektedir. Günümüzde kandidoz etkeni olarak diğer türlere göre son sıralarda yer almakta ve özellikle hematolojik malignitesi olan hastalar ile kemik iliği alıcılarında sık görülmektedir (Tümbay 1999; Kocabay ve ark. 2005).

C. kefyr, SDA besiyerinde beyaz-krem rengine, yumuşak ve S tipi koloniler oluşturmaktadır. Mısır unlu-tween 80 agarda yalancı hifler ve genellikle hiften ayrılıp birbirine paralel dizilim gösteren blastokonidyumlar gözlenir. Bu görünüm ırmakta yüzen kütüklere benzetilebilir (Larone 2011).

1.3.9. *Candida krusei*

Berkhout tarafından 1923 yılında isimlendirilen *C. krusei*, daha önceleri *Sacharomyces krusei*, *Endomyces krusei*, *Monilia krusei* olarak adlandırılmıştır (Kwon-Chung KJ ve Bennet JE 1992).

C. krusei genellikle kommensal olarak tanımlanan, çeşitli hasta grupları ve sağlıklı kişilerin mukozal yüzeylerinden nadir olarak izole edilen bir türdür. Bu tür azol grubu antifungallere karşı doğal dirençlidir, özellikle flukonazol profilaksisi alan immun sistemi baskılanmış hastalarda fırsatçı infeksiyonlara neden olmaktadır (Abbas ve ark. 2000; Pfaller ve ark. 2008). Fırsatçı patojen olarak gittikçe önemi artmakta olan *C. krusei*, invaziv kandidozlarda *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*' in ardından beşinci sırada yer almaktadır (Samaranayake ve Samaranayake 1994).

C. krusei SDA besiyerinde; yassı, kuru görünümlü, mat, krem renginde, düzensiz kenarlı koloniler oluşturmakta, CHROMagar Candida' da ise; merkezi pembe kenarları beyaz olan koloniler gözlenmektedir. Mısır unlu-tween 80 agarda uzamış blastokonidyalara psöдохif oluşturmaya, çapraz (birbirine girmiş) kibrit çöpü veya ağaç dalı görüntüsü ile ayrılmaktadır (Larone 2011).

1.4. Candida Türlerinin Virulans Faktörleri

Dünyada invaziv mantar infeksiyonları önemli düzeyde artmaktadır. 600' den fazla mantar türü insanlarda patojen olarak rapor edilmesine rağmen; *Candida* türleri en sık izole edilen mantarlardır. Patojen olarak ilk akla gelen tür *C. albicans* olmakla birlikte, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* gibi non-*C. albicans* (NCAC) türlerinin neden olduğu infeksiyonlar önemli oranda artış göstermektedir (Silva ve ark. 2012; Mayer ve ark. 2013).

Hücrel bağışıklık mikrobiyal infeksiyonlara karşı birincil konak savunmasını oluşturmaktadır. Sağlıklı konakta fırsatçı fungal patojenler yaygın şekilde mukozal yüzeylerde kolonize olmaktadır. İmmun sistemi sağlam kişilerde ikincil infeksiyonlara (bebeklerde pamukçuk, kadınlarda vajinal infeksiyonlar gibi) neden olan fungal patojenler, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda ölümcül sistemik infeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Yang 2003).

Candida türlerinin sahip olduğu bazı özellikler konağın savunma sistemini yenerek hastalık oluşturmaya çalışmaktır. Bireylerde hastalığın oluşumunda konak faktörlerinin yanısıra mayanın sahip olduğu virulans faktörleri de önemli rol oynamaktadır (Tümbay 1999). Bu faktörler başlıca; adherens, dimorfizm, toksin, enzim üretimi ve biyofilm oluşumu başlıkları altında toplanabilir.

Adherens (Yapışma): Adherens, hücrelerin yüzey özellikleri ile ilişkilidir ve özellikle mukokutanöz kandidozun bu yapışma ile başladığı kabul edilmektedir. *Candida*' ların mukoza epitel ve endotel hücrelerine yapışması kolonizasyonun ilk aşamasını oluşturmakla birlikte, kandidozun ortaya çıkmasında önemli bir adımdır. *C. albicans*' ın mukoza yüzeylerine yapışma yeteneği, bu infeksiyonların ortaya çıkmasında ilk basamak olarak bilinmektedir. (Yücel ve Kantarcıoğlu 2000).

Dimorfizm (Morfolojik Değişim): Dimorfizm çeşitli koşullara bağlı olarak sırasıyla maya (blastospor), germ (çimlenme) tüpü, yalancı hif ve gerçek hif oluşumunu kapsamaktadır. İnfeksiyon bölgelerinde hem maya hücreleri hem de hif oluşumuna rastlanmaktadır (Abacı ve Haliki 2004). Dimorfizmin sıcaklık, pH ve besiyeri ortamıyla düzenlendiği bildirilmektedir. *Candida* türleri optimum şartlar olan, 33- 42°C ve pH 6-8 aralığında germ tüp oluşturmaktadır (Yücel ve Kantarcıoğlu 2001).

Enzimler: Mantarlar, konak dokularında ilerlemelerine (invazyona) yardımcı olan hidrolitik enzimler oluşturma yeteneğine sahiptirler (Yücel ve Kantarcıoğlu 2000). Bu enzimler, hücre membranında bulunan fosfolipidleri ve proteinleri hidrolize etmektedir (Ghannoum 2000). *C. albicans*' ın salgıladığı enzimler iki ana grupta toplanmaktadır: i- Peptid bağlarını hidrolizleyen proteinazlar, ii- Fosfogliseridleri hidrolizleyen fosfolipazlar ile lizofosfogliseridleri hidrolizleyen lizofosfolipazlar (Yücel ve Kantarcıoğlu 2000).

Biyofilm Oluşumu: Biyofilmler; tekil ya da serbest durumdaki benzerlerinden fenotipik olarak farklı özellikler sergileyen, ekstrasellüler polimerik maddeden (EPS) oluşan bir matriks ile kaplı mikrobiyal topluluklar olarak tanımlanmaktadır (Öztürk 2011). Biyofilm oluşumu; mikroorganizmaların sıralı biçimde yüzeylere adhezyonu ile başlar, burada maya hücreleri çoğalır ve biyofilmin üst kısmında hifal hücreler oluşur, ekstrasellüler matriks materyali salgılanır ve birikir, sonunda biyofilm kompleksinden maya hücreleri dağılır (Mayer ve ark. 2013). *Candida* türlerinde biyofilm özelliği; adherens ve kolonizasyonu kolaylaştıran, mantarın etrafını sararak konağın savunma mekanizmasından kaçmasına yardımcı olan, türlere ve kökenlere göre farklılık gösteren bir virulans faktörü olarak tanımlanmaktadır (Hawser ve Douglas 1994).

Toksinler: *C. albicans*' ın maya fazında endotoksine benzer maddeler ve hemolizin üretimi gösterilmiştir. *C. albicans*' ın toksinleri; yüksek moleköl ağırlıklı (glikoprotein toksinler ve kanditoksin) ve düşük moleköl ağırlıklı olanlar olmak üzere iki grupta toplanabilmektedir (Kuştımur 1994; Yücel ve Kantarcıoğlu 2000).

1.5. *Candida* İnfeksiyonlarının Patogenezi

Bir organizmanın hastalık oluşturma yeteneği patojenlik olarak tanımlanmaktadır. Hastalık yapıcı özellikteki mikroorganizmalar patojen, hastalık oluşturma özelliği bulunmayanlar ise apatojen olarak bilinmektedir. Patojen bir mantarın infeksiyon oluşturmada vücuda girmesi yeterli olmamakla birlikte, konakta üreyebilmesi ve çoğalması etkenin infeksiyon oluşturabilmesi için bir ön koşuldur. Mantarla konak arasındaki karşılıklı etkileşim sonucuna bağlı olarak ya subklinik düzeyde infeksiyonlar (latent veya gizli infeksiyonlar) ya da klinik bulguların ortaya çıkması şeklinde hastalık meydana gelmekte veya hastalık oluşumu önlenmektedir (Yücel ve Kantarcıoğlu 2000).

Candida türleri klinik örneklerde çevreden kontaminasyon veya kolonizasyon nedeniyle ya da gerçek hastalık etkeni olarak bulunabilmektedirler. Normal florada bulunan *Candida* türleri, bir hastalık veya tedavi nedeniyle bağışıklık sistemi bozulmuş hastalarda, dokulara girerek yaşamı tehdit eden infeksiyonlara yol açabilmektedir (Murray ve ark. 2014).

Candida infeksiyonlarının gelişmesine neden olan faktörler; geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, hücresel immun yetmezlikler, normal floranın baskılanması, ciddi yanıklar, cerrahi işlemler, kataterler (üriner ve damar içi), nötropeni (malignite veya malignitenin tedavisi nedeniyle), AIDS, diyabet, peptik ülser, kortikosteroidler ve başka immunosupresif ilaçlar şeklinde sıranabilir (Tümbay 1999; Ener ve ark. 2001).

Kandidozlar, yüzeysel ve sistemik olmak üzere iki grupta incelenebilir. Yüzeysel (kutanöz veya mukozal) kandidoz; deri veya epiteldeki hasarın yalancı hiflerin lokal invazyonuna izin vermesiyle oluşmaktadır. Kutanöz ve mukokutanöz lezyonlarda çok sayıda tomurcuklanan hücreler ve yalancı hifler bulunmaktadır. Sistemik kandidoz ise, *Candida* türlerinin kan dolaşımına girmesi ve konak fagosit savunmasının üreme ve yayılmayı engellemedeki yetersizliği sonucu gelişmektedir. Kanda çoğalan *Candida*

türleri; böbrekleri, protez kalp kapaklarını tutabilir veya vücudun herhangi bir yerinde (artrit, menenjit, endoftalmit) infeksiyon oluşturabilmektedir (Mitchell 2010).

Candida türleri içerisinde en sık izole edilen *C. albicans*, çeşitli virulans faktörlerine sahiptir. İnfeksiyon patogeneğinde büyük rol oynayan *C. albicans*' ın virulans faktörleri; epitel hücrelerinde yalancı hif oluşturma, yüzey moleküllerini tanıma, hücre dışı hidrolitik enzimler ve fenotipik değişikliklerdir. *Candida* türlerinden salgılanan hidrolitik enzimler (fosfolipaz ve aspartil proteinaz) konakta; mantarın aşırı büyümesinde, dokulara adheransı ve invazyonunda önemli rol oynamaktadır (Schaller ve ark. 2005; Tsang ve ark. 2007). *Candida*' ların bütün türlerinden salgılanan aspartil proteinaz 5 ve 9; en fazla *C. albicans* tarafından salgılanmakta olup bunu sırasıyla *C. tropicalis*, *C. kefyr* ve *C. krusei* takip etmektedir (Singh ve ark. 2013). Özellikle membran lipidlerini hidrolize eden fosfolipazlar, *C. albicans* türlerinin birçoğunda salgılanmaktadır (Yücel ve Kantarcıoğlu 2000).

1.6. *Candida* Türlerinin Neden Olduğu İnfeksiyonlar

Kandidoz ya da kandidiyazis, 150' den fazla *Candida* türünün oluşturduğu infeksiyonlar için kullanılan terimlerdir. *Candida* infeksiyonları; kutanöz ve mukozal, sistemik ve kronik mukokutanöz kandidoz olmak üzere üç grupta incelenebilir (Edwards 2010).

1.6.1. Kutanöz ve mukozal kandidoz

Kutanöz kandidoz; nemli deri bölgeleri, üst solunum yolu ve vulvavajen mukozasında oluşan yüzeysel mantar infeksiyonları olarak bilinmektedir. Daha çok *C. albicans* türü; deri, mukoza ve tırnaklarda hastalığa neden olmaktadır (Gençoğlu 2011). Gebelik, diyabet, çok genç ve ileri yaşlar, doğum kontrol hapları, travma (yanıklar, derinin maserasyonu), AIDS ve benzeri immunosupresif hastalıklar gibi faktörler kandidozla ilişkilidir (Mitchell 2010).

Oral kandidoz: Oral *Candida* infeksiyonları oldukça yaygın olmakla birlikte, pamukçuk şeklinde dil, damak, yanak ve diş etlerinde gelişebilmektedir. Pamukçuk; epitel hücreleri, mayalar ve yalancı hiflerden oluşan beyaz yamalarla karakterizedir. AIDS'li

hastalarda, anne sütü alan bebeklerde kanserli hastalarda, solunum yolu ile steroid alanlarda sıklıkla görülmektedir (Mitchell 2010).

Özofagus kandidozu: Özofagus mukozası ve submukozasında *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlardır. Disfaji, odinofaji, substernal, boyun ön yüzü ya da epigastriumda hissedilen yanıcı olarak tarif edilen ağrı klinik bulguları arasında yer almaktadır. Daha çok AIDS hastalarında görülmekle birlikte; bazı antineoplastik ajanların, lokal ve sistemik steroidlerin kullanımı *Candida* özofajitine yatkınlığı arttırmaktadır (Şenol 2011).

Sindirim kanalı kandidozu: Sindirim sistemi mukozasının yüzeyinde genellikle beyaz lekeler şeklinde görülmektedir. Mide, ince ve kalın bağırsakları da tutabilmektedir. Kanserli hastalarda yaygın olarak görülmektedir (Tümbay ve Karakartal 1994).

Deri ve tırnak kandidozu: Yaygın olarak lezyonlar kasık, meme altı, koltuk altı, parmak araları gibi vücudun çeşitli bölgelerinde görülmektedir. İmmüsuprese hastalarda ve normal insanlarda da görülebilmektedir. Enfeksiyonun oluşması için risk faktörleri; nemli veya kapalı alanlar, yanık, radyasyon uygulanan alanlardır (Maenza and Merz, 1998).

Tırnak enfeksiyonlarının %5-10' luk kısmında etken olarak kabul edilen *Candida*' lar; onikomikoz ve paronişi' ye neden olmaktadır. Onikomikoz, tırnakta renk değişikliği ve şekil bozukluğu ile ortaya çıkmakta; paronişi ise tırnak yatağına *Candida*' nın invazyonu sonucu oluşmaktadır (Gençoğlu 2011).

Vulvovajinal kandidoz (VVK): *Candida*, hem immüsuprese hemde sağlıklı kadınlarda vajina mukozasında kolonize olabilmektedir. Asemptomatik kolonizasyon aksine, vulvovajinal kandidozda enfeksiyon yokluğunda bile, *Candida* türleri bazı belirtilere ve enfeksiyon semptomlarına neden olabilmektedir. VVK, uluslararası kabul edilen komplike ve komplike olmayan olgular şeklinde sınıflandırılmaktadır. Komplike olmayan VVK; sağlıklı kadınlarda *C. albicans* türünün neden olduğu, sporadik veya seyrek olarak görülen hastalık olarak bilinmektedir. Komplike VVK, non- *C. albicans* türlerinin neden olduğu şiddetli VVK olarak bilinmektedir. Bu yaygın enfeksiyon gebelik, kontrolsüz diyabet, immüsupresif tedavi ve sağlıklı kadınlarda rekürren vulvovajinal kandidoz (RVVK) durumlarında görülmektedir. RVVK, bir yıl içinde en

az dört defa infeksiyon geçirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Sobel ve ark. 1998; Achkar ve Fries 2010).

Vajinal *Candida* infeksiyonları en sık görülen alt genital sistem infeksiyonlarından olup, olguların %20-30' unu oluşturmaktadır (Beigi ve ark 2004). Kadınların %75' inin hayatlarında en az bir defa vulvovajinal kandidoz geçirdikleri bildirilmektedir (Achkar ve Fries 2010). Hastaların %45' i ise birden fazla kandidal vajinit atağı geçirmektedir (Balcı ve Çapar 2005). Türkiye' de yapılan çeşitli çalışmalarda VVK prevalansı %11-28,9 olarak saptanmıştır (Bengi ve ark. 2014).

Vulvovajinal kandidozda en önemli risk faktörleri gebelik, antibiyotik tedavisi, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, immunosupresif tedaviler, kontrolsüz diyabet ve hormon replasman tedavileridir. Vajinal infeksiyonlarda semptomları spesifik olmamakla birlikte, yaygın yakınmalar arasında irritasyon, kötü kokulu akıntı, yanma, dizüri ve dispareni sayılabilir (Vargas ve ark. 2004)

VVK olgularında etken olarak en sık *C. albicans* (%85-90) izole edilmekte; bunu *C. glabrata* (%5-10), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr* ve *C. guilliermondii* takip etmektedir. Rekürren infeksiyonları olan hasta örneklerinin kültürlerinden özellikle *C. glabrata* türü izole edilmiştir. Kadınların %15-20' sinde asemptomatik kolonizasyon mevcuttur ve esas olarak barsak florası *Candida* rezervuarı olarak görev yapmaktadır (Göker 2011).

Vulvovajinal kandidozda, *Candida* türlerinin dağılımların populasyonların yanı sıra lokasyonlarada bağlı olarak değiştiği çalışmalarda gösterilmiştir. Vajinal sürüntü kültürlerde genellikle tek tür tanımlanmakta; ancak bazen (%2-5) iki veya daha fazla tür teşhis edilebilmektedir. ABD, Avrupa ve Avusturalya' da VVK' da en sık izole edilen tür *C. albicans* (%76-89)' tır ve bunu *C. glabrata* (%7-16) izlemektedir. non- *C. albicans* türlerinin ülkeler ve kıtalardaki dağılımı %11-24 oranında değişmektedir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda non- *C. albicans* türlerinin sıklığının arttığı rapor edilmektedir. Asya ve Afrika ülkelerinde non- *C. albicans* türlerinden, en sık *C. glabrata*' nın izole edildiği belirtilmektedir. Türkiye, Hindistan ve Nijerya' daki olgularda *C. glabrata*' nın dağılımı %30-37 arasında değiştiği ve Çin' de *Candida* türlerinin dağılımının ABD ile benzer olduğu ileri sürülmektedir (Achkar ve Fries 2010).

1.6.2. Kronik mukokutanöz kandidoz

Kronik mukokutanöz kandidoz (KMK); erken çocuklukta başlayan, nadir görülen, deri, mukoza veya tırnaklarda *Candida* türlerinin neden olduğu kronik ve tedaviye dirençli infeksiyonlar olarak tanımlanmaktadır. KMK, T-lenfositlerin *Candida* antijenlerine yeterli immun yanıt oluşturmamasından kaynaklanmaktadır. Hücresel bağışıklık yetersizliği ile ilişkili bu infeksiyonlar genellikle sistemik bir yayılım özelliği göstermezler (Kılıç 2005).

KMK hastalarında; şiddetli seyreden ve sürekli bulunan mukokutanöz *Candida* lezyonları vardır, buna yaygın tırnak tutulumu ve vajinit de eşlik etmektedir (Hazen ve Howell 2009). Hastalık, tutulan tüm deri ve mukozalarda kronik infeksiyona bağlı deformasyonlarla sonuçlanmaktadır (Mitchell 2010).

1.6.3. Sistemik kandidoz

Sistemik veya invaziv kandidoz, *Candida* türlerinin hematogen yayılımından kaynaklanmakta, özellikle hematolojik maligniteli ve solid organ alıcıları gibi immun yetmezlikli olan hastalarda görülmektedir. Kateter kaynaklı kandidoz, akut dissemine kandidoz, kronik dissemine kandidoz ve derin organ kandidozu olmak üzere dört grupta incelenmektedir (Pappas ve ark. 2010).

Kateter kaynaklı kandidoz (Kandidoz): Bir veya birden fazla kan kültüründen *Candida* izole edilmesi sistemik kandidozun en sık karşılaşılan durumudur. Kandidoz, invazif kandidozu olan hastaların % 50-70' inde karşımıza çıkmaktadır (Akalın 2008).

Son yıllarda girişimsel işlemlerin, immun sistemi baskılayıcı tedavi yöntemlerinin uygulanma sıklığının artması, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı gibi çeşitli nedenlerle kandidoz insidansının arttığı ileri sürülmektedir. Kandidoz etkeni olarak en sık *C. albicans* izole edildiği bildirilmekle birlikte, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* gibi non- *C. albicans* türlerinin sıklığının da giderek arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Öztürk ve ark. 2013).

Akut dissemine kandidoz: Akut dissemine kandidoz; daha çok sitotoksik kemoterapiye veya altta yatan hematolojik maligniteye bağlı nötropenik hastalarda en yaygın görülen formdur. Hematogen yayılım sonucunda birçok organın tutulumu ile kandidoz gelişmektedir. Önemli klinik bulguları; eritematöz veya hemorajik, palpe edilebilen bir

döküntüye sahiptir ve bu lezyonlar küçük damarlardaki vaskülitte bağlıdır. En sık rastlanan komplikasyonlar; menenjit, beyin apsesi, piyelonefrit, miyokardit, endokardit, endoftalmit, kutanöz apselerdir (Pappas 2006; Akalın 2008).

Kronik dissemine kandidoz (Hepatosplenik kandidoz): Genellikle hematolojik maligniteli hastalarda kemoterapiye bağlı nütropeni gelişmiş hastalarda ortaya çıkan kronik formdur (Pappas 2006). İnfeksiyon; akut lösemi, miyelodisplastik sendrom ve aplastik anemili uzun süre nütropenik kalan hastalarda daha sık gelişmektedir (Uzun 2006).

Derin organ kandidozu: *Candida* türlerinin yayılımı bu formda sıklıkla kalp, meninksler, idrar yolu, deri, göz, karaciğer, dalak gibi bölgelere olmakta ve perikardit, miyokardit, endokardit, menenjit, üretrit, sistit, septik artrit, tenosinovit, pnömoni gibi infeksiyonlara neden olmaktadır (Vasquez ve Sobel 2003).

1.6.4. Diğer *Candida* infeksiyonları

Üriner sistem kandidozu: *Candida* türleri alt veya üst üriner sistemde infeksiyona neden olabilmektedir. Bu infeksiyonlar en sık kateterli hastalarda görülmektedir. Üretral kandidoz hem kadınlarda hem de erkeklerde görülebilmektedir (Edwards 2010).

Son yıllarda kandidüri ve üriner *Candida* infeksiyon insidansında artış gözlenmektedir. Kandidüri ya da diğer bir deyişle idrar örneğinde *Candida* saptanması, tanı ve tedavide zorlukların yaşandığı bir sağlık sorunudur. İdrar da *Candida* varlığı, idrar örneği alımı sırasında oluşan kontaminasyonu, mesane kolonizasyonunu, böbrek ve toplayıcı sistemin infeksiyonunu ya da yaşamı tehdit edici yaygın kandidozu düşündürmektedir (Avcı 2011).

Hastane kaynaklı üriner sistem infeksiyonlarının en az %10-15' inde etkenin *Candida* türleri olduğu bildirilmektedir (Avcı 2011). *C. tropicalis*, *C. glabrata* gibi non-*C. albicans* türler sıklıkla idrardan izole edilmesine rağmen *C. albicans* halen en sık soyutlanan patojendir (Passos ve ark. 2005).

Yapılan çalışmalarda kandidüriler için zemin hazırlayan faktörler; diabetes mellitus, uç yaşlar, cinsiyet, üriner sistem defektleri, genitoüriner tüberküloz, malignite, kronik böbrek yetmezliği, nütropeni, immünsüpresif tedavi, antimikrobiyal kullanımı, üriner kateter ya da üretral stent gibi üriner sisteme uygulanan yabancı Cisimler,

hemodiyaliz, cerrahi girişim ve böbrek transplantasyonu olarak bildirilmektedir (Nayman Alpat ve ark. 2011).

Merkezi sinir sistemi kandidozu: Santral sinir sistemi tutulumuna sık rastlanmamakla birlikte, genellikle dissemine kandidozun bir komplikasyonu olarak ortaya çıkmaktadır. *Candida* türleri hematogen yayılım ile enfeksiyona neden olabilirken, travma sonucu mantarın santral sinir sistemine inokülasyonu ile de ortaya çıkabilmektedir. Prematüre yenidoğanlar ve nöroşirurji hastaları gibi iki özel hasta grubunda risk özellikle artmaktadır. *C. albicans* (%70-100) en sık izole edilen etkindir. *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* türleri *C. albicans*' ı izlemektedir. Son zamanlarda yetişkinlerde görülen *Candida* menenjitlerinde etken olarak *C. tropicalis*' te artış görüldüğü rapor edilmektedir (Goldani ve Santos 2010; Yılmaz 2011).

Solunum sistemi kandidozu: *Candida* türlerine bağlı pnömoni şeklinde gelişmektedir. Pnömoni, sıklıkla lokal veya nodüler diffüz infiltratlar şeklinde olmaktadır. Etkenin akciğerlerde endobronşial inokülasyonu sonucu lokal diffüz bronkopnömoni veya yaygın enfeksiyon sırasında gelişen interstisyel pnömoni görülmektedir. Ayrıca, bronşiyal enfeksiyon, larenjit, epiglottite de neden olabilir (Edwards 2010).

1.7. *Candida* Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi

Candida türleri doğada yaygın olarak bulunan maya mantarlarıdır. Birçok bitkide, hava, su ve toprakta, cansız objelerde, yiyecekler üzerinde ve hastane ortamında da kolaylıkla canlılıklarını sürdürebilirler. İnsan florasında; gastrointestinal sistem başta olmak üzere, deri, ağız mukozası ve vajina mukozası olmak üzere çeşitli bölgelerden izole edilebilir. Hem ağız hem de gastrointestinal sistemin diğer bölgelerinden en fazla izole edilen tür *C. albicans* (%50-70) olmakla birlikte, *C. glabrata* %7-9, *C. tropicalis* %2-7, *C. parapsilosis* %2-5, *C. krusei* %2-3, *C. kefyr* %0,1-1 ve *C. guilliermondii* %0,4-0,7 oranında rastlanmaktadır (Ener 2011).

Yoğun kolonizasyonu nedeniyle her türlü hasta örneğinden izole edilebilen *Candida* türlerinin herhangi bir klinik örnekteki varlığı; çevresel kontaminasyon, kolonizasyon ya da aktif enfeksiyona bağlı olabilmektedir. Bu nedenle *Candida* enfeksiyonlarında en değerli örnekler; kan, steril vücut sıvıları, deri, mukoza, iç organlardan alınabilen biyopsi örnekleridir ve *Candida* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi bu örneklerdeki üremelere dayandırılmaktadır (de Hoogs ve ark. 2000).

Candida infeksiyonlarında endojen ve ekzojen faktörler rol oynamaktadır. Çoğunlukla hastalığa kişinin kendi florası kaynak oluşturmaktadır. Gastrointestinal sistem kolonizasyonu çok önemli olmakla beraber, deri kolonizasyonu da özellikle damariçi kateteri olan hastalarda önemlidir. Ayrıca sağlık personeli ve hastadan hastaya geçiş yolu ile de gelişmiş bazı olgular rapor edilmiştir (Ener 2011).

İnvaziv mantar infeksiyonlarında izole edilen en yaygın tür *C. albicans* olmasına rağmen, non-*C. albicans* türlerine bağlı infeksiyon sıklığı da gittikçe artmaktadır. Kuzey Amerika’ da büyük tıp merkezlerinde 2019 hasta ile yapılan bir çalışmada; non- *C. albicans* türlerin üstünlüğü gözlenmekle birlikte, en sık *C. albicans*, sırasıyla *C. glabrata* ve diğer non-*C. albicans* türleri izole edilmiştir. Epidemiyolojideki bu değişiklik ciddi immunsupresyon, prematürite, hastaların geniş spektrumlu antibiyotiklere maruz kalması ile ilişkilendirilmektedir (Horn ve ark. 2009). Avrupa ülkelerinde yapılan bir analizde; kandidoz vakalarının yarısından fazlasına *C. albicans* türünün neden olduğu ve diğer non- *C. albicans* kandidoz infeksiyonlarında etken olarak olguların %14’ ünde *C. glabrata* ve *C. parapsilosis*, %7’ sinde *C. tropicalis*, %2’ sinde *C. krusei* varlığı gösterilmiştir (Tortorano ve ark. 2006). Epidemiyolojideki değişiklikler Latin Amerika ülkelerinde de gözlenmiştir. Şili’ de, *C. albicans* prevalansında değişiklik ve non-*C.albicans* türlerinin neden olduğu infeksiyonlarda da artış saptanmıştır. Etken olarak en sık *C. parapsilosis* türü, bunu *C. tropicalis* ve *C. glabrata* türleri takip etmiştir. Aynı çalışmada tüm izolatların amfoterisin B’ ye duyarlı, ancak *C. glabrata* suşlarının %50’ sinin flukonazole dirençli olduğu tespit edilmiştir (Ajenjo ve ark. 2011). Brezilya’ daki kandidoz çalışmalarında ise; olguların %40,9’ unda etkenin *C. albicans* olduğu, bunu sırasıyla *C. tropicalis* (%20,9), *C. parapsilosis* (%20,5) ve *C. glabrata* (%4,9)’ nın takip ettiği bildirilmiştir (Colombo ve ark. 2006; Nucci ve ark. 2010; Sardi ve ark. 2013).

Ülkemizde yapılan kandidoz çalışmalarının çoğu tek merkezli çalışmalardır. Bu çalışmalardan elde edilen kısıtlı bilgiler sonucunda *C. parapsilosis* türü *C. albicans*’ tan sonra ikinci sırada karşımıza çıkmaktadır. Ancak kesin bilgilere ulaşabilmek için, Türkiye genelinde tüm merkezlerin olduğu prospektif çalışmalar yapılmalıdır (Ener 2011).

1.8. *Candida* Türlerinin İdentifikasyonu

Candida türlerinin birçoğunun normal flora elemanı olmaları nedeniyle, izole edilen her mayanın tanımlanması gerekli değildir. Ancak; kan, beyin omurilik sıvısı (BOS) ve diğer steril vücut sıvılarını ile biyopsi dokusundan soyutlananlar, bir örnekte yoğun miktarda saptanan mayalar, immunsuprese hastalardan tekrarlayan izolatlar ve mikoz etkeni olduğu düşünülen mantar türlerinin identifikasyonu mutlaka yapılmalıdır. *Candida* infeksiyonlarının tanısı için incelenecek örnekler; kan, BOS, idrar, aspirat, solunum yolu örnekleri, doku biyopsi örnekleri, ağız ve vajen sürüntü örnekleri, saç-tırnak-deri örnekleri olarak sayılabilir (Yıldıran 1999).

Klinik örneklerden izole edilen mayaların identifikasyonunda çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar geleneksel yöntemler, hızlı identifikasyon testleri, yağ asidi metil esterleri (FAME) analizi, serolojik yöntemler ve moleküler yöntemler olarak gruplandırılabilir (Neppelenbroek ve ark. 2014).

1.8.1. Geleneksel yöntemler

Candida türlerinin geleneksel yöntemlerle identifikasyonu morfolojik ve fiziksel özelliklerine dayalı yapılmaktadır (Cardenes ve ark. 2004). Kültür ortamından ayrılan *Candida* izolatları için germ tüp testi, klamidospore oluşturma yetenekleri, karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon testleri kullanılmaktadır (Alam ve ark. 2014).

1.8.2. Germ tüp (Çimlenme borusu) testi

Germ tüp testi *Candida*’ ların identifikasyonunda ilk adımdır. Hızlı sonuç veren, uygulaması kolay, *C. albicans*’ ın diğer *Candida*’ lardan ayrılmasını sağlayan basit ve çok değerli bir testtir. Ancak *C. albicans* kökenlerinin hepsinde pozitif olmayıp yalancı pozitiflik olabilmektedir. *C. albicans* kökenlerinin %95-97’ si germ tüp oluşturmakla birlikte, *C. stellatoidea* türü de germ tüp üretmektedir. *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei* türlerinde de pseudogerm tüp oluşumu görülebilir. Germ tüp blastospordan orijin alan başlangıç noktasında hiç daralma olmayan ve uzunluğu boyunca hiç kabarıklık yapmayan bir filament olarak görülmektedir. Pseudogerm tüp de ise daha büyük blastospor vardır ve hif ile bağlantı bölgesinin daha belirgin olduğu gözlenmektedir. (Helvacı ve ark. 1992).

Germ tüp testi için 24-48 saatlik saf ve taze kültürlerin kullanılması, optimal koşulların sağlanması da önemlidir. Çimlenme borusu oluşumu; sıcaklık, inokülasyon konsantrasyonu, ortamın içeriği, pH, bakteriyel kontaminasyon, *Candida* türleri ve su ları gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir (Neppelenbroek ve ark. 2014).

Çimlenme borusu testi için insan serumu, sığır serum albumin, koagüle tav an plazması, koyun serumu gibi çeşitli peptonlu besiyerleri kullanılabilir. Germ tüp oluşumunu gözlemlemek için, test edilecek izolat serum içerisine aktarılır ve 37 C’ de 3 saat inkübe edilir. Inkübasyon sonrası, maya-serum süspansiyonundan bir damla alınarak lam-lamel arasında, germ tüp varlığı açısından mikroskopik olarak incelenir (Hazen ve Howell 2009). Germ tüp deneyi için rutinde insan serumu tercih edilmektedir. İnsan serumu yapılan çalışmalarda 2 saat ve üstü inkübasyon süresinde, %98 duyarlılık ve %100 özgüllük saptanmıştır (Hilmioglu ve ark. 2007).

1.8.3. Hif, blastospor ve klamidospor yapımı

Klamidospor oluşumu; *C. albicans*, *C. dublinensis* ve nadiren *C. tropicalis*’ in bazı su larına ait bir özelliktir. (Gutierrez ve ark. 2002; Kim ve ark. 2002). Dalmau ekim tekniği ile *C. albicans* izolatlarının terminal ve kısa yan dallar üzerinde bulunan; büyük, ışığı yansıtabilen klamidosporları kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Bu yapıların besin tüketimine bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (Shin ve ark. 1999). Mısır unlu (corn meal)-tween 80 agar ve pirinç unu-tween 80 agar en iyi klamidospor indükleyici besiyerleri olarak bilinmesine rağmen; Wolin Bevis agar, Oxgall agar veya Czapek Dox-Tween 80 agar kazein agar, Staib agar, tütün agar başka besiyerleri de önerilmektedir (Buckley 1989; Staib ve Morschhauser 2007; Neppelenbroek ve ark. 2014).

Besiyerine yeni  remi  bir koloniden  ze ile alınıp  ze 45 derecelik açı ile tutularak besiyeri yüzeyine üç paralel  izgi (Dalmau ekimi)  ekilir ve agarın yüzeyi, inokülasyon çizgilerini örtecek şekilde steril bir lamel ile kapatılır. Oda sıcaklığında (25-27 C) 24-72 saat inkübe edildikten sonra mikroskopik olarak incelenir. Besiyerinin derinliğine ekim yapılması, kapatılan lamel ile ortamın oksijeninin azaltılması ve tween 80’ in yüzey gerilimini d   rmesi klamidospor ve pseudohif yapımını arttırmaktadır. Bu yöntem ile mayaların oluşturdukları gerçek ve yalancı hifler, blastokonidyalar,

klamidosporların yapı ve yerleşimlerine göre tür düzeyinde tanımlama yapılmaktadır (Yıldıran 1999; Larone 2011).

1.8.4. Kromojenik besiyerleri ile identifikasyon

Kromojenik besiyerleri primer izolasyon ve identifikasyon amacıyla kullanılmaktadır. Farklı *Candida* türlerinin varlığını göstermeleri ve özellikle *C. albicans* olmak üzere erken dönemde hızlı tanımlama yapmaları açısından oldukça yararlı olmaktadır (Metin 2011). Bu özel besiyerlerinde mayalar tarafından salgılanan enzimlerle reaksiyon sonucu, çeşitli kromojenik substratların parçalanması ürünlerinden ortaya çıkmasına bağlı olarak farklı morfoloji ve değişik renkte koloni oluşumu sağlamaktadırlar. Böylelikle türe özgü renk ve koloni özelliklerine bakılarak mayaların identifikasyonu yapılabilmektedir (Nadeem ve ark. 2010).

Albicans ID (Bio Merieux, Marcy Etoile, France), Candichrom albicans (International Mycoplasma, Toulon Cedex-France), Candida Ident Agar (Sigma-Aldrich-USA) Candiselect (Sanofi Diagnostics Pasteur), CHROMagar Candida (BBL), MAST ID-CHROMagar Candida (Mast Diagnostics, United Kingdom), BiGGY agar (Oxoid, Basingstoke, İngiltere), Fluoroplate Candida (Merck, Almanya), Fungiscreen 4H (Sanofi Diagnostics Pasteur), Murex Candida albicans (Murex Diagnostics, A.B.D.), Brilliance Candida Agar (Oxoid, Basingstoke, İngiltere) gibi çeşitli kromojenik besiyerleri bulunmaktadır. Kromojenik besiyerleri ile yapılan çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olduğu ileri sürülmektedir (Freydiere ve ark. 1997; Ellepola ve Morrison 2005).

1.8.4.1. CHROMagar Candida

CHROMagar Candida besiyeri mantarların izolasyonu ve tanımlanmasında kullanılan seçici bir besiyeridir. İçeriğinde bir β -N-acetylhexosaminidase substratı ile bir fosfataz bulunmaktadır. Kromojenik maddelerle türler farklı renkte koloniler oluşturmaktadır. *C. albicans* sarı-yeşil ile mavi-yeşil koloniler, *C. krusei* soluk pembe ile mor pürüzlü koloniler, *C. tropicalis* ise koyu mavi ile mavimsi yeşil veya metalik mavi koloniler oluşturmaktadır (Odds ve Bernaerts 1994). *C. famata*, *C. firmetaria*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis* ve *C. parapsilosis* gibi non- *C. albicans* türleri; doğal renklerini (krem) geliştirebilir veya

pembe veya açık ila koyu leylak görünebilir (Pfaller ve ark. 1996). Bu besiyerinin diğer avantajı ise, farklı renklerde koloni görünüşleri sebebiyle karma maya kültürlerinin kolay saptanmasına izin vermektedir (Odds ve Bernaerts 1994).

CHROMagar üzerindeki *Candida* kolonileri bir gecelik inkübasyondan sonra oldukça küçük olduğundan renklerine bakılarak tanımlamazlar. Bu yüzden renklerinin gözlenebilmesi için 48 saatlik inkübasyon tavsiye edilmektedir (Pincus ve ark. 2007). CHROMagar *Candida* diğer kromojenik besiyerleri karşılaştırıldığında; tanıda oldukça hızlı ve etkili olduğu, ayrıca birçok çalışmada duyarlılık ve özgüllüğünün %100' e yakın oranlarda olduğu bildirilmektedir (Momani 2000; Iyampillai ve ark. 2004; Yücesoy ve ark. 2005).

1.8.4.2. *Candida Ident agar (Candida ID)*

Candida Ident Agar (Candida ID); β -N- acetylgalactosaminidase substratı içeren seçici bir besiyeridir. Karışık maya popülasyonlarını içeren klinik örneklerin kullanılmasında yararlıdır. Koloniler, 30°C' de 24-48 saat inkübasyondan sonra ayırt edilebilmektedir. *C. albicans* açık yeşil renkte düz koloniler, *C. tropicalis* mavi ile metalik mavi renkte koloniler, *C. krusei* mor renkte kabarık koloniler, *C. glabrata* ise krem-beyaz renkte koloniler oluşturmaktadır. (Rousselle ve ark. 1994).

1.8.4.3. *Bismuth Sulfite-Glucose-Glycine Yeast (BIGGY) agar*

BIGGY agar (Nickersen agar) içeriğinde bulunan bizmut sülfiti, *Candida* cinsinden mayalar kullanarak kahverengiden siyaha kadar değişebilen renkte koloniler oluşturmaktadır. Ekimi yapılan örnekler 30°C' de 48-72 saat inkübasyon sonucunda siyah-kahverengi mat koloniler *C. albicans*, koyu kahverengi ve siyah merkezli koloniler *C. tropicalis*, gümüşü-kahverengi-siyah merkezli koloniler *C. krusei* ve koyu kırmızı-kahve parlak renkte koloniler *C. kefyr* olarak değerlendirilmektedir (Kalkancı ve ark. 1999; Aktaş ve ark. 2001).

1.8.4.4. *Brilliance Candida agar (Oxoid Chromogenic Candida Agar (OCCA))*

Brilliance *Candida* agar içeriğinde bulunan iki kromojen hedef aldığı enzimlerle etkisini gösterir. Besiyeri; heksoz aminidaz ve alkalen fosfataz aktivitesini saptamak için 5-bromo-4-kloro-3-indol/N-asetil beta-D-glukozamid ve 5-bromo-6-kloro-3-indol

fosfat p-toludin tuzu substratlarını içmektedir. Hazırlanan besiyerine ekim yapılan izolatlar 30°C’ de 48-72 saat inkübasyon sonucunda renklerine göre yorumlanmaktadır. Heksoz aminidaz aktivitesi gösterenler *C. tropicalis* koyu mavi, *C. albicans* ve *C. dubliniensis* yeşil renkte, alkalen fosfotaz aktivitesi gösterenler *C. krusei* kuru pembe renkte, *C. glabrata*, *C. kefir*, *C. parapsilosis* ve *C. lusitaniae* ise bej, sarı, kahverengi renkte koloniler oluşturmaktadırlar (Baixench ve ark. 2006).

1.8.5. Biyokimyasal identifikasyon

Karbonhidrat fermentasyon testleri: Fermentasyon testleri genellikle sıvı ortamlarda yapılır ve CO₂ veya alkol üretimine göstermeye yönelik anaerobik testlerdir (Neppelenbroek ve ark. 2014). Gaz oluşumu fermentasyon göstergesidir ancak besiyerinin pH’ı değişmeyebilmektedir. Bu test *Cryptococcus* ve *Rhodotorula* türlerinin ayırımında kullanılmaktadır (Hazen ve Howell 2009).

Üreaz testi: Bazı mayalar üreaz enzim aktivitesi göstererek, üreyi parçalayıp amoyak oluşturmaktadırlar. *Candida* türlerin neredeyse tümü üreaz negatifken, *C. krusei* ve *C. lipolytica*’nın bazı suşları üreyi hidroliz edebilmektedir (Hazen ve Howell 2009).

Nitrat asimilasyon testi: Mayaların azot kaynağı olarak nitrojeni kullanma yeteneklerini ortaya çıkarmaktadır. *Cryptococcus*, *Rhodotorula* ve *Pichia* türlerinin tanımlanmasında kullanılabilir (Hazen ve Howell 2009).

Karbonhidrat asimilasyon testleri: Tür düzeyindeki identifikasyonunda kullanılan karbonhidrat asimilasyon testlerinde, mayaların oksijen varlığında karbon kaynağı olarak spesifik bir karbonhidratı kullanma yetenekleri değerlendirilmektedir. Bu test; Wickerham yöntemi, oksanografik yöntem ve ticari tiplendirme kitleri gibi değişik yöntemler kullanılarak yapılabilmektedir (Yıldıran 1999).

1.8.6. Hızlı identifikasyon testleri

Maya türlerinin tanımlanmasında kolay uygulanabilen ve kısa sürede sonuç veren hızlı tanımlama testleri olarak ticari kitler geliştirilmiştir. API Yeast Identification System (Analytab product), Uni Yeast Tek (Flow laboratories), Abott Yeast Identification System (Abott Diagnostic), ATB ID 32C (Biomerieux-Fransa), API 20C AUX(Biomerieux-Fransa), API ID 32C (Biomerieux-Fransa), Auxacolor (Biorad-

Fransa), API *Candida* (Biomerieux-Fransa), Baxter MicroScan Yeast Identification Panel (Baxter MicroScan-USA), Microring YT system (MYT-USA) RapID Yeast Plus (Innovative Diagnostic-ABD) ve VITEK 2 ID-YST (Biomerieux-Fransa) bunlardan bazılarıdır. Bu kitlerde *Candida* türlerinin identifikasyonu asimilasyonu/fermentasyon özelliklerine göre yapılmaktadır. API ID 32C, VITEK YBC ve VITEK 2 ID-YST otomatize olarak okunan sistemlerdir (Pincus ve ark. 2007; Neppelenbroek ve ark. 2014).

1.8.6.1. VITEK 2 ID-YST Sistem

Vitek 2 ID-YST sistemi; 47 floresan biyokimyasal testler birlikte 64 kuyucuklu ikinci nesil otomatik bir sistemdir. YST kart, biyokimyasal metodlar ve yeni geliştirilmiş substratlara dayalı bir sistemden oluşmaktadır. Bu kart, 20 karbonhidrat asimilasyon testi (L-Malate, Erythritol, Glycerol, Arbutine, Amygdaline, D-Galactose, Gentiobiose, D-Glucose, Lactose, D-Cellobiose, D-Maltose, D-Raffinose, D-Mannose, D-Melibiose, D-Melezitose, D-Sorbose, L-Rhamnose, Xyliol, D-Sorbitol, Saccharose/Sucrose), 6 organik asit asimilasyon testi, 4-methylumbelliferone ile birlikte oksidazları belirlemek için 8 substrat, 7-amino-metilkumarin ile birlikte özellikle arylamidase varlığı için 9 substrat ve 4 çeşitli test içermektedir. Yaklaşık 15 saat içinde sonuç verebilen bu sistemin doğru identifiye etme oranının %98,9 olduğu ileri sürülmektedir (Graf ve ark. 2000; Barnett ve ark. 2000).

1.8.7. Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) analizi

FAME analizi için kullanılan Mikrobiyal İdentifikasyon Sistemi (MIS); yağ asidi profillerine dayalı olarak bakteri, mikobakteri, çevresel ve klinik örneklerden izole edilen mantarların identifikasyonu için kullanılan otomatik gaz kromatografisi (GC) sistemidir (Crist ve ark. 1996; Teng ve ark. 2004). Bu sistemde türlerin ayrımı için; yağ asitleri metil esterleri (FAME), dimetil asetiller (DMA), aldehitler ve bilinmeyen bileşikler gibi 140' dan fazla farklı bileşik veritabanında tanımlı şekilde bulunmaktadır (Teng ve ark. 2004).

MIS programı; 9'la 20 C atomu içeren yağ asitlerini, mikroorganizmaların yağ asidi metil esterlerini nicelendirme ve identifikasyonunu analiz edebilmektedir. Sistemde bulunan veritabanıyla yağ asidi kompozisyonları ve iyi karakterize edilmiş

suşların FAME profillerini karşılaştırıp araştırmaktadır. Diğer identifikasyon metodlarıyla fiyat ve zaman açısından karşılaştırıldığında FAME analizinin daha kullanışlı olduğu ileri sürülmektedir (Peltroche-Llacsahuanga ve ark. 2000).

Bazı yağ asitleri belli mikroorganizmalarda bulunmaktadır ve bunlar kemotaksonomi çalışmalarında biyomarkör olarak kullanılmaktadır (Devi ve ark. 2006). Yapılan çalışmalarda hücrenin gaz kromatografisiyle çıkarılan FAME profilleri, klinik ve endüstri alanlarında önemli maya türlerinin identifikasyonu için hızlı ve güvenilir olduğu kanıtlanmıştır (Botha ve Koch 1993; Peltroche-Llacsahuanga ve ark. 2000).

1.8.8. Serolojik Testler

Mantar infeksiyonlarının tanısında serolojik testler, hastanın tedaviye cevabının değerlendirilmesinde ve hastalık ilerlemesinin gösterilmesinde kullanılabilmektedir. Son yıllarda hasta serumu ve vücut sıvılarında *Candida* antikorlarını, antijenlerini ve metabolitlerini saptayan serolojik testler geliştirilmiştir (Özkütük 2011).

Antikor arama testlerinde; *C. albicans* hücre duvarının önemli bir polisakkariti olan mannan, 230-250 kDa' luk germ tüp hücre duvar mannopteini, blastospor hücre duvarı, miselyum hücre duvarı, çeşitli sitoplazmik antijenleri, sekrete edilen aspartil proteinaz (SAP) ve enolaz gibi çeşitli antijenler kullanılmaktadır. Bu testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinde farklı sonuçlar görülmektedir (Ellepola ve Morrison 2005).

Antijen arama testlerinde en çok kullanılan antijenik yapı mannandır. Mannan, *C. albicans*'ın temel hücre duvar mannopteini olup, tanımlayıcı bir antijendir. Bu antijen ısıya, kaynatmaya, proteinazlara ve asidik pH' a dayanıklıdır. Bu nedenle istenmeyen antijen-antikor kompleksleri bu yöntemlerle uzaklaştırılabilmektedir. Serumda mannan antijenlerini saptamaya yönelik ELISA ve lateks aglutinasyon temelli ticari testler bulunmaktadır (Özkütük 2011).

Metabolit saptayan testlerde ise; *Candida* türleri tarafından salgılanan D-arabinitol serum veya idrarda oluşturulabilen bir metabolittir ve saptanarak tanımlama yapılabilmektedir. Bazı hasta gruplarında arabinitol birikimi olmaktadır. Bu yüzden D-arabinitol seviyesinin D-arabinitol / kreatinin oranı şeklinde verilmesinin daha uygun olduğu belirtilmektedir (Özkütük 2011).

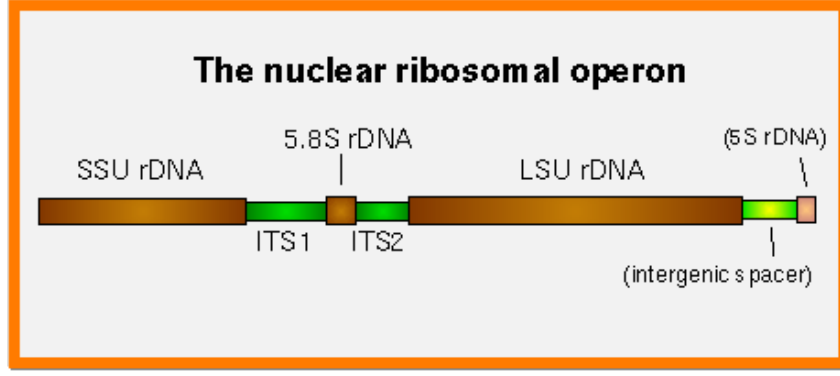
Serolojik tanı, duyarlılık ve özgüllük yönünden zayıf kalmaktadır. Ayrıca immün sistemi baskılanmış hastalarda, antikor üretimi değişkenlik gösterdiği için tanıyı zorlaştırmaktadır (Wahyuningsih ve ark. 2000).

1.8.9. Moleküler yöntemler

Patojen mantarların kısa sürede ve doğru olarak tanımlanması oldukça önemlidir. Özellikle antifungal ajanlara dirençli olan bazı mantarların tür düzeyinde identifikasyonu önemli bir gereksinimdir. Bu nedenle *Candida* türlerinin doğru ve hızlı identifikasyonu, uygun antifungal tedaviye erken dönemde başlanması açısından önem taşımaktadır (Sullivan ve Coleman 2002). Son zamanlarda mantarların identifikasyonunda moleküler yöntemlerin kullanımı artış göstermektedir. Bazı mantarlar PCR ve spesifik problemlerle tür düzeyinde tanımlanabilmektedir. Ayrıca nested PCR, multipleks PCR, real time PCR, spesifik problemlerle hibridizasyon ve dizi analizi yöntemleri identifikasyonda kullanılmaktadır (Koç 2007).

Moleküler yöntemler; *Candida*' ların cins ve tür düzeyinde tanımlanmasında, virulans faktörlerinin genotipik olarak saptanmasında, epidemiyolojik tiplendirmelerinde, genom baz dizilerinin ortaya çıkarılmasında, mutasyonların belirlenmesinde ve filogenetik analizleri için kullanılmaktadır (Saraçlı 2002; Saghrouni ve ark. 2013).

Patojen mantarların moleküler tanısı, ya doğrudan hasta örneği ya da kültür ortamından gerçekleştirilebilir. Enfeksiyon etkeni olan mantarların tür düzeyinde tanımlanmasında en yaygın kullanılan DNA bölgeleri; küçük (SSU-18S) ve büyük ribozomal alt üniteleri (LSU-26S) arasında yer alan türe özgül internal transcribed spacer (ITS) ve büyük ribozomal alt ünitesinin D1/D2 bölgeleridir (Şekil 1.1). Bu bölgeler tür düzeyinde farklılıklar gösteren yeterli zincir heterojenitesi içermesinden dolayı mantarları tür düzeyinde tanımlamak ve olası mutasyonel değişiklikleri saptamak için daha uygundur. Mantarların genotiplendirme çalışmalarında, protein kodlayan intron bölgeler ve ribozomal DNA (rDNA) gibi protein kodlamayan gen bölgeleri hedef olarak kullanılmaktadır. ITS' nin yanı sıra en çok tercih edilen gen bölgeleri; aktin geni, kitin sentetaz geni, mitokondriyal sitokrom b ve p450 bölgeleridir (Susever ve Yeğenoğlu 2011).



Şekil 1.1. *Fungal rDNA Bölgesi* (http://www.melkonian.uni-koeln.de/research_phylogeny_about.htm)

Kodlanmayan iki değişken bölgeden meydana gelen ITS bölgesi, SSU ile 5.8S alt birimi arasında (ITS1 bölgesi) ve de LSU rRNA genleri ile 5.8S alt birimi arasındaki bölgede (ITS2 bölgesi) yer almaktadır. ITS bölgesi; oldukça korunmuş bir rRNA alt birimidir ve çok değişkenli bölgeler içermektedir. Ayrıca bu bölge küçüktür (500-800 baz çifti) ve tek bir primer çifti ile çoğaltılabilmektedir (White ve ark. 1990; Lee ve Taylor 1992). Morfolojik açıdan farklı olan türler arasında değişken olabilmesinden dolayı da tür düzeyinde identifikasyonu kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle bu bölge hedef alınarak tasarlanan primerler ile yapılan PCR'ın duyarlılığı da artmaktadır (Abacı ve Haliki 2005). Yapılan çalışmalarda maya türleri arasındaki farklılığın saptanması ve hızlı tanımlamaları için ITS bölgesinin kullanılabileceği vurgulanmıştır (Tarr 2004). Son zamanlarda Yaşam Barkot Konsorsiyumu (Consortium for the Barcode of Life) tarafından ITS bölgesi sekansının bir primer mantar barkod markeri olduğu öne sürülmüştür (Schoch ve ark. 2012).

Mantarların büyük ribozomal alt ünitesinde (LSU-26S) bulunan D1/D2 bölgeleri yaklaşık 600 baz çifti büyüklüğündedir. D1/D2 bölgesindeki 6 veya daha fazla (%1) nükleotidin farklı olması, izolatların farklı türler olduğunu göstermektedir (Kurtzman ve Robnett 1998). Birçok maya türü ile yapılan çalışmalarda D1/D2'deki sekans farklılığından türlerin identifikasyonun yapılabileceği ileri sürülmüştür (Kurtzman ve Robnett 1998; Fell ve ark. 2000). Mayaların tanımlanmasında D1/D2 bölgesinin sekansının kullanımı gittikçe artmaktadır ve Frutos ve ark. bu bölgenin maya taksonomisinde evrensel kabul edileceğini öne sürmektedir (Scorzetti ve ark. 2002; Frutos ve ark. 2004). Bazı çalışmalarda konvansiyonel yöntemlerle daha önce

tanımlanamayan bazı türlerin bu bölgeyle yeni tür olarak identifikasyonlarının yapılabildiği ileri sürülmüştür (Kurtzman 2000). D1/D2 sekanslarıyla oluşturulan geniş kapsamlı veritabanıyla, daha kolay, pratik ve güvenilir identifikasyonun yapılabileceği düşünülmektedir (Kurtzman 2001; Abliz ve ark. 2004).

Ribozomal RNA (rDNA) gen kompleksi polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı birçok yöntemde hedef bölgeler olarak kullanılmaktadır. Çünkü bütün mikroorganizmalarda bulunan bu gen kompleksinin 100-200 kopyası bulunmakta ve oldukça korunmuş domainler içermektedir. Bu yüzden mantarlar için evrensel PCR primerler tasarlanabilmektedir (White ve ark. 1990; Taverna ve ark. 2013).

1.8.9.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR; özgül bir gen bölgesinin uç kısımlarına bağlanan iki sentetik oligonükleotit öncül (primer) ve Taq DNA polimeraz kullanılarak yapılan amplifikasyon işlemidir. Tanısal PCR' ın özgüllüğü, çoğaltım (amplifikasyon) için uygun hedef dizisinin belirlenmesiyle gerçekleşmektedir. Özgüllük farklı cinsler veya türlerin DNA dizileri ile hedef dizi arasındaki homolojinin derecesi ile belirlenmektedir. Örneğin, enfeksiyonun bakteriyel veya mantar orijinli olup olmadığını anlamak için tüm mantarlarda evrensel olarak bulunan yüksek oranda korunmuş bir gen bölgesi uygun hedef dizi olacaktır. Cins veya tür düzeyinde tanı fungal DNA identifikasyonu için çeşitli PCR çoğaltım ürünü saptama metodu kullanılmaktadır (Trtkova ve Raclavsky 2006).

Risk grubunda bulunan hastalar için PCR yöntemi ile erken tanı konulup uygun tedaviye başlanması çok önemlidir. Bu hasta grubunda PCR yöntemi daha hızlı sonuç verdiği için avantajlı bir yöntemdir. Kültüre dayalı yöntemlerle *Candida* saptanması için 48 saat gerekirken, tür tanımlaması da 48-72 saat sürmektedir. PCR ile 8 saat içerisinde bu sonuca ulaşılabileceği bildirilmiştir (Wahyuningsih ve ark. 2000).

Mantarların karakterizasyonunda PCR temelli birçok yöntem bulunmaktadır. Kullanılan bazı yöntemler; Restriksiyon Enzim Analizi (REA), Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Elektroforetik Karyotipleme (EK), DNA Microarray Yöntemi, Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNPs), Multilokus Dizi Tiplendirmesi (MLST) ve DNA dizi analizi yöntemleridir (White ve ark. 2005; Kiraz 2015).

1.8.9.1.1. Restriksiyon Enzim Analizi (REA)

REA, rDNA amplifikasyon ürünlerinin elde edilmesini gerektiren yöntemlerden birisidir. *Candida* türlerinin genotiplerinin araştırılması amacıyla ilk kullanılan yöntem olup, *Candida* infeksiyonlarında moleküler epidemiyolojik amaçlı çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Hazen ve Howell 2009).

REA yönteminde kullanılan restriksiyon endonükleazlar (RE), kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilere yakın bölgelerden veya bu diziler içindeki özgül bölgelerden DNA' yı kesen yapılar olup, büyük bir kısmı bakterilerden elde edilmiştir. Bu enzimler, DNA tanıma bölgesi ve katalitik bölge olmak üzere iki fonksiyonel alt birimden oluşmaktadır. DNA tanıma bölgesi özgül bölgeyi tanır ve katalitik bölgeyi buraya yerleştirir. Tanıma dizisine yerleşen katalitik bölge de DNA heliksinin fosfodiester bağlarını kırar. Uygulanması basit bu yöntem, pürifikasyon ve sonrasında DNA' nın özgül restriksiyon enzimleri ile kesilmesi esasına dayanır. Kesim sonrası oluşan DNA parçacıkları agaroz jelde elektroforez yöntemi ile ayrılıp, etidyum bromür ile boyanarak ortaya çıkan bant patternleri görsel olarak karşılaştırılmaktadır (Sullivan ve Coleman 2002; Trost ve ark. 2004).

1.8.9.1.2. Amplifiye Olmuş Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)

AFLP yöntemi; genomik DNA' nın enzimlerle (RE) kesimi sonucunda oluşan parçaların PCR ile çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Kesilen parçaların ucuna sentetik nükleotid dizilimleri eklenir (adaptör) ve DNA amplifikasyonu yapılır. Elde edilen ürünler poliakrilamit jel elektroforezi sonrası sonuçlar bilgisayar programı ile değerlendirilebilen dalgalara dönüştürülmektedir. Yapılan çalışmalar, klinik açıdan önemli *Candida*' ların tür düzeyinde identifikasyonunda güvenilir bir yöntem olduğunu ve sonuçlarının türler arasındaki farklılığı ortaya çıkardığını ileri sürmüşlerdir (Borst ve ark. 2003).

1.8.9.1.3. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

RAPD yönteminde tek bir primer veya bir primer çifti kullanılır. Bu primerler 9-10 nükleotid uzunluğunda ve PCR ile hedef genomik DNA' nın amplifikasyonu yapılmaktadır. Çoğaltılan parçaların jel elektroforezindeki görüntülerine bakılarak, her

izolatın bant profilleri karşılaştırılmaktadır (Alam ve ark 2014). Bazı çalışmalarda konvansiyel metodlarla tanımlanan bazı *Candida* türlerinin sonuçlarının bu yöntemle %100 uyumlu olduğu ileri sürülmüştür (Melo 1998).

1.8.9.1.4. Elektroforetik Karyotipleme (EK)

EK, DNA moleküllerinin elektrik akımı altında agaroz jel matriksi üzerinde birkaç megabazlık molekülere ayrılmasına dayalı yöntemdir. Değişken elektrik akımı kullanılarak kromozom uzunluk polimorfizmi bu yöntemle görüntülenebilmekte, ayrıca türler içindeki karyotip varyasyonları da belirlenebilmektedir. *C. albicans* ve diğer *Candida* türlerinin fingerprintlerini (parmak izleri) ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır (Gil-Lamagnere ve ark. 2003; Kiraz 2015).

1.8.9.1.5. Multilokus Dizi Tiplendirmesi (MLST)

Multilokus dizi tiplendirmesinde; multilokus enzim elektroforez (MLEE) sistemine benzemektedir. Nükleotid dizi analizi kullanılarak, birkaç temel metabolik fonksiyonu kodlayan genin (housekeeping gene) allelleri araştırılmaktadır. Bu yöntemde, yedi tane housekeeping genin (lokusun) arasında kalan gen parçaları (internal fragments) PCR ile çoğaltılarak her bir suşa özgü allel profili ortaya çıkarılmaktadır (Durmaz 2005) .

1.8.9.1.6. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNPs)

Tek nükleotid polimorfizmi; özgü bir lokasyonda meydana gelmiş olan tek baz değişimleridir. Bu değişimlerin gösterilebilmesi için Tek Zincir Konformasyon Polimorfizm (Single-Strand Confirmation Polymorphism, SSCP) analizi ve Heterodupleks analizi gibi yöntemler bulunmaktadır (Durmaz 2007).

1.8.9.1.7. DNA Microarray yöntemi

DNA microarray yöntemi, hibridizasyon tabanlı genotiplendirme tekniğidir. Chip'ler veya microarraylar; katı yüzey üzerine yerleştirilmiş oligonükleotid problemleri yüksek yoğunluklu mikroskopik setler olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemin en önemli özelliği, küçük bir alanda çok sayıda genomik incelemenin yapılmasına olanak sağlamasıdır. Microarray teknolojisi; patojen mantarların cins ve tür düzeyinde

tanımlanması, gen ekspresyon profilinin ortaya konması yoluyla patogeneze, hücre biyolojisi ve antifungal direnç mekanizmalarının incelenmesi ve mantar varlığında konakta ortaya çıkan yanıtın değerlendirilmesi için kullanılabilir (Saraçlı 2007; Singh 2014).

1.8.9.1.8. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, mantarların tanımlamasında referans olarak kullanılan moleküler yöntemlerden biridir. Özellikle çift yönlü analiz yapıldığında hedef bölgelerdeki nükleik asit farklılıklarını gösterebilmektedir. Enfeksiyon etkeni olan mantarların tanımlanması amacıyla kullanımı gittikçe önem kazanmaktadır (Chemaly ve ark. 2006).

Dizi analizi için; dizilenmek istenen DNA dizileri, birçok kopyası bulunan primer normal deoksi nükleotidler (dNTP; dATP, dCTP, dGTP, dTTP), dideoksi nükleotidler (ddNTP' ler ddNTP; ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) ve DNA polimeraz veya sekans enzimlerinden birisi kullanılarak DNA iplikçığının komplementeri sentezlenmektedir. Sentezlenen DNA iplikçığıne dNTP eklendiğinde uzama devam ederken, 3' ucunda OH grubu taşımayan ddNTP eklendiğinde zincir uzaması durmaktadır. Dolayısıyla böyle bir molekül zincir uzamasını durdurarak zincirin son nükleotidini oluşturmaktadır. Dizi analizi yapıldıktan sonra elde edilen nükleik asit dizisi veri tabanından bilinen diziyle karşılaştırılmakta ve tanımlama iki dizi arasındaki benzerliğe dayanarak yapılmaktadır. Bu yöntem ile mayaların identifikasyonu 24-36 saatte tamamlanmaktadır (Chemaly ve ark. 2006; Üstek 2011).

Dizi analizi ile mantarların; doğru olarak tanımlanması, alt türlerinin saptanması, direnç ve virulans genlerindeki mutasyonlar ve diğer mantarlarla olan filogenetik ilişkisi belirlenebilmektedir. Dizi analiziyle mantarların tanımlanması ile ilgili çalışmalar sürmektedir (McGinnis 2006).

1.9. Antifungal İlaçlar

Son yıllarda, immün sistemi baskılanmış hastalarda ortaya çıkan fırsatçı mantar enfeksiyonlarındaki artış, yeni antifungal ilaçlara olan gereksinimi de arttırmıştır. Antifungal ajanlar mantar enfeksiyonlarına karşı etkili olan; topikal, oral veya parenteral

yoldan uygulanabilen bileşiklerdir. Mantar hücrelerinin memeli hücrelerine benzer şekilde ökaryotik yapıda olmasından dolayı, protein, DNA ve RNA biyosentezini inhibe eden antifungal ilaçların insanlar için toksik etkileri bulunmakta ve antifungal ajanlarla ilgili çalışmalar da yavaş ilerlemektedir (Arıkan ve Rex 2009).

Antifungal ilaçlar 1950' li yıllara kadar potasyum iyodür ve metilen mavisi ile sınırlı kalmıştır. 1951 yılında hem oral hem de topikal etkili polyen antibiyotik olan nistatin bulunmuştur. 1956' da polyen bir antibiyotik olan amfoterisin B' nin bulunması sistemik antifungal tedavide dönüm noktası olmuştur. Ardından sitostatik bir madde olan flusitozin mantar tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Amfoterisin B ve 5-flusitozin' in uygulamalarının zor olması ve toksik olmalarından dolayı, birçok yeni antifungal ilaçlar geliştirilmiş veya eski ilaçların yeni formülleri yapılmıştır. 1958'de oral antifungal olan griseofulvin, 1969' da imidazol türevlerinden klotrimazol ve mikonazol, 1977' de ketokonazol ve 1980' li yıllarda geniş etki alanına sahip flukonazol ve itrakonazol piyasaya sürülmüştür (Kiraz 2003). Antifungal ilaç gelişimiyle ilgili son yıllarda birçok çalışma yapılmasına rağmen lisans alabilenlerin sayısı yeterli değildir (Arıkan ve Rex 2009).

Son yirmi yıldır, antifungal tedavinin temelini hücre duvarının bütünlüğünü hedefleyen ilaçlar oluşturmuştur. Bu grup içinde poliyenler (amfoterisin B ve nistatin) ve azol türevleri (flukonazol ve itrakonazol) yer almaktadır. Son yıllarda bu ilaçlara karşı direnç gelişiminin gözlenmesi, araştırmacıları mevcut ilaçlarda yeniliklere ve farklı mekanizmalarla etki gösteren yeni antifungal ilaçlar üzerinde çalışmaya yöneltmiştir. Azol grubundaki ilaçlar üzerinde gerçekleşen yenilikler; itrakonazolün parenteral formunun geliştirilmesi ve vorikonazol, posakonazol gibi yeni azol türevlerinin klinik kullanıma girmesi olmuştur (Dalgıç ve İnce 2005).

1.9.1. Poliyen antifungaller

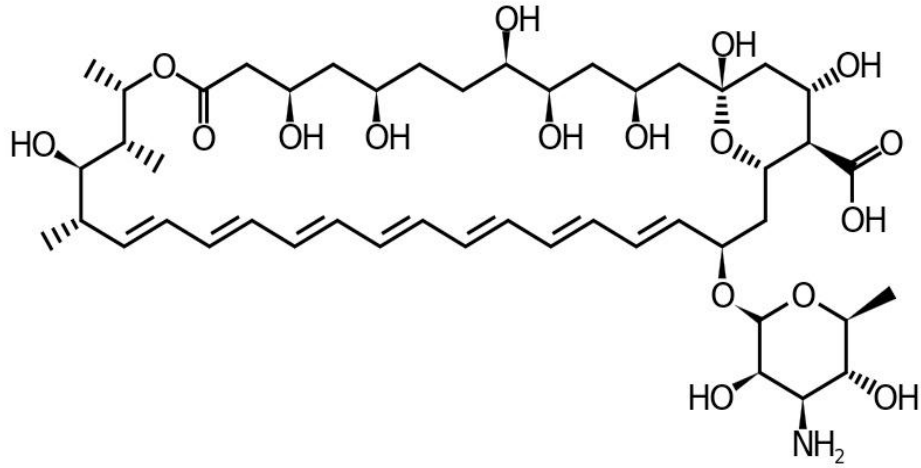
Poliyen grubu antifungaller, hücre zarında bulunan ergosterolü hedef alan ajanlardır. Bu grup içerisinde, amfoterisin B ve nistatin yer almaktadır. Amfoterisin B ve lipid formları sistemik fungal infeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Nistatin ise sadece topikal olarak bulunmaktadır. Liposomal formu da geliştirilen nistatinin, bu formunun klinik kullanımından vazgeçilmiştir (Arıkan ve Rex 2009).

1.9.1.2. Amfoterisin B ve lipid formülasyonları

Streptomyces nodosus cinsi mikroorganizmadan elde edilen geniş spektrumlu bir antifungal olan amfoterisin B poliyen grubunun en önemli üyesidir. Amfoterisin B ciddi sistemik mikozlarda en etkili ilaçtır. Amfoterik özellikte olup asit ve bazik ortamda çözülebilen tuzlar yapar ve pH 2-11 arasında suda erimez. Bu nedenle sodyum deoksikolat ile kararlı kolloidal bir süspansiyon oluşturularak suda çözünübilirliği artırılmıştır (Şekil 1.2) (Stevens ve Bennett 2000).

Amfoterisin B, mantar hücre membranındaki ergosterole bağlanır ve osmotik dengeyi bozar. Hücre duvarında oluşan porlar hücrenin geçirgenliğinin artmasına neden olur. Bunun sonucunda, intrasellüler potasyum, magnezyum, şeker ve metabolitlerinin membrandan sızmakta ve bu durum hücre ölümüne neden olmaktadır (İnci 1999; Arıkan ve Rex 2009). Amfoterisin B' nin ergosterole afinitesi memeli hücre zarında bulunan kolesterolden daha fazladır. Klinik çalışmalarda, amfoterisin B' yi lipozomlar ve lipid emülsiyonlar içine paketlemenin daha başarılı sonuçlar oluşturduğu gösterilmiştir. Lipid preparatların toksisitesi daha düşük olması, daha yüksek konsantrasyonda amfoterisin B kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Mitchell 2010).

Amfoterisin B, geniş bir antifungal spektruma sahiptir. Birçok *Candida* türü, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* ve *Mucor* türleri ile *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* gibi mantarların tedavisinde kullanılabilir. Amfoterisin B; *Aspergillus terrius*, *Fusarium* türleri, *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium proliferans*, *Trichosporon* türleri ve bazı dermatofitlere etkili olmayabilmektedir. Ayrıca *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* ve *C. rugosa* ya azalmış duyarlılığı bilinmektedir (Stevens ve Bennett 2000; Arıkan ve Rex 2009).



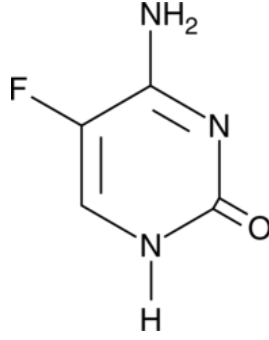
Şekil 1.2. *Amfoterisin B' nin kimyasal formülü*

1.9.4. Primidin sentezi inhibitörleri (Antimetabolitler)

1.9.4.1. Flusitozin (5-fluorositozin, 5FC)

Flusitozin (5-fluorositozin), sitozinin florinlenmiş bir türevidir. Antifungal aktivitesini; pirimidin metabolizmasını bozarak, fungal hücrelerdeki DNA, RNA ve protein sentezini engelleyerek gösterir. Flusitozin, sitozin permeaz enzimi sayesinde fungal hücre içerisine girer ve sitoplazmada 5-florourasile (5FU) deamine olur. 5FU'de 5-florodeoksiüridin'e dönüşür ve bu da fungal DNA sentezini ve nükleer bölünmeyi sağlayan timidilat sentetazı inhibe eder (Şekil 1.3) (Arıkan ve Rex 2009).

Flusitozinin etki spektrumu *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* gibi mantarlarla sınırlıdır. Flusitozine sekonder direnç geliştiğinden monoterapide kullanılmaz. Amfoterisin B ile birlikte kullanımı sinerjistik etki göstermektedir. En önemli kullanımı, kriptokok menenjitinde Amfoterisin B ile kombinasyondur (Arıkan ve Rex 2009; Mitchell 2010).



Şekil 1.3. *Flusitozin' in kimyasal formülü*

1.9.5. Glukan sentez inhibitörleri

Glukan sentez inhibitörleri; mantar hücre duvarı polisakkaridi olan β -glukan sentezini, β -(1,3)-glukan sentetaz enzimini inhibe ederek bozmaktadır. Memeli hücre yapısında β -(1,3)-glukan olmamasından dolayı mantarlar için selektif bir ilaçtır. Bu etkiye sahip 3 grup vardır: Akulasinler, ekinokandinler ve papulokandinler. Günümüzde, tolere edilebilir özelliğinden dolayı sadece ekinokandinler klinik uygulamalarda kullanılmaktadır (Arıkan ve Rex 2009).

Ekinokandinler, lipopeptid yapıda geniş spektrumlu antifungallerdir. Bunlar, β -(1,3)-glukan sentetaz enzimini inhibe ederek glukan yapımını bozan yeni antifungal ajanlardır. Bunun sonucunda hücre duvar bütünlüğü, morfolojisi bozularak hücrenin ölümü ile sonuçlanır. Memeli hücrelerinde aynı yapının olmaması ilacın toksisitesi açısından önemlidir. Günümüzde kullanılan ekinokandinler: Kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin' dir (Dalgıç ve İnce 2005; Mitchell 2010)

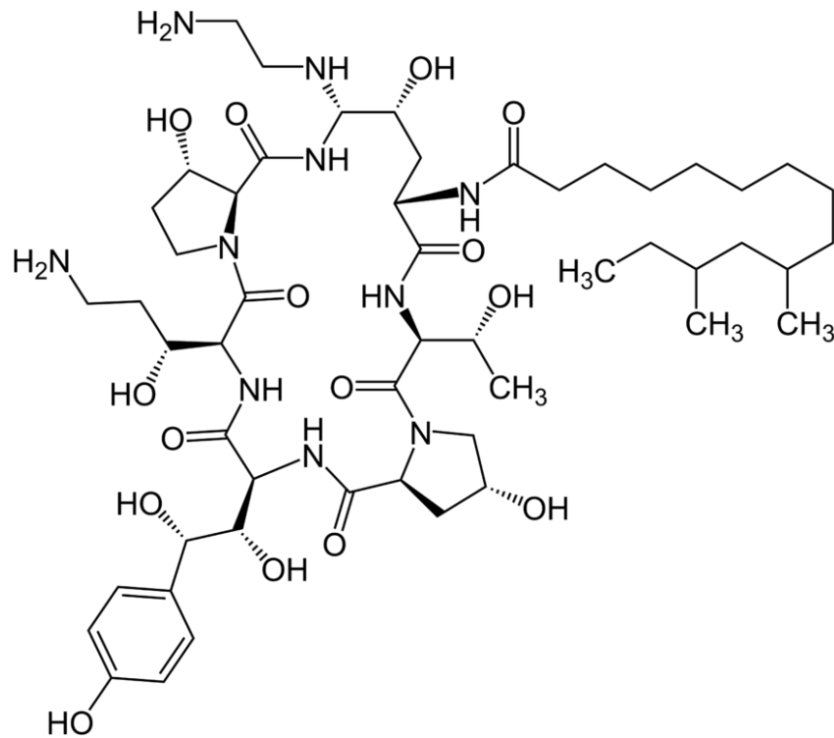
1.9.5.1. Kaspofungin

Kaspofungin, invazif aspergilloz ve çeşitli *Candida* türleri ile gelişen sistemik kandidozlara etkili olduğu için, 2001 yılında FDA onayı almıştır. *Glarea lozoyensis* mantarından elde edilen bir fermentasyon ürünü olan “pneumocandin B0” ın FDA onaylı semisentetik türevidir (Şekil 1.4) (Dalgıç ve İnce 2005).

Yapılan çalışmalar kaspofunginin, *Aspergillus spp.*' ye karşı fungistatik ve birçok *Candida spp.*' ye karşı fungisit olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, bazı *Candida* izolatlarının (*C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. albicans*) bu ilaca dirençli olduğunu gösteren raporlar bildirilmiştir. Kaspofunginin *Pneumocystis carinii*,

Coccidioides immitis, *Scedosporium* spp. ve *Paecilomyces variotii* gibi mantarlara karşı aktivitesinin daha az olduğu; *Trichosporon* spp., *Fusarium* spp., *Sporothrix schenckii* ve *Zigomisetlere* karşı aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir (Küçüköğlu 2008).

Birçok çalışmada, kaspofunginin hem amfoterisin B hem de azollere dirençli *Candida*’lara ve *Aspergillus*’a karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Dalgıç and İnce 2005). Kaspofungin ve amfoterisin B’ nin karşılaştırıldığı bir çalışmada, invazif *Candida* infeksiyonlarının tedavisinde ilaçların etkinlikleri eşdeğer bulunmuş ancak kaspofunginin daha iyi tolere edildiği saptanmıştır (Küçüköğlu 2008).



Şekil 1.4. Kaspofungin’ in kimyasal formülü

1.9.4. Azoller

Azol grubu antifungal ajanlar azol halkasında iki ya da üç nitrojen bulunmasına göre; imidazoller (ketokonazol, mikonazol, klotrimazol, ekonazol) ve triazoller (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, ravukonazol) olarak iki gruba ayrılmaktadır. İmidazol grubunda bulunan ketokonazol sadece sistemik etkili iken, triazol grubunun tümü sistemik etki göstermektedir (Sheehan ve ark. 1999).

Sistemik uygulamalarda, triazol türevleri imidazol türevlerine üç noktada üstünlük gösterirler:

- a- Daha yavaş metabolize edildikleri için etkileri daha uzun sürer ve doz aralıkları daha uzundur.
- b- İnsan hücrelerindeki sterol sentezi üzerinde daha az etkili oldukları için direkt toksik etkileri azdır.
- c- Sistemik uygulamada imidazol türevi ilaçların gösterdiği endokrin yan etkilerini göstermezler (İlkit 2000).

Azollerin etki mekanizması, mantar hücre membranının asıl sterolü olan ergosterol sentezini hedef almaktadır. Azoller; sitokrom p-450 bağımlı enzim sistemine bağlanarak lanosterolün C-14 α demetilasyonunu bloke ederler. Bu enzim lanosterolü ergosterole dönüştürdüğü için, ergosterol sentezinin bozulmasıyla fungal hücrelerdeki membran sentezi inhibe olmaktadır. Azol grubu ilaçlar, fungostatik (fungal hücre gelişimini engelleyerek) veya fungisidal (fungal hücreyi öldürerek) etki gösterirler (Arıkan ve Rex 2009).

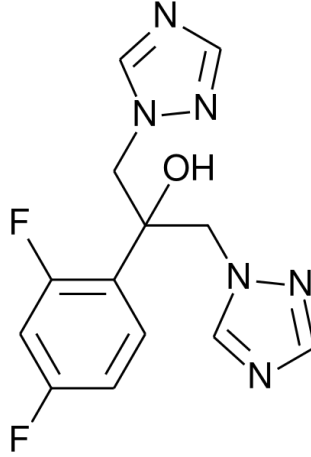
1.9.4.1. Flukonazol

Birinci kuşak triazol türevi olan flukonazol, gastrointestinal sistemden emilimi iyi olan düşük toksisiteli bir ajandır. Oral ve intravenöz formları bulunmaktadır. Suda çözülebilir olmasından dolayı beyin omurilik sıvısına rahatça geçebilmektedir. İyi tolere edilir ve yan etkisi oldukça düşüktür (Şekil 1.5) (Arıkan ve Rex 2009).

Flukonazolün sudaki çözünürlüğünün çok iyi olması; intravenöz kullanımına olanak sağladığı gibi oral alımından sonra emiliminin iyi olmasına, mükemmel doku dağılımına ve ilaç etkileşiminin diğer azollerden daha az olmasına da olanak sağlamaktadır. Bu avantajlarıyla birlikte bazı mantar türlerinde direnç gelişmesi etki alanını sınırlamaktadır (Como ve Dismukes 1994; Viviani ve ark. 1998).

Flukonazolün etki spektrumu oldukça geniştir. *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans* gibi mantar türlerine etkilidir. Bununla birlikte flukonazol *C. krusei*' ye karşı intrinsik direnç, *C. glabrata* türüne ise azalmış duyarlılık göstermektedir (Arıkan ve Rex 2009).

Flukonazol vajinal kandidozun tedavisinde de çok etkilidir. Kandidozlu nötropenik olmayan hastalarda amfoterisin B kadar etkili olmaktadır (Wingard 1994). İmmüsuprese hastalarda orofarinks ve özefagus kandidozu tedavisinde oldukça etkindir (Dalgıç ve İnce 2005).



Şekil 1.5. *Flukonazol' un kimyasal formülü*

1.9.4.2. Vorikonazol

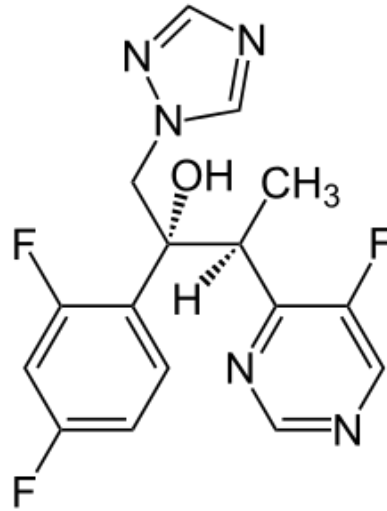
İkinci kuşak triazol olan vorikonazol, 2002 yılında FDA tarafından onay almış bir antifungaldir. Flukonazolün sentetik bir türevidir. Flukonazolde bulunan triazol kısmı floropirimidin grubu ile değiştirilmiş ve propanol zincirine bir metil grubu eklenerek vorikonazol elde edilmiştir (Şekil 1.6) (Girmenia ve ark. 1998; Küçüköğlu 2008).

Vorikonazol, oral ve parenteral kullanıma uygundur. Yüksek biyoyararlanım ve yüksek dağılım hacmine sahip olduğu için, intravenöz ve oral kullanım arasında geçiş yapma imkanı sağlamaktadır (FDA 2001). Çalışmalarda, ergosterol sentezini doza bağımlı inhibe etmesinden dolayı flukonazolden daha etkin olduğu ileri sürülmüştür (Yıldıran 2001).

Flukonazole oranla daha geniş antifungal spektruma sahiptir. *Candida* türleri (bazı flukonazole dirençli izolatlar), *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon* spp., *Blastoschizomyces capitatus*, *Aspergillus* spp. (itrakonazol dirençli *A. fumigatus* ve amfoterisin B dirençli *A. terreus*), *Fusarium* spp., *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium prolificans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*,

Coccidioides immitis, *Penicillium marneffe*i ve dermatofitlere karşı etkilidir (Arıkan ve Rex 2009).

Yapılan çalışmalarda *Zygomycetes* grubu mantarların genel olarak vorikonazole karşı dirençli olduğu ileri sürülmüştür. Yapılan in-vivo ve in-vitro çalışmalarda ise; *C. krusei* ve *C. guilliermondii* gibi dirençli suşlara ve flukonazole duyarlılığı azalmış veya flukonazole dirençli *C. albicans* suşlarına karşı vorikonazolün etkili olduğu saptanmıştır (Yücesoy 2000).



Şekil 1.6. *Vorikonazol*' un kimyasal formülü

1.9.5. Alilaminler

Alilamin grubunda; terbinafin ve naftifin yer almaktadır. Terbinafinin oral ve topikal, naftifinin ise sadece topikal formu bulunmaktadır. Alilaminler, skualen epoksidaz enzimini inhibe ederek ergosterol sentezini engellemektedirler (Arıkan ve Rex 2009). Bu etki sonucunda; ergosterol eksikliği ve skualen birikmesiyle, membran permeabilitesi artarak mantar hücresinin ölümü gerçekleşmektedir (Sugar ve ark. 1998).

Dar etki spektrumuna sahiptirler ve dermatofit infeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadırlar. Dermatofitlere karşı diğer kullanılan ilaçlardan farklı olarak fungisid etki göstermektedirler (İlkit 2000).

1.10. Antifungal İlaçlara Direnç

Mantar infeksiyonlarının sayısında önemli artış, antifungal ajanların sıklıkla kullanılmaya başlanmasına sebep olmuştur. Son yıllarda antifungallerin tedavi ve profilaksi amaçlı olarak yaygın kullanımı antifungal direnç sorununun ortaya çıkmasına ve artışına neden olmuştur. Antifungal direnç gelişimi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Bu sebeple bu durumun klinik, in vitro (mikrobiyolojik) ve moleküler açıdan incelenmesi gerekmektedir (Yeğenoğlu 2012).

Klinik olarak antifungal direnç, uygulanan antifungal tedavide başarısızlık olarak tanımlanmaktadır. Direnç, genellikle primer (intrensek) ve sekonder (kazanılmış) olarak iki tipte sınıflandırılmaktadır. Primer direnç; bir tür veya kökenin antifungallere maruz kalmadan kalıtımla gelen özelliktir, sekonder direnç ise antifungaller ile uzun süreli tedavi sonucu sabit veya geçici genotipik değişimlerle ortaya çıkmaktadır. Antifungal dirençte üçüncü bir tip olarak tanımlanan klinik direnç, tekrarlayan veya ilerleyen mantar infeksiyonları olarak bilinmektedir (Kontoyiannis ve Lewis 2002).

Direnç gelişiminde birçok etken rol oynamaktadır:

- 1- Klinik faktörler: Antifungalın tedavi veya profilaksi amacıyla uzun süre kullanılması direncin oluşmasına neden olmaktadır.
- 2- Hücresel faktörler: Kişinin doğal direnci olan suşlarla enfekte olması direnç için önemlidir. Çünkü dirençli suşun duyarlı suş ile yer değiştirerek veya çeşitli mutasyonlara neden olması direnç gelişimi kazandırmaktadır.
- 3- Moleküler faktörler: Dirençli suşlar; a) Membranın sterol komponentinde değişiklik yaparak ilaç girişini azaltırlar ve böylelikle amfoterisin B'ye de direnç görülmektedir. b) 14 α -demetilaz enzimini kodlayan ERG 16 geninde spesifik nokta mutasyonlarıyla enzimin yapısını değiştirerek ilacın enzimi tanıyamaz hale getirebilirler. Ayrıca enzim sentezleyen gende amplifikasyon ve ekspresyon artmasına yol açarak, enzimin aşırı miktarda salgılanıp inhibe edilmesini engellerler. c) İlaç atım pompalarında ilaçların ve küçük moleküllerin hücre içi konsantrasyonlarını azaltmaya yönelik çalışırlar. Atım işlevindeki sistemlere ait

gen ekspresyonundaki artış sonucu ilaçların dışarı atılma miktarı ve hızı artarak direnç gelişimi görülmektedir (White 1997).

Günümüzde kullanılan antifungal ilaçlar için doğal dirençli olan mantar türleri bulunmaktadır. *Candida* türlerinden *C. krusei* azollere doğal olarak dirençlidir. Ayrıca, birçok *C. glabrata* izolatları doğal olarak dirençli veya doza bağımlı duyarlı olabilmektedir. Profilaksi veya tedavi amacıyla azol grubu ilaçların kullanımı diğer mantar türlerine de direnç kazandırmaktadır. Kazanılmış azol direnci AIDS hastalarındaki *C. albicans* izolatlarında önemli bir sorun haline gelmektedir. Çünkü oral kandidoz HIV ile enfekteli hastalarda en sık gözlenen fırsatçı enfeksiyon olup, tüm hastaların %90' ından fazlasında gözlenmektedir. Son yıllarda tanımlanan *C. albicans*' tan ayrılması oldukça zor olan *C. dubliniensis*' te azollere karşı direnç geliştirme yeteneğine sahiptir (White 2009).

Sterol sentezini bloke eden azol grubu ilaçların veya sitotoksik kemoterapinin amfoterisin B' nin hedef yapısını ortadan kaldırarak direnç oluşuma neden olduğu görülmektedir. Amfoterisin B' ye direnç genellikle tedavi sırasında ortaya çıkmaktadır. *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *Trichosporon beigeli*, *Pseudallescheria boydii*, *Scopulariopsis* spp., *Fusarium* spp. türlerinde amfoterisin B' ye karşı primer direnç görülebilmektedir. Kanseri hastalarında enfeksiyona neden olan mayalarda amfoterisin B' ye sekonder direnç oluşturduğu gözlemlenmiştir (White ve ark. 1998).

Flusitosine direnç gelişimi ilacın tek başına kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Sitozin deaminaz enzim yapısındaki değişikliğe bağlı olarak, primer direncin en sık görüldüğü ilaçtır (Wingard 1994). *Candida* türleri ve *C. neoformans*' ın flusitozin direnci çoğunlukla monoterapi esnasında gelişmektedir. Flusitozin ve amfoterisin B kombinasyonunun uygulanması direnç oluşumunu engellemektedir. Yapılan çalışmalarda *Candida* türlerinin % 7-8' i, *C. neoformans*' ın % 1-2' sinin flusitozine dirençli olduğu gösterilmiştir (Yeğenoğlu 2012).

Ekinokandinler klinik kullanıma yeni girdiklerinden direnç gelişimi nadir görülmektedir. Diğer antifungallerle çapraz direnci henüz belirlenememiştir. Yapılan çalışmalarda ekinokandinlerin birçok *Candida* ve *Aspergillus* türüne karşı etkili olduğu; *Zygomycetes* sınıfı mantarlar, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium* ve *Trichosporon* türlerine ise etkisiz olduğu ileri sürülmüştür. Çalışmalarda; ekinokandinlerden

kaspofungin kullanımının *Candida* infeksiyonlarını arttırdığı, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis* türlerine karşı direncinin tedavi sırasında geliştiği gösterilmiştir (Yeğenoğlu 2012).

1.11. Antifungal Duyarlılık Testleri

Son yıllarda antifungal ilaçların kullanım sıklıkları artmış olup, birçok yeni antifungal ilaç klinik kullanıma girmektedir. Antifungal duyarlılık testleri yeni geliştirilen ilaçların in vitro etki spektrumunu belirlemek ve klinik izolatların invitro duyarlılıklarının saptanabilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu testlerin geliştirilmesi ve standardizasyonu klinik mikoloji alanında çok önemli bir yer oluşturmaktadır. Bu amaçla eski adıyla NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) yeni adıyla CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) tarafından standart yöntemler geliştirilmektedir (Arıkan 2002; Koç 2012).

İdeal olarak in vitro duyarlılık testleri;

- İki ya da daha fazla ilacın aktivitesini güvenilir olarak belirleyebilir,
- İlaçların in vivo aktiviteleri ile uyumlu ve tedavi sonuçlarını takip edebilir,
- Normal olarak duyarlı organizma topluluğu içindeki direncin gelişmesinin izlenmesini sağlayabilir,
- Yeni geliştirilen antifungal ilaçların terapötik potansiyelini belirleyebilir özellikte olmalıdır (Kuştımur 1999).

Duyarlılık testleri bu özelliklerin yanı sıra; kolay, hızlı, tekrarlanabilir ve ekonomik olmalıdır. Ayrıca bu testlerin sonuçları, klinik açıdan anlamlı bilgi sağlamalıdır (Konntoyiannis ve Lewis 2002).

Antifungal duyarlılık testleri; mikrodilüsyon, makrodilüsyon, difüzyon temeline dayalı ve flovsitometrik yöntemler olarak öne sürülmüştür (Rex ve ark. 2001).

1.11.1. Makrodilüsyon yöntemi

Makrodilüsyon testi, mantar izolatlarına karşı tüm antifungal ajanları test etmek için uygun bir yöntemdir. Bu yöntem yalnızca *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans* için standardize edilmiştir. Dimorfik mantarların maya şekillerine ve

filamentöz (küf) mantarlarına uygulanmamıştır. Örnek sayıları az olan laboratuvarlar için uygundur (Espinell-Ingroff ve Phaller 2009).

Yöntemde besiyeri olarak, RPMI 1640 besiyeri (glutamin ve pH indikatörü içeren, bikarbonatsız) kullanılır. Antifungal ilaçlar önce kendilerine uygun çözeltiler içerisinde sulandırılır. Mayaların bulanıklıkları 0,5 McFarland bulanıklığa göre ayarlanarak $1-5 \times 10^6$ hücre olacak şekilde steril serum fizyolojik içerisinde süspansiyon edilir. Bir deney tüpüne hazırlanan antifungal çözeltisinden 0,1 ml, maya süspansiyonundan 0,9 ml eklenerek karıştırılır ve 35°C’ de 46-50 saatlik inkübasyon sonucunda ilaç içeren besiyeri tüpleri, üreme kontrol tüpleri ile kıyaslanarak görsel olarak değerlendirilir (CLSI M27-A3, 2008).

1.11.2. Mikrodilüsyon yöntemi

Mikrodilüsyon yöntemi sonuçlarının makrodilüsyon sonuçlarıyla uyumlu olmasından dolayı CLSI tarafından referans yöntem olarak kabul edilmiştir. Makrodilüsyon yöntemi hem zaman alıcıdır hem de fazla malzeme kullanılmaktadır. Mikrodilüsyon yöntemi ise, yapılması kolay, daha hızlı, ekonomik ve otomatize edilebilir olmasından dolayı tercih edilmiştir (Rex ve ark. 2001).

CLSI tarafından yayınlanan; “M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard” mayaların ve “M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard” ise küf mantarlarının antifungal ilaçlara duyarlılıklarını belirlemek için geliştirilmiş mikrodilüsyon yöntemidir (CLSI M27-A3 2008; CLSI M38-A2 2008)

Bu yöntemde de makrodilüsyon yönteminde olduğu gibi önce ilaçların ve maya mantarlarının uygun sulandırılmaları hazırlanır. Deneyler U tabanlı 96 kuyucuklu steril mikrotiplerde çalışılır. Kuyucuklara 100’ er µl antifungal çözeltisi ve 100’ er µl maya solüsyonu eklenerek, plaklar 35°C’ de 24- 48 saat inkübe edilir. Test çukurları üreme kontrol çukuru ile görsel olarak değerlendirilir ve elde edilen bulanıklık 0’ dan 4’ e kadar rakamla ifade edilir (Tablo 1.1):

0: Bulanıklık yok

1: Hafif bulanık (kontrole göre % 0-25 bulanıklık olması)

2: Bulanıklıkta belirgin azalma (kontrole göre %25-50 bulanıklık)

3: Bulanıklıkta hafif azalma (kontrole göre %75-100 bulanıklık)

4: Bulanıklıkta azalma yok (kontrole göre %100 bulanıklık)

Bu kriterler göz önüne alınarak MİK değerleri amfoterisin B için hiç bulanıklığın olmadığı 0 değeridir. Azoller için ise 2 değeridir (CLSI M27-S3 2008).

Tablo 1.1. CLSI Antifungal ilaç MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$)

Antifungal	Duyarlı	Doza Bağımlı Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
Anidulafungin	≤ 2	-	-	-
Caspofungin	≤ 2	-	-	-
Flukonazol	≤ 8	16-32	-	≥ 64
Flusitosin	≤ 4	-	8-16	≥ 32
İtrakonazol	$\leq 0,125$	0,25-0,5	-	≥ 1
Micafungin	≤ 2	-	-	-
Vorikonazol	≤ 1	2	-	≥ 4

Kaynak: CLSI M27-S3, 2008

1.11.3. Agar dilüsyon yöntemi

Xu ve arkadaşlarının (1998) agar dilüsyon temeline dayalı geliştirdikleri yöntemdir. Yöntemle ilgili bir standart bulunmadığından sonuçlar farklı yorumlanabilmektedir. Agar dilüsyon testi hem mayalar hem küfler için uygulanabilir de, mayalardan ziyade küfler için uygun bir yöntem olarak önerilmektedir. Bu testin; basit, hızlı, ucuz ve ek alet gerektirmeyen referans yöntemine uygun sonuç verdiği bildirilmiştir (Xu ve ark. 1998).

Bu yöntemde ilaç dilüsyonları agar besiyeri hazırlanırken içerisine 1/10 oranında ilave edilir. Üreme kontrolünün yapılabilmesi için de ilaçsız besiyeri hazırlanır. Maya solüsyonu diğer yöntemlerdeki gibi hazırlanır. Bu solüsyonlardan besiyerine 1-3 μl ekim yapılır. Yapılan ekimler 30°C' de 24 saat inkübe edildikten sonra değerlendirme yapılır. Koloniler, ilaç içermeyen besiyerlerindeki ortalama ile

karşılaştırılır ve kontrole göre koloni çevresinde önemli miktarda azalma saptanan en düşük ilaç konsantrasyonu MİK olarak belirlenir (Espinel- Ingroff ve Phaller 2009).

1.11.4. Disk difüzyon yöntemi

Bu yöntemde antifungal ajanlarla doyurulmuş diskler kullanılmaktadır. Kolay uygulanabilir ve basit olan bu yöntemin özellikle 24 saat sonraki değerlendirmelerde referans yöntem ile çok iyi korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Bu yöntemin tek dezavantajı olarak doza bağımlı duyarlı suşlar ile gerçek dirençli suşları ayırt edemediği belirtilerek bu açıdan kantitatif testlere gerek duyulduğu vurgulanmıştır (Kirkpatrick ve ark. 1998).

Disk difüzyon yöntemi standart dökümanları; *Candida* için “M44-A2 Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline” , dermatofit dışı küf mantarları için ise “M51-A Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline” olarak yayınlanmışlardır (CLSI M44-A2 2009; CLSI M51-A 2010).

Yöntemde besiyeri olarak Müller Hinton Agar (% 2 dektroz ve 0,6 µg metilen mavisi eklenmiş) kullanılmaktadır. Besiyeri üzerine, bulanıklığı spektrofotometrede 530 nm dalga boyu (%75-77 transmittans) ya da McFarland 0,5 No’ lu bulanıklık tüpüne göre $1-5 \times 10^6$ hücre olacak şekilde ayarlanan maya süspansiyonundan ekim yapıldıktan sonra üzerine yerleştirilen antifungal disklerin 24 saat sonra zon çaplarının değerlendirilmesiyle sonuç elde edilir (Kirkpatrick ve ark. 1998).

1.11.5. Flovsiometrik yöntemler

Flovsiometrik yöntemlerin temelini, DNA’ ya bağlanan vital boyalar ile ölü ve canlı hücrelerin ayrılması oluşturmaktadır. Propidyum iyodürün DNA’ ya bağlanmasını takiben FA Scan Flow Cytometer cihazında floresans ölçümü yapılarak sonuç elde edilmektedir. Hücrelerde ilaca bağlı membran hasarı oluştuğunda ortama eklenen floresanlı boyalar hücre içine girer ve antifungal ilaçların etkinliği araştırılarak MİK değerleri belirlenir. Bu yöntemin avantajı; kısa sürede sonuç vermesi, çok hücre

incelenmesi nedeniyle hata payının azaltılması ve antifungallerin etki mekanizmalarının ayırımına olanak vermesi olarak sayılabilir (Ramani ve Chaturvedi 2000).

1.11.6. Kolorimetrik yöntemler

Bu yöntemlerin esasını, MİK' in daha kolay okunması için ortama oksidasyon-redüksiyon indikatörü eklenmesi oluşturmaktadır. İndikatör olarak Alamar mavisi ve XTT (2,3-bis 2-metoksi-4-nitro-5-sulfafenil-5-fenilamino karbonil 2H-tetrazolium hidrokset) ile MTT (3-[4,5-dimetil-2-tiyazol]-2,5 difenil tetrazonyum bromür) gibi tetrazolium tuzları ve son zamanlarda sodyum resazurin kullanılmaktadır. Besiyerine indikatör eklenip diğer basamaklar mikrodilüsyon yöntemine benzer şekilde yapılır. Birçok araştırmacı indikatör olarak ticari Alamar mavisini kullanmıştır. Alamar mavisi normalde mavi olan bir ayıraçtır ve üreme olduğunda pembe-kırmızıya dönüşmektedir. MİK değeri kırmızı rengin oluşmasını önleyen en düşük ilaç konsantrasyonudur (Kuştımur 1999).

1.11.7. Spektrofotometrik yöntemler

Antifungal içeren kuyucukların MİK değerlendirilmesinin yapılması için spektrofotometrede absorbanları alınır ve kontrol kuyucuğuyla karşılaştırılır. Amfoterisin B için 630 nm, 5-FC ve flukonazol için ise 405 nm dalga boyu esas alınır. Amfoterisin B için optik dansitenin 0,1' in altında olduğu (üremenin izlenmediği) en düşük ilaç konsantrasyonu; 5-FC ve flukonazol için ise optik dansitenin kontrol kutucuğuna göre % 80 veya daha fazla azalma gösterdiği en düşük ilaç konsantrasyonu MİK olarak belirlenir (Rodriguez-Tudela ve ark. 1996).

1.11.8. Ticari olarak geliştirilen antifungal duyarlılık testleri

Antifungal duyarlılık testlerini geliştirilen ticari sistemlerle de bulunmaktadır. Bu sistemler referans yöntemlere alternatif olabilecek daha kolay, tekrarlanabilir, kullanılabilirliği yüksek, ucuz ve uygun yöntemlerdir. Bunlar içinde en sık kullanılan ticari yöntemler; E test (AB Biodisk, Sonla, Sweden), Integral system yeasts antifungal disk (Liofilchem Diagnostics, L'Aquila, Italy), Candi-fast (International Microbio/Stago Group, Milona Italy), Fungitest (Bio-Rad SDP, Paris, France), Vitek 2 (bioMerieux), Mast goup antifungal disk, Rosco neosensitive disk test (Neo-Sensitabs

user's guide; A/S Rosco Diagnostica, Taastrup, Denmark), BD Phoenix (Diagnostic Systems Circle Sparks, MD USA), Yeastone (Trek Diagnosytic system, Inc.), ATB fungus 2 (API-bioMerieux, Marcy l'Etoile, Fransa), Mycostandard (Institut Pasteur, Paris, Fransa), Mycototal (Behring Diagnostic, Rueil-Malma-ion, Fransa), ASTY colorimetric panel (Kyokuyuto Pharmaceutical Industrial, Ltd. Tokyo, Japon), Biomic® vision sistem ve ayrıca araştırmacıların standart yöntemleri modifiye ettiği sistemler olup, yeni yöntemler ile çalışmalar literatürde bulunmaktadır (Koç 2012).

1.11.8.1. VITEK 2 antifungal testi (AST-YS kart)

VITEK 2 antifungal duyarlılık testi; otomatize, standart ve hızlı bir testtir. Duyarlılık testi için geliştirilmiş AST kartları kullanılmaktadır. Tamamen otomatik olan VITEK 2 sistem ile antifungal duyarlılık testleri için, inokulum hazırlığı, kartların doldurulması, inkübasyon sıcaklığı ve süresi, MİK noktasının belirlenmesi gibi kritik parametrelerin standardizasyonu sağlanmıştır (Pfaller ve ark. 2007).

Antifungal duyarlılık kartlarında, bir dizi çift dilüsyonda antifungal doldurulmuş kuyular ve her bir antifungalın raporlanabilir aralığı bulunmaktadır. VITEK 2 okuyucusu spektrofotometrik olarak ölçüm sağlamaktadır. Inkübasyon süresince her bir kuyudaki üremeye göre geçen ışık miktarını ölçerek sonuç vermektedir. Kuyulardaki üreme ışığın daha az geçmesine sebep olur, her bir değişiklik hafızaya alınarak inkübasyon sonunda MİK sonuçları saptanmaktadır. VITEK 2 sistemi MİK değerlerini CLSI' e göre yorumlamaktadır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada kullanılan besiyerleri

2.1.1.1. *Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (BD Difco-210950)*

Kazeinin Pankreatik Dijesti	5 g
Hayvan Dokularının Peptik Dijesti	5 g
Dekstroz	40 g
Agar	15 g
Distile Su	1000 ml
pH : 5,6 ± 0,2	

Yukarıda içeriği verilen hazır toz besiyerinden 65 g tartılarak distile suda çözdürölüp 121°C' de 15 dakika 1,5 atm basınçta otoklavlanarak steril edildikten sonra maya kültürlerinin gelişmesinde kullanılmıştır.

2.1.1.2. *Mısır Unlu-Tween 80 Agar (Corn Meal Agar) (BD BBL- 211132)*

Mısır Unlu	2 g
Agar	15 g
Tween 80	10 ml
Distile Su	1000 ml
pH : 6.0 ± 0.2	

Yukarıda içeriği verilen hazır toz besiyerinden 17 g tartılarak distile suda çözdürölüp 121°C' de 15 dakika 1,5 atm basınçta otoklavlanarak steril edildikten sonra mayaların identifikasyonunda kullanılmıştır (McGinnis 1980).

2.1.1.3. CHROMagar Candida besiyeri (BD BBL- 254093)

Kromopepton	10 g
Glukoz	20 g
Kromojen Karışımı	2 g
Kloramfenikol	0,5 g
Agar	15 g
Distile Su	1000 ml

Yukarıda içeriği verilen kromojenik besiyeri olan CHROMagar Candida besiyeri hazır plak şeklinde alınarak, mayaların identifikasyonunda kullanılmıştır (Odds ve Bernaerts 1994).

2.1.1.4. Candida Ident agar (Sigma Aldrich- 94382)

Hayvan Dokularının Peptik Dijesti	5 g
Yeast Ekstrakt	3 g
Malt Ekstrakt	3 g
Glukoz	10 g
Kloramfenikol	0.05 g
Kromojenik Karışım	3 g
Agar	18 g
Distile Su	1000 ml
pH: 7.2 ± 0.2	

Yukarıda içeriği verilen kromojenik hazır toz besiyerinden 42.1 g tartılarak 100 mg Gentamisin eklendikten sonra, distile suda çözdürülüp 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm basınçta otoklavlanarak steril edildikten sonra mayaların identifikasyonunda kullanılmıştır.

2.1.1.5. *BIGGY agar (Sigma Aldrich-73608)*

Yeast Ekstrakt	1 g
Glisin	10 g
Dekstroz	10 g
Bismuth Amonyum Sitrat	5 g
Sodyum Sülfid	3 g
Agar	16 g
Distile Su	1000 ml

pH: 6.8 ± 0.2

Yukarıda içeriği verilen kromojenik hazır toz besiyerinden 45 g tartılarak distile suda çözündürülüp, yavaşça kaynatılıp tamamen çözünmesi sağlanarak, 45°C' ye kadar soğutularak steril petrilere dağıtılmıştır. Hazırlanan besiyeri mayaların identifikasyonunda kullanılmıştır.

2.1.1.6. *Brilliance Candida agar (Oxoid- CM1002)*

Pepton	4 g
Kromojenik Karışım	13.6 g
Agar	13.6 g
Distile Su	1000 ml

pH 6.0 ± 0.2

Yukarıda içeriği verilen kromojenik hazır toz besiyerinden 31,2 g tartılarak, 500 mg kloramfenikol eklendikten sonra distile suda çözündürülüp, yavaşça kaynatılıp tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Besiyeri 45°C' ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dağıtılmıştır. Hazırlanan besiyeri mayaların identifikasyonunda kullanılmıştır.

2.1.1.7. Yeast Ekstrakt Pepton Dekstroz (YPD) agar (Difco BD- 242720)

Yeast Ekstrakt	10 g
Pepton	20 g
Dekstroz	20 g
Agar	15 g
Distile Su	1000 ml

Yukarıda içeriği verilen hazır toz besiyerinden 65 g tartılarak distile suda çözdürölüp 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm basınçta otoklavlanarak steril edildikten sonra DNA izolasyonu için maya kültürlerinin gelişmesinde kullanılmıştır.

2.1.1.8. Yeast Ekstrakt Pepton Dekstroz (YPD) broth (Difco BD- 242820)

Yeast Ekstrakt	10 g
Pepton	20 g
Dekstroz	20 g
Distile Su	1000 ml

Yukarıda içeriği verilen hazır toz besiyerinden 50 g tartılarak distile suda çözdürölüp 121°C’ de 15 dakika 1,5 atm basınçta otoklavlanarak steril edildikten sonra 5’ er ml falkon tüplere dağıtılmıştır. Hazırlanan besiyeri DNA izolasyonu için maya kültürlerinin gelişmesinde kullanılmıştır.

2.1.1.9. RPMI 1640 besiyerinin hazırlanışı

RPMI 1640	10,4 g
MOPS	34,53 g

L-glutaminli ve bikarbonatsız RPMI 1640 besiyeri distile suda çözölerek tampon olarak kullanılan MOPS eklenmiş distile su içerisinde 1000 ml olacak şekilde çözölümüştür (pH 7,0). Besiyeri filtrasyon yöntemi ile sterilize edilerek 100 ml’ lik

steril kapaklı şişelere dağıtılarak, kullanılıncaya kadar +4 °C’ de saklanmıştır (Pfaller ve ark. 1996).

2.1.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler

2.1.2.1. Yağ asidi analizi çözeltileri

Reagent I (Saponifikasyon ayıracı)

Sodyum Hidroksit (ACS)	45 g
Metanol (HPLC saflıkta)	150 ml
Deionize Distile Su	150 ml

Reagent II (Metilasyon ayıracı)

6.00 N Hidroklorik Asit	325 ml
Metanol (HPLC saflıkta)	275 ml

Reagent III (Ekstraksiyon ayıracı)

Heksan (HPLC saflıkta)	200 ml
Metiltert-butyl eter (HPLC saflıkta)	200 ml

Reagent IV (Yıkama)

Sodyum Hidroksit (ACS)	10,8 g
Metanol (HPLC saflıkta)	900 ml

Reagentlerin hepsi hazırlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır. 40 g NaCl 100 ml distile suda çözülmüş, yeterli çökelme olamayan durumlarda kullanılmıştır (Telefoncu ve ark. 2003).

2.1.2.2. Moleküler identifikasyon için kullanılan çözeltiler

1. 2 M'lık Sorbitol hazırlanışı

Sorbitol 21,86 g

Distile Su 100 ml

Distile suyla karıştırılarak çözülür, 121°C' de 15 dakika 1,5 atm basınçta otoklavlanarak steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

10 mM'lık Kalsiyum Klorür (CaCl₂) hazırlanışı

CaCl₂ 0,11 g

Distile Su 100 ml

Distile suyla karıştırılarak çözülür, 121°C' de 15 dakika 1,5 atm basınçta otoklavlanarak steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

0.1 M'lık Tris-HCl hazırlanışı

Tris-HCl 1.57 g

Distile Su 100 ml

Distile suyla karıştırılarak çözülür ve pH' ı 7,5 olarak ayarlanır. 121°C' de 15 dakika 1,5 atm basınçta otoklavlanarak steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

Sorbitol tampon hazırlanışı: Yukarıda hazırlanan üç çözeltiliden (1,2 M'lık Sorbitol, 10 mM'lık CaCl₂, 0,1 M'lık Tris-HCl) eşit hacimlerde alınıp, 35 mM β-merkaptoetanol ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

10 mM'lık EDTA hazırlanışı

EDTA 0,37 g

Distile Su 100 ml

Distile suyla karıştırılarak çözülür ve pH' ı 8.0 olarak ayarlandıktan sonra oda sıcaklığında saklanmıştır.

50X Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu stok solüsyon hazırlanışı

Tris Base	242 g
Glasial Asetik asit	57,1 ml
EDTA (0.5 M pH:8)	100 ml

Çözelti distile su ile 1000 ml' ye tamamlanmış ve 1:49 oranında distile su ile karıştırılarak 1X TAE olarak elektroforez işlemlerinde kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyon oda ısısında saklanmıştır (Sambrook ve Russell 2001).

5X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponu stok solüsyon hazırlanışı

Tris Base	54 g
Borik Asit	27, 5 g
EDTA (0.5 M, pH: 8.0)	20 ml

Çözelti distile su ile 1000 ml' ye tamamlanmış ve pH 8,0' e ayarlanarak oda ısısında saklanmıştır. 5X TBE stok tampon solüsyonu 1:9 oranında distile su ile karıştırılarak 0,5X TBE olarak REA elektroforez işlemlerinde kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyon oda ısısında saklanmıştır (Sambrook ve Russell 2001).

2.1.3. Antifungal duyarlılık testi için hazırlanan antifungal maddeler

Antifungal ilaç miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$Ağırlık (mg) = [Hacim (ml) \times Konsantrasyon (\mu g/ml)] / Potens (\mu g/mg)$$

Amfoterisin B (AMB)

Potensi: %80	Stok Solüsyon Konsantrasyonu: 1600 $\mu g/ml$
AMB	40 mg
DMSO	20 ml

Flusitosin (5FC)

Potensi: %100 Stok Solüsyon Konsantrasyonu: 5120 µg/ml

5FC 102,4 mg

Distile Su 20 ml

Kaspofungin (CAS)

Potensi: %97 Stok Solüsyon Konsantrasyonu: 5120 µg/ml

CAS 105,5 mg

Distile Su 20 ml

Flukonazol (FLU)

Potensi: %98 Stok Solüsyon Konsantrasyonu: 5120 µg/ml

FLU 104,4 mg

Distile Su 20 ml

Vorikonazol (VOR)

Potensi: %98 Stok Solüsyon Konsantrasyonu: 1600 µg/ml

VOR 32,6 mg

DMSO 20 ml

Antifungallerin stok solüsyonları hazırlanarak ependorf tüplere bölünerek kullanılıncaya kadar -80° C' de saklanmıştır (CLSI M27-A3).

2.2. Metod

2.2.1. Örneklerin toplanması

Çalışmaya; Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Ağustos 2010- Ağustos 2011 tarihleri arasında vajinal sürüntü ve idrar örneklerinden soyutlanan 100 maya izolatu ile altı referans suşu (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida tropicalis* NRRL Y-12968 dahil edilmiştir. Maya kolonileri ayrı ayrı SDA içeren tüplere transfer edilip +4°C' de muhafaza edilmiştir. Ayrıca isolatlar %15' lik gliserol içerisinde -80°C' de stoklanmıştır. Stok besiyerlerinden SDA' ya iki kez pasajlanan suşlar 37°C' de 24- 48 saat inkübe edilerek üretilmiştir.

2.2.2. Geleneksel yöntemlerle identifikasyon

2.2.2.1. Germ Tüp testi

Germ tüp testi uygulanacak maya kolonisi, 0,5-1 ml insan serumu bulunan tüp içerisine eklenerek karıştırılmıştır. 37°C' de 2 saat inkübe edildikten sonra, direkt preparat hazırlanarak ışık mikroskopunda 40x objektifle incelenmiştir. Blastospordan köken alan, başlangıç noktasında boğumlanma göstermeyen ve maya hücresinin 3-4 katı uzunluğundaki hif benzeri yapılar, germ tüp olarak kabul edilmiştir. Ana hücreden boğumlanma göstererek oluşan yapılar, pseudogerm tüp oluşumu olarak değerlendirilmiştir. Germ tüp üreten maya kökenleri *C. albicans* olarak tanımlanmıştır (Tümbay 1999).

2.2.2.2. Mısır unlu-tween 80 Agar'da morfolojik özelliklerin belirlenmesi

SDA' daki saf maya kolonilerinden iğne uçlu öze ile alınarak mısır unlu agar besiyerine, birbirine paralel 3-4 çizgi şeklinde ekim yapılmıştır. Ekim çizgilerinin üzerini kaplayacak şekilde steril lamel kapatılıp ve 25-27°C' de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüm maya isolatları; ışık mikroskopunda 40x objektif ile klamidospor, blastospor, artrospor, psödohif ve hif oluşturma özelliği yönünden incelenmiştir. Sitoplazma içerisinde globüllerin bulunduğu, çok fazla küme yapmamış ve kalın duvarlı klamidosporlara sahip mayalar *C. albicans* olarak tanımlanmıştır (Larone 2011).

2.2.2.3. Kromojenik besiyerleriyle identifikasyon

2.2.2.3.1. CHROMagar Candida

Test edilecek kökenin SDA' daki saf kültüründen steril bir öze ile alınan koloniler CHROMagar Candida besiyerine ekilerek, $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ ' de 48 saat inkübe edildikten sonra koloni renkleri değerlendirilmiştir. Sarı-yeşil ile mavi-yeşil koloniler *C. albicans*, soluk pembe gül rengindeki koloniler *C. krusei*, koyu mavi ile mavimsi yeşil veya metalik mavi koloniler *C. tropicalis* olarak yorumlanmıştır (Odds ve Bornaerts 1994; Pfaller ve ark. 1996).

2.2.2.3.2. Candida Ident agar (Candida ID)

İzolatların SDA' daki saf kültüründen steril bir öze ile alınan koloniler Candida Ident agara ekilerek, 30°C ' de 24-48 saat inkübe edildikten sonra koloni renkleri değerlendirilmiştir. Açık yeşil renkte düz koloniler *C. albicans*, mavi ile metalik mavi renkte koloniler *C. tropicalis*, mor renkte kabarık koloniler *C. krusei*, krem-beyaz renkte koloniler ise *C. glabrata* olarak tanımlanmıştır (Rousselle ve ark. 1994).

2.2.2.3.3. BIGGY agar

SDA besiyerindeki taze kültürden BIGGY agara ekimi yapılan örnekler 30°C ' de 48-72 saat inkübasyon sonucunda; siyah-kahverengi mat koloniler *C. albicans*, koyu kahverengi ve siyah merkezli koloniler *C. tropicalis*, gümüşü-kahverengi-siyah merkezli koloniler *C. krusei* olarak değerlendirilmiştir (Kalkancı ve ark. 1999; Aktaş ve ark. 2001).

2.2.2.3.4. Brilliance Candida agar

Hazırlanan besiyerine taze kültürden ekim yapılan izolatlar 30°C ' de 24-48-72 saat inkübasyon sonucunda renklerine göre yorumlamıştır. Koyu mavi renkteki koloniler *C. tropicalis*, yeşil renkteki koloniler *C. albicans* ve *C. dubliniensis*, kuru pembe-kahverengi renkteki koloniler *C. krusei*, bej, sarı, kahverengi renkteki koloniler *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* ve *C. lusitaniae* olarak değerlendirilmiştir (Baixench ve ark. 2006).

2.2.3. Hızlı identifikasyon testi ile tanımlama

2.2.3.1. VITEK 2 ID-YST Sistem

İzolatların SDA’ daki 18-24 saatlik taze kültürleri kullanılmıştır. Üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlıklar yapılmıştır. VITEK 2 Compact System için inokulum süspansiyonu için polistiren tek kullanımlık test tüpleri kullanılmıştır. Bu tüplere konulan 3 ml steril serum fizyolojik içinde 2,0 McFarland (1,80- 2,20 aralığı) olacak şekilde bioMérieux DensiChek ile ölçülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonlar kartuşlara ve VITEK YST kartlarının sırasıyla barkodları okutularak cihaza yerleştirilmiştir. Cihaz otomatik olarak vakumla kartlara dolum yapmakta ve inkübasyona başlamaktadır. İnkübasyon sonunda cihazdan sonuçlar alınarak değerlendirilmiştir (BioMerieux Diagnostics) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. YST kart test substratları

Kuyucuk	Test	Kısa İsmi	Miktar/ Kuyucuk (mg)
3	L-Lizin-Arilamidaz	LysA	0,0228
4	L-Malat asimilasyonu	IMLTa	0,1500
5	Lösin-Arilamidaz	LeuA	0,0234
7	Arginin	ARG	0,1500
10	Eritritol asimilasyonu	ERYa	0,3000
12	Gliserol asimilasyonu	GLYLa	0,1600
13	Tirozin arilamidaz	TyrA	0,0276
14	Beta-N-Asetil Glikozaminidaz	BNAG	0,0408
15	Arbutin asimilasyonu	ARBa	0,3000
18	Amigdalin asimilasyonu	AMYa	0,3000
19	D-Galaktoz asimilasyonu	dGALa	0,3000
20	Gentiobiyoz asimilasyonu	GENa	0,3000
21	D-Glukoz asimilasyonu	dGLUa	0,3000
23	Laktoz asimilasyonu	LACa	0,9600
24	Metil-A-D-Glukopiranosid asimilasyonu	MAdGa	0,3000
26	D-Selobiyoz asimilasyonu	dGELa	0,3000
27	Gama-Glutamil-Transferaz	GGT	0,0228
28	D-Maltoz asimilasyonu	dMALa	0,3000
29	D-Rafinoz asimilasyonu	dRAFa	0,3000
30	PNP-N-Asetil-BD-galaktozaminidaz 1	NAGA1	0,0306
32	D-Mannoz asimilasyonu	dMNEa	0,3000
33	D-Melibiyoz asimilasyonu	dMELa	0,3000
38	L-Sorboz asimilasyonu	ISBEa	0,3000
39	L-Ramnoz asimilasyonu	IRHAa	0,3000
40	Ksilitol asimilasyonu	XLTa	0,3000
42	D-Sorbitol asimilasyonu	dSORa	0,3000
44	Sakkaroz/ Sükroz asimilasyonu	SACa	0,3000
45	Üreaz	URE	0,1500
46	Alfa-glikosidaz	AGLU	0,0360

47	D-Turanoz asimilasyonu	dTURa	0,3000
48	D-Trehaloz asimilasyonu	dTREa	0,3000
49	Nitrat asimilasyonu	NO3a	0,0300
51	L-Arabinoz asimilasyonu	IARaA	0,3000
52	D-Galakturonat asimilasyonu	dGATa	0,1500
53	Eskülin hidrolizi	ESC	0,2250
54	L-Glutamat asimilasyonu	IGLTa	0,1500
55	D-Ksiloz asimilasyonu	dXYLa	0,3000
56	DL-Laktat asimilasyonu	LATa	0,1500
58	Asetat asimilasyonu	ACEa	0,1500
59	Sitrat (Sodyum) asimilasyonu	CITa	0,1500
60	Glukuronat asimilasyonu	GRTas	0,1500
61	L-Prolin asimilasyonu	IPROa	0,1500
62	2-Keto-D-Glukonat asimilasyonu	2KGa	0,1500
63	N-Asetil-glikozamin asimilasyonu	NAGa	0,1500
64	D-Glukonat asimilasyonu	dGNTa	0,1500

* Tabloda 1 ile 64 arasındaki belirtilmeyen diğer kuyucuklar boştur. **Kaynak:** Pincus 2006.

2.2.4. Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) analizi

Bütün izolatlar yağ asidi metil esterlerinin (FAME) analizi için işleme alınmıştır. Analiz edilecek mayalar Sabouraud Dextrose Agar (SDA)' da 2 gün 28°C' de inkübe edilmiştir. Her bir izolat yaklaşık 80 mg olacak şekilde steril kapaklı cam tüplere tartılarak, izolatlara; saponifikasyon, metilasyon ve ekstraksiyon basamaklarından sonra yağ asitleri elde edilerek standart suşlar ile kıyaslanarak identifikasyonları yapılmıştır (Schutter ve Dick 2000). Bu basamakların yapıları aşağıda verilmiştir:

1- Saponifikasyon: 1 ml Reagent I' den aktarılıp 5-10 saniye vortekslenip 5 dakika 100°C' de bekletilmiş bekletilmiş tekrar 5-10 saniye vortekslenerek 100°C' de 25 dakika bekletilerek hemen soğuk suya konularak soğutulmuştur.

2- Metilasyon: 2 ml Reagent II ilave edilerek 5-10 saniye vortekslenip 80°C' de 10 dakika bekletilmiş ve hemen soğutulmuştur.

3- Ekstraksiyon: 1,25 ml Reagent III ilave edilerek 5 dakika yatay karıştırıcıda karıştırılarak cam pipet yardımıyla alt faz atılmıştır.

4- Yıkama: 3 ml Reagent IV ilave edilerek yatay karıştırıcıda 5 dakika karıştırılmış ve üst faz viallere alınmıştır (Shutter ve Dick 2000).

Yağ asidi identifikasyonları, Sherlock Mikrobial İdentifikasyon Sistemi ile cihaz şartlarına uygun olarak yapılacaktır. Sonuçlar YEAST28 kütüphanesinde değerlendirilmiştir.

2.2.5. Moleküler yöntemlerle identifikasyon

2.2.5.1. DNA izolasyonu

Yeast ekstrakt pepton dekstroza (YPD) agar' da 37°C' de 48 saat inkübasyon sonucu üretilen suşlardan alınan bir koloni, 5ml'lik YPD buyyon içeren tüplere aktararak 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. YPD buyyon içinde inkübe edilmiş olan suşlar Nucleospin Tissue Kit (Macherey- Nagel, Almanya) kullanılarak, üretici firma önerileri doğrultusunda ekstraksiyona alınmıştır.

5 ml' lik YPD buyyonda inkübe edilmiş suşlar 5.000×g' de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatantları atılmıştır. Çökeltiye 10 mM EDTA' dan 1000 µl eklenip, 5.000×g' de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatantı atılmıştır. Santrifüj işlemi sonrası elde edilen çökelti ön-lizis işlemine alınmış ve bu işlemde 600 ml sorbitol tampon ve 50U litikaz ile süspanse edilen çökelti 1,5 ml' lik ependorf tüplerine alınmıştır. Elde edilen karışım 30°C' de 30 dakika inkübe edildikten sonra 2.000×g' de 10 dakika santrifüjlenip, süpernatantı atılmıştır. Elde edilen çökeltiye 180 ml kit içeriğinde bulunan T1 tampon ve 25 ml proteinaz K solüsyonu ilave edilip, vortekslenmiştir. Örnekler, 56°C' de su banyosunda 2 saat inkübe edildikten sonra sonra lizis işlemine geçilmiştir. Lizis işleminde su banyosundan çıkarılan örnekler vortekslenildikten sonra 200 ml B3 tampon eklenerek vorteks işlemi tekrar edilmiştir. Daha sonra 70°C' de 10 dakika inkübe edilen örneklerin lizis işlemi tamamlandıktan sonra örneklerle 210 ml %96-100'lük etanol eklenip ve vortekslenmiştir. Örnekler 2 ml' lik toplama tüplerine yerleştirilmiş olan Nucleospin Tissue kolonlara alınarak ve 11.000×g' de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Sıvının toplandığı toplama tüpleri atılıp ve kolonlar yeni toplama tüpleri içine yerleştirilmiştir. Bu işlem ile DNA'nın silika membrana bağlanması sağlanmıştır. Silika membranın yıkanması amacıyla 500 ml BW tampon eklenip ve 11.000×g' de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Sıvının toplandığı toplama tüpleri atılıp ve kolonlar yeni toplama tüpleri içine alınmıştır. Kolonlara 600 ml B5 tamponu eklenerek, 11.000×g' de 1 dakika santrifüjlenip ve yine sıvının toplandığı toplama tüpleri atılarak kolonlar yeni toplama tüpleri içine yerleştirilmiştir. Silika membranın kurutulması için 11.000×g' de 1 dakika santrifüj uygulanmıştır. Bu işlem ile artakalan etanol kalıntılarının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kolonlar 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. DNA eldesi için silika membran üzerine önceden 70°C' ye ısıtılmış 100 ml elüsyon tampon BE eklenip, oda ısısında 1 dakika inkübe edilerek, 11.000×g' de

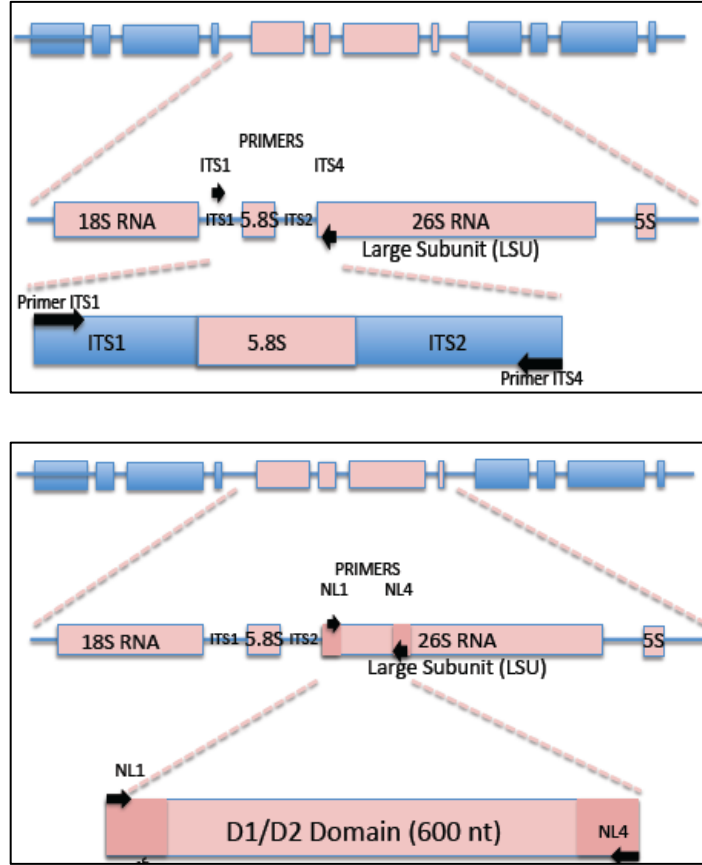
1 dakika santrifüjlenmiştir. Böylece DNA eldesi 100 ml hacimde tamamlanmıştır. Elde edilen DNA örneği 1 kb marker eşliğinde, 6X yükleme boyası ile 3 µl hacminde % 1' lik agaroz jele yüklenerek, 1X TAE tamponunda 90V' da 50 dk yürütme işleminden sonra UV transilluminatörde (Uvitec) incelenmiştir. DNA örnekleri -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

2.2.5.2. Gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu

İzolatların ITS1-5.8S-ITS4 bölgesi amplifikasyonu ITS-1 (Forward) ve ITS-4 (Reverse) evrensel primerleri kullanılarak yapılmıştır. LSU alt ünitesindeki D1/D2 bölgesi ise NL-1 (Forward) ve NL-4 (Reverse) primerleri kullanılarak çoğaltılmıştır (Tablo 2.2, Şekil 2.1). Bu amaçla; 2,5 µl 10X PCR tamponu, 1,5 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl 10 mM deoksinükleotidtrifosfatlar karışımı (dNTP Mix; dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,5 µM primerler, 1,25 µl Taq polimeraz (1 unit/µl), 16,25 µl nükleaz içermeyen distile su ve 1 µl kalıp DNA olmak üzere toplam 25 µl hacimlik reaksiyon kullanılmıştır. Reaksiyonlar için Bio-Rad i-cycler, Techne Thecgene ve Techne TV-5000 Thermal Cyclelar kullanılmıştır.

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan primerler

Primerler	Primerlerin Dizileri (5'-3')	Kaynak
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White ve ark. 1990
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
NL1	5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'	O'Donnell 1993
NL4	5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	



Şekil 2.1. Hedef genlere primerlerin bağlanma bölgeleri

(<https://www.studyblue.com/notes/note/n/yeast-molecular-taxonomy/deck/9823159>)

ITS ve D1/D2 bölgesi için kullanılan reaksiyon koşulları aşağıda belirtilmiştir:

ITS1-5.8S-ITS4

95 °C 2 dakika (Denatürasyon)
 95 °C 1 dakika
 55 °C 45 saniye } 35 Döngü
 72 °C 1,30 dakika
 72 °C 5 dakika
 4 °C Süresiz

D1/D2

95 °C 2 dakika (Denatürasyon)
 95 °C 1 dakika
 64 °C 45 saniye } 35 Döngü
 72 °C 1,30 dakika
 72 °C 5 dakika
 4 °C Süresiz

Elde edilen PCR ürünleri % 1' lik agaroz jele 6X'lik yükleme boyası kullanılarak yüklenmiş ve 1X TAE tamponunda 90V 50 dk boyunca yürütülerek UV transilluminatörde (Uvitec) incelenmiştir.

2.2.5.3. Restriksiyon Enzim Analizi (REA)

ITS1-5.8S-ITS2 ve D1/D2 bölgesi için elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon enzim analizleri için *Hinf* I, *Hae* III, *Dde* I ve *Bfa* I enzimleri kullanılmıştır.

Hinf I, *Hae* III, ve *Dde* I enzimleri için reaksiyon: 20 µl' lik hacimde; 2 µl 10X' lik buffer, 0,2 µl BSA (10 µg/ µl), 7.5 µl nükleaz içermeyen steril distile su, 10 µl PCR ürünü ve 0,5 µl enzim şeklinde kurulmuştur.

Bfa I enzimi (Fermantas) için reaksiyonu: 20 µl' lik hacimde; 2 µl 10X'lik Tango Buffer, 7 µl nükleaz içermeyen steril distile su, 10 µl PCR ürünü ve 1 µl enzim şeklinde kurulmuştur.

***Hinf* I**

5'...G▼ANT C...3'

3'...C TNA▲G...5'

***Dde* I**

5'...C▼TNA G...3'

3'...G ANT▲C...5'

***Hae* III**

5'...GG▼CC...3'

3'...CC▲GG...5'

***Bfa* I**

5'...C TA▼G...3'

3'...G▲AT C...5'

Restriksiyon enzim analizi için kurulan reaksiyonlar 37°C' de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen kesim ürünleri 1kb ve 100 bp marker eşliğinde 6X yükleme boyası ile %2' lik agaroz jele yüklenerek 70V' da 210 dakika yürütüldükten sonra UV transilluminatörde görüntülenmiştir. REA sonucuna göre PCR ürünlerinin farklı profilleri belirlenerek, dizi analizi için her bir profile ait örnekler seçilmiştir.

2.2.5.4. PCR ürünlerinin saflaştırılması

Jelden kesilen PCR ürünlerinin saflaştırılmasında, saflaştırma kiti (Promega Wizard SV and PCR Clean-Up System A9280, A9281, A9282) kullanılmıştır. Jelden kesilen bandların her 10 mg' ı için üzerine 10 µl membran bağlayıcı solüsyon eklenmiş ve vortekslenerek jelin erimesi için 55°C' lik su banyosunda 10 dakika bekletilmiştir. Eritilen örnek; toplama tüpü üzerine konulmuş minikolona aktarılmıştır. Bir dakika oda sıcaklığında inkübe edilip, 16.000 rcf (relatif santrifüj kuvveti)' de bir dakika santrifüj edilmiştir. Minikolon başka bir toplama tüpünün üzerine konularak, 700 µl membran yıkama solüsyonu eklenmiştir. Tekrar bir dakika 16.000 rcf' de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde bulunan sıvı dökülüp, minikolon üzerine tekrar 500 µl membran yıkama solüsyonu konulmuştur ve 16.000 rcf' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı dökülüp tekrar bir dakika 16.000 rcf' de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü üzerinden alınan minikolona temiz bir ependorfa konulup, minikolon 50 µl nükleaz içermeyen su eklenmiş ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübe edilmiş örnek 16.000 rcf' de 1 dakika santrifüj edilip jelden saflaştırılmış ürünler elde edilmiştir.

Elde edilen PCR ürünleri 1 kb marker eşliğinde 6X yükleme boyası ile %1' lik agaroz jele yüklenerek 1X TAE tamponunda 90V' da 50 dk yürütme işleminden sonra UV transilluminatörde (Uvitec) incelenmiştir.

2.2.5.5. PCR ürünlerinden dizi analizi

Saf olarak elde edilen PCR ürünleri; ITS1-5.8S-ITS2 rRNA ve D1/D2 gen bölgelerinin dizi analizleri için, Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi (NABİLTEM)'ne gönderilmiştir.

2.2.5.6. Gen dizilerinin analizi

Dizi analizi sonrası elde edilen tüm izolatlar ait ITS ve D1/D2 gen bölgelerine ait dizi bilgileri; National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov) gen bankasındaki verilerle Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul ve ark. 1997) programı ile filogenetik benzerlikleri incelenmiştir. Veriler MEGA v. 6.0 (Tamura ve ark. 2013) programındaki ClustalW kullanılarak hizalanmıştır. İncelenen izolatlar ve NCBI gen bankasındaki en yakın karşılıklarına ait

evrimsel gelişim süreci Tamura-Nei modeline (Tamura ve Nei 1993) dayalı olarak Neighbor Joining (NJ) (Satiou ve Nei 1987) yöntemi ile 1000 tekrarlı (Bootstrap 1000) olarak incelenmiş ve dendogramlar oluşturulmuştur. Dendogramlarda benzerlik oranlarının belirlenmesi için her türe ait tip tür (T) kullanılmış ve dizi analizi sonucunda tanımlanan türler www.indexfungorum.org sitesinden kontrol edilerek isimlendirilerek, telemorf ve anamorf isimleri belirtilmiştir.

2.2.6. Çalışılan antifungal duyarlılık testleri

2.2.6.1. Mikrodilüsyon yöntemi

Mikrodilüsyon yöntemi CLSI M27-S3 önerileri doğrultusunda hazırlanarak ve uygulanmıştır. Önceden hazırlanmış antifungal stok süspansiyonları kullanılarak CAS, 5FC, FLU için 0,0625-64 µg/ml, VOR ve AMB için 0,0313-16 µg/ml arasındaki iki katlık ilaç konsantrasyonlarını içeren tüpler hazırlanmıştır. Her antifungal son konsantrasyonlarının iki katı olacak şekilde dilüsyonları yapılmıştır (Tablo 2.3, 2.4). Üreme kontrol kuyucukları için ilaç içermeyen bir tüp çalışmaya eklenmiştir (CLSI M27-S3).

Tablo 2.3. CAS, 5FC, FLU dilüsyonlarının hazırlanma şeması

Adım	Konsantrasyon (µg/ml)	Kaynak	Hacim+Besiyesi (ml + ml)		Ara Konsantrasyon (µg/ml)	Son Konsantrasyon (µg/ml)	Log ₂
1	5120	Stok	1	7	640	64	6
2	640	1. adım	1	1	320	32	5
3	640	1. adım	1	3	160	16	4
4	160	3. adım	1	1	80	8	3
5	160	3. adım	0,5	1,5	40	4	2
6	160	3. adım	0,5	3,5	20	2	1
7	20	6. adım	1	1	10	1	0
8	20	6. adım	0,5	1,5	5	0,5	-1
9	20	6. adım	0,5	3,5	2,5	0,25	-2
10	2,5	9. adım	1	1	1,25	0,125	-3
11	2,5	9. adım	0,5	1,5	0,625	0,0625	-4
12	2,5	9. adım	0,5	3,5	0,3125	0,03125	-5

Kaynak: CLSI M27-S3, 2008.

Tablo 2.4. VOR ve AMB dilüsyonlarının hazırlanma şeması

Adım	Konsantrasyon (µg/ml)	Kaynak	Hacim+Çözücü DMSO (ml + ml)		Ara Konsantrasyon (µg/ml)	Son Konsantrasyon (µg/ml)	Log2
1	1600	Stok	-		1600	16	4
2	1600	Stok	0,5	0,5	800	8	3
3	1600	Stok	0,5	1,5	400	4	2
4	1600	Stok	0,5	3,5	200	2	1
5	200	4. adım	0,5	0,5	100	1	0
6	200	4. adım	0,5	1,5	50	0,5	-1
7	200	4. adım	0,5	3,5	25	0,25	-2
8	25	7. adım	0,5	0,5	12,5	0,125	-3
9	25	7. adım	0,5	1,5	6,25	0,0625	-4
10	25	7. adım	0,5	3,5	3,13	0,0313	-5

Kaynak: CLSI M27-S3, 2008.

Antifungal duyarlılık testinde maya süspansiyonlarının hazırlanmasında tüm isolatların SDA besiyerindeki 24 saatlik taze kültürleri kullanılmıştır. Kültürlerden yaklaşık 1 mm çaplı beş koloni alınarak 5 ml steril serum fizyolojik içinde standart maya süspansiyonları hazırlanmıştır. Süspansiyonlar yaklaşık 15 saniye vorteksenerek homojen hale getirildikten, sonra spektrofotometrik olarak 0,5 McFarland standardının bulanıklığına göre ayarlanmıştır. Bu işlemle her mililitresinde $1-5 \times 10^6$ hücre içeren stok maya süspansiyonları elde edilmiştir. Stok maya süspansiyonu; RPMI 1640 besiyeri ile önce 1/50 ve ardından 1/20 oranlarında seyreltilerek, testte kullanılacak olan $1-5 \times 10^3$ hücre/ml’lik son konsantrasyona ulaşılmıştır.

Bu test için, steril U tabanlı ve 96 kuyucuklu mikrolaklar kullanılmıştır. Tüm etiketlemeler yapıldıktan sonra mikroplağın yatay sıradaki ilk kuyucuğu sterilite kontrol kuyucuğu olarak, son kuyucuğu ise üreme kontrol kuyucuğu olarak belirlenmiştir. Sterilite kontrolü olan kuyucuğa 200 µl RPMI, üreme kontrol kuyucuğuna ise 100 µl RPMI konulmuştur. Mikroplağın her bir sütununa bir ilaç konsantrasyonu olacak şekilde yapılan dilüsyonlar 100’ er µl dağıtılmıştır. En yüksek ilaç konsantrasyonu 2. kuyucukta, en düşük konsantrasyon ise 11. kuyucukta olacak şekilde pipetle dağıtım yapılmıştır (Schwalbe ve ark. 2007).

Mikroplaklar hazırlandıktan sonra her bir sırada bir izolat olacak şekilde hazırlanan maya süspansiyonlarından 100' er µl eklenmiştir. Sadece sterilite kontrolü olan kuyucuğa maya süspansiyonu konulmamıştır. Bu işlem sonunda hem maya hem ilaç konsantrasyonları ½ oranında seyreltilerek çalışma konsantrasyonuna ulaşılmıştır. Mikroplakların üzeri kapatılıp, 35°C' de 48 saat inkübasyonun ardından duyarlılık sonuçları görsel olarak değerlendirilmiştir. (Schwalbe ve ark. 2007).

2.2.6.2. VITEK 2 Sistem ile antifungal duyarlılık (AST-YS06 kart)

İzolatların saf ve taze kültürlerinden inokulum süspansiyonu hazırlanmıştır. Üretici firma önerileri doğrultusunda antifungal duyarlılık testi için hazırlıklar yapılmıştır. VITEK 2 Compact System için inokulum süspansiyonu için polisitren tek kullanımlık test tüpleri kullanılmıştır. Bu tüplere konulan 3 ml steril serum fizyolojik içinde 2,0 McFarland (1,80- 2,20 aralığı) olacak şekilde bioMérieux DensiChek ile ölçülerek hazırlanmıştır. Antifungal duyarlılık testi için hazırlanan inokulum süspansiyonundan alınan 280 µl inokulum süspansiyonu diğer tüpteki 3 µl sterile serum fizyolojik içine aktararak, bu tüplere de VITEK 2 AST-YST antifungal duyarlılık kartları yerleştirilmiştir. Hazırlanan süspansiyonlar kartlara doldurulup inkübasyona bırakılmış ve otomatik olarak okuma yapıp değerlendirilmiştir (BioMerieux Diagnostics).

VITEK 2 Compact System antifungal duyarlılık kartların (AST-YS06); amfoterisin B 0,25-16 µg/ml, flusitozin 0,25-4 µg/ml, flukonazol 1-64 µg/ml, vorikonazol 1-64 µg/ml ve kaspofungin 0,12-8 µg/ml aralıklarında ilaç dilüsyonlarını içermektedir. Cihaza yüklenen örneklerin 18-27 saatlik inkübasyon süresi sonunda MİK sonuçları alınmaktadır. VITEK 2 sistemi MİK değerini CLSI kriterlerine göre yorumlamaktadır.

3. BULGULAR

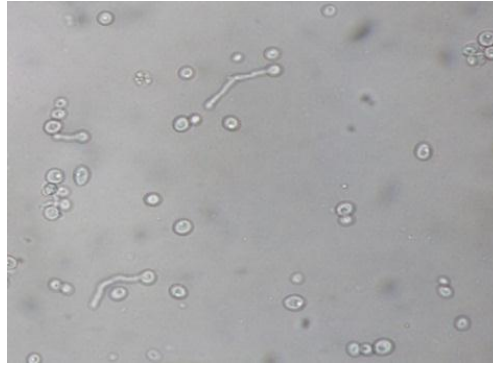
3.1. Çalışmaya Alınan İzolatlar

Çalışmaya toplam 100 maya izolatu alınmıştır. İzolatların 63' ü vajen 37' si idrar örneklerinden soyutlanmıştır. Bu örneklerin %65' i Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniği; %17' si Üroloji Polikliniği ve %18' i diğer birimlere (İç Hastalıkları Polikliniği, Enfeksiyon Polikliniği, Hematoloji Polikliniği, Dermatoloji Servisi, Genel Yoğun Bakım, Endokrinoloji Servisi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Servisi, Nöroloji Servisi) çeşitli şikayetlerle başvuran kadın hastalardan oluşmaktadır. Stok besiyerlerinde bulunan maya kolonilerinden SDA' ya pasajlanan izolatlar çalışmalarda kullanılmak üzere suşlar 37°C' de 24- 48 saat inkübe edilerek üretilmiştir.

3.2. İzolatların Geleneksel Yöntemlerle İdentifikasyonları

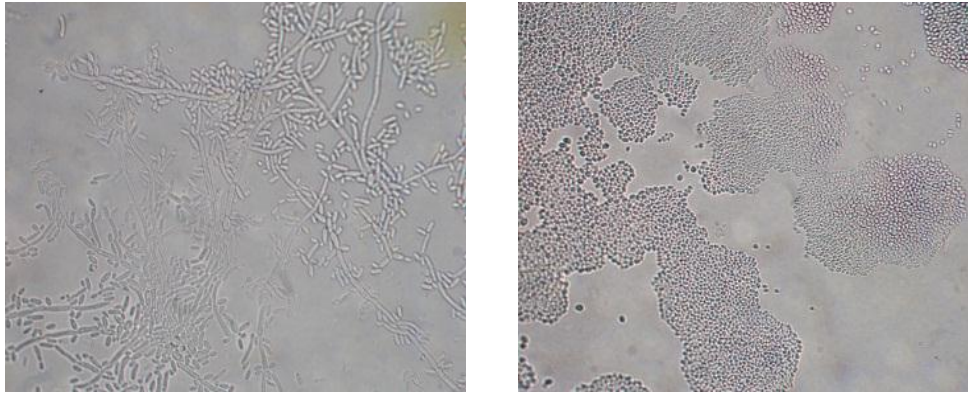
Çalışmaya alınan 100 maya izolatının identifikasyonları için kullanılan klasik yöntemlerden; germ tüp testi, mısır unlu-tween 80 agar besiyerindeki morfolojileri, kromojenik besiyerlerindeki (CHROMagar Candida, Candida Ident agar, BIGGY agar, Brilliance Candida agar) morfolojileri ve kolonilerin renk oluşumları değerlendirilmiştir (Tablo 3.1).

Tüm maya izolatlarında germ tüp oluşturma özelliğine bakılmıştır. Germ tüp oluşumu pozitif olanlar *C. albicans*; negatif olanlar ise non- *C. albicans* olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1). Bu teste göre; izolatların 49' u *C. albicans*, 51' i ise non- *C. albicans* olarak tanımlanmıştır.

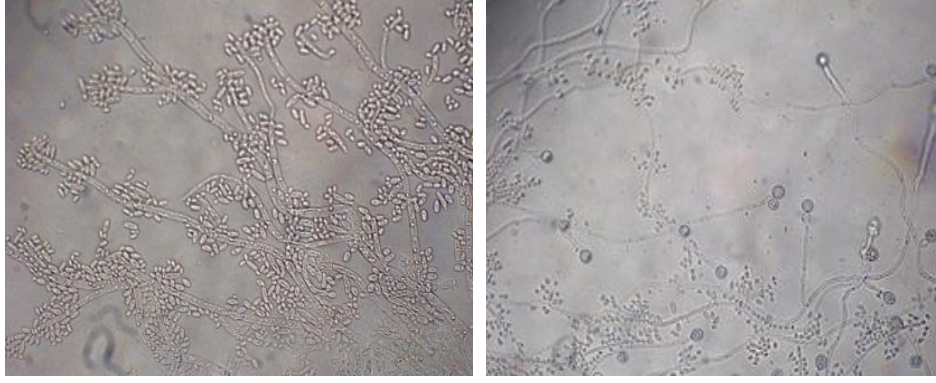


Şekil 3.1. Germ tüp oluşumu

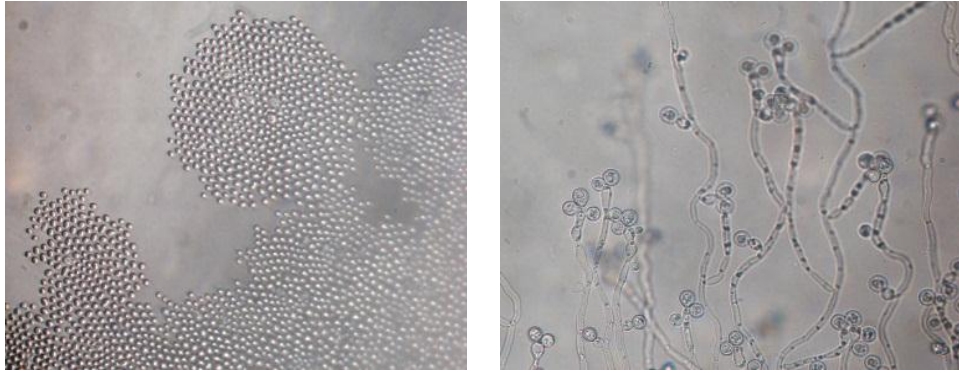
Mısır unlu-tween 80 agarda identifikasyon; gerçek ve yalancı hifler, blastokonidyalar, klamidosporların yapı ve yerleşimlerine değerlendirilerek yapılmaktadır. Hiflerin uçlarından geniş, kalın duvarlı, genellikle tekli terminal klamidosporlar, gerçek ve yalancı hifler, yalancı hiflerin çevresinde kümeler oluşturmuş blastokonidyalar görülen izolatlar *C. albicans* ve bu türe oldukça benzeyen hiflerin ucunda çoklu terminal klamidosporlar görülen izolatlar *C. dubliniensis* olarak isimlendirilmiştir. Küçük, oval ve uçlarından tomurcuklanan maya hücreleri üreten izolatlar *C. glabrata*; tipik olarak kütükler görünümü veren belirgin şekilde dağınık, dikdörtgen şeklinde uzamış blastokonidyalar ile yalancı hifler oluşturan izolatlar *C. kefir*; çapraz konulmuş kibrit çöpleri şeklinde, ağaç benzeri görünüm veren uzun blastokonidyalar ile yalancı hifler oluşturan türler *C. krusei*; uzun, dallanmış ve kıvrık yalancı hiflerle birlikte kısa zincirler oluşturan uzun blastokonidyalar görülen izolatlar *C. lusitaniae* olarak tanımlanmıştır. Oval veya uzamış yuvarlak tomurcuklanan hücrelerin olduğu izolatlar ise *Rhodotorula* sp. olarak identifikasyonları yapılmıştır (Tümbay 1999; Larone 2011). İzolatların mısır unlu-tween 80 agardaki morfolojilerine göre; 49' u *C. albicans*, 39' u *C. glabrata*, 5' i *C. kefir*, 4' ü *C. krusei*, 1' i *C. lusitaniae*, 1' i *C. dubliniensis* ve 1 izolat ise *Rhodotorula* sp. olarak tanımlanmıştır.



Şekil 3.2. Y-3 ve Y-16 izolatlarının mısır unlu tween 80 agar'da görünümü

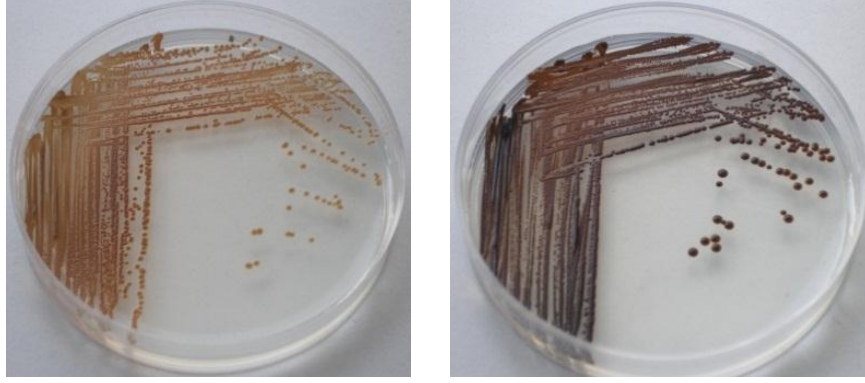


Şekil 3.3. Y-49 ve Y-60 izolatlarının mısır unlu tween 80 agar'da görünümü

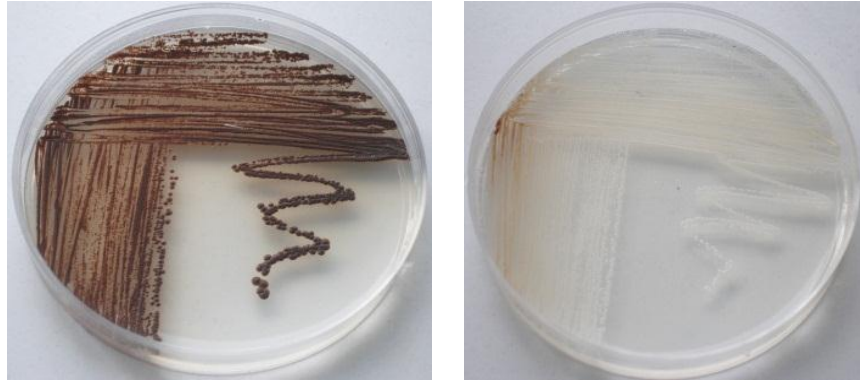


Şekil 3.4. Y-75 ve Y-85 izolatlarının mısır unlu tween 80 agar'da görünümü

BIGGY agar ile identifikasyon standart suşlara ve literatüre bakılarak yapılmıştır. Koloni morfolojilerine ve renklerine göre; siyah-kahverengi S tipi koloniler *C. albicans*, koyu kahverengi pürüklü R tipi koloniler *C. krusei*, koyu kırmızı-kahve parlak renkte koloniler *C. kefyr*, kahverengi S tipi koloniler *C. tropicalis* ve açık kahverengi-krem renkli kolonileri bulunan izolatlar ise *C. glabrata* olarak değerlendirilmiştir (Yücesoy ve Marol 2003; İlkit ve ark. 2007; Messeir ve ark. 2012). Bu besiyerinde izolatların 50' si *C. albicans*, 37' si *C. glabrata*, 6' sı *C. kefyr*, 4' ü *C. krusei*, 3' ü *C. tropicalis* olarak tanımlanmıştır.

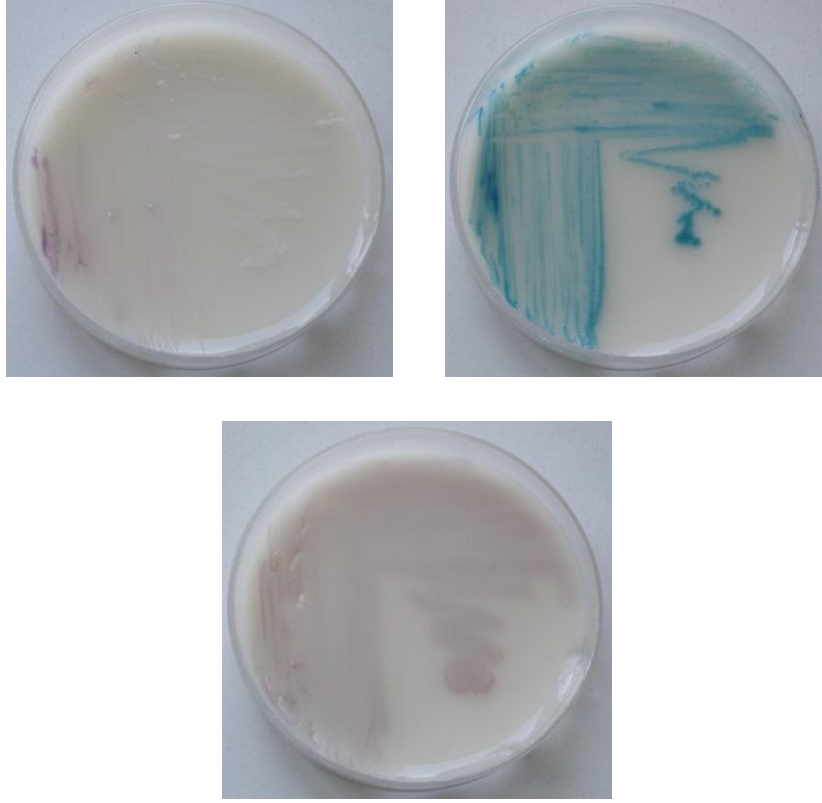


Şekil 3.5. Y-3 ve Y-5 izolatlarının *BIGGY* Agar koloni morfolojisi ve rengi



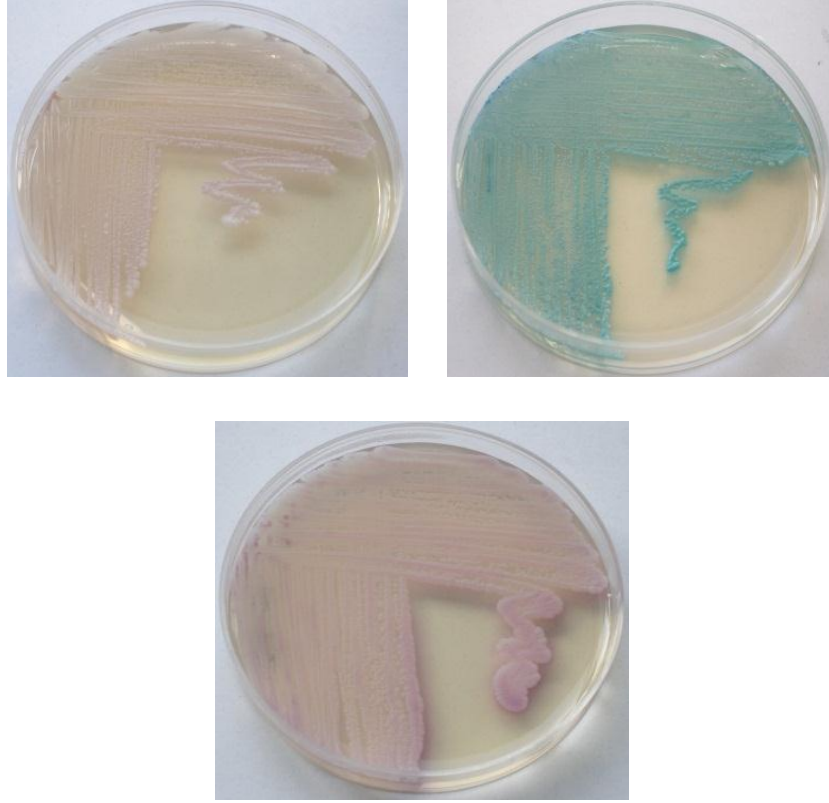
Şekil 3.6. Y-49 ve Y-71 izolatlarının *Biggy* Agar koloni morfolojisi ve rengi

Brilliance Candida Agar’ da; *C. tropicalis* koyu mavi, *C. albicans* ve *C. dubliniensis* yeşil renkte, *C. krusei* kuru pembe renkte, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* ve *C. lusitaniae* ise bej, sarı, kahverengi renkte koloniler oluşturmaktadırlar (Baixench ve ark. 2006; Messeir ve ark. 2012). Koloni renk ve morfolojilerine göre; 51 izolat *C. albicans*, 43 izolat *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* veya *C. lusitaniae*, 4 izolat *C. krusei* ve 1 izolat *C. dubliniensis* olarak tanımlanmış; 1 izolat ise renk farklılığından dolayı koloni morfolojisine göre tanımlama yapılamamıştır.



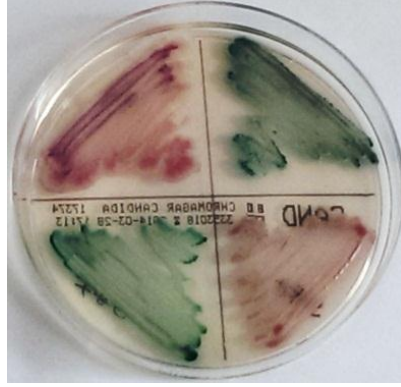
Şekil 3.7. Y-25, Y-38 ve Y-91 (altta) izolatının Brilliance Candida Agar koloni morfolojisi ve rengi

Candida Ident Agar besiyerine ekilen izolatlar. literatüre ve standart mikroorganizmalara göre yorumlanmıştır. Buna göre; açık yeşil renkte düz koloniler *C. albicans*, mavi ile metalik mavi renkte koloniler *C. tropicalis*, mor renkte kabarık koloniler *C. krusei*, krem-beyaz ve çok hafif pembe renkteki koloniler ise *C. glabrata* olarak değerlendirilmiştir (Messeir ve ark. 2012). Toplam 100 izolatın; 50' si *C. albicans*, 45' i *C. glabrata*, 4' ü *C. krusei* olarak tanımlanmış; renk farklılığından dolayı bir izolatın koloni morfolojisine göre tanımlaması yapılamamıştır.



Şekil 3.8. Y-20, Y-58 ve Y-79 (altta) izolatlarının *Candida Ident Agar* koloni morfolojisi ve rengi

CHROMagar’ da; hafif veya orta yeşil koloniler *C. albicans*, koyu yeşil koloniler ise *C. dubliniensis*, beyazımsı sınırları olan. açık gül rengi veya pembe koloniler *C. krusei*, koyu mavi ile mavimsi yeşil veya metalik mavi koloniler *C. tropicalis* ve açık pembe veya eflatun koloniler *C. glabrata* olarak yorumlanmıştır (Odds ve Bernaerts 1994; Peng ve ark. 2007; Özcan ve ark. 2010; Messeir ve ark. 2012). Bu besiyerinde izolatların 49’ u *C. albicans*, 45’ i *C. glabrata*, 4’ ü *C. krusei*, 1’ i *C. dubliniensis* olarak tanımlanmıştır. Bir izolat ise koloni morfolojisine göre tanımlanamamıştır.



Şekil 3.9. Y-85 (sağ üst), Y-86 (sol üst), Y-87 (sol alt) ve Y-88 (sağ alt) izolatlarının CHROMagar koloni morfolojisi ve rengi

Çalışmamızda kullanılan CHROMagar’ da koloni rengine göre *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. dubliniensis* türleri kolaylıkla tanımlanmıştır. Kullanılan standart suşların koloni morfolojisi ve renklerine göre *C. glabrata* izolatlarının identifikasyonu yapılmıştır. Ancak *C. lusitaniae*, *C. kefyr* ve *Rhodotorula* sp. olarak isimlendirilen izolatlar CHROMagar’ da tanımlanamamıştır.

Brilliance Candida Agar ile yapılan identifikasyonda bazı türlerin koloni rengine göre ayrımı yapılamamıştır. Bu besiyerinde spesifik koloni rengi göstermeyen 43 izolat için diğer besiyerlerine bakılarak isimlendirilmeye çalışılmıştır. Ayrıca iki *C. glabrata* Brilliance Candida Agar’ da *C. albicans* olarak yanlış tanımlanmış, bir *Rhodotorula* sp. izolatı ise koloni rengine göre identifiye edilememiştir.

Kromojenik besiyerlerinden BIGGY Agar ile yapılan identifikasyonda; türlerin ayrımı için koloni renklerinin birbirine çok yakın veya aynı olmasından dolayı farklı *Candida* türlerinin ayrımı yapılamamıştır. Bu sebeple; üç *C. glabrata* suşu bu besiyerinde *C. tropicalis* olarak değerlendirilmiş, bir *C. lusitaniae* izolatı *C. albicans*, bir *Rhodotorula* sp. izolatı *C. kefyr*, bir *C. dublinensis* suşu *C. glabrata*, bir *C. glabrata* izolatı *C. albicans*, bir *C. albicans* izolatı ise *C. glabrata* olarak yanlış identifikasyonları yapılmıştır.

Candida Ident Agar ile yapılan değerlendirmede bazı izolatlar koloni morfolojisine göre yanlış tanımlanmıştır. Beş *C. kefir* ve bir *C. lusitaniae* izolatı *C. glabrata*, *C. dubliniensis* izolatı *C. albicans* olarak yanlış değerlendirilmiş ve bir *Rhodotorula* sp. ise isimlendirilememiştir.

Geleneksel yöntemlerle yapılan tüm identifikasyon sonuçlarına göre *Rhodotorula glutis/mucilaginos*a olarak tanımlanan tür çalışmadan çıkarılmıştır. Bu sebeple diğer yöntemlerde toplam 99 izolatla çalışılmıştır.

İzolatların hızlı identifikasyon testlerinden olan VITEK 2 ID-YST kart kullanılarak yapılan tanımlamalarında; 49' u *C. albicans*, 36' sı *C. glabrata*, 5' i *C. kefir*, 4' ü *C. krusei*, 3' ü *C. sphaerica*, 1' i *C. dubliniensis*, 1' i *C. lusitaniae* ve 1 izolat ise *Rhodotorula glutis/mucilaginos*a (*Cryptococcus laurentii*) olarak isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda germ tüp oluşturma özelliği, kromojenik besiyerleri ve VITEK 2 ID-YST kart ile kullanılarak yapılan tanımlamalarda yöntemlere bağlı olarak bazı izolatların identifikasyonlarında farklılıklar görölmüştür. Kromojenik besiyerlerinde tanımlama koloni rengine bağlı olduğundan bazı türlerin identifikasyonu yapılamamaktadır. Mısır unlu-tween 80 agar ile VITEK tanımlaması genellikle uyumludur. Ancak mısır unlu-tween 80 agarda *C. glabrata* olarak tanımlanan üç izolat VITEK 2 ID-YST kart ile *C. sphaerica* olarak tanımlanmıştır. Bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak; Aubertine ve arkadaşları (2006) CHROMagar ve VITEK 2 maya identifikasyon kartını kullanarak yapmış oldukları çalışmada, *C. glabrata* olarak tanımlanan izolatların kart ile *C. sphaerica* olarak yanlış tanımlandığını ileri sürmüşlerdir.

Tablo 3.1. Geleneksel yöntemler ve VITEK 2 identifikasyonların karşılaştırılması

İzolat	Germ Tüp	Cornmeal Agar	CHROMagar Candida	Brilliance Candida Agar	Biggy Agar	Candida ID Agar	VITEK 2 ID-YST	
							Olasılık (%)	İdentifikasyon
Y-1	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-2	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	95	<i>C. albicans</i>
Y-3	-	<i>C. kefyr</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. kefyr</i>	<i>C. glabrata</i>	95	<i>C. kefyr</i>
Y-4	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	95	<i>C. albicans</i>
Y-5	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	95	<i>C. albicans</i>
Y-6	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-7	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	95	<i>C. albicans</i>
Y-8	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	95	<i>C. albicans</i>
Y-9	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	98	<i>C. albicans</i>
Y-10	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	97	<i>C. albicans</i>
Y-11	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	97	<i>C. albicans</i>
Y-12	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-13	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-14	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-15	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-16	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	96	<i>C. glabrata</i>
Y-17	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-18	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	95	<i>C. sphaerica</i>

Tablo 3.1. (devamı) Geleneksel yöntemler ve VITEK 2 identifikasyonların karşılaştırılması

İzolat	Germ Tüp	Cornmeal Agar	CHROMagar Candida	Brilliance Candida Agar	Biggy Agar	Candida ID Agar	VITEK 2 ID-YST	
							Olasılık (%)	İdentifikasyon
Y-19	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-20	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-21	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	96	<i>C. sphaerica</i>
Y-22	-	<i>C. kefyr</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. kefyr</i>	<i>C. glabrata</i>	96	<i>C. kefyr</i>
Y-23	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-24	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	96	<i>C. glabrata</i>
Y-25	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-26	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-27	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-28	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-29	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-30	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	95	<i>C. albicans</i>
Y-31	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	93	<i>C. albicans</i>
Y-32	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	96	<i>C. albicans</i>
Y-33	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-34	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>

Tablo 3.1. (devamı) Geleneksel yöntemler ve VITEK 2 identifikasyonların karşılaştırılması

İzolat	Germ Tüp	Cornmeal Agar	CHROMagar Candida	Brilliance Candida Agar	Biggy Agar	Candida ID Agar	VITEK 2 ID-YST	
							Olasılık (%)	İdentifikasyon
Y-35	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-36	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-37	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-38	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-39	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-40	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-41	-	<i>C. kefir</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. kefir</i>	<i>C. glabrata</i>	98	<i>C. kefir</i>
Y-42	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	95	<i>C. albicans</i>
Y-43	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	95	<i>C. albicans</i>
Y-44	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-45	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	95	<i>C. albicans</i>
Y-46	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	95	<i>C. albicans</i>
Y-47	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-48	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	97	<i>C. albicans</i>

Tablo 3.1. (devamı) Geleneksel yöntemler ve VITEK 2 identifikasyonların karşılaştırılması

İzolat	Germ Tüp	Cornmeal Agar	CHROMagar Candida	Brilliance Candida Agar	Biggy Agar	Candida ID Agar	VITEK 2 ID-YST	
							Olasılık (%)	İdentifikasyon
Y-49	-	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	99	<i>C. krusei</i>
Y-50	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-51	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-52	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-53	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-54	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-55	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-56	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. glabrata</i>	97	<i>C. sphaerica</i>
Y-57	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-58	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	92	<i>C. albicans</i>
Y-59	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-60	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	98	<i>C. albicans</i>
Y-61	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	98	<i>C. albicans</i>
Y-62	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-63	-	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	93	<i>C. lusitaniae</i>
Y-64	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>

Tablo 3.1. (devamı) Geleneksel yöntemler ve VITEK 2 identifikasyonların karşılaştırılması

İzolat	Germ Tüp	Cornmeal Agar	CHROMagar Candida	Brilliance Candida Agar	Biggy Agar	Candida ID Agar	VITEK 2 ID-YST	
							Olasılık (%)	İdentifikasyon
Y-65	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-66	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-67	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	95	<i>C. albicans</i>
Y-68	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-69	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	96	<i>C. albicans</i>
Y-70	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-71	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-72	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-73	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-74	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-75	-	<i>Rhodotorula sp.</i>	**	**	<i>C. kefyr</i>	**	95	<i>Rhodotorula glutis/mucilaginososa (Crypto. Laurentii)</i>
Y-76	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-77	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-78	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-79	-	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	99	<i>C. krusei</i>

Tablo 3.1. (devamı) Geleneksel yöntemler ve VITEK 2 identifikasyonların karşılaştırılması

İzolat	Germ Tüp	Cornmeal Agar	CHROMagar Candida	Brilliance Candida Agar	Biggy Agar	Candida ID Agar	VITEK 2 ID-YST	
							Olasılık (%)	İdentifikasyon
Y-80	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-81	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-82	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-83	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-84	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-85	-	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. albicans</i>	95	<i>C. dubliniensis</i>
Y-86	-	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	99	<i>C. krusei</i>
Y-87	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-88	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-89	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-90	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>
Y-91	-	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. krusei</i>	99	<i>C. krusei</i>
Y-92	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-93	-	<i>C. kefyr</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. kefyr</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. kefyr</i>
Y-94	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	96	<i>C. glabrata</i>
Y-95	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	95	<i>C. albicans</i>
Y-96	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>

Tablo 3.1. (devamı) Geleneksel yöntemler ve VITEK 2 identifikasyonların karşılaştırılması

İzolat	Germ Tüp	Cornmeal Agar	CHROMagar Candida	Brilliance Candida Agar	Biggy Agar	Candida ID Agar	VITEK 2 ID-YST	
							Olasılık (%)	İdentifikasyon
Y-97	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-98	-	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	99	<i>C. glabrata</i>
Y-99	-	<i>C. kefir</i>	<i>C. glabrata</i>	*	<i>C. kefir</i>	<i>C. glabrata</i>	95	<i>C. kefir</i>
Y-100	+	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	99	<i>C. albicans</i>

* *C. glabrata*, *C. kefir*, *C. parapsilosis* veya *C. lusitaniae* ** Tanımlanmamış

3.3. Yağ Asidi Metil Esterleri (FAME) Analizi

Klinik örneklerden soyutlanan 99 izolatın, MIS (Microbial Identification System)'in içerdiği veri tabanına göre yağ asitleri analizleri yapılmıştır. FAME sonuçlarına göre; Y-3 hariç tüm izolatlarda, 16:1 *Cis* 9 (w 7) ve 16:00 yağ asitleri saptanmıştır (Tablo 3.2).

Tüm izolatlarda en sık rastlanan diğer yağ asitleri sırasıyla; Sum In Feature 8, 18:00, 14:00, 18:2 *Cis* 9,12/18:0 a, 14:0 Aldehyde, Sum In Feature 5 ve 17:1 *Cis* 9 (w 8)' dir. İzolatlarda tanımlanan ve az rastlanan diğer yağ asitleri, 20:5 *Cis* (w3), Sum In Feature 11, 19:1 TRANS 7 (w 9), 16:0 ISO, Sum In Feature 9, 18:0 2 OH, 11:0 ISO 3OH, 17:0 ISO, C 20 N Alcohol, Sum In Feature 13, Sum In Feature 1, 15:0 3 OH, 20:00, 12:00, 20:1 *Cis* w 9 Alcohol, Sum In Feature 7, Unknown 19.521, Sum In Feature 12, 19:0 CYCLO C11-12, 17:0 ANTEISO, Sum In Feature 10, 18:0 12 OH, 15:0 ISO, 15:00, 18:1 (w 11), 16:0 2 OH, Sum In Feature 13, 14:1 at 7 Position, 18:1 (w ?) Alcohol, 16:0 2 OH, Unknown 18.197, 14:0 ISO, 10:00, 14:1 at 9 Position ve 13:0 ISO 3 OH' dır (Çizelge 3.2).

Y-3 izolatında belirlenen yağ asitleri; 16:0 ISO (%30,46), Sum In Feature 9 (%4,82), diğer izolatlardan farklı olarak ise 18:0 ISO (%60,23) ve Unknown 15.665 (%4,49) yağ asitleri saptanmıştır .

Tablo 3.2. İzolatların FAME analizi sonuçları (%)

İzolat	14:00	14:0 Aldehyde	16:1 Cis 9 (w 7)	Sum In Feature 5	16:00	17:1 Cis 9 (w 8)	18:2 Cis 9,12/18:0a	Sum In Feature 8	18:00
Y-1	1,24	5,86	7,86	1,18	12,91	1,40	33,19	23,82	7,14
Y-2			7,15		15,75		38,12	30,98	4,10
Y-4	1,19	3,42	8,17	1,43	13,16	1,55	37,94	21	6,36
Y-5	1,64		6,21	0,84	16,15	1,58	37,63	27,16	4,90
Y-6	2,12		15,62		22,39	2,84	17,44	34,93	4,66
Y-7			8,29		12,75		44,42	31,18	3,35
Y-8	2,07		5,87		16,53		39,45	31,74	4,33
Y-9			8,55		18,06		33,76	29,65	4,64
Y-10	2,04		11,77	1,60	14,12	2,09	32,2	27,80	3,73
Y-11	2,33		14,92	2,36	14,82		27,89	24,62	4,30
Y-12	2,24		10,62	2,32	13,73		35,64	29,92	3,36
Y-13			8,75		15,12		36,37	28,03	4,07
Y-14	1,60		9,11	1,62	14,79	1,78	39,07	26,13	3,20
Y-15	1,14	3,07	54,83		5,47			23,83	5,46
Y-16			57,83		8,93			27,45	5,79
Y-17			50,53		6,13			35,97	4,73
Y-18	2,62		14,16		20,85		29,83	29,65	2,89
Y-19	2,02		51,97		9,19			26,60	5,42
Y-20			53,07		5,49			32,59	3,79
Y-21	1,71		11,63	1	20,09		28,18	33,13	2,60

Tablo 3.2. (devamı) İzolatların FAME analizi sonuçları (%)

İzolat	14:00	14:0 Aldehyde	16:1 Cis 9 (w 7)	Sum In Feature 5	16:00	17:1 Cis 9 (w 8)	18:2 Cis 9,12/18:0a	Sum In Feature 8	18:00
Y-22	2,02		16,43	1,89	18,10		28,47	29,80	1,89
Y-23			1,05		3,01		6,88	5,77	0,97
Y-24			47,01		7,88			25,99	4,69
Y-25	1,24		57,46		6,78			26,35	4,08
Y-26	2,05		9,09	1,25	15,53	1,04	34,91	29,82	3,45
Y-27			57,87		6,88			27,93	4,70
Y-28	2,59		12,96	2,17	27,32	2,11		40,38	8,22
Y-29	1,41		8,78	1,04	15,64	1,41	35,94	30,78	4,05
Y-30			4,58		15,99		37,32	25,43	5,81
Y-31	1,50		9,45	1,37	17,24	1,29	32,26	30,40	4,98
Y-32			11,20		14,87		34,81	39,13	
Y-33			53,89		7			29,70	4,69
Y-34	0,42	1,60	26,90		2,21			17,86	3,19
Y-35	1,73	3,98	11,43	1,71	16,47	1,16	30,95	26,30	6,27
Y-36	1	5,82	7,17		14,01	1,47	36,43	26,39	7,71
Y-37	0,96	3,82	51,14		5,25			25,15	6,41
Y-38	1,27	4,33	9,47	1,13	16	1,24	29,82	29,10	7,63
Y-39	1,04	3,88	46,48		4,76			29,57	6,79
Y-40	1,40	1,89	46,93		6,41			25,83	6,04
Y-41	1,33	1,10	13,52	0,68	18,50		23,96	30,67	3,13

Tablo 3.2. (devamı) İzolatların FAME analizi sonuçları (%)

İzolat	14:00	14:0 Aldehyde	16:1 Cis 9 (w 7)	Sum In Feature 5	16:00	17:1 Cis 9 (w 8)	18:2 Cis 9,12/18:0a	Sum In Feature 8	18:00
Y-42	1,21	3,30	9,23	1,33	13,21	2,12	32,40	26,53	5,87
Y-43	1,51	2,40	8,43	1,66	15,42		37,41	27,30	5,70
Y-44	1,35	4,12	7,04	0,95	12,75	0,96	26,79	27,40	6,15
Y-45	1,33	3,93	8,33	1,39	14,86	1,40	34,56	30,36	
Y-46	1,66	2,91	9	1,42	15,14	1,77	33,07	28,27	6,74
Y-47	1,02		42,12		6,28			40,27	5,21
Y-48	1,11	6,96	9,49	1,15	13,22	2,12	30,51		8,37
Y-49		1,94	6,63		10,64	0,55	20,27	52,19	2,43
Y-50	1,49		55,80		6,97			27,29	4,45
Y-51	1,31	1,91	9,29	1,65	15,59	1,79	35,62	24,95	5,17
Y-52	1,48	2,21	48,95		6,39			21,21	7,09
Y-53			13,15		16,61		42,42	27,82	
Y-54			15,40	2,37	11,15		41,80	29,27	
Y-55	1,32	3,73	51,72		6,61			22,91	6,64
Y-56	1,85	6,19	16,28	2,86	18,67		24,24	23,17	
Y-57			59,80		4,48			29,09	3
Y-58		6,81	7,39		13,83		38,10	27,46	
Y-59			12,14		17,28		37,22	33,37	
Y-60			11,17		19,53		44,99	24,31	
Y-61	0,96	5,06	10,24	1,48	15,80	1,82	34,13	25,34	

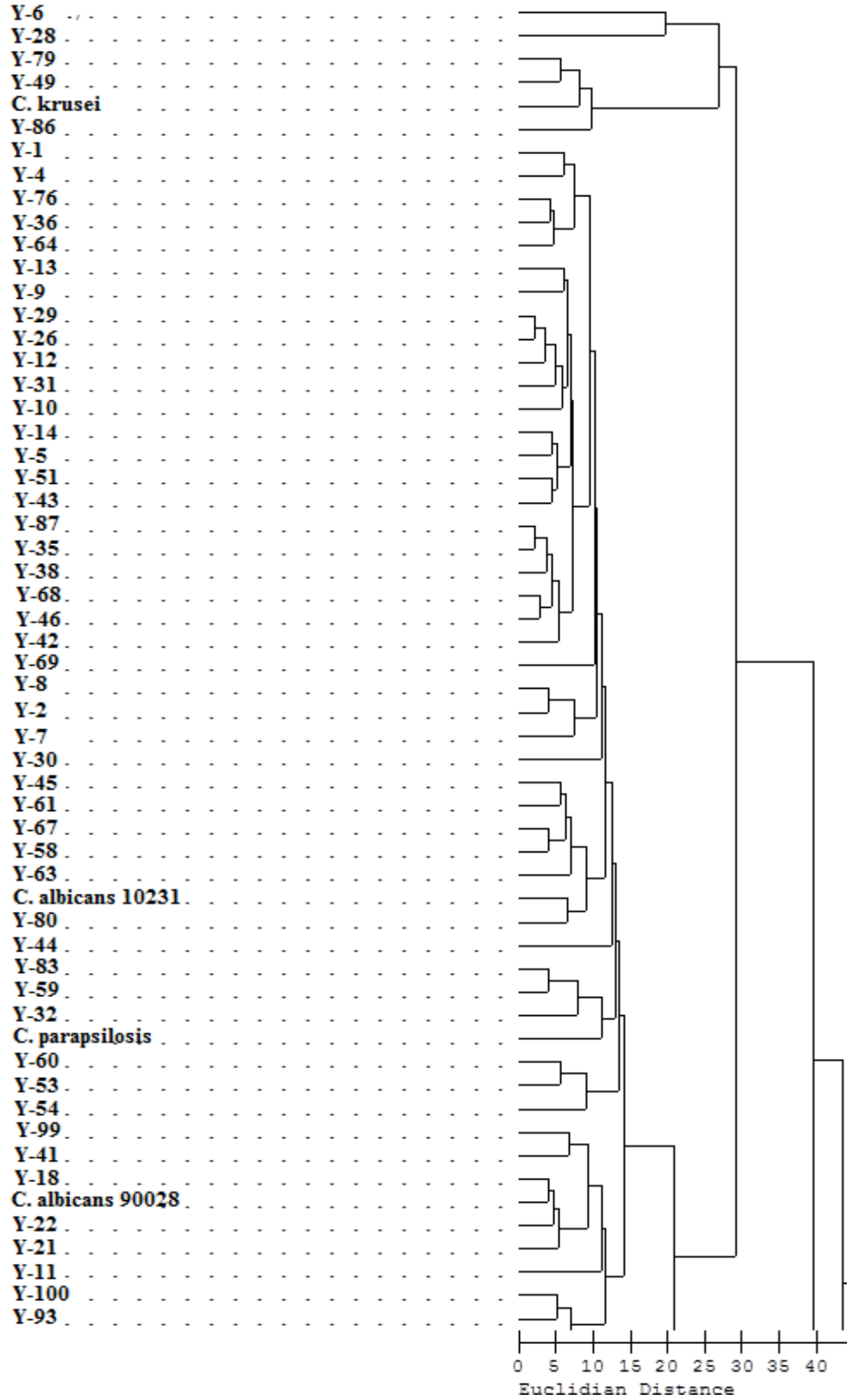
Tablo 3.2. (devamı) İzolatların FAME analizi sonuçları (%)

İzolat	14:00	14:0 Aldehyde	16:1 Cis 9 (w 7)	Sum In Feature 5	16:00	17:1 Cis 9 (w 8)	18:2 Cis 9,12/18:0a	Sum In Feature 8	18:00
Y-62	0,97	5,07	8,37	1,07	8,84	0,88	18,06	15,68	
Y-63	1,13	5,66	4,31		16,72		36,73	30,43	
Y-64	1,02	6,47	7,02	1,39	14,37	1,66	37,09	22,20	8,78
Y-65			64,32		5,29			24,10	3,92
Y-66	1,25	1,57	54,13		6,44			24,81	5,73
Y-67	1,10	5,10	8,80	1,16	14,33	1,03	38,49	25,38	
Y-68	1,55	1,75	9,71	1,37	15,57	1,86	34,66	28,31	4,88
Y-69	2,30		14,36	3,24	15,26	1,84	36,20	22,65	2,38
Y-70		5,76	44,92		4,55				7,65
Y-71	1,11	5,03	50,28		4,40			23,59	7,34
Y-72	1,35		55,09		5,04			31,39	3,80
Y-73	0,72	3,72	49,55		5,01			27,11	6,49
Y-74	1,11	3,65	49,95		6,05			26,03	6,99
Y-76	1,57	5,03	8,19	1,69	16,19	1,21	34,51	24,49	7,11
Y-77	0,97	5,04	57,22		5,71			21,92	
Y-78	0,81		62,46		5,26			23,53	3,91
Y-79		1,29	7,04		12,12	0,82	17,06	55,07	
Y-80	0,92	5,55	10,37		13,59	1,71	30,19	31,33	
Y-81	0,85	3,36	52,28		4,94			25,78	6,43
Y-82	0,79	3,90	50,53		3,92			26,54	6,35

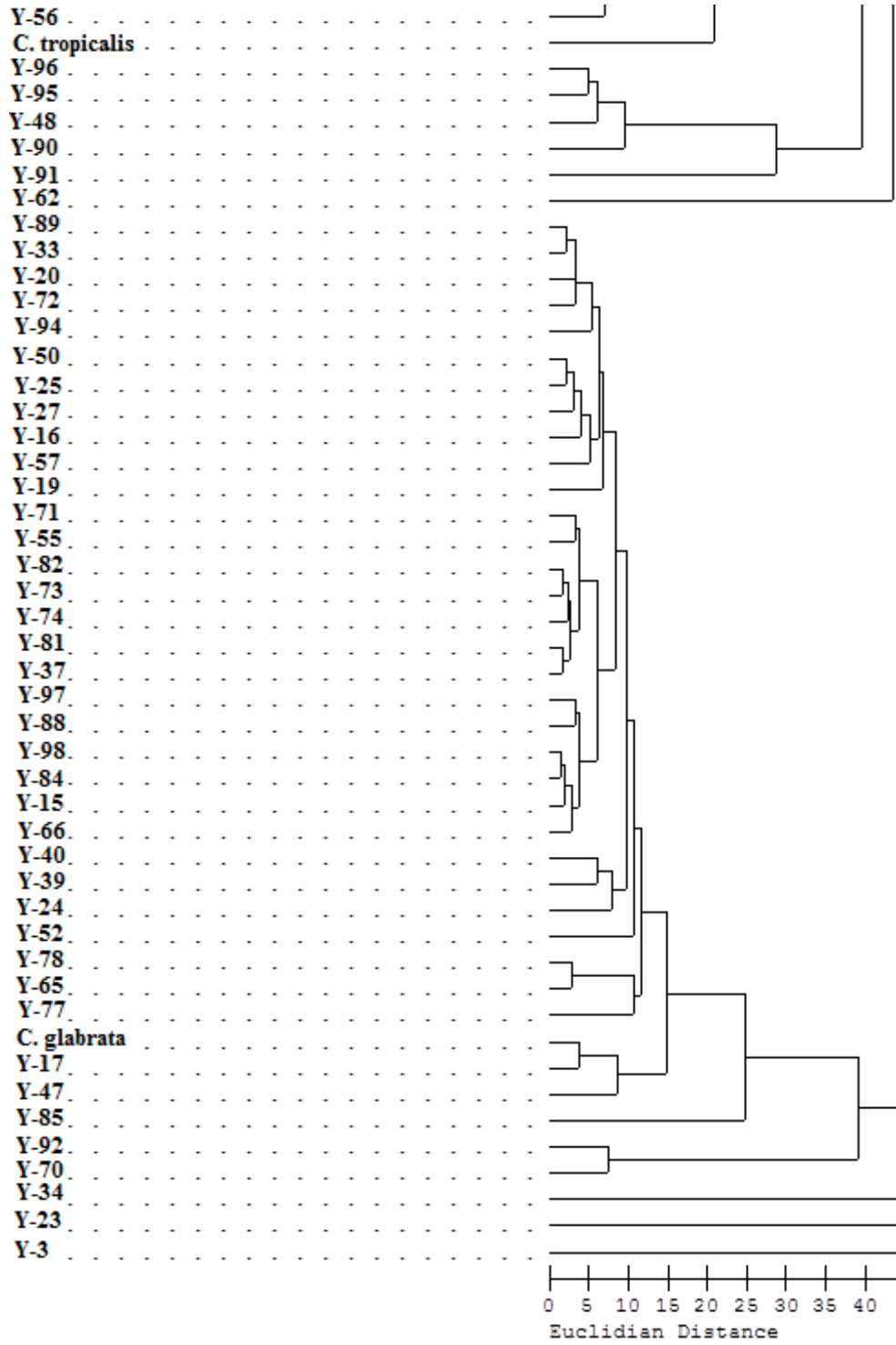
Tablo 3.2. (devamı) İzolatların FAME analizi sonuçları (%)

İzolat	14:00	14:0 Aldehyde	16:1 Cis 9 (w 7)	Sum In Feature 5	16:00	17:1 Cis 9 (w 8)	18:2 Cis 9,12/18:0a	Sum In Feature 8	18:00
Y-83			13,61		19,60		34,76	32,02	
Y-84	0,79	2,88	55,74		4,48			24,37	5,36
Y-85	1,29	2,82	34,60		10,65	1,15	13,58	27,09	6,09
Y-86		1,65	5,28		10,39		24,90	47,83	3,73
Y-87	1,45	3,84	10,76	1,26	15,53	1,74	31,61	27,59	5,71
Y-88	1,09	2,76	56,62		5,46			22,12	5,61
Y-89	0,99		54,20		6,24			30,70	4,39
Y-90		5,21	11,65	2,18	12,62		31,68		6,80
Y-91		2,90	9,41		12,58	1,02	16,48	22,16	3,04
Y-92		4,37	51,53		3,42				6,03
Y-93	1,48	5,65	16,10	1,88	16		28,38	24,49	
Y-94	0,77	3,28	52,75		3,79			29,02	5,53
Y-95	1,28	6,02	7,78		14,77	1,35	35,94		7,31
Y-96	1,48	5,38	10,95	1,59	14,81	1,52	33,32		6,73
Y-97	1,02	3,62	57,06		4,87			23,30	6,07
Y-98	0,95	2,74	54,96		4,14			25,29	5,14
Y-99	1,57	4,23	15,77	1,07	16,76		20,55	29,79	5,19
Y-100	1,81	4,24	12,27	1,62	16,49	1,50	29,80	25,12	

*(Sum In Feature 5: 16:1 Trans 9 (w7), Sum In Feature 8: 18:1 Cis 9 (w9))



Şekil 3.10. Yağ asitleri profillerine göre izolatlar ve standart suşlar arasındaki benzerlik dendrogramı



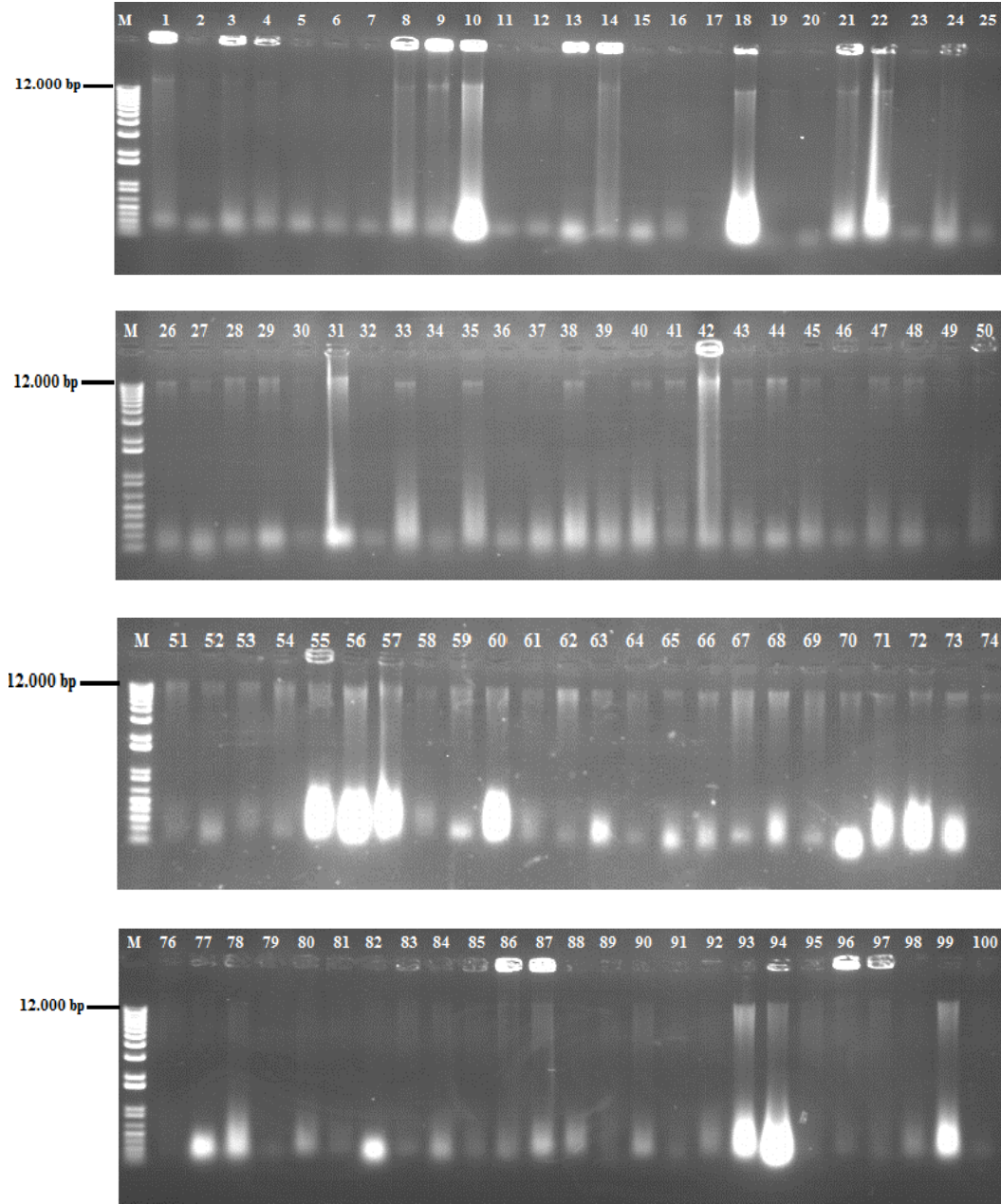
Şekil 3.10. (devamı) Yağ asitleri profillerine göre izolatlar ve standart suşlar arasındaki benzerlik dendrogramı

İzolatların FAME profilleri göre akrabalık ilişkileri cluster analizi ile belirlenmiştir. Oluşan dendrograma göre, izolatlar arasındaki Euclidian mesafesi 10 ve daha altında olan izolatların aynı türe ait olabileceği, 6 ve daha altında olan izolatların tipik olarak aynı alttür veya biyotip; 2,5 ve daha altında olan izolatların ise aynı strain olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (MIDI 2002). Dendrograma karşılaştırma için standart suşlarında FAME profilleri eklenmiştir. Yapılan diğer identifikasyon yöntemlerinde aynı tür olarak isimlendirilen bazı izolatlar farklı Euclidian mesafesine sahiptir. FAME profillerine göre; diğer yöntemlerle *C. albicans* olarak tanımlanan; Y-6, Y-28, Y-23 ve Y-62 izolatları dendrograma oldukça farklı mesafelerde bağlanmıştır. Ayrıca aynı grupta bulunan *C. albicans* suşlarına göre Y-48, Y-90, Y-95 ve Y-96 izolatları da farklılık göstermektedir. Diğer yöntemlerle *C. glabrata* olarak tanımlanan türlerin çoğu yakın Euclidian mesafesinde (10 ve altı) dendrograma bağlanmıştır. Ancak bazı izolatlar Y-18, Y-56 ve Y-34'ün dendrograma oldukça uzak mesafede bağlı olduğu görülmektedir. Y-3 izolatı diğer *C. kefyr* ve tüm izolatlardan oldukça uzak mesafede en dışta dendrograma bağlanmıştır (Şekil 3.10).

3.4. Moleküler Yöntemlerle İdentifikasyon

3.4.1. DNA izolasyonu

İzolatların DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA'ların agaroz jelde varlığını gözlemek için; 3 µl DNA örneği ve 1 µl örnek yükleme boyası karıştırılıp %1'lik agaroz jelde 90 voltta yürütülmüştür. Jel UV transilluminatörde incelenmiş ve görüntülenmiştir (Şekil 3.11).

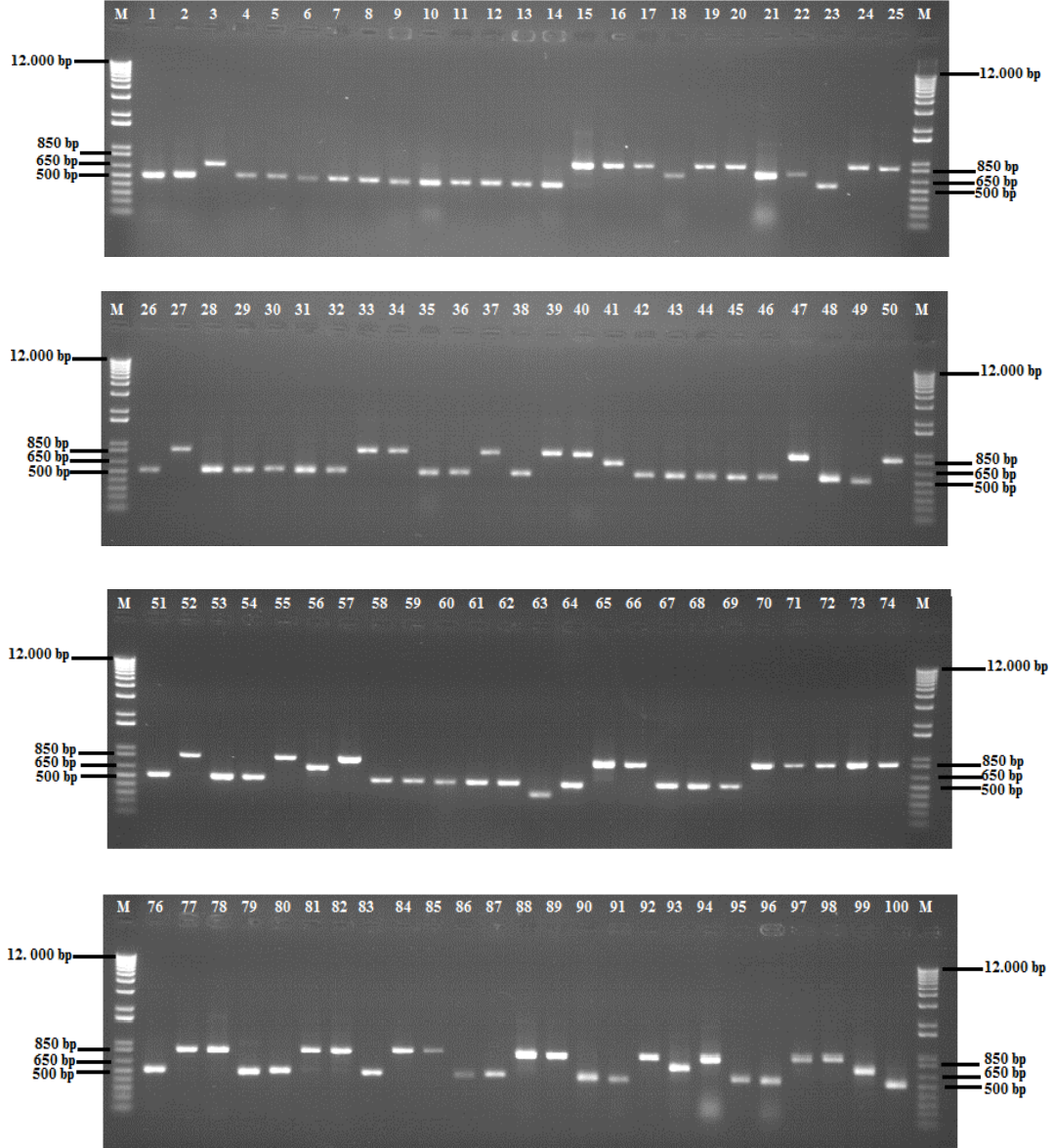


Şekil 3.11. İzolatların DNA izolasyonuna ait jel görüntüsü (M: 1 kb Marker)

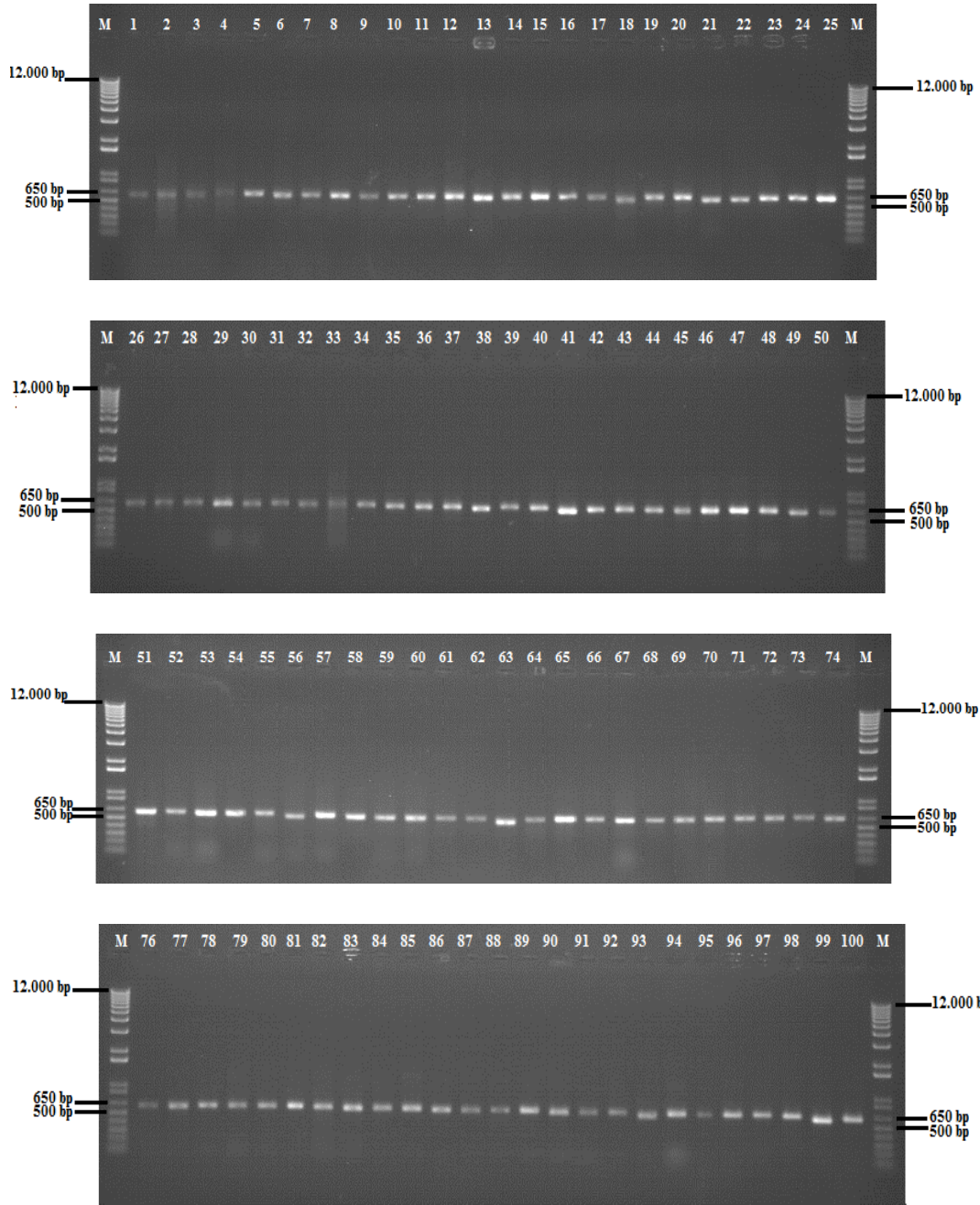
3.4.2. Gen bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu

İzole edilen DNA' lardan ITS-1 ve ITS-4 primer çifti kullanılarak ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi yaklaşık 500-850 bp boyutunda, NL-1 ve NL-4 primerleri kullanılarak D1/D2 bölgesi yaklaşık 600 bp boyutunda amplifiye edilmiştir. PCR' dan sonra PCR ürünlerinin varlığını gözlemek için her bir örnek tüpünden 5 µl alınmış ve 1µl örnek

yükleme boyası ile karıştırılıp, %1'lik agaroz jelde 90 voltta yürütülmüştür. Jel UV transilluminatörde incelenmiş ve görüntülenmiştir (Şekil 3.12, Şekil 3.13).



Şekil 3.12. İzolatların ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin amplifikasyon ürünlerine ait jel görüntüsü (M:1 kb Marker)



Şekil 3.13. İzolatların *D1/D2* bölgesinin amplifikasyon ürünlerine ait jel görüntüsü
(M:1 kb Marker)

3.4.3. Restriksiyon Enzim Analizi (REA)

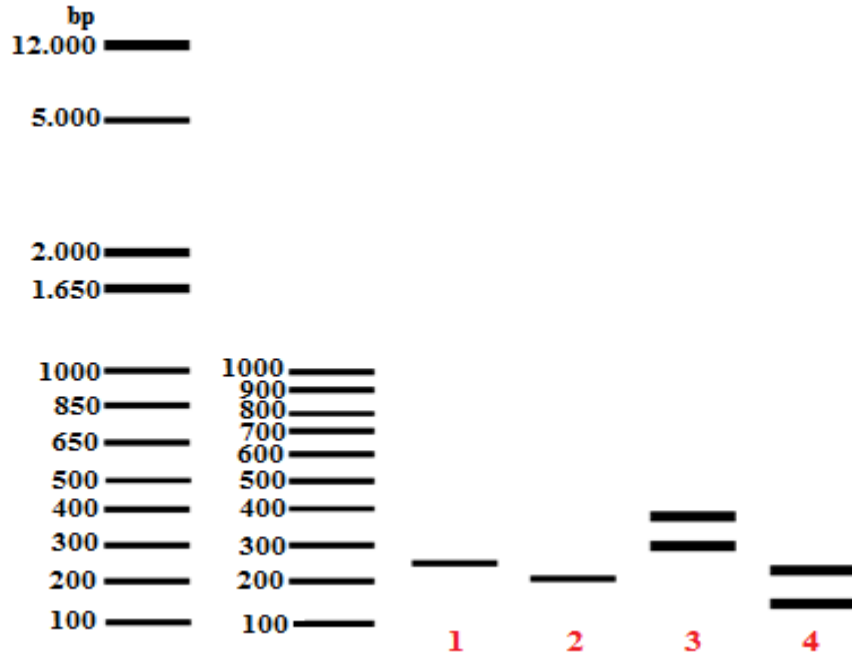
ITS1-5.8S-ITS2 ve D1/D2 bölgesi için elde edilen PCR ürünlerinin restriksiyon enzim analizleri için *Hinf* I, *Hae* III, *Dde* I ve *Bfa*I enzimleri kullanılmıştır.

Restriksiyon kesimleri sonrası örnekler %2 lik agaroz jele yüklenerek yürütülmüştür. Toplam 99 izolattın PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilerek oluşan farklı profiller belirlenip gruplandırılmıştır. Buna göre farklı profiller gösteren izolatların hangileri olduğu belirlenerek dizi analizi yapılacak izolatlar seçilmiştir.

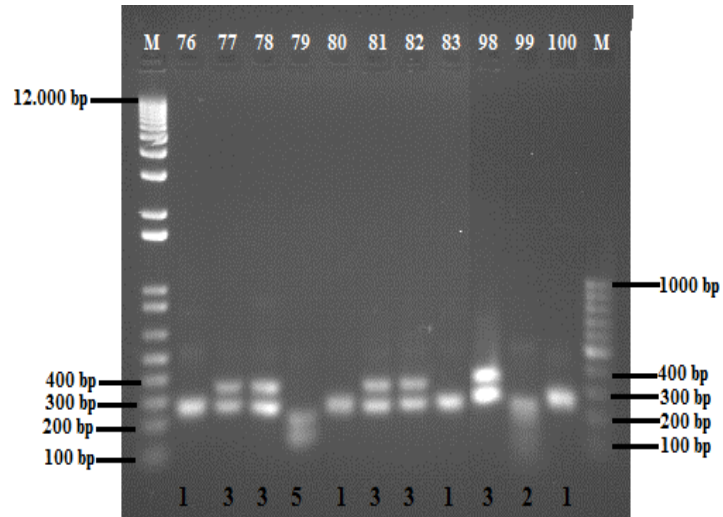
İzolatların restriksiyon enzim kesimlerine göre bant patternleri; ITS bölgesi için *Hinf* I enzimi 4, *Hae* III enzimi 8, *Dde* I enzimi 5 ve *Bfa* I enzimi ile 7 profil elde edilmiştir. D1/D2 bölgesi enzim kesimlerine göre; *Hinf* I enzimi 10, *Hae* III enzimi 8, *Dde* I enzimi 6 ve *Bfa* I enzimi ile 9 profil belirlenmiştir.

Çalışmamızda ITS ve D1/D2 bölgesi kesimleri sonucunda belirlenen bant paternlerinde, bazı izolatların PCR bant büyüklüğünden daha farklı olması (≈ 1.650 bp) genomik DNA' nın kontaminasyonundan kaynaklandığını düşündürmektedir. Ayrıca şekillerde kare içine alınan farklı bantlar gözardı edildiğinde, belirlenen profil gruplandırmasını değişmemektedir.

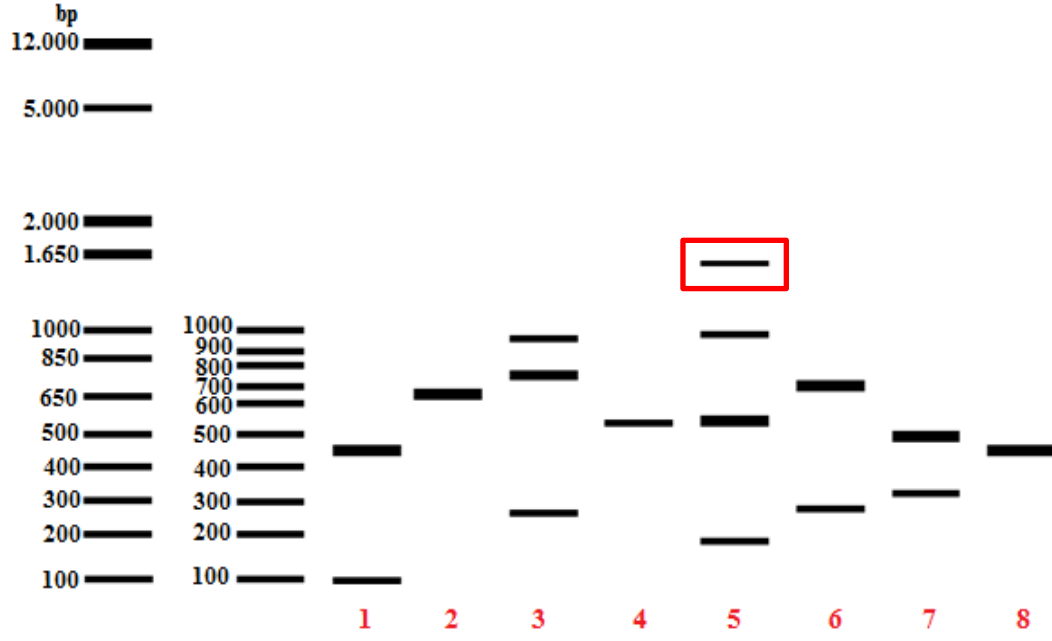
Bant profillerine göre, 99 izolattan 18' i dizi analizi yapılmak üzere ayrılmıştır. REA sonrası kesim haritaları ve farklı profillere ait jel görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25, 3.26, 3.27, 3.28, 3.29).



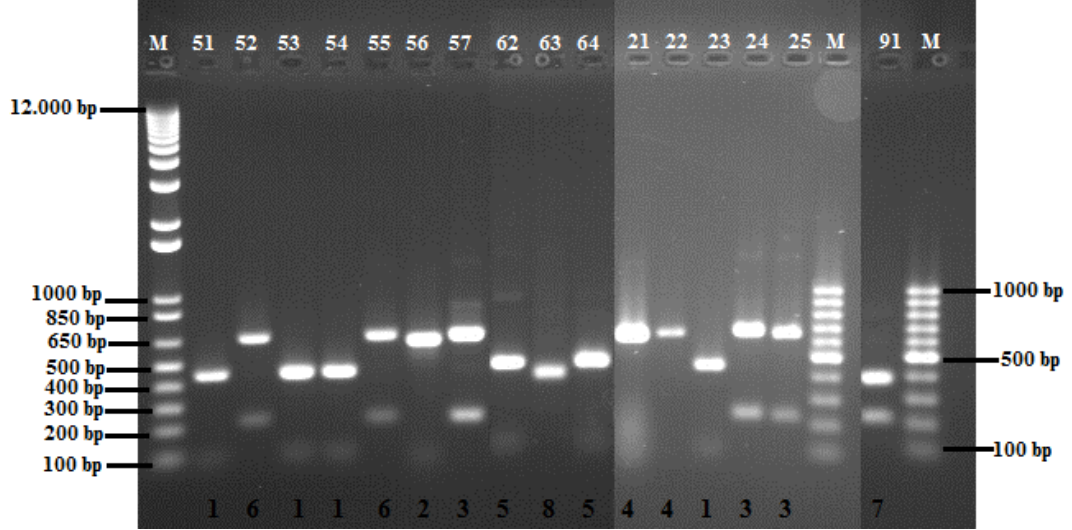
Şekil 3.14. İzolatların ITS bölgesi *Hinf*I enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası



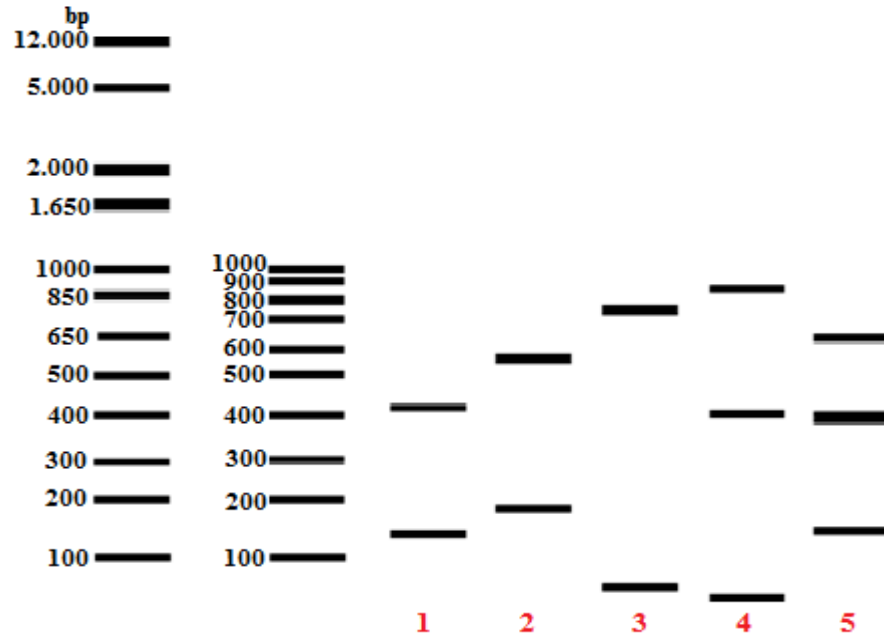
Şekil 3.15. Bazı izolatların ITS bölgesi *Hinf*I enzim ile kesimi



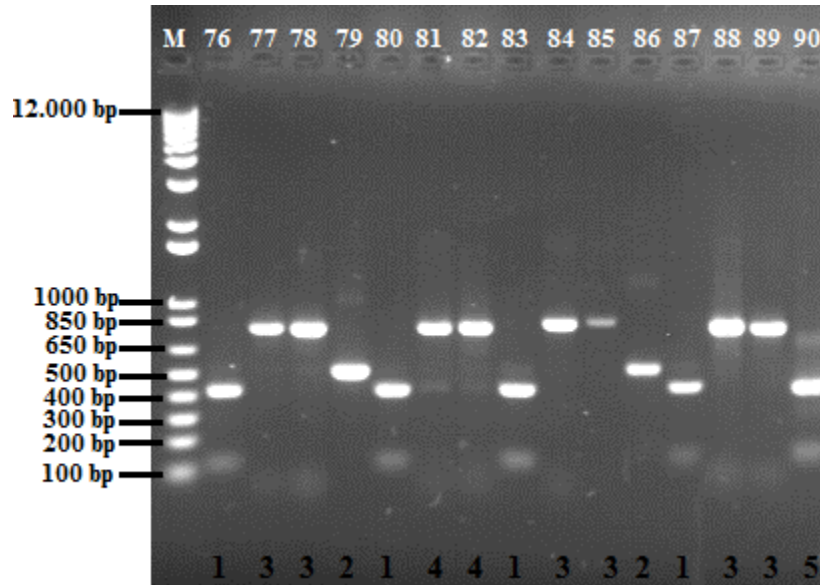
Şekil 3.16. İzolatların ITS bölgesi *Hae* III enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası



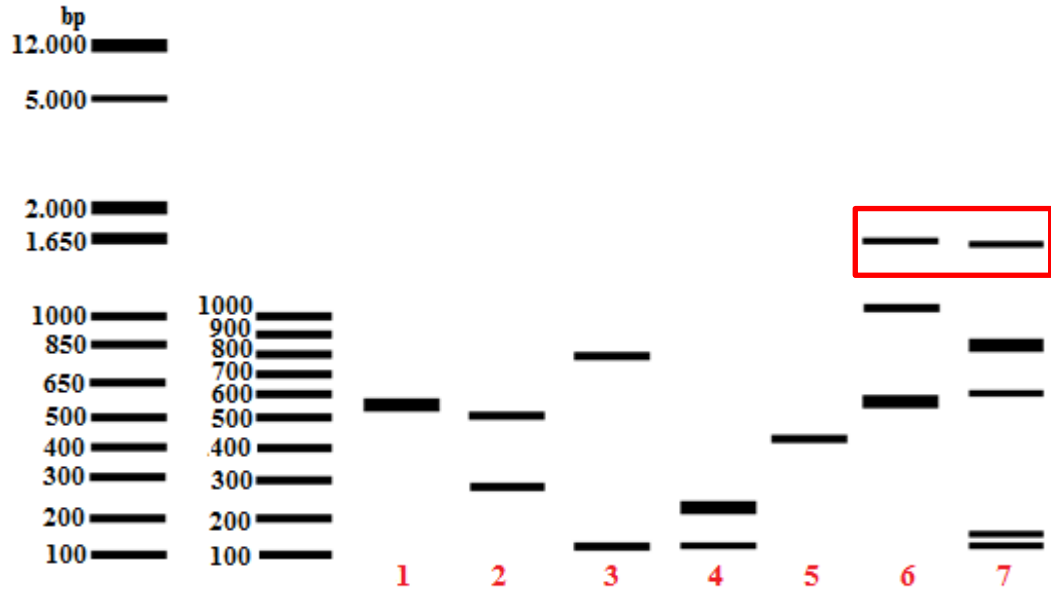
Şekil 3.17. Bazı izolatların ITS bölgesi *Hae* III enzim ile kesimi



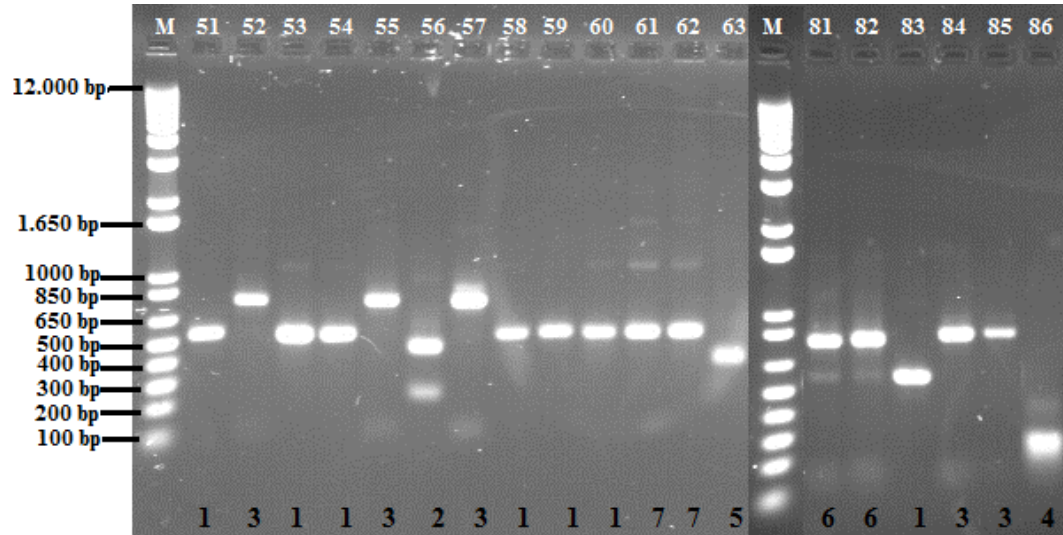
Şekil 3.18. İzolatların ITS bölgesi Dde I enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası



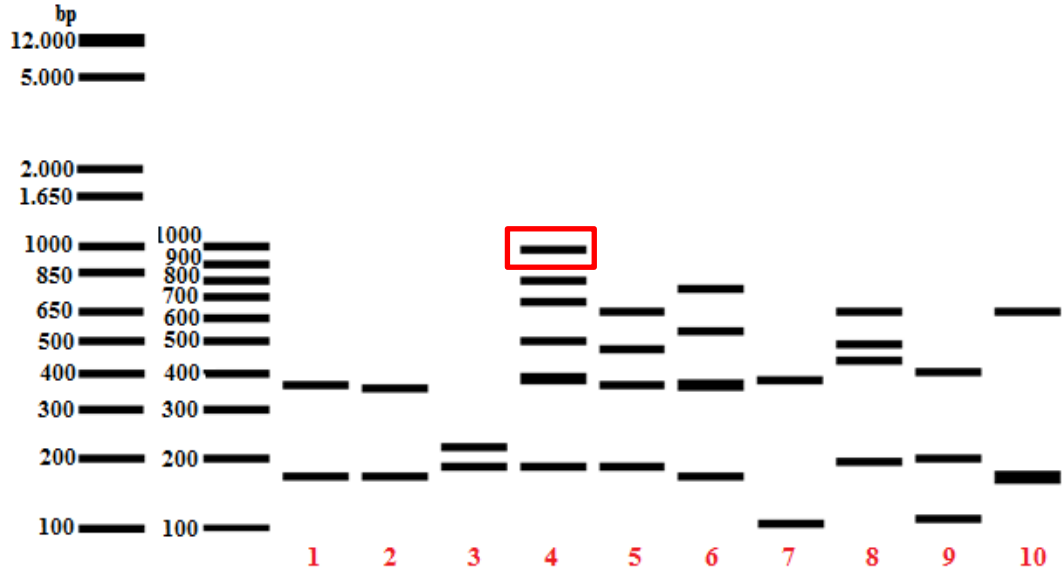
Şekil 3.19. Bazı izolatların ITS bölgesi Dde I enzim ile kesimi



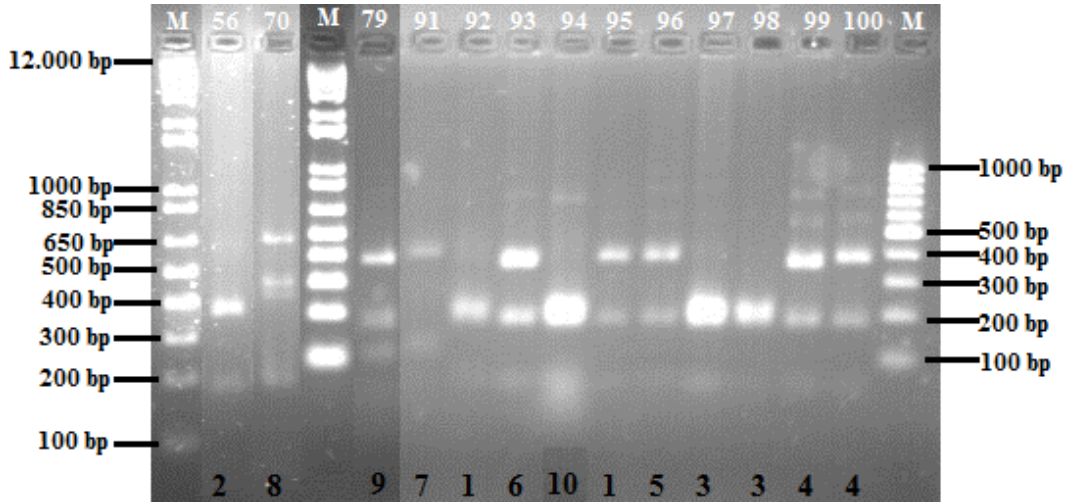
Şekil 3.20. İzolatların ITS bölgesi *Bfa* I enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası



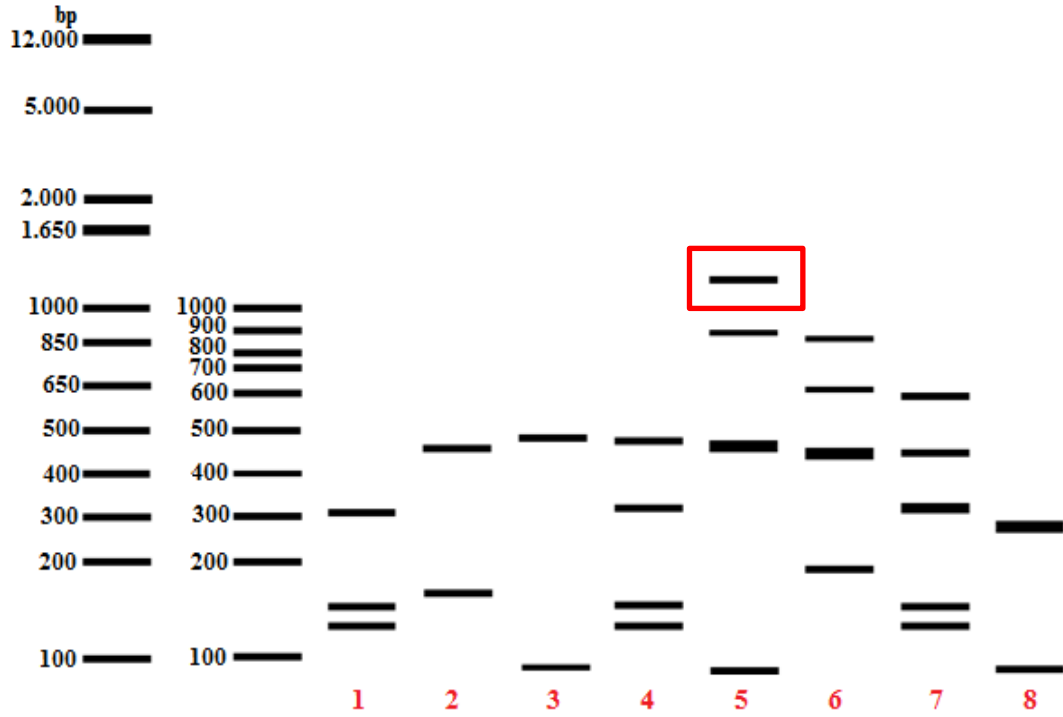
Şekil 3.21. Bazı izolatların ITS bölgesi *Bfa* I enzim ile kesimi



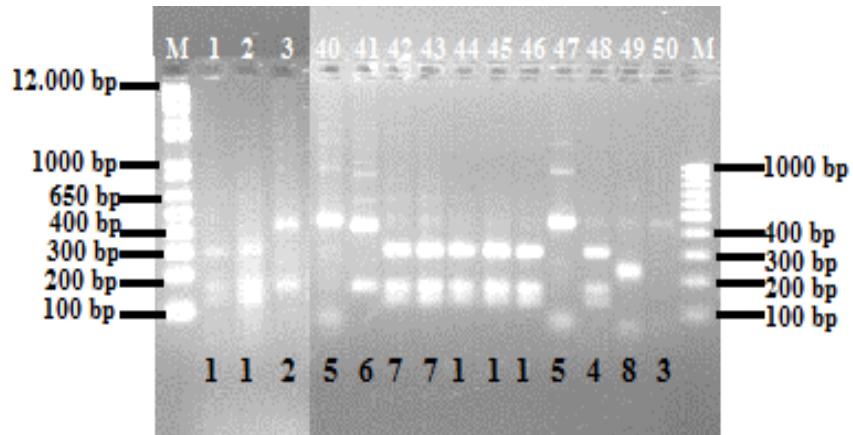
Şekil 3.22. İzolatların D1/D2 bölgesi *Hinf* I enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası



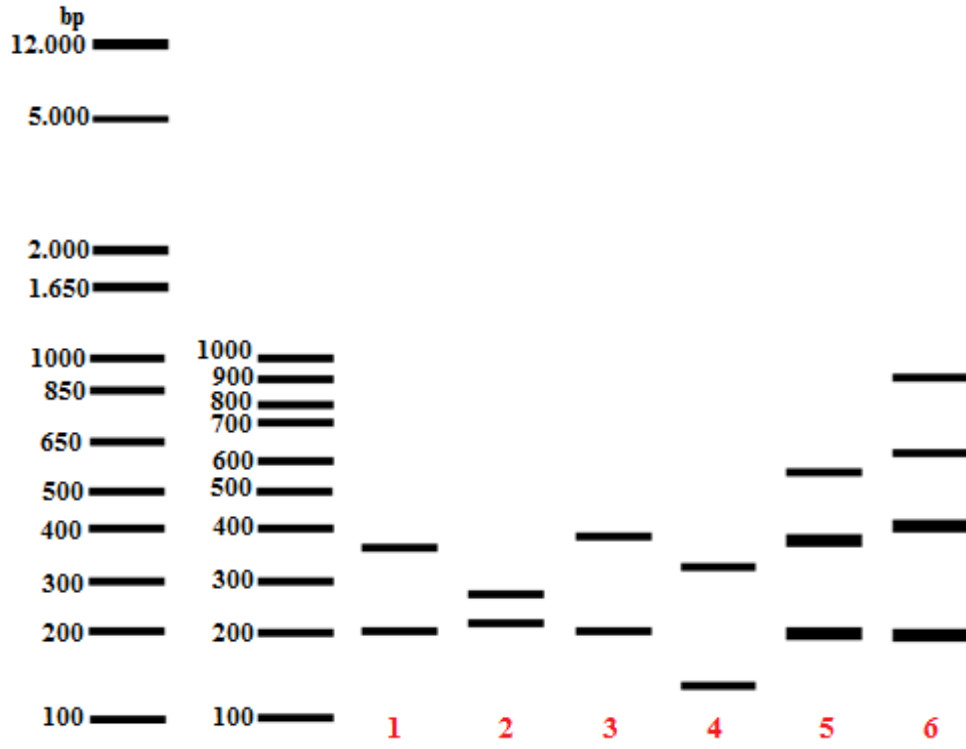
Şekil 3.23. Bazı izolatların D1/D2 bölgesi *Hinf* I enzim ile kesimi



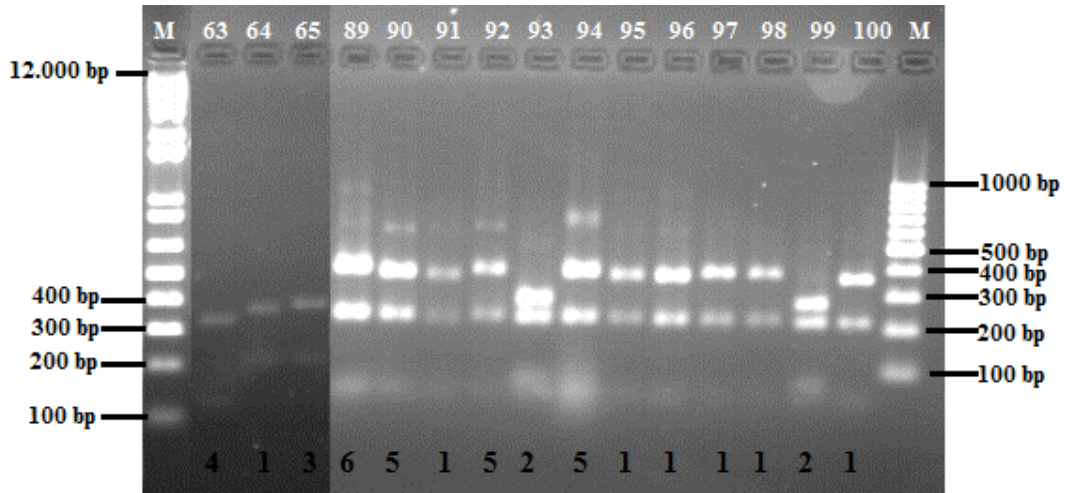
Şekil 3.24. İzolatların D1/D2 bölgesi *Hae* III enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası



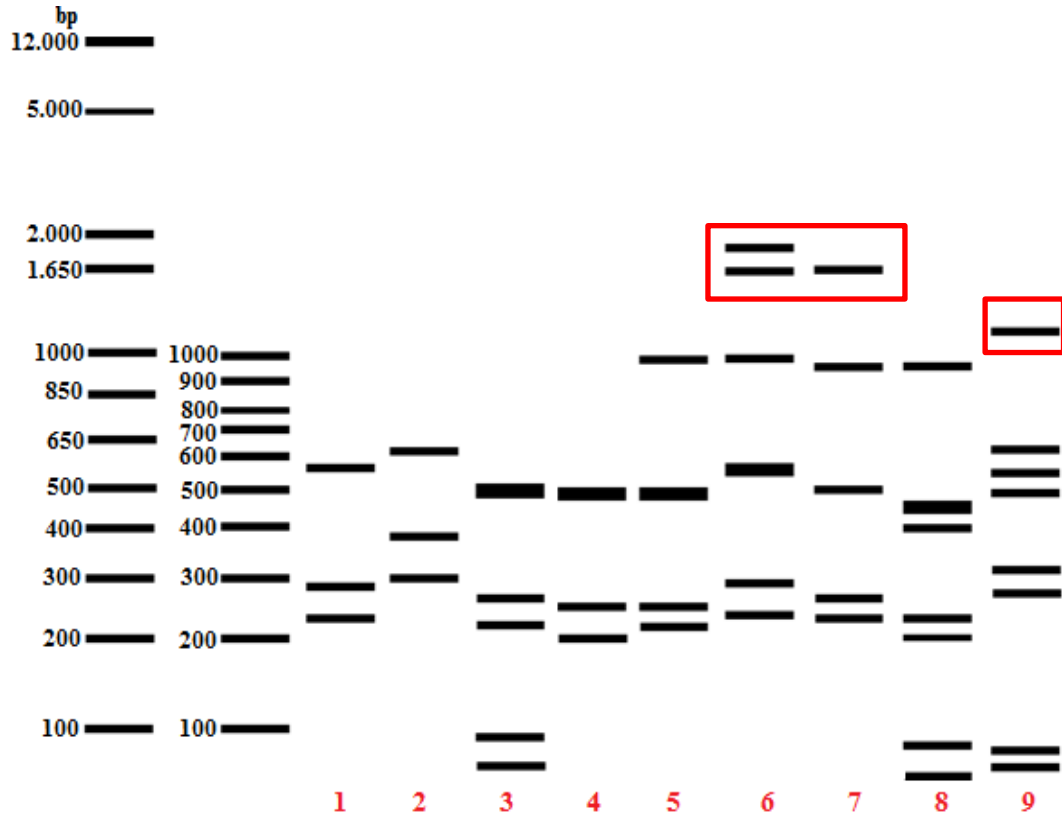
Şekil 3.25. Bazı izolatların D1/D2 bölgesi *Hae* III enzim ile kesimi



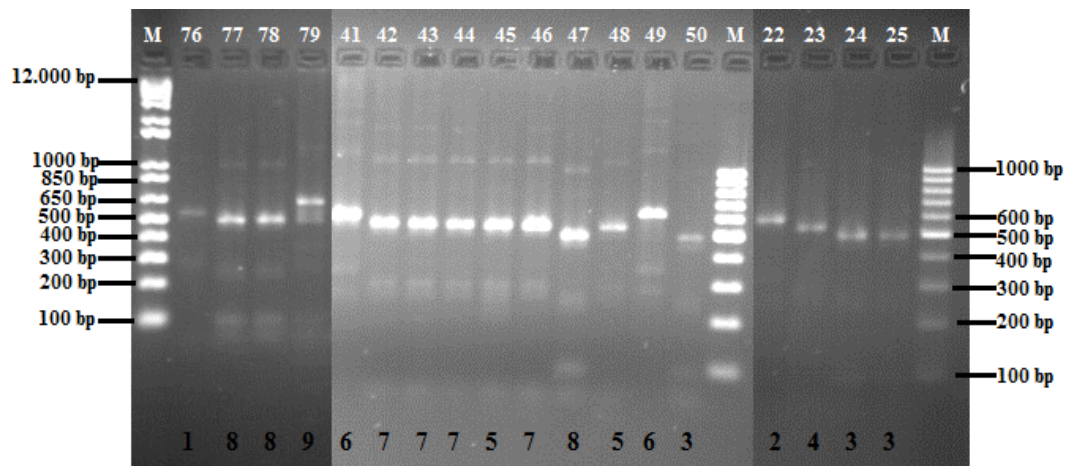
Şekil 3.26. İzolatların D1/D2 bölgesi Dde I enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası



Şekil 3.27. Bazı izolatların D1/D2 bölgesi Dde I enzim ile kesimi ve profil numarası



Şekil 3.28. İzolatların D1/D2 bölgesi Bfa I enzimi ile kesim sonrası elde edilen paternlerin restriksiyon kesim haritası



Şekil 3.29. Bazı izolatların D1/D2 bölgesi Bfa I enzim ile kesimi ve profil numarası

3.4.4. PCR ürünlerinden dizi analizi

Restiraksiyon enzim analizleri sonucunda bant profillerine göre toplam 18 izolat dizi analizine alınmıştır. Seçilen izolatlar; Y-1, Y-3, Y-15, Y-23, Y-32, Y-41, Y-43, Y-47, Y-52, Y-61, Y-63, Y-70, Y-79, Y-81, Y-88, Y-90, Y-91ve Y-94. Bu izolatlar uygun primer çiftleri (ITS1/ITS4, NL1/NL4) kullanılarak amplifiye edilmiş, saflaştırma kiti ile PCR ürünleri saf olarak elde edilmiştir. Dizi analizi verileri Blast programı ile değerlendirilerek her bir izolatın NCBI gen bankasında benzerlik gösterdiği türler belirlenmiştir. Elde edilen dizi analizi bilgileri Tablo 3.3’ te verilmiştir.

Tablo 3.3. İzolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

İzolat No	Dizi Analizinde Kullanılan Primerler	Elde Edilen Dizin Uzunluğu	Eşleşen Baz Sayısı	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı
Y-1	ITS-1	572	557/570	% 98 KC422406 <i>Candida albicans</i>
	ITS-4	781	463/512	%90 FJ697167 <i>Candida albicans</i>
	NL-1	558	557/558	%99 KJ534502 <i>Candida albicans</i>
	NL-4	608	577/586	%98 CP017630 <i>Candida albicans</i>
Y-3	ITS-1	809	651/654	%99 CP015058 <i>Kluyveromyces marxianus</i>
	ITS-4	840	550/574	%97 CP015058 <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS4857
	NL-1	476	474/476	%99 KP268081 <i>Kluyveromyces marxianus</i>
	NL-4	581	566/571	%99 JF715180 <i>Kluyveromyces marxianus</i>
Y-15	ITS-1	856	844/849	%99 KP764979 <i>Candida glabrata</i>
	ITS-4	872	767/795	%96 KP878250 <i>Candida glabrata</i>
	NL-1	561	560/560	%100 KF214414 <i>Candida glabrata</i>
	NL-4	611	598/603	%99 KP780469 <i>Candida glabrata</i> ATCC 64677
Y-23	ITS-1	510	504/505	%99 KP675288 <i>Candida albicans</i>
	ITS-4	722	491/498	%99 KT271769 <i>Candida albicans</i>
	NL-1	519	518/518	%100 KM013367 <i>Candida albicans</i>
	NL-4	588	567/578	%98 KM103003 <i>Candida albicans</i>

Tablo 3.3. (devamı) İzolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

İzolat No	Dizi Analizinde Kullanılan Primerler	Elde Edilen Dizinin Uzunluğu	Eşleşen Baz Sayısı	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı
Y-32	ITS-1	512	455/505	%90 KP674551 <i>Candida albicans</i>
	ITS-4	432	402/430	%93 KY101888 <i>Candida albicans</i> CBS 2700
	NL-1	587	575/576	%99 KJ624050 <i>Candida albicans</i>
	NL-4	611	590/595	%99 CP017630 <i>Candida albicans</i>
Y-41	ITS-1	727	664/673	%99 KP132330 <i>Kluyveromyces marxianus</i>
	ITS-4	697	647/695	%93 KP132330 <i>Kluyveromyces marxianus</i>
	NL-1	532	532/532	%100 CP015058 <i>Kluyveromyces marxianus</i> CBS4857
	NL-4	522	522/522	%100 KJ641888 <i>Kluyveromyces marxianus</i>
Y-43	ITS-1	589	408/505	%81 KP675000 <i>Candida albicans</i>
	ITS-4	504	461/499	%92 GQ280331 <i>Candida albicans</i>
	NL-1	560	558/558	%100 KM102992 <i>Candida albicans</i>
	NL-4	485	480/485	%99 KY106281 <i>Candida albicans</i> CBS2689
Y-47	ITS-1	769	755/769	%98 LT577612 <i>Candida glabrata</i>
	ITS-4	549	547/549	%99 KP131705 <i>Candida glabrata</i>
	NL-1	568	566/567	%99 KM103014 <i>Candida glabrata</i>
	NL-4	598	583/590	%99 KY106479 <i>Candida glabrata</i> CBS6633
Y-52	ITS-1	820	811/815	%99 KP131703 <i>Candida glabrata</i>
	ITS-4	834	754/769	%98 KY102104 <i>Candida glabrata</i> CBS6633
	NL-1	568	565/565	%100 EF690394 <i>Candida glabrata</i>
	NL-4	552	552/552	%100 KY106479 <i>Candida glabrata</i> CBS6633

Tablo 3.3. (devamı) İzolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

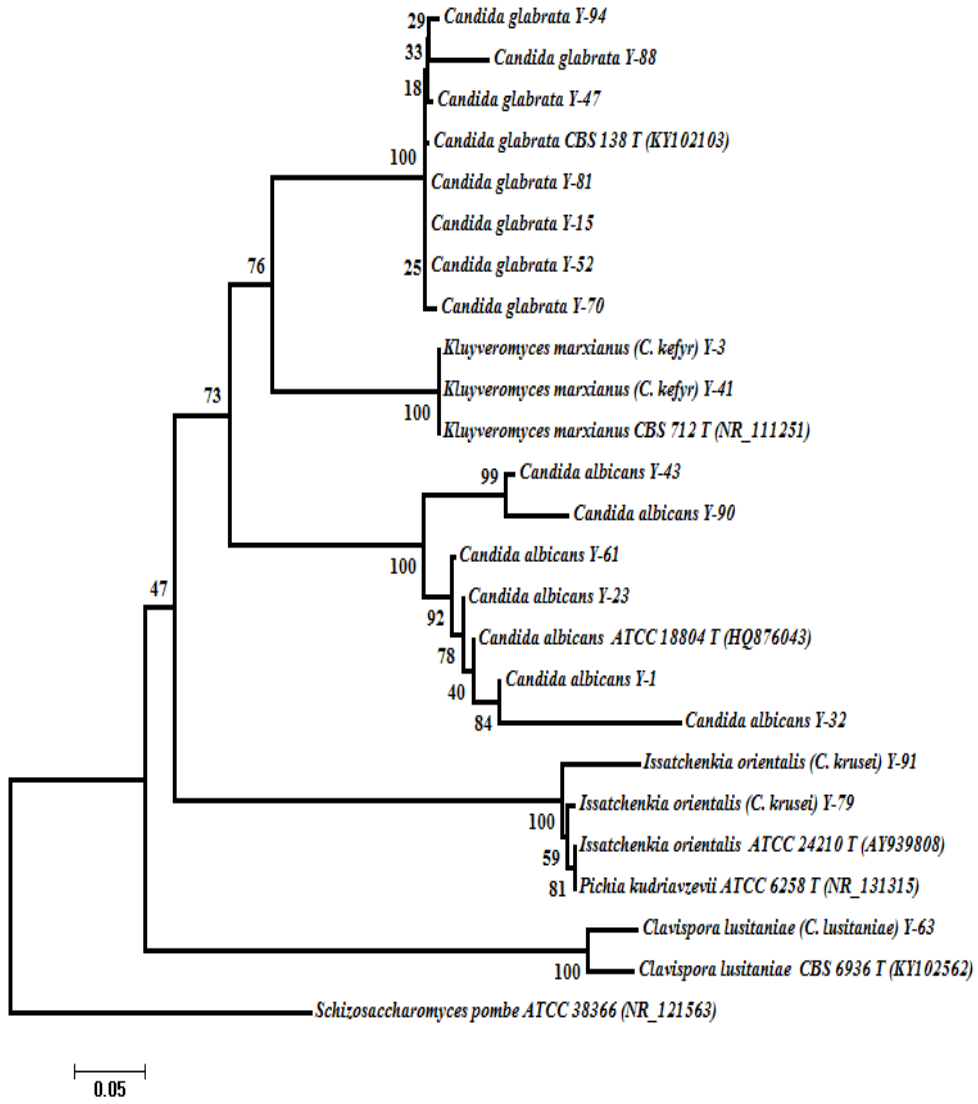
İzolat No	Dizi Analizinde Kullanılan Primerler	Elde Edilen Dizinin Uzunluğu	Eşleşen Baz Sayısı	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı
Y-61	ITS-1	514	509/513	%99 KP131669 <i>Candida albicans</i>
	ITS-4	501	496/499	%99 KY101918 <i>Candida albicans</i> CBS6426
	NL-4	514	504/514	%98 KF214323 <i>Candida albicans</i>
Y-63	ITS-1	490	425/500	%85 KX426345 <i>Clavispora lusitaniae</i>
	ITS-4	561	316/324	%98 KC254018 <i>Clavispora lusitaniae</i>
	NL-1	484	478/484	%99 KY106936 <i>Clavispora lusitaniae</i> CBS5094
	NL-4	555	529/533	%99 DQ377645 <i>Clavispora lusitaniae</i>
Y-70	ITS-1	782	777/782	%99 LC042132 <i>Candida glabrata</i>
	ITS-4	599	596/600	%99 LC042132 <i>Candida glabrata</i>
	NL-1	558	556/556	%100 EF690394 <i>Candida glabrata</i>
	NL-4	558	558/558	%100 KY106479 <i>Candida glabrata</i> CBS6633
Y-79	ITS-1	613	607/612	%99 KJ706301 <i>Pichia kudriavzevii</i>
	ITS-4	474	474/474	%100 KY104587 <i>Pichia kudriavzevii</i> CBS2053
	NL-1	551	550/551	%99 LC177056 <i>Pichia kudriavzevii</i>
	NL-4	542	542/542	%100 KY108856 <i>Pichia kudriavzevii</i> CBS7322
Y-81	ITS-1	907	799/808	%99 AM492797 <i>Candida glabrata</i>
	ITS-4	751	700/724	%97 KY102104 <i>Candida glabrata</i> CBS6633
	NL-1	557	557/557	%100 KY106477 <i>Candida glabrata</i> CBS860
	NL-4	600	585/589	%99 KY106479 <i>Candida glabrata</i> CBS6633

Tablo 3.3. (devamı) İzolatların dizi analizleri sonrası belirlenen en yakın NCBI gen bankası temsilcileri

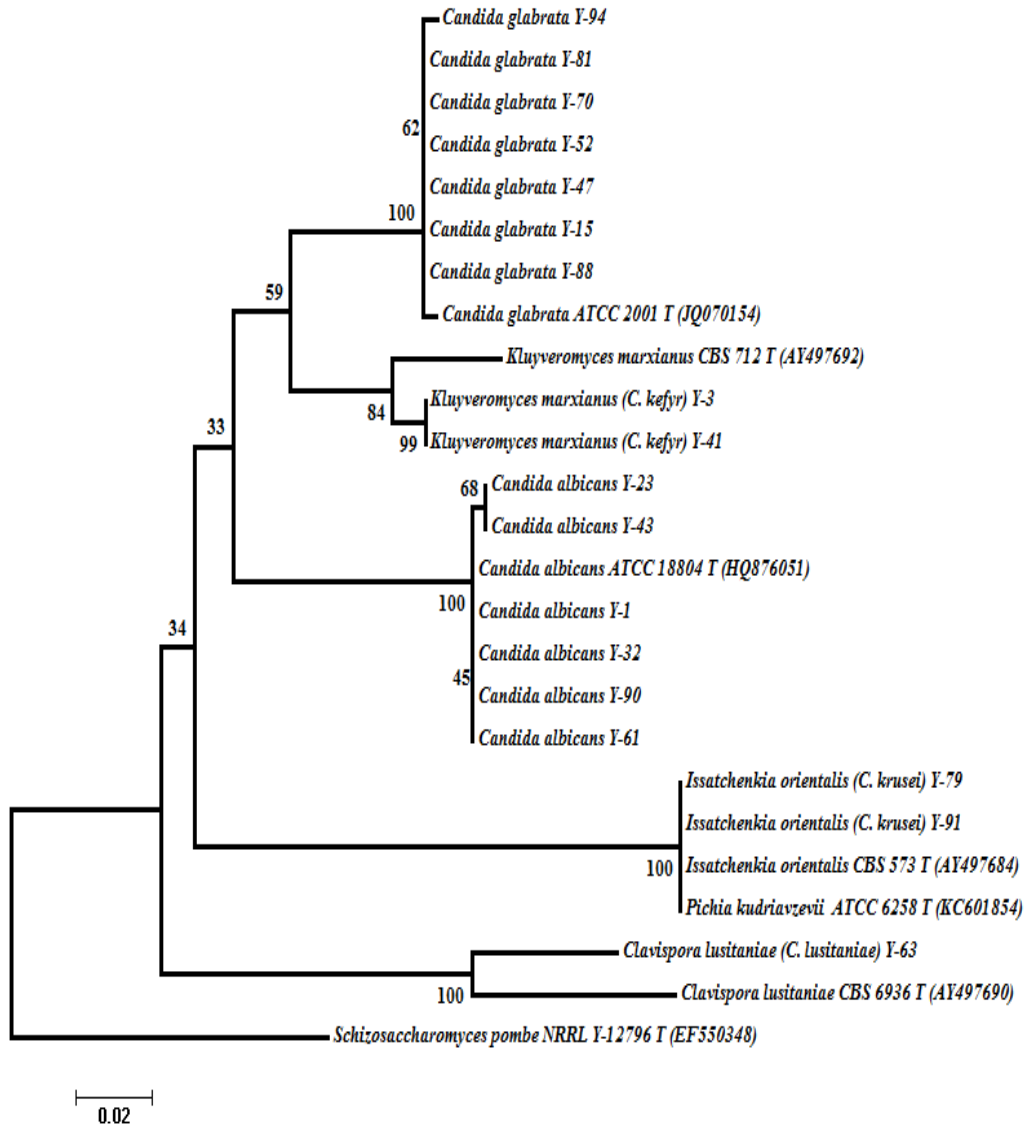
İzolat No	Dizi Analizinde Kullanılan Primerler	Elde Edilen Dizinin Uzunluğu	Eşleşen Baz Sayısı	NCBI Gen Bankasındaki En Yakın Karşılığı
Y-88	ITS-1	631	607/630	%96 GU199447 <i>Candida glabrata</i>
	ITS-4	618	561/591	%95 GU199447 <i>Candida glabrata</i>
	NL-1	569	568/568	%100 KM103026 <i>Candida glabrata</i>
	NL-4	607	598/602	%99 KY106476 <i>Candida glabrata</i> CBS863
Y-90	ITS-4	532	484/505	%96 GQ280331 <i>Candida albicans</i>
	NL-1	558	557/558	%99 KT718064 <i>Candida albicans</i>
	NL-4	584	569/573	%98 KT718064 <i>Candida albicans</i>
Y-91	ITS-1	655	631/661	% 95 KJ706301 <i>Pichia kudriavzevii</i>
	ITS-4	486	460/486	%95 KX015901 <i>Pichia kudriavzevii</i>
	NL-1	545	545/545	%100 KY108855 <i>Pichia kudriavzevii</i> CBS6799
	NL-4	540	540/540	%99 KY108856 <i>Pichia kudriavzevii</i> CBS7322
Y-94	ITS-1	828	807/826	%98 GQ376081 <i>Candida glabrata</i>
	ITS-4	686	659/674	%98 KP675674 <i>Candida glabrata</i>
	NL-4	593	573/583	%98 KY106477 <i>Candida glabrata</i> CBS860

3.4.5. Gen dizilerinin filogenetik analizi

Seçilen 18 izolatın ITS bölgesi ve D1/D2 bölgesine ait dizi bilgileri kullanılarak elde edilen filogenetik ağaçları Şekil 3.30 ve 3.31’ de belirtilmiştir.



Şekil 3.30. İzolatların ITS bölgesi dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi: Tamura-Nei modeline dayalı Neighbor Joining yöntemi, Bootstrap 1,000. Dış grup: *Schizosaccharomyces pombe* (NR_121563).



Şekil 3.31. İzolatların D1/D2 bölgesi dizilerine dayalı filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi: Tamura-Nei modeline dayalı Neighbor Joining yöntemi, Bootstrap 1,000. Dış grup: *Schizosaccharomyces pombe* (EF550348).

3.5. Antifungal Duyarlılık Testleri Sonuçları

İzolatların antifungal duyarlılıkları, mikrodilüsyon yöntemi (MDY) ve VITEK AST-YS06 antifungal duyarlılık kartı kullanılarak belirlenmiştir. Amfoterisin B, flusitozin, kaspofungin, flukonazol ve vorikonazol' ün MİK değerleri Tablo 3.4' te verilmiştir.

Mikrodilüsyon yöntemi ve VITEK ile izolatların antifungallere karşı MİK değerleri belirlenmiştir. Çalışmamızda amfoterisin B için MDY MİK aralığı: 0,125-1 µg/ml VITEK MİK aralığı: 0,5-1 µg/ml olarak saptanmıştır. Sonuçların birbirleriyle uyumlu olduğu ve tüm izolatların MİK değerlerinin göreceli olarak düşük olduğu tespit edilmiştir. Flusitozin MİK aralıkları sırasıyla 0,125-4 µg/ml ve ≤ 1 - 4 µg/ml olarak belirlenmiş ve CLSI M27-S3 kriterlerine göre tüm izolatların duyarlı olduğu görülmüştür. Kaspofungin MİK değerleri MDY ile 0,125-1 µg/ml, VITEK ile tüm izolatların MİK değerleri $\leq 0,25$ µg/ml olarak saptanmıştır ve CLSI' ya göre MİK direnç sınırı ≤ 2 µg/ml olduğundan izolatların hepsi duyarlı bulunmuştur. Azol grubu antifungallerden flukonazol ve vorikonazole karşı MİK değerleri belirlenmiştir. Flukonazol için sırasıyla MİK aralığı: 0,125-64 µg/ml ve ≤ 1 - ≥ 64 µg/ml olduğu görülmüştür. *C. krusei* suşlarının flukonazole doğal dirençli olmalarından dolayı 4 izolatta (Y-49, Y-79, Y-86, Y-91) direnç ve bir *C. glabrata* izolatında (Y-97) direnç saptanmıştır. CLSI kriterlerine göre *C. glabrata* izolatlarının flukonazol duyarlılığında MİK ≤ 32 µg/ml olan suşlarda doza bağımlı duyarlılık (S-DD) bildirilmesi gerekmektedir. Bu sebeple çalışmamızda 35 *C. glabrata* izolatının duyarlılığı S-DD olarak belirlenmiştir. Vorikonazol MİK aralığı MDY için 0,0313-1 µg/ml, VITEK için $\leq 0,12$ - 1 µg/ml olarak saptanmış ve tüm izolatların duyarlı olduğu görülmüştür. Sonuçlarımıza göre, Mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak yapılan antifungal duyarlılık testi sonuçları ile otomatize sistemle yapılan antifungal duyarlılık (VITEK) sonuçları karşılaştırıldığında antifungallerin duyarlılıkları açısından uyumlu bulunmuştur, ancak bazı antifungallerde MDY MİK değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Tablo 3.4. Antifungallere karşı izolatların MİK değerleri (µg/ml)

İzolatlar	Amfoterisin B		Flusitozin		Kaspofungin		Flukonazol		Vorikonazol	
	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2
Y-1	0,25	1	0,125	≤1	0,125	≤0,25	0,25	≤1	0,125	≤0,12
Y-2	0,125	1	0,125	≤1	0,125	≤0,25	0,5	≤1	0,25	≤0,12
Y-3	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	1	≤1	0,0625	≤0,12
Y-4	0,5	1	0,125	≤1	0,125	≤0,25	1	≤1	0,125	≤0,12
Y-5	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,5	≤1	0,125	≤0,12
Y-6	0,125	1	0,125	≤1	0,125	≤0,25	1	≤1	0,0313	≤0,12
Y-7	0,125	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	1	≤1	0,125	≤0,12
Y-8	0,125	0,5	0,125	≤1	0,125	≤0,25	0,25	≤1	0,0625	≤0,12
Y-9	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	1	≤1	0,0313	≤0,12
Y-10	0,5	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,5	≤1	0,0625	≤0,12
Y-11	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,25	≤1	0,0625	≤0,12
Y-12	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,5	≤1	0,0625	≤0,12
Y-13	0,25	0,5	0,125	≤1	0,125	≤0,25	1	≤1	0,0625	≤0,12
Y-14	0,25	0,5	0,125	≤1	0,125	≤0,25	1	≤1	0,0313	≤0,12
Y-15	0,25	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	2	2	0,25	≤0,12
Y-16	0,25	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	4	4	0,25	≤0,12
Y-17	0,25	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	8	8	0,25	≤0,12
Y-18	0,5	0,5	2	≤1	0,125	≤0,25	0,25	≤1	0,0313	≤0,12
Y-19	0,25	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	1	2	0,25	≤0,12
Y-20	0,5	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	8	4	0,125	≤0,12

Tablo 3.4. (devamı) Antifungallere karşı izolatların MİK değerleri (µg/ml)

İzolatlar	Amfoterisin B		Flusitozin		Kaspofungin		Flukonazol		Vorikonazol	
	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2
Y-21	1	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	1	≤1	0,0313	≤0,12
Y-22	0,5	0,5	1	≤1	0,25	≤0,25	1	≤1	0,0313	≤0,12
Y-23	0,25	0,5	0,125	≤1	0,125	≤0,25	0,25	≤1	0,0625	≤0,12
Y-24	0,25	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	4	4	0,25	≤0,12
Y-25	0,25	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	8	4	0,25	≤0,12
Y-26	0,5	1	0,125	≤1	0,125	≤0,25	0,25	≤1	0,0313	≤0,12
Y-27	0,5	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	4	4	0,25	≤0,12
Y-28	0,5	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,25	≤1	0,0313	≤0,12
Y-29	0,5	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,5	≤1	0,0313	≤0,12
Y-30	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,125	≤1	0,0313	≤0,12
Y-31	0,5	1	0,25	≤1	0,25	≤0,25	2	≤1	0,25	≤0,12
Y-32	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,25	≤1	0,0625	≤0,12
Y-33	0,5	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	4	4	0,125	≤0,12
Y-34	0,5	1	0,125	≤1	0,5	≤0,25	8	8	0,25	≤0,12
Y-35	0,25	1	2	≤1	0,25	≤0,25	0,5	≤1	0,125	≤0,12
Y-36	0,5	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,25	≤1	0,0625	≤0,12
Y-37	0,5	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	8	2	0,25	≤0,12
Y-38	0,25	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,25	≤1	0,0313	≤0,12
Y-39	0,5	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	8	8	0,25	≤0,12
Y-40	0,5	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	2	2	0,25	≤0,12

Tablo 3.4. (devamı) Antifungallere karşı izolatların MİK değerleri (µg/ml)

İzolatlar	Amfoterisin B		Flusitozin		Kaspofungin		Flukonazol		Vorikonazol	
	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2
Y-41	0,25	1	0,25	≤1	0,25	≤0,25	0,5	2	0,0313	≤0,12
Y-42	0,125	0,5	0,25	≤1	1	≤0,25	1	≤1	0,25	≤0,12
Y-43	0,25	0,5	0,25	≤1	0,25	≤0,25	0,5	≤1	0,125	≤0,12
Y-44	0,25	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,25	≤1	0,0625	≤0,12
Y-45	0,25	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,5	≤1	0,125	≤0,12
Y-46	0,25	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,5	≤1	0,0625	≤0,12
Y-47	0,25	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	4	4	0,25	≤0,12
Y-48	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,5	≤1	0,25	≤0,12
Y-49	0,5	0,5	2	2	0,5	≤0,25	16	4	0,25	≤0,12
Y-50	0,25	0,5	1	≤1	0,5	≤0,25	2	2	0,25	≤0,12
Y-51	0,25	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,5	≤1	0,0313	≤0,12
Y-52	0,5	1	0,125	≤1	0,5	≤0,25	8	8	0,5	≤0,12
Y-53	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	1	≤1	0,0313	≤0,12
Y-54	0,25	1	0,25	≤1	0,125	≤0,25	0,25	≤1	0,0313	≤0,12
Y-55	0,25	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	8	4	0,25	≤0,12
Y-56	0,25	1	1	≤1	0,25	≤0,25	0,25	≤1	0,0313	≤0,12
Y-57	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	8	8	0,5	≤0,12
Y-58	0,25	1	0,125	≤1	0,125	≤0,25	0,5	≤1	0,0625	≤0,12
Y-59	0,25	0,5	0,5	≤1	0,125	≤0,25	0,5	≤1	0,0625	≤0,12
Y-60	0,125	1	0,125	≤1	0,125	≤0,25	0,25	≤1	0,0313	≤0,12

Tablo 3.4. (devamı) *Antifungallere karşı izolatların MİK değerleri (µg/ml)*

İzolatlar	Amfoterisin B		Flusitozin		Kaspofungin		Flukonazol		Vorikonazol	
	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2
Y-61	0,25	1	0,125	≤1	0,125	≤0,25	0,25	≤1	0,125	≤0,12
Y-62	0,25	0,5	0,125	≤1	0,125	≤0,25	0,5	≤1	0,0313	≤0,12
Y-63	0,125	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	1	≤1	0,0313	≤0,12
Y-64	0,25	1	0,125	≤1	0,125	≤0,25	0,25	≤1	0,0625	≤0,12
Y-65	0,25	1	0,125	≤1	0,5	≤0,25	8	8	0,5	≤0,12
Y-66	0,5	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	8	8	0,5	≤0,12
Y-67	0,25	1	0,125	≤1	0,5	≤0,25	0,5	≤1	0,0313	≤0,12
Y-68	0,25	1	0,125	≤1	0,125	≤0,25	0,25	≤1	0,0313	≤0,12
Y-69	0,25	1	0,125	≤1	0,125	≤0,25	0,25	≤1	0,0313	≤0,12
Y-70	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	2	2	0,5	≤0,12
Y-71	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	16	8	0,5	≤0,12
Y-72	1	1	0,125	≤1	0,5	≤0,25	32	32	1	1
Y-73	0,25	1	0,125	≤1	0,5	≤0,25	8	4	0,5	≤0,12
Y-74	0,25	1	0,125	≤1	0,5	≤0,25	8	8	0,25	≤0,25
Y-76	0,125	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,25	≤1	0,0313	≤0,12
Y-77	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	8	4	0,25	≤0,12
Y-78	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	2	4	0,25	≤0,12
Y-79	0,5	1	4	4	0,5	≤0,25	16	8	0,25	≤0,12
Y-80	0,25	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	1	≤1	0,125	≤0,12
Y-81	0,25	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	4	4	0,25	≤0,12

Tablo 3.4. (devamı) *Antifungallere karşı izolatların MİK değerleri (µg/ml)*

İzolatlar	Amfoterisin B		Flusitozin		Kaspofungin		Flukonazol		Vorikonazol	
	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2	MDY	VITEK 2
Y-82	0,25	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	4	4	0,25	≤0,12
Y-83	0,25	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	0,25	≤1	0,0313	≤0,12
Y-84	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	8	4	0,125	≤0,12
Y-85	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	8	8	0,25	≤0,25
Y-86	0,5	1	4	4	0,5	≤0,25	8	8	0,5	≤0,12
Y-87	0,25	1	0,125	≤1	0,125	≤0,25	0,5	≤1	0,125	≤0,12
Y-88	0,5	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	4	4	0,25	≤0,12
Y-89	0,25	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	8	8	0,25	≤0,25
Y-90	0,25	0,5	0,125	≤1	0,125	≤0,25	0,5	≤1	0,25	≤0,12
Y-91	1	0,5	0,125	≤1	0,5	≤0,25	8	4	0,25	≤0,12
Y-92	0,25	0,5	4	4	0,25	≤0,25	4	8	0,0625	≤0,12
Y-93	0,25	0,5	0,5	≤1	0,25	≤0,25	0,25	≤1	0,25	≤0,12
Y-94	0,25	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	32	16	0,125	≤0,12
Y-95	0,25	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	1	≤1	0,0625	≤0,12
Y-96	0,25	1	0,25	≤1	0,25	≤0,25	0,25	≤1	0,125	≤0,12
Y-97	0,25	1	0,125	≤1	0,25	≤0,25	64	≥64	0,5	≤0,12
Y-98	0,5	0,5	0,125	≤1	0,25	≤0,25	2	2	0,5	≤0,12
Y-99	0,25	1	1	≤1	0,125	≤0,25	2	2	0,0625	≤0,12
Y-100	0,25	1	1	≤1	0,125	≤0,25	0,5	≤1	0,0313	≤0,12

4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Mantar infeksiyonu etkeni olarak yaygın olarak tanımlanan *Candida* türleri, yaşamı olumsuz etkileyen mukokutanöz hastalıklara neden olmaktadır (Richards ve ark. 2000). *Candida* türleri deri, gastrointestinal ve ürogenital sistemde kolonize olabilmekte olup, en fazla infeksiyona neden olan tür *C. albicans*' tır. non- *C. albicans* türleri de mukokutanöz yüzeylerde kolonize olarak fırsatçı patojen özellik göstermektedirler. *Candida* infeksiyonlarının patogenezi ve prognozu konak immün durumundan etkilenmekte ve hastalık oluşumlarında büyük farklılıklar göstermektedir. Bu sebeple tanı ve tedavi seçenekleri hastaya göre değişmektedir (Sobel 2006).

Mukokutanöz kandidoz; ürogenital ve nongenital yüzeyel mantar infeksiyonları olarak sınıflandırılabilir. Ürogenital kandidozun en sık rastlanılan bulguları; kandidüri, kadınlarda vulvovajinal kandidoz (VVK), erkeklerde balanit ve balanopostit olarak görülmektedir. Bu hastalıklar; bağışıklığı baskılanmış hastaların yanısıra immünokompetan gibi farklı populasyonlarda da oldukça yaygındır. VVK çoğunlukla sağlıklı kadınları etkilemekle birlikte, kandidüri genellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda veya yenidoğanlarda karşımıza çıkmaktadır (Sobel ve ark. 1998).

Kadınlarda vulvovajinal kandidoz (VVK) oldukça yaygın olduğundan, tüm kadınların %75' inin hayatlarının bir döneminde bu infeksiyonu geçirdikleri saptanmıştır (McCormack ve ark. 1994). Kadınların çoğunda doğum sonrasında en az bir kere VVK tanısı konulmaktadır. Hastaların büyük bir kısmı uygun tedaviyle iyileşmekte iken, hastaların %5' inde infeksiyon kronik bir hal alarak tekrarlayan vajinit atakları görülmektedir. Bu durum tekrarlayan VVK olarak adlandırılmakta, son bir yıl içerisinde en az 4 kez mikolojik olarak ispatlanmış kandidal vajinit tablosunun görülmesi şeklinde tanımlanmaktadır. (Trama ve ark. 2005; Moreira ve Paula 2006).

Candida' ların normal vajen florasında da bulunmaları nedeniyle patojen ve nonpatojen ayırımının yapılması gerekmektedir. Kültürden izole edilen *Candida*' ların klinik olarak anlam ifade edebilmesi için, hastada klinik bulguların olması veya alınan örnekten izole edilen *Candida*' lar tür düzeyinde tanımlanmalıdır. Tür düzeyindeki tanımlama tedaviye yanıtın izlenmesinde ve klinik relapsların değerlendirilmesinde de yararlı olmaktadır (Murray ve ark. 2014).

Geleneksel olarak *Candida*' ların identifikasyonu makroskopik ve mikroskopik özelliklerine göre yapılmaktadır. Ayrıca tür düzeyinde identifikasyon için biyokimyasal testlerde kullanılmaktadır. Morfolojik karakterleri olarak; hücre büyüklüğü ve şekli, koloni rengi ve görünümü, hif ve/veya pseudohif üretimi, germ tüp veya klamidospore oluşturma yetenekleri gibi özelliklerine bakılmakta; biyokimyasal testlerde ise; karbonhidrat fermentasyon ve asimilasyonu, üre hidrolizi ve nitrat asimilasyonu değerlendirilmektedir (Koneman ve ark. 1997).

Germ tüp testi; *Candida*' ların identifikasyonunda kullanılan oldukça değerli ve basit testlerden biridir. *C. albicans*' ın diğer *Candida*' lardan ayrılmasını sağlayan, hızlı sonuç veren ve uygulaması kolay olan bir testtir. Ancak *C. albicans* izolatlarının hepsinde pozitif olmayıp yalancı pozitiflik de oluşabilmektedir. *C. albicans* kökenlerinin %95-97' si germ tüp oluşturmaktadır (Helvacı ve ark. 1992).

Geleneksel yöntemlerden olan; mısır unlu (Corn meal) -tween 80 agar da *Candida*' ların hif, pseudohif, blastospor ve klamidospore üretme özellikleri mikroskopik olarak değerlendirilerek tanımlama yapılmaktadır (Koneman ve ark. 1997). Çalışmamızda; 100 maya izolatının germ tüp oluşturma özelliği değerlendirildiğinde; 49' u *C. albicans*, 51' i ise non- *C. albicans* olarak saptanmıştır. İzolatların mısır unlu-tween 80 agardaki morfolojilerine göre; 49' u *C. albicans*, 39' u *C. glabrata*, 5' i *C. kefyr*, 4' ü *C. krusei*, 1' i *C. lusitanae*, 1'i *C. dubliniensis* ve 1'i *Rhodotorula* sp. olarak tanımlanmıştır.

Candida türlerinin çoğu SDA' da krem rengi koloniler oluşturmaktadır. Koloni rengi konvansiyonel olarak kullanılan besiyerlerinde ayırt edilememektedir. *Candida* türlerinin farklı renkte koloniler oluşturduğu besiyerleri bulunmaktadır: Albicans ID (Bio Merieux, Marcy Etoile, France), Candichrom albicans (International Mycoplasma, Toulon Cedex-France), Candida Ident Agar (Sigma-Aldrich-USA) Candiselect (Sanofi Diagnostics Pasteur), CHROMagar Candida (BBL), MAST ID-CHROMagar Candida (Mast Diagnostics, United Kingdom), BIGGY agar (Oxoid, Basingstoke, İngiltere), Fluoroplate Candida (Merck, Almanya), Fungiscreen 4H (Sanofi Diagnostics Pasteur), Murex Candida albicans (Murex Diagnostics, A.B.D.), Brilliance Candida Agar (Oxoid, Basingstoke, İngiltere). Yapılan çalışmalarda mayaların identifikasyonunda kullanılan, kromojenik besiyerlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin yüksek olduğu bildirilmektedir

(Freydiere ve ark. 1997; Ellepola ve Morrison 2005). Besiyerlerinde oluşan farklı renk ve koloni morfolojileri sayesinde organizmalar tür düzeyinde tanımlanabilmekte ve aynı zamanda klinik örnekte bulunabilecek farklı türlerin belirlenmesinde de kolaylık sağlamaktadır. Günümüzde değişik kromojenik besiyerlerinin karşılaştırılmasıyla ilgili birçok çalışma yapılmıştır.

Pfaller ve arkadaşları (1996) klinik örneklerden izole edilen toplam 316 izolatı Sabouraud glukoz agar (kloramfenikol ve gentamisinli) ve CHROMagar Candida besiyerinde değerlendirmiştir. *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*' nin koloni rengi ve morfolojisine göre %95 oranında doğru olarak tanımlandığını, *C. glabrata*' nın identifikasyonunda da güvenilir sonuçlar elde ettiklerini ileri sürmüşlerdir.

Houang ve arkadaşları (1997), 1784 vajinal sürüntü örneğini ile yaptıkları çalışmada; SDA besiyerinde 373 ve CHROMagar Candida' da 368 örnekte pozitif sonuç elde etmişlerdir. Bu besiyerinin *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* izolatlarının hepsini, *C. glabrata* türlerinin ise %82' sini doğru tanımladığını saptamışlardır.

Candida ID ve CHROMagar Candida besiyerleri ile yapılan bir çalışmada, *C. albicans* için 24 saatlik inkübasyon sonrasında sırasıyla duyarlılığı %96,8 ve %49,6; 48 saatlik inkübasyondan sonra %99,7 ve %98,9; 72 saatlik inkübasyon sonrası her iki besiyerinde duyarlılığı %100 olarak belirlemişlerdir. Özellikle *C. albicans* izolatlarının Candida ID ile 24 saatlik inkübasyon sonrasında tanımlanabildiğini vurgulamışlardır (Willinger ve ark. 2001).

Cooke ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları bir çalışmada; *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* türlerinin tanımlanmasında Candida ID agarın duyarlılığını %94,7, özgüllüğünü %93,8 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca CHROMagar' a göre daha kısa inkübasyon süresinde (24 saat) koloni renklerinin ayırım sağladığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda Candida ID besiyerinde toplam 100 izolatın; 50' si *C. albicans*, 45' i *C. glabrata*, 4' ü *C. krusei* olarak tanımlanmış, renk farklılığından dolayı bir izolat isimlendirilememiştir. Candida Ident Agar ile yapılan değerlendirmede bazı izolatlar koloni morfolojisine göre yanlış tanımlanmıştır. Beş *C. kefyr* ve bir *C. lusitaniae* izolatı

C. glabrata; *C. dubliniensis* izolatu *C. albicans* olarak yanlış değerdendirilmiş ve bir *Rhodotorula* sp. ise isimlendirilememiştir. Sonuçlarımıza göre Candida ID agarın *C. albicans* izolatlarının kısa inkübasyon süresi sonunda tanımlamada kullanılabileceği, yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Yücesoy ve Marol (2003) maya türlerini CHROMagar Candida ve BIGGY agar' la tanımlamaya çalışmışlardır. CHROMagar Candida besiyerinin *C. albicans* için duyarlılığını %99,4, BIGGY agar' ın %87; özgüllüğü ise sırasıyla %100 ve %75,2 olarak tespit etmişlerdir. *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. krusei* izolatları için CHROMagar Candida besiyerinde duyarlılığı %90,9-100, özgüllüğü %100; *C. tropicalis* ve *C. krusei* izolatları için BIGGY agar duyarlılığını %66.6-100, özgüllüğü ise %95,4-100 olarak bildirmişlerdir. CHROMagar' ın özellikle *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei*' yi doğru tanımladığını, BIGGY agarın ise düşük duyarlılık ve zgllğnden dolayı identifikasyonda kullanımının sınırlı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Yücesoy ve arkadaşları (2005) farklı kromojenik besiyerleri kullanarak *Candida* izolatlarını tanımlamaya çalışmışlardır. CHROMagar' ın *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata*' yı belirlemede, Albicans ID₂' nin ise *C. albicans*' ı tanımlamada güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini vurgulamışlardır. BIGGY agarın ise; koyu kahverengi koloniler oluşturan *C. krusei* türünü tanımlamada %100 duyarlı olduğunu saptamışlardır. BIGGY agar ile yapılan diğer çalışmalarda; bazı türlerin tanımlanmasında yetersiz olduğu; ancak *C. albicans*, *C. glabrata*' nin koloni rengine bakılarak ayırt edilebileceğini ve *C. kefir* identifikasyonunda başarılı olduğunu ileri sürmüşlerdir (Kalkancı ve ark. 1999; Aktaş ve ark. 2001; İlkit ve ark. 2007).

Daef ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada; CHROMagar Candida' nın birçok *Candida* türünün (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. krusei*) identifikasyonu için kolay ve doğru bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. BIGGY agarda; *C. albicans* ve *C. tropicalis*' in koloni rengi ayrımının oldukça zor olduğunu, *C. glabrata* suşlarının ayırt edilebildiğini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda BIGGY agardaki koloni renklerine göre; 50' si *C. albicans*, 37' si *C. glabrata*, 6' sı *C. kefir*, 4'  *C. krusei*, 3'  *C. tropicalis* olarak isimlendirilmiştir. Kromojenik besiyerlerinden BIGGY Agar ile yapılan identifikasyonda; türlerin ayrımı için koloni renklerinin birbirine çok yakın veya aynı olmasından dolayı farklı *Candida*

türlerinin ayrımı yapılamamıştır. Bu sebeple; üç *C. glabrata* suşu bu besiyerinde *C. tropicalis* olarak değerlendirilmiş, bir *C. lusitaniae* izolatu *C. albicans*, bir *Rhodotorula* sp. izolatu *C. kefyr*, bir *C. dublinensis* suşu *C. glabrata*, bir *C. glabrata* izolatu *C. albicans*, bir *C. albicans* izolatu ise *C. glabrata* olarak yanlış identifikasyonları yapılmıştır. Sonuçlarımızın literatür sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüş; *C. albicans*, *C. krusei*, *C. kefyr* suşlarının identifikasyonunda başarılı olduğu saptanmış ve BIGGY agarın *C. glabrata* izolatlarının tanımlanmasında kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Oxoid Chromogenic Candida Agar (OCCA) ve CHROMagar Candida Agar' ın *Candida* türleri tanımlanmasının karşılaştırıldığı bir çalışmada; 48 saatlik inkübasyon sonunda *C. albicans* için OCCA besiyerinin duyarlılığının %96,6 özgüllüğünün %100 olduğunu göstermişlerdir. OCCA' nın *C. tropicalis* ve *C. krusei* suşlarını doğru identifiye ettiğini saptamışlardır. OCCA besiyerinin, CHROMagar gibi *Candida* gelişmesinde etkili olduğunu sonuçların yorumlanmasının kolay olduğunu vurgulamışlardır (Baixench ve ark. 2006).

Ghelardi ve arkadaşlarının (2008), Chromogenic Candida Agar (CCA-Oxoid)'da kan kültürlerinden soyutlanan patojenik maya türlerinin primer kültürlerdeki farklılığını karşılaştırmışlardır. Bunun için, kan kültürleri hem SDA' ya hem de CCA' ya ekim yapılmıştır. SDA' dan izole edilip CCA' ya aktarılan ve direk CCA' ya ekilen örneklerin identifikasyonunda farklılık olmadığını ve CCA' nın primer kültür besiyeri olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. CCA'nın *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *T. mucoides* ve *G. capitatum* türlerinin identifikasyonu için duyarlılık ve özgüllüğünün %99,4 olmasına rağmen; kandidozda yaygın olarak etken olan *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* türlerinin ayrımını yapamadığını belirtmişlerdir.

CHROMagar Candida ve OCCA besiyerinin karşılaştırıldığı bir çalışma da; OCCA' nın *C. albicans* ve birden fazla türün bulunduğu popülasyonların ayrımında daha etkili ve güvenilir olduğu; CHROMagar' ın ise *C. krusei* ve *C. tropicalis* identifikasyonunda daha iyi olduğu vurgulanmışlardır (Özcan ve ark. 2010).

Araştırmamızda CHROM agar Candida besiyerinde izolatların 49' u *C. albicans*, 45' i *C. glabrata*, 4' ü *C. krusei*, 1' i *C. dubliniensis* olarak tanımlanmıştır. Bir izolat (Y-75) ise koloni morfolojisine göre isimlendirilememiştir. Çalışmamızda kullanılan

CHROMagar' da koloni rengine göre *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. dubliniensis* türleri kolaylıkla tanımlanmıştır. Kullanılan standart suşların koloni morfolojisi ve renklerine göre *C. glabrata* izolatlarının da identifikasyonu yapılmıştır. Ancak *C. lusitaniae*, *C. kefir* ve *Rhodotorula* sp. olarak isimlendirilen izolatlar CHROMagar' da identifiye edilememiştir. Çalışmamızda elde edilen verilerin, daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarıyla oldukça uyumlu olduğu ve literatürde de belirtildiği gibi CHROMagar' ın referans besiyeri olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda Brillance Candida Agar (OCCA)' da koloni renk ve morfolojilerine göre; 51 izolat *C. albicans*, 43 izolat *C. glabrata*, *C. kefir*, *C. parapsilosis* veya *C. lusitaniae*, 4 izolat *C. krusei* ve 1 izolat *C. dubliniensis* olarak tanımlanmış, bir izolatın ise renk farklılığından dolayı koloni morfolojisine göre tanımlaması yapılamamıştır. Brillance Candida Agar (OCCA) ile yapılan identifikasyonda bazı türlerin koloni rengine göre ayrımı yapılamamıştır. Bu besiyerinde spesifik koloni rengi göstermeyen 43 izolat için diğer besiyerlerine bakılarak isimlendirilmeye gidilmiştir. Ayrıca iki *C. glabrata* Brillance Candida Agar' da *C. albicans* olarak yanlış tanımlanmış, bir *Rhodotorula* sp. izolatı ise koloni rengine göre identifiye edilememiştir. Sonuçlarımız; Baixench ve ark. 2006; Ghelardi ve ark. 2008; Özcan ve ark. 2010 yaptıkları çalışmalarla karşılaştırıldığında *C. albicans*, *C. dubliniensis* ve *C. krusei*' nin doğru şekilde identifikasyonunun yapılabildiğini; *C. glabrata* için farklı besiyerlerinin de kullanılması gerektiğini göstermiştir.

Günümüzde mikoloji laboratuvarlarında standart identifikasyon yöntemlerinin yerine, asimilasyon esasına dayanan, 4-72 saat gibi kısa sürelerde sonuç veren ve daha kolay uygulanabilen maya identifikasyon kitleri tercih edilmektedir. Bu kitler hem sık bulunan hem de az rastlanan türlerin identifikasyonunda kullanılmaktadır. API Yeast Identification System (Analytab product), Uni Yeast Tek (Flow laboratories), Abott Yeast Identification System (Abott Diagnostic), ATB ID 32C (Biomerieux-Fransa), API 20C AUX (Biomerieux-Fransa), API ID 32C (Biomerieux-Fransa), Auxacolor (Biorad-Fransa), API Candida (Biomerieux-Fransa), RapID Yeast Plus (Innovative Diagnostic-ABD) ve VITEK 2 ID-YST (Biomerieux-Fransa) bunlardan bazılarıdır. Bu kitlerde *Candida* türlerinin identifikasyonu asimilasyon/fermentasyon özelliklerine göre yapılmaktadır. API ID 32C, VITEK YBC ve VITEK 2 ID-YST otomatize olarak yorumlanan sistemlerdir (Pincus ve ark. 2007).

Günümüzde VITEK 2 ve diğer identifikasyon yöntemlerini karşılaştıran birçok çalışma yapılmıştır. Araştırmalarda; mayalar için doğru tanımlama oranı %84-94, yanlış identifikasyon oranı ise %0,9-2,7 arasında değişmektedir. VITEK 2 ile özellikle *C. glabrata* izolatlarının yanlış tanımlanabileceği ileri sürülmüştür (Graf ve ark. 2000; Loiez ve ark. 2006; Aubertine ve ark. 2006; Meurman ve ark. 2006; Hata ve ark. 2007).

Graf ve arkadaşları (2000), VITEK 2 ID-YST kart ve ID32C strip ile maya ve maya benzeri organizmaların tanımlanmasında, VITEK 2 sisteminin %96,3 oranında doğru identifikasyon gerçekleştirdiğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca *C. guilliermondii* ve *C. lusitaniae* türlerini tanımlamada problemli olduğunu, mevcut veri tabanı ile *C. inconspicua* ve *C. norvegensis*' i ayıramadığını belirtmişlerdir.

Başka bir çalışmada, VITEK 2 YST ve ID-YST kart, CHROMagar ve API 20C testleri *Candida* türlerinin identifikasyonunda karşılaştırılmıştır. CHROMagar' da gelişen izolatlardan Vitek 2 ID-YST kartla yapılan identifikasyonda doğruluk oranının (%99) daha yüksek olduğunu saptamışlardır. *C. glabrata* türünü *C. sphaerica* olarak yanlış isimlendirdiğini ve çok nadir izole edilen türlerin identifikasyonun doğrulanması gerektiğini vurgulamışlardır (Aubertine ve ark. 2006).

Meurman ve ark. 2006 yılında yaptıkları çalışmada başka testler yaparak da doğruladıkları izolatlarda; VITEK 2' nin doğru olarak tanımlama oranının %94 olduğu; *C. guilliermondii* suşunu *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides* suşunu *C. famata*/ *C. valida*, bir *Trichosporon* spp.' yi *Cryptococcus humicolus* olarak toplam üç suşu yanlış tanımladığını (%1,8) ileri sürmüşlerdir.

VITEK 2 sistemle yapılan başka bir çalışma da; YST kartın *C. glabrata* izolatlarını %86,6, *C. albicans* izolatlarını %100 ve diğer *Candida* spp.' lerin %88,2 oranında doğru identifikasyonunu yaptığını saptamışlardır. Çalışmanın sonucunda; *Candida* türlerinin VITEK 2 YST kart ile %91,1 doğrulukta tanımlandığını belirtmişlerdir (Vijgen ve ark. 2011).

CHROMagar ve VITEK 2' nin karşılaştırıldığı bir çalışmada; patojen mayaların teşhis için erken tanımlanması gerektiği, CHROMagarın mayaların hızlı olarak taranmasında kullanılabileceği ama identifikasyonun zaman alıcı (en az 48 saat) olduğunu bildirmişlerdir. VITEK 2' nin tanımlamada hızlı olduğunu ancak

konvansiyonel metodlarla birlikte çalışılması gerektiğini belirtmişlerdir (Mathur ve ark. 2014).

İzolatlarımızın hızlı identifikasyon testlerinden olan VITEK 2 ID-YST kart kullanılarak yapılan tanımlamalarında; 49' u *C. albicans*, 36' sı *C. glabrata*, 5' i *C. kefyr*, 4' ü *C. krusei*, 3'ü *C. sphaerica*, 1' i *C. dubliniensis*, 1'i *C. lusitaniae* ve 1 izolat ise *Rhodotorula glutis/mucilaginosus* (*Cryptococcus laurentii*) olarak isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda germ tüp oluşturma özelliği, hif, blastospor, klamidospore yapımı, kromojenik besiyerleri ve VITEK 2 ID-YST kart ile kullanılarak yapılan tanımlamalarda yöntemlere bağlı olarak bazı izolatların identifikasyonlarında farklılıklar görülmüştür. Kromojenik besiyerlerinde tanımlama koloni rengine bağlı olduğundan bazı türlerin identifikasyonu yapılamamaktadır. Mısır unlu-tween 80 agar ile VITEK 2 tanımlaması (%97) genellikle uyumludur. Besiyerleri ile *C. glabrata* olarak tanımlanan üç izolat VITEK 2 ID-YST kart ile *C. sphaerica* olarak tanımlanmıştır. Yapılan diğer çalışmalarla benzer olarak izolatlarımızın VITEK 2 ile yanlış tanımlanabileceği ve bu oranın %3 olduğu saptanmıştır.

Günümüzde mayaların identifikasyonu için geleneksel yöntemlerin kullanılmasının yanısıra bunların eksikliklerine yönelik metodların geliştirilmesi için araştırmalar yapılmaktadır. Türlerin ayrımının yapılması için yağ asidi kompozisyonlarının kullanımı üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur (Kock ve ark. 1985; Viljoen ve ark. 1986). Yapılan çalışmalarda hücrenin gaz kromatografisiyle çıkarılan FAME profillerinin, klinik ve endüstri alanlarında önemli maya türlerinin identifikasyonu için hızlı ve güvenilir olduğu kanıtlanmıştır (Botha ve Koch 1993; Peltroche-Llacsahuanga ve ark. 2000).

FAME analizinde kullanılan MIS (Microbial Identification System) programı; yağ asitlerini, mikroorganizmaların yağ asidi metil esterlerini nicelendirme ve identifikasyonunu analiz edebilmektedir. Kütüphanesinde bulunan veritabanıyla yağ asidi kompozisyonları ve iyi karakterize edilmiş suşların FAME profillerini karşılaştırıp araştırmaktadır. Diğer identifikasyon metodlarıyla fiyat ve zaman açısından karşılaştırıldığında FAME analizinin daha kullanışlı olduğu ileri sürülmektedir (Peltroche-Llacsahuanga ve ark. 2000).

Augustyn ve arkadaşlarının (1992) 16 standart maya türü ve 58 strainin yağ asidi analizi sonuçlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, *Kluyveromyces* spp. ve *Torulaspora* spp. suşlarının hepsinde C17: 1 (8) yağ asidi saptanmıştır. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* (n:5) suşlarında yüksek oranlarda saptanan yağ asitleri ortalamaları; C18:1 %41.88, C16:1 %18.65, C18:2 %16,42 ve C16:0' ın ise %15,31 olarak belirlenmiştir.

Menyavi ve arkadaşları (2000) çeşitli klinik örneklerden izole edilen konvansiyonel yöntemler, CHROMagar ve API ID 32C ile tanımlanan 1024 maya izolatında, yağ asitleri karakterizasyonuna dayalı türe spesifik tanımlama yapmaya çalışmışlardır. Tüm izolatlarda C16:0 (hekzadekanoik asit) yağ asidinin belirlendiğini ve ortalamasının %14,45 olduğunu saptamışlardır. *C. albicans* (n:525) olarak tanımlanan izolatlarda C16:0' ın %15.37 (11,26-19,48), C16:1' in %13.43 (11,20-15,66), C18:1'in %34.74 (29,95-39,53), C18:2' nin %26,58 (23,13-30,03) ve C18:0' ın %3,31 (2,45-4,17) oranında olduğunu belirlemişlerdir. *C. glabrata* izolatlarında (n:107); sırasıyla %8,99 (7,41-10,57), %50,45 (45,58-55,33), %30,1 (27,05-32,97), C18:2' nin tespit edilemediği ve C18:0' ın %4,69 (3,74-5,98) olarak saptamışlardır. *C. krusei* suşlarında (n:95) ise; sırasıyla %15,52 (13,40-17,67), %4,29 (3,14-5,55), %54,46 (51,34-57,58), %18,39 (15,40-21,38) ve %1,26 (0,88-1,64) oranında tespit edilmiştir. *C. lusitaniae* izolatında (n:24); %16,31 (15,58-17,61), %6,87 (4,88-7,73), %40,45 (38,35-42,41), %32,95 (30,41-35,91) ve %1,87 (1,24-2,35) oranında belirlenmiştir. *C. kefir* (*C. pseudotropicalis*) (n:28) izolatlarında; yağ asitleri sırasıyla %17,49 (14,36-20,62), %12,77 (10,60-14,94), %34,67 (30,69-38,65), %28,83 (24,70-32,96) ve C18:0 yağ asidini ise %1,94 (1,60-2,28) olarak bulunmuştur. Tetradekanoik asit (C14:1), pentadekanoik asit (C15:1), heptadekanoik asit (C17:0), 2-hidroksi-hekza-dekanoik asit (2-OH C16:0) ve 2-hidroksi-oktadekanoik asit (2-OH C18:0); tüm izolatlarda belirlenemeyip çok az miktarda bulunan yağ asitleri olarak tespit edilmiştir. Ayrıca C12:0 ve C14:0 yağ asitlerinin *C. albicans* ve *C. kefir* türlerinin ayırımında oldukça önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Klinik örneklerden izole edilen *C. glabrata* ve *Saccharomyces cerevisiae* türlerinin ayırımında MIS kullanılarak FAME analizi yapılan bir çalışmada; özellikle trehaloz negatif *C. glabrata* suşlarının tanımlanmasının zor olduğu ileri sürülmüştür. Bu türler filogenetik olarak oldukça yakın olduğundan FAME profillerinin de benzer

olduğu ve MIS ile yanlış tanımlanabildiği bildirilmiştir. Ancak MIS identifikasyonunda hücre kütlesinin önemli olduğu, *C. glabrata* izolatları için 30-45 mg ve *S. cerevisiae* için 90 mg alınarak yapılan analiz sonucunda identifikasyonun daha başarılı olduğu saptanmıştır (Peltroche-Llacsahuanga ve ark. 2000).

Tarr (2004)' ın topraktan izole ettikleri mayaların sınıflandırılmasında kullandığı yağ asitleri analizinde; *Issatchenkia orientalis* (*C. krusei*) ve *Kluyveromyces lactis* izolatlarının yağ asiti dağılımının benzer olduğunu, en yüksek miktarda 18:1 yağ asitinin elde edildiğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca *I. orientalis* linolenik asit (18:3)' in %14,6 oranında saptandığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda; klinik örneklerden soyutlanan 99 izolattın, MIS'in içerdiği YEAST28 veri tabanına göre yağ asitleri analizleri yapılmıştır. FAME sonuçlarına göre; Y-3 hariç tüm izolatlarda, 16:1 *Cis* 9 (w 7) ve 16:00 yağ asitleri saptanmıştır. İzolatların C16:0 yağ asidi ortalaması %11,7, 16:1 *Cis* 9 (w7)' un ise %25,82 olarak belirlenmiş ve diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür.

Tüm izolatlarda en sık rastlanan diğer yağ asitleri sırasıyla; Sum In Feature 8, 18:00, 14:00, 18:2 *Cis* 9,12/18:0a, 14:0 Aldehyde, Sum In Feature 5 ve 17:1 *Cis* 9 (w 8)' dir. İzolatlarda tanımlanan ve az rastlanan diğer yağ asitleri, 20:5 *Cis* (w3), Sum In Feature 11, 19:1 TRANS 7 (w 9), 16:0 ISO, Sum In Feature 9, 18:0 2OH, 11:0 ISO 3OH, 17:0 ISO, C20 N Alcohol, Sum In Feature 13, Sum In Feature 1, 15:0 3OH, 20:00, 12:00, 20:1 *Cis* w9 Alcohol, Sum In Feature 7, Unknown 19.521, Sum In Feature 12, 19:0 CYCLO C11-12, 17:0 ANTEISO, Sum In Feature 10, 18:0 12OH, 15:0 ISO, 15:00, 18:1 (w 11), 16:0 2OH, Sum In Feature 13, 14:1 at 7 Position, 18:1 (w ?) Alcohol,16:0 2OH, Unknown 18.197, 14:0 ISO, 10:00, 14:1 at 9 Position ve 13:0 ISO 3OH' dir.

C. albicans olarak tanımlanan izolatlarımız da; C16:0 yağ asidinin ortalaması %15,15 (3,01-27,32), 16:1 *Cis* 9 (w7)' nin %9,63 (1,05-15,62), C18:0' in %5,41 (0,97-8,78), 18:1 *Cis* 9 (w9) (Sum In Feature 8)' un %27,50 (5,77-40,38), 18:2 *Cis* 9,12/18:0a' ın %33,91 (6,88-44,99) olarak belirlenmiştir. *C. glabrata*' nın ise sırasıyla ortalama %6,71 (2,21-20,85), %49,48 (11,63-64,32), %5,25 (2,6-7,65), %26,78 (17,86-40,27), 18:2 *Cis* 9,12/18:0a yağ asidi ise sadece üç suşta belirlenmiş ve %27,41 (24,24-29,83) oranında saptanmıştır. Y-3 dışında diğer dört *C. kefir* izolatında; C16:0 ortalama

%17,34 (16-18,5), 16:1 *Cis* 9 (w7) %15,45 (13,52-16,43), C18:0 %3,40 (1,89-5,19), 18:1 *Cis* 9 (w9) %28,68 (24,49-30,67) ve 18:2 CİS 9,12/18:0 a ise %25,34 (20,55-28,47) olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda dört *C. krusei* izolatında 18:1 *Cis* 9 yağ asitinin diğer yağ asitlerinden farklı olarak daha yüksek oranda ve ortalamasının %44,31 (22,16-55,07) olduğu; C16:0 yağ asidi %11,43 (10,39-12,58), 16:1 *Cis*9 (w7) %7,09 (5,28-9,41), 18:0' ın %3,06 (2,43-3,73), 18:2 *Cis* 9,12/18:0 a ise %19,67 (16,48-24,9) oranında belirlenmiştir. Bulgularımızın diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda izolatların içerdikleri yağ asitleri oranlarına göre akrabalık ilişkileri cluster analizi ile belirlenmiştir. Oluşan dendrograma göre (Şekil 3.10), izolatlar arasındaki Euclidian mesafesi 10 ve daha altında olan izolatların aynı türe ait olabileceği, Euclidian mesafesi 6 ve daha altında olan izolatların tipik olarak aynı alttür veya biyotip; 2,5 ve daha altında olan izolatların ise aynı strain olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (MIDI 2002). Dendrograma karşılaştırma için standart suşlarında FAME profilleri eklenmiştir. Buna göre, aynı gruplar içerisindeki bazı izolatlar arasındaki mesafe 10 ve daha altında olduğu için bu izolatların aynı türe ait olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Yapılan diğer identifikasyon yöntemlerinde aynı tür olarak isimlendirilen bazı izolatlar farklı Euclidian mesafesine sahiptir. FAME profillerine göre; diğer yöntemlerle *C. albicans* olarak tanımlanan; Y-6, Y-28, Y-23 ve Y-62 izolatları oldukça dendrograma oldukça farklı mesafelerde bağlanmıştır. Ayrıca aynı grupta bulunan *C. albicans* suşlarına göre Y-48, Y-90, Y-95 ve Y-96 izolatları da farklılık göstermektedir. Diğer yöntemlerle *C. glabrata* olarak tanımlanan türlerin çoğu yakın Euclidian mesafesinde (10 ve altı) dendrograma bağlanmıştır. Ancak bazı izolatlar Y-18, Y-56 ve Y-34' ün dendrograma oldukça uzak mesafede bağlı olduğu görülmektedir. Y-3 izolatı diğer *C. kefyr* ve tüm izolatlardan oldukça uzak mesafede en dışta dendrograma bağlanmıştır.

Son zamanlarda mantarların identifikasyonunda moleküler yöntemlerin kullanımı artış göstermektedir. Bu yöntemlerin esas amacı, patojen mantarların klinik örnekte kültürü yapılmadan önce kısa sürede saptanması veya klasik yöntemler ile kültürde üretilmiş olan mantarın hızlı tanımlanmasıdır. Cins düzeyinde tanımlama birçok küf mantarı için yeterli olabilmektedir. Ancak antifungal ilaçlara dirençli olan bazı mantarlar için tür düzeyinde tanımlama gerekmektedir. Bu nedenle *Candida*

türlerinin doğru ve hızlı identifikasyonu, uygun antifungal tedaviye erken dönemde başlanması açısından önem taşımaktadır (Sullivan ve Coleman 2002).

Moleküler tanı yöntemleri; *Candida*' ların cins ve tür düzeyinde tanımlanmasında, virulans faktörlerinin genotipik olarak saptanmasında, epidemiyolojik tiplendirmelerde, genom baz dizilerinin ortaya çıkarılmasında, mutasyonların belirlenmesinde ve filogenetik analizleri için kullanılmaktadır (Saraçlı 2002). Bu sebeple; genomik DNA'nın restriksiyon enzim analizi (REA), southern hibridizasyon analizi, pulsed field jel elektroforezi, polimeraz zincir reaksiyonu gibi DNA bazlı ve immunoblot finger printing, hücresel proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi, multilokus enzim elektroforezi gibi protein bazlı yöntemler geliştirilmiştir.

Tanısal PCR' da çoğaltım (amplifikasyon) için uygun hedef dizisinin belirlenmesi gerekmektedir. Özgüllük; farklı cinsler veya türlerin DNA dizileri ile hedef dizi arasındaki homolojinin derecesi ile belirlenmektedir. Örneğin, enfeksiyonun bakteriyel veya mantar nedenli olup olmadığını anlamak için tüm mantarlarda evrensel olarak bulunan yüksek oranda korunmuş bir gen bölgesi uygun hedef dizi olacaktır. Cins veya tür düzeyinde tanı fungal DNA identifikasyonu için çeşitli PCR çoğaltım ürünü saptama metodu kullanılmaktadır (Hugnes ve ark. 1998).

PCR için farklı birkaç dizi olmasına rağmen, rRNA genleri tüm DNA' ları çoğaltabilen yüksek oranda korunmuş bölgeler içerdikleri için en uygun hedef bölgeleridir. Diğer bir avantajı ise rRNA genlerinin PCR' ın hassasiyetini arttıran yüksek kopya sayısının olmasıdır (Hugnes ve ark. 1998). *C. albicans*' da bu genin 50-100 kopyası bulunmaktadır. Bu nedenle PCR yöntemi tek kopyalı genlere göre çok kopyalı genlerin kullanımı için daha hassastır. Tek kopyalı genler türe spesifik olabilmektedir (Loeffler ve ark. 2000).

İnfeksiyon etkeni olan mantarların tür düzeyinde tanımlanmasında en yaygın kullanılan DNA bölgeleri; küçük (SSU-18S) ve büyük ribozomal alt üniteleri (LSU-26S) arasında yer alan türe özgül internal transcribed spacer (ITS) ve büyük ribozomal alt ünitesinin D1/D2 bölgeleridir. Bu bölgeler tür düzeyinde farklılıklar gösteren yeterli zincir heterojenitesi içermesinden dolayı, mantarların tür düzeyinde tanımlamasında ve olası mutasyonel değişikliklerin saptanması için oldukça uygundur (Susever ve Yeğenoğlu 2011).

PCR temelli birçok identifikasyon yöntemi mevcuttur. Bunlardan Restriksiyon Enzim Analizi (REA), rDNA amplifikasyon ürünlerinin elde edilmesini gerektiren yöntemlerden birisidir. REA; *Candida* türlerinin genotiplerinin araştırılması amacıyla ilk kullanılan yöntem olup, *Candida* infeksiyonlarının moleküler epidemiyolojik çalışmaları için yaygın olarak kullanılmaktadır (Hazen ve Howell 2009).

Williams ve arkadaşları (1995) tarafından yapılan, intergenic spacer regions (ITS) bölgelerinin çoğaltılmasına yönelik olarak ITS1 ve ITS4 primerlerinin kullanıldığı bir çalışmada; *C. albicans*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. kefir*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata*’ yı içeren sekiz *Candida* türünün tanımlanması amacıyla suşlara PCR ve REA uygulanmıştır. *Hae* III, *Bfa* I ve *Dde* I restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı çalışmada, türlerin ayrımında *Bfa* I enzimi ile en iyi sonuçların elde edildiği ileri sürülmüştür. *C. glabrata*, *C. kefir* ve *C. guilliermondii* türlerinin hızlı tanımlanması için çoğaltılan PCR ürünlerinin elektroforezi yeterliyken, diğer beş türün tanımlanması için, izolatların özellikle *Dde* I ve *Bfa* I enzimleriyle kesiminin yapılması gerektiği belirtilmiştir (Williams ve ark. 1995).

Baek ve arkadaşları (1998) onikomikoz etkeni olan mantarlarla yaptığı çalışmalarında; 18S-rRNA geni amplifiye edilmiş ve *Hae* III enzimi ile kesim yapılmıştır. Sonuçlara göre; dermatofitler, küfler ve mayaların ayrımında bu enzimin kullanılabileceğini vurgulamışlardır (Baek ve ark. 1998).

Restriksiyon enzimleriyle yapılan diğer bir çalışmada, 137 klinik *Candida* izolatının ITS1-5.8 rDNA-ITS2 bölgeleri çoğaltılarak; *Msp* I enzimi ile kesilmiştir. Kesim sonucunda *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata* türleri gibi klinik örneklerden sıklıkla soyutlanan altı adet *Candida* türü tanımlanabilmiş, ancak *C. albicans* ve *C. dubliniensis* için ayırım sağlayacak bant paternleri elde edilememiştir (Mirhendi ve ark. 2006).

Fujita ve Hashimoto’ nun yaptığı bir çalışmada (2000), *Candida* türleri arasındaki farklılığı *Hinf* I enzimiyle kesim yaparak ortaya koymuşlardır. 337 maya izolatın; 111’ i *C. albicans*, 4’ ü *C. krusei*, 35 tanesi *C. glabrata*, 11’ i *C. dubliniensis*, 48 tanesi *C. tropicalis*, 41’ i *C. guilliermondii* ve 49’ u *C. parapsilosis* olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçlara göre *Hinf* I enzimin maya türlerini ayırt etmede kullanılabileceği önerilmektedir (Fujita ve Hashimoto 2000).

Başka bir çalışmada, fungemiye neden olan 60 etkenin (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* ve *Histoplasma capsulatum*) REA ile identifikasyonları değerlendirilmiştir. İzolatlar ITS1/ ITS4, NL4/ ITS5 ve primer1/ primer3 (Trost ve ark. tarafından tasarlanan) öncülleriyle amplifiye edilerek; *Hae* III, *Dde* I ve *Bfa* I enzimleriyle kesim yapılmıştır. Çalışmalarında, bu enzimlerle kesim sonucu çok sayıda izolatın başarılı bir şekilde tanımlanabildiğini ileri sürmüşlerdir (Santos ve ark. 2010)

Ülkemizde; Yiş' in yaptığı bir çalışmada (2007), çeşitli *Candida* türlerinin ITS1-5.8S-ITS2 bölgeleri amplifiye edildikten sonra *Mwo* I ve *Bsl* I enzimleri kullanılarak REA uygulamışlardır. Çalışmaları sonucunda bu enzimlerin *Candida* türleri arasında bazı farklılıkları ortaya koyabildiğini ileri sürmüşlerdir.

EL-Mashad ve arkadaşları (2013) onikomikoz etkeni olan *Candida*' ların karakterizasyonunda *Hae* III, *Dde* I ve *Bfa* I enzimleri ile ITS1 ve ITS2 bölgesinde yaptığı restriksiyon enzim analizinde; *Hae* III enziminin *C. albicans* ve *Non- C. albicans* türlerinin ayırımında en iyi farklılığı gösterdiğini öne sürmüşlerdir. Ayrıca *Bfa* I enziminin *Non- C. albicans* türlerinin ayırımını sağlayabildiğini ve *Dde* I ile kesim yapılarak *C. albicans* identifikasyonlarının doğrulandığı belirtilmiştir.

Elena ve ark. (2015) *C. albicans* ve *C. krusei* türleri olmak üzere toplam 8 izolatın REA ile bant profillerini belirlemeye çalışmışlardır. ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi *Dde* I enzim kesimi ile *C. albicans*' ların, *Cfo* I enzimiyle ise *C. krusei* türlerinin oldukça iyi tanımlanabildiğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda; toplam 99 izolatın PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilerek oluşan farklı profiller belirlenip gruplandırılmıştır. İzolatların restriksiyon enzim kesimlerine göre bant patternleri; ITS bölgesi için *Hinf* I enzimi 4, *Hae* III enzimi 8, *Dde* I enzimi 5 ve *Bfa* I enzimi ile 7 profil elde edilmiştir. D1/D2 bölgesi enzim kesimlerine göre; *Hinf* I enzimi 10, *Hae* III enzimi 8, *Dde* I enzimi 6 ve *Bfa* I enzimi ile 9 profil belirlenmiştir.

ITS bölgesi *Hinf* I enzim kesimi bant paternlerine bakıldığında; *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* izolatlarının ayrı profillerde gruplandığı ve türler arası ayırım yapılabildiği görülmüştür. *Hae* III ve *Dde* I enzim kesimleri sonucunda; *C. albicans* ve

C. glabrata türlerinin ayırt edilebildiği saptanmıştır. Ayrıca *Bfa* I REA ile *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* ve *C. kefyr* izolatlarının oldukça iyi tanımlanabileceği gözlemlenmiştir. D1/D2 bölgesi REA analizinde; *Hinf* I enzimi oldukça farklı paternler oluşturmuş; ancak sadece *C. krusei* izolatları tanımlanabilmiş ve ayrıca diğer izolatlar arasında farklı varyeteler olması nedeniyle farklı kesim paternleri elde edilmiştir. *Hae* III kesimi ile *C. albicans* ve *C. glabrata*' ların profillere göre tanımlanabileceği ve *C. albicans* varyetelerinin belirlenebileceği görülmüştür. *Dde* I enziminde *C. kefyr* izolatları aynı profilde belirlenmiştir. *Bfa* I REA sonucu 9 profil tespit edilmiş, *C. albicans* ve *C. glabrata* izolatlarının her ikisinde farklı iki profil oluşturmuştur. Çalışmamızda ITS ve D1/D2 bölgesi kesimleri sonucunda belirlenen bant paternlerinde, bazı izolatların PCR bant büyüklüğünden daha farklı olması (≈ 1.650 bp) genomik DNA' nın kontaminasyonundan kaynaklandığını düşündürmektedir. Ayrıca farklı bantlar gözardı edildiğinde, belirlenen profil gruplandırmasını değişmemektedir. Literatürlere bakıldığında, çalışmamızda yapılan restriksiyon enzim analizleri sonuçlarının uyumlu olduğu görülmüştür. REA sonrası elde edilen verilerle birlikte; farklı bant profillerine göre 99 izolatın, 18' i dizi analizi yapılmak üzere ayrılmıştır.

PCR temelli identifikasyon yöntemlerinden biri olan DNA dizi analizi, mantarlar için alternatif bir tanımlama yöntemidir. Gen dizi bilgileri; kan, doku gibi örneklerde etken mantarların gösterilmesi veya kültürde üremiş mantarların tanımlanması amacıyla kullanımı gittikçe önem kazanmaktadır. Ayrıca dizi verilerinin bilinmesi günümüzde invitro tanı yöntemlerinin geliştirilmesi için oldukça gereklidir. Dizi analizi verileri ile mantarların tanımlanması ve diğer mantarlarla olan filogenetik ilişkisi belirlenebilmektedir. Bu yöntem ile mayaların identifikasyonu için geçen süre 24-36 saattir (McGinnis 2006).

Son on yılda maya veritabanında bulunan verilerin iki kat artış gösterdiği ileri sürülmektedir (Kurtzman ve ark. 2011). Günümüzde; DNA dizi verilerinin oldukça artmasına rağmen 740.000 - 6 milyon fungal türden yalnızca 100.000' nin tanımlandığı tahmin edilmekte, ayrıca tanımlanan fungal türlerin %50' sinin DNA dizi bilgilerinin veritabanlarında bulunmadığı düşünülmektedir (Xu 2016). Özellikle, *Saccharomycetaceae* ve *Basidiomycota* aileleri için ITS ve D1/D2 bölgesi sekans verileri belirlenmeye çalışılmaktadır. D1/D2 ve ITS sekansları genellikle benzer ayırım gücü göstermekle birlikte, bazı taksonlara spesifik varyasyonlar görülmekte ve her iki

sekansın kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir. *Ascomycetes* ve *Basidiomycetes*’ lerde bulunan bir türün strainlerinde ITS ve D1/D2 sekanslarında %1’ den daha az farklılık olduğu tahmin edilmektedir (Kurtzman ve Robnett 1998; Fell ve ark. 2000; Scorzetti ve ark. 2002; Sugita ve ark. 2002; Kurtzman 2014).

Dizi analizlerinde ITS bölgesinin kullanımı; morfolojik açıdan farklı olan türler arasında değişken olabilmesinden dolayı da tür düzeyinde identifikasyonu kolaylaştırmaktadır (Abacı ve Haliki 2005). Son zamanlarda Yaşam Barkot Konsorsiyumu (Consortium for the Barcode of Life) tarafından ITS bölgesi sekansının bir primer mantar barkot markırı olduğu öne sürülmüştür (Schoch ve ark. 2012). Mayaların tanımlanmasında D1/D2 bölgesinin sekansının kullanımı gittikçe artmaktadır ve Frutos ve arkadaşları bu bölgenin maya taksonomisinde evrensel kabul edileceğini ileri sürmektedir (Scorzetti ve ark. 2002; Frutos ve ark. 2004). Yapılan çalışmalarda; D1/D2 sekanslarıyla oluşturulan geniş kapsamlı veritabanıyla, daha kolay, pratik ve güvenilir identifikasyonun yapılabileceği belirtilmiştir (Kurtzman 2001; Abliz ve ark. 2004). Ayrıca D1/D2 ve ITS veritabanlarının hızlı tanımlamada ve soyları bilinmeyen türlerin saptanması için güçlü bir araç olabileceği belirtilmiştir (Kurtzman 2014).

Dizi analizi sonuçlarına dayalı filogenetik analizler, hangi özelliklerin mantarlardan geldiğini anlamamıza yardımcı olmaktadır. Bu özellikler mantarı tanımamızı ve filogenetik ilişkiyi yansıtan sınıflama şemasını oluşturmamızı sağlayabilmektedir. Mantarların filogenetik ilişkileri tıbbi mikolojinin önemli uygulama alanları için yarar sağlamaktadır. Filogeni; daha önce karşılaşılmayan veya nadiren patojen olarak karşımıza çıkan mantarlara bağlı gelişen fırsatçı mikozların tedavisi için antifungal seçiminde oldukça önemlidir. McGinnis ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada filogeni ile antifungal ilaçlara duyarlılık arasında yakın bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir (McGinnis ve ark. 1998; McGinnis ve ark. 2006). Dizi analiziyle ilgili çalışmalar sürmektedir.

Leaw ve arkadaşları (2005) yapmış oldukları çalışmada; 299 referans izolat, 74 klinik izolat olmak üzere toplam 373 (86 tür) maya izolatını API ID32 sistem ve dizi analizi ile tanımlamışlardır. İzolatların ITS1 ve ITS2 bölgelerini; ayrıca bazı türlerin doğrulanması için D1/D2 bölgesini sekanslamışlardır. Referans izolatların ITS1 ve ITS2 bölgesinin doğru tanımlama oranını sırasıyla %97 ve %99,7; klinik izolatlar da ise

%95,9 ve %100 olarak saptamışlardır. Özellikle ITS2 bölgesinin patojen mayaların tanımlanmasında güvenilir bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır.

Linton ve arkadaşları (2007), 2004-2006 yılları arasında klinik örneklerden soyutlanan 3.033 maya izolatını germ tüp testi, AUXACOLOR2 sistem ve API 20C kiti ile tanımlamaya çalışmışlardır. Konvansiyonel metotlarla tanımlanamayan 153 izolat için LSU D1/D2 bölgesini sekans analizi yaparak tanımlamışlardır. Çalışmalarında, klinik olarak önemli maya türlerinin isimlendirilmesinde D1/D2 bölgesinin oldukça güvenilir olduğunu öne sürmüşlerdir.

Yapılan diğer bir çalışmada; 750 klinik izolat konvansiyonel yöntemler, VITEK 2 ve RapID Yeast Plus sistem ile tanımlanmış, ayrıca izolatların ITS bölgesi sekanslanarak referans yöntem olarak kullanılmıştır. VITEK 2 ile 737 (%98,2) izolatın, Rap ID Yeast Plus sistemin ise 716 (%95,5) izolatı doğru tanımladığını saptamışlardır. Tanımlanamayan veya yanlış tanımlanan 24 izolatı dizi analizi yöntemiyle; 14' ü *C. dubliniensis*, 2' si *C. albicans*, 2'si *C. krusei* ve diğerleri *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica*, *C. parapsilosis*, *S. cerevisiae*, *Geotrichum klebahnii* olarak tanımlamışlardır (Sanguinetti ve ark 2007).

Garner ve arkadaşları (2010); hayvan patojeni *Candida*' ların (n:109) identifikasyonunda substrat asimilasyonu, yağ asidi profil analizi, D1/D2 ve ITS2 bölgelerinin sekans analizlerinin sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Sonuçlarına göre; asimilasyon testleriyle izolatların %54' ünün, FAME ile %47' sinin ve sekans analiziyle %87' sinin tür düzeyinde tanımlandığını belirtmişlerdir. Ayrıca FAME analiziyle identifikasyonun diğer yöntemlere göre ucuz olduğunu ve asimilasyon testlerinden daha az zaman gerektirdiğini vurgulamışlardır. Sekanslamanın ise en güvenilir metod olduğunu; gerekli uygun ekipmanların maliyetinin yüksek olmasının yanı sıra, D1/D2 bölgesinin hayvan patojeni mayaların tanımlanmasında iyi bir metod olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Taverna ve ark. 2013 yılında yapmış oldukları bir çalışmada; 18 referans suş, fenotipik olarak tanımlanmış 69 izolat ve kesin olarak tanımlanamayan 20 izolatın ITS ve D1/D2 bölgeleri sekanslanarak tanımlamaya çalışmışlardır. Tüm izolatların %88' i (94/107) ITS bölgesi, %12' si (13/107) ise D1/D2 bölgesi ile tanımlanmıştır. Fenotipik

olarak isimlendirilen izolatların %10' unun (7/69) yanlış identifiye edildiğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında, fenotipik olarak tanımlanamayan izolatların hepsi hedef gen bölgeleri dizilenerek identifikasyonları gerçekleştirilmiştir. ITS bölgesi verileriyle oluşturulan filogenetik ağaca *C. glabrata* ve *C. kefyr* suşlarının %59 bootstrap değeriyle bağlandığını ve bu kümeye Grup A (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis*)' nın ise %86 bootstrap değeriyle bağlandığını belirtmişlerdir. Ayrıca, izolatların ITS sekansları kullanılarak genetik yakınlıkları değerlendirilmiş, ancak tek gen bölgesinin filogenetik analizde yeterli bilgi sağlayamadığını vurgulamışlardır.

Yapılan başka bir çalışmada; son zamanlarda nadir olarak kandidoza neden olan, geleneksel identifikasyon sistemleriyle doğru tanımlanamayan *Candida famata*, *Meyerozyma guilliermondii* ve *C. auris* izolatlarının (n:55) çeşitli yöntemlerle identifikasyonlarını karşılaştırmışlardır. Çalışmalarında, 55 izolatın 38' i VITEK 2 sistemle *C. famata*; aynı izolatların ITS bölgesi sekanslanması sonucunda 20' si *C. tropicalis*, 7' si *C. albicans*, 4' ü *C. parapsilosis*, 2' si *M. guilliermondii*, 2' si *C. auris* ve diğer 3 izolat *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *Pichia fabianii* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, *C. auris* izolatları D1/D2 bölgesi sekanslanarak doğrulanmıştır. VITEK 2 ile *C. lusitaniae* olarak isimlendirilen 12 izolat ITS bölgesi dizi analizi sonuçlarına göre; 6' sı *C. lusitaniae*, 3' ü *C. tropicalis*, 2' si *C. albicans* ve 1' i *C. krusei* olarak tanımlanmıştır. *M. guilliermondii* olarak tanımlanan 5 izolat (VITEK 2); ITS bölgesi ile 2' si *M. guilliermondii*, 2' si *C. glabrata* ve 1' i *C. parapsilosis* olarak identifiye edilmiştir. Sonuç olarak daha az sıklıkta etken olabilen *Candida* türlerinin laboratuvarlarda kullanılan birçok sistemle yanlış tanımlanabileceğini vurgulamışlardır (Kim ve ark. 2016).

Çalışmamızda; seçilen 18 izolatın ITS1-5.8S-ITS2 ve rDNA' nın büyük alt ünitesinin (LSU) yüksek değişken D1/D2 bölgesine ait dizi bilgilerinin blast analizleri sonucu iki dendrogram oluşturulmuştur. Dendrogramlarda *Schizosaccharomyces pombe* dış grup olarak eklenmiş, benzerlik oranlarının belirlenmesi için her türe ait tip tür (T) kullanılmış ve 1000 tekrarlı (bootstrap) olarak karşılaştırma yapılmıştır. Dizi analizi sonucunda tanımlanan türler www.indexfungorum.org sitesinden kontrol edilerek isimlendirilmiş, telemorf ve anamorf isimleri belirtilmiştir.

Filogenetik ağaçlarda birbirleriyle yakın ilişkili olan türlerin benzer topolojiye sahip oldukları ve aynı zamanda birbirlerini doğruladıkları görülmüştür. Ayrıca aynı türlere ait izolatların aynı kümede yer aldığı ve yüksek bootstrap değerlerine (%99 veya %100) sahip oldukları belirlenmiştir. *C. glabrata* ve *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefyr*) izolatları %76 (ITS), %59 (D1/D2) bootstrap değerleriyle bağlanarak kümeler oluşturmuş, *C. albicans*' lar ise farklı dallanma yaparak %73 (ITS), %33 (D1/D2) bootstrap değerleriyle filogenetik ağaçta yer almış, farklı küme oluşturan *Issatchenkia orientalis* (*C. krusei*) izolatları ise %47 (ITS), %34 (D1/D2) bootstrap değerleriyle bağlanmıştır. Ağaçlarda aynı türlere ait izolatların küme içerisinde farklı bootstrap değerleriyle bağlanması, strainler arasında genetik farklılıklar olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızdaki verilerin literatürlerle uyumlu olduğu görülmüş ve geleneksel yöntemlerle yanlış tanımlanmış izolatlar için moleküler teknikler kullanılarak güçlü veriler elde edilmiştir.

Son zamanlarda mantarlar için barkot markırı kavramı tartışılmaktadır. Geniş mantar çeşitleri için ITS bölgesi kullanımının başarılı identifikasyon sağladığı, bununla birlikte tür içi ve türler arasındaki varyasyonlar için en net tanımlanan barkod aralığı olduğu gösterilmiştir (Schoch ve ark. 2012). Daha önce bitkiler için benimsenen iki markırlı barkotlama sistemi, özellikle *Ascomycetes*' ler için ITS ve 26S rDNA sekanslarını birleştiren barkotlama sistemi mikologlar tarafından tartışılmaktadır. Literatürlerde de belirtildiği gibi çalışmamızda; ITS gibi evrensel korunmuşluğa sahip temel gen bölgesinin yanı sıra, 26S rDNA D1/D2 bölgesinin kullanılması sonucunda birbirleriyle tutarlı verilerle birlikte, filogenetik yakınlık ilişkilerinin yansıtılmasında destekleyici veriler elde edilmiştir.

Son yıllarda, immün sistemi baskılanmış hastalarda ortaya çıkan fırsatçı mantar enfeksiyonlarındaki artış, yeni antifungal ilaçlara olan gereksinimi de arttırmıştır. Antifungal ajanlar mantar enfeksiyonlarına karşı etkili olan; topikal, oral veya parenteral yoldan uygulanabilen bileşiklerdir. Mantar hücrelerinin memeli hücrelerine benzer şekilde ökaryotik yapıda olmasından dolayı, protein, DNA ve RNA biyosentezini inhibe eden antifungal ilaçların insanlar için toksik etkileri bulunmakta, bu sebeple yeni antifungal ajanlarla ilgili çalışmalar da yavaş ilerlemektedir (Arıkan ve Rex 2009).

Günümüzde antifungallerin tedavi ve profilaksi amaçlı olarak yaygın kullanımı antifungal direnç sorununun ortaya çıkmasına ve artışına sebep olmaktadır. Antifungal direnç birçok faktöre bağlı olarak gelişebilmektedir (Yeğenoğlu 2012). Antifungal ajanlara direncin artmasıyla birlikte, birçok yeni antifungal ilaç da klinik kullanıma girmektedir. Yeni geliştirilen ilaçlar için antifungal duyarlılık testleri, in vitro etki spektrumunu belirlemek ve klinik izolatların invitro duyarlılıklarının saptanabilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu testlerin geliştirilmesi ve standardizasyonu klinik mikoloji için oldukça önemlidir. Bu amaçla, CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) tarafından standart yöntemler geliştirilmektedir (Arıkan 2002; Koç 2012).

Candida’ ların antifungal duyarlılığını belirlemek için birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlar makrodilüsyon, mikrodilüsyon, agar difüzyon, disk difüzyon, E-test yöntemi ve ticari sistemler (Fungitest, Candifast, ATB fungus, Sensititre YeastOne, VITEK 2 sistem vb.)’ dir (Ghannoum ve ark. 1996; Morace ve ark. 2002). Çalışmamızda izolatların MİK değerleri; CLSI tarafından önerilen standart mikrodilüsyon yöntemi ve VITEK 2 antifungal duyarlılık sistemi ile belirlenerek karşılaştırılmıştır.

Brezilya’da 1995-2003 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen 1000 *Candida* izolatında yapılan çalışmada; izolatların antifungal duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. İzolatların %97’ si flusitozin’e, %97,9’ u flukonazol’e, %99,7’si vorikonazol’e ve %100’ ü Amfoterisin B’ye duyarlı bulunmuştur. MİK aralıkları Amfoterisin B için 0,06- 1 µg/ml, flusitozin ve flukonazol için 0,125- 64 µg/ml, vorikonazol için 0,03- 4 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Matta ve ark. 2007).

Zepelin ve ark. Almanya’ da Temmuz 2004-Ağustos 2005 arasında klinik örneklerden soyutlanan toplam 561 maya izolatının mikrodilüsyon yöntemiyle antifungal ajanların duyarlılıkları belirlemişlerdir. Çalışmalarında; flusitosin için MİK aralığı < 0,125- > 16 µg/ml %4,5 direnç ve %1,8 oranında doza bağımlı duyarlılık; flukonazol antifungalinde < 0,25 - > 64 µg/ml %3,7 direnç %5,9 oranında doza bağımlı duyarlılık; vorikonazol için < 0,0313- 16 µg/ml %0,4 direnç ve %0,5 doza bağımlı duyarlılık; amfoterisin B için ise < 0,0313- 4 µg/ml MİK aralığı ve sadece %0,5 oranında direnç saptamışlardır (Zepelin ve ark. 2007).

Ülkemizde yapılan VITEK 2 YST kart ile toplam 129 *Candida* izolatının duyarlılıklarının belirlendiği bir çalışmada; flusitozin MiK aralığı $\leq 1-8$ µg/ml ve %95,34 oranında duyarlılık saptanmıştır. Flukonazol MiK aralığı 1-64 µg/ml, izolatların %91,47' sinin duyarlı ve %3,87' sinin dirençli olduğu tespit edilmiştir. Vorikonazol MiK aralığı 0,125-8 µg/ml (%99,22 duyarlılık), Amfoterisin B ise 0,25-16 µg/ml ve %86,04 duyarlı, %13,17 oranında izolatlarda orta duyarlılık belirlemiştir (Rahmanalı-Onur 2009).

Hazırolan ve arkadaşlarının 187 klinik *Candida* izolatında VITEK 2 ile yapılan antifungal duyarlılık testine göre; flukonazol için %92,52, vorikonazol için %98,85, Amfoterisin B için %95,97 flusitozin için %91,95 ve kaspofungin için %100 oranında duyarlılık saptamışlardır. Çalışmalarında; amfoterisin B'ye karşı bir izolat (*C. kefyr*), vorikonazol' e bir izolat (*C. glabrata*) ve flusitozin' e bir izolatta (*C. albicans*) direnç belirlenmiştir. Ayrıca *C. glabrata* ve *C. krusei* izolatlarında flusitozine orta duyarlılık; *C. albicans*, *C. kefyr* ve *C. krusei* izolatlarında da amfoterisin B'ye orta duyarlılık gözlenmiştir (Hazırolan ve ark. 2015).

Klinik örneklerinden soyutlanan maya izolatlarından (614 *Candida* spp., 10 *Cryptococcus neoformans*, 1 *Geotrichum capitatum*) antifungal duyarlılık testlerinden VITEK 2 ve CLSI mikrodilüsyon yönteminin karşılaştırıldığı bir çalışmada; sonuçların amfoterisin B %99,5, flukonazol %92 ve vorikonazolün %98,2 oranında uyumlu olduğu saptanmıştır. Flukonazol ajanında bazı türlerde (*C. glabrata* ve *C. krusei*) düşük oranda uyumsuzluk görülmüştür. Ayrıca VITEK 2 sistemde *Cryptococcus neoformans* türleri için vorikonazol duyarlılığı belirlenememiştir. VITEK 2 sistemin antifungal duyarlılığın belirlenmesinde kullanılabileceği, ancak sisteminde bulunmayan ekinokandinler ve posakonazol gibi ilaçların diğer yöntemlerle test edilmesi gerektiği vurgulanmıştır (Borghi ve ark. 2010).

Peterson ve arkadaşlarının VITEK 2 sistem ve mikrodilüsyon yöntemini (CLSI) karşılaştırdıkları bir çalışmada; kaspofungin (%99,8) ve mikafungin (%98,2) ve posakonazol (%98,1) sonuçlarının oldukça uyumlu olduğu ileri sürülmüştür. Kaspofungin ve mikafunginin VITEK 2 ile belirlendiği MiK sonuçlarının oldukça güvenilir olduğunu; özellikle *C. albicans* izolatları için posakonazol MiK değerlerinin referans yöntemle çok iyi uyumluluk gösterdiği bildirilmiştir (Peterson ve ark. 2011).

Melhem ve ark. (2013) kan kültüründen elde ettikleri 32 *Candida* izolatının antifungal duyarlılıklarını VITEK 2 sistem, CLSI ve EUCAST BMD referans yöntemini kullanarak karşılaştırmışlardır. Flukonazol için; VITEK 2 sistemle MİK aralığı ≤ 1 - ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$, CLSI' da $0,12$ - ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiştir. Vorikonazol ajanı için sırasıyla $\leq 0,12$ - 1 $\mu\text{g/ml}$ ve $0,015$ - 4 $\mu\text{g/ml}$; flusitozin için ≤ 1 - 16 $\mu\text{g/ml}$ ve $0,12$ - 16 $\mu\text{g/ml}$; amfoterisin B için $\leq 0,25$ - ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır. Hastanelerde flukonazol duyarlılığı için VITEK 2 sistemin tercih edilebileceğini ve vorikonazol direncinde referans yöntemlerin yerini tutabileceği bildirmişlerdir. Ayrıca referans yöntemlere göre VITEK 2 sistemde MİK değerleri daha yüksek belirlenmiş, bunun nedeninin ise ilaç konsantrasyonlarının aynı aralıkta olmamasından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Çalışmalarında VITEK 2 sistem ile referans sistemin duyarlılık sonuçlarında uyumun yüksek olduğunu (%88,5); *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa* (*Pichia anomala*) ve *C. guilliermondii* izolatlarının duyarlılıklarının %100 uyumlu olduğunu belirtmişlerdir. *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* izolatlarında ise tüm antifungallerde sırasıyla % 97,5 ve % 87,5 uyumluluk tespit edilmiştir. Çalışmalarında; VITEK 2 sisteminde *C. lusitaniae*, *C. kefyr* ve *C. haemulonii* için amfoterisin B MİK değerlerinin referans yöntemlere göre daha yüksek, nadir rastlanan mantar türlerinde ise flukonazol ve vorikonazol MİK değerlerinin beş kat yüksek olduğunu saptamışlardır.

Antifungal duyarlılık için VITEK 2 sistem ve CLSI referans yöntemin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada; 172 *Candida* izolatınının sırasıyla flukonazole duyarlılık oranları %92,4 ve %88,95; amfoterisin B duyarlılığı %98,3 ve %97,7 olarak tespit edilmiştir. VITEK 2' nin *Candida* türlerinin etken olduğu infeksiyonlarında duyarlılık testi için alternatif bir yöntem olabileceği ileri sürülmüştür (Kaur ve ark. 2016).

Çalışmamızda mikrodilüsyon yöntemi (MDY) ve VITEK 2 ile izolatların antifungallere karşı MİK değerleri belirlenmiştir. Çalışmamızda amfoterisin B için MDY MİK aralığı $0,125$ - 1 $\mu\text{g/ml}$ VITEK 2 MİK aralığı $0,5$ - 1 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır. Amfoterisin B sonuçların birbirleriyle uyumlu olduğu ve CLSI M27-S3 önerilerine göre duyarlılık yorumu yapılamadığından, tüm izolatların MİK değerlerinin göreceli olarak düşük olduğu tespit edilmiştir. Flusitozin MİK aralıkları sırasıyla $0,125$ - 4 $\mu\text{g/ml}$ ve ≤ 1 - 4 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlenmiş ve CLSI M27-S3 kriterlerine göre tüm izolatların duyarlı olduğu görülmüştür. Kaspofungin MİK değerleri MDY ile $0,125$ - 1

$\mu\text{g/ml}$, VITEK 2 ile tüm izolatların MİK değerleri $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır ve CLSI' ya göre MİK direnç sınırı $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ olduğundan izolatların hepsi duyarlı bulunmuştur. Azol grubu antifungallerden flukonazol ve vorikonazole karşı MİK değerleri belirlenmiştir. Flukonazol için sırasıyla MİK aralığı: 0,125-64 $\mu\text{g/ml}$ ve $\leq 1- \geq 64 \mu\text{g/ml}$ olduğu görülmüştür. *C. krusei* suşlarının flukonazole doğal dirençli olmalarından dolayı 4 izolatta (Y-49, Y-79, Y-86, Y-91) direnç ve bir *C. glabrata* izolatında (Y-97) direnç saptanmıştır. CLSI kriterlerine göre *C. glabrata* izolatlarının flukonazol duyarlılığında MİK $\leq 32 \mu\text{g/ml}$ olan suşlarda doza bağımlı duyarlılık (S-DD) bildirilmesi gerekmektedir. Bu sebeple çalışmamızda 35 *C. glabrata* izolatının duyarlılığı S-DD olarak belirlenmiştir. Vorikonazol MİK aralığı MDY için 0,0313-1 $\mu\text{g/ml}$, VITEK 2 için $\leq 0,12- 1 \mu\text{g/ml}$ olarak saptanmış ve tüm izolatların duyarlı olduğu görülmüştür. Sonuçlarımıza göre, Mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak yapılan antifungal duyarlılık testi sonuçları ile otomatize sistemle yapılan antifungal duyarlılık (VITEK 2) sonuçları karşılaştırıldığında antifungallerin duyarlılıkları açısından uyumlu bulunmuştur, ancak amfoterisin B hariç diğer antifungallerde düşük MİK değerleri ilaç konsantrasyonları VITEK 2 ile belirlenememiştir. Flukonazol hariç tüm antifungallerde %100 duyarlılık tespit edilmiş; literatürlerle de uyumlu olarak flukonazol ajanı için izolatların %94,9 oranında duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bazı antifungallerde MDY MİK değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak;

Candida izolatlarının prognostik, epidemiyolojik ve terapötik nedenlerle erken, hızlı ve doğru identifikasyonu kritik öneme sahiptir. Günümüzde klasik yöntemler, identifikasyon için halen altın standart kabul edilmekte, ancak nadir rastlanan türlerin yanlış tanımlanmasına neden olabilmektedir. Bu sebeple; klasik yöntemler ile tanımlamada sorun yaşanan *Candida* türlerinin identifikasyonunda moleküler yöntemlerin kullanımına ilişkin yönelme oluşmuştur. Ayrıca moleküler yöntemlerin hız ve doğruluk açısından identifikasyona ek kazanımlar getirebileceği düşünülmektedir.

Araştırmamızda, vajinal sürüntü ve idrar örneklerinden soyutlanan mayaların identifikasyonu yapılmıştır. Germ tüp oluşturma özelliği, kromojenik besiyerleri ve VITEK 2 ID-YST kart ile kullanılarak yapılan tanımlamalarda yöntemlere bağlı olarak bazı izolatların identifikasyonlarında farklılıklar görülmüştür. Kromojenik

besiyerlerinde tanımlama koloni rengine bağlı olduğundan bazı türlerin identifikasyonu yapılamamaktadır. Mısır unlu tween 80 agar ile VITEK 2 tanımlaması genellikle uyumludur. Ancak mısır unlu tween 80 agarda *C. glabrata* olarak tanımlanan üç izolat VITEK 2 ID-YST kart ile *C. sphaerica* olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle tanımlama yapılırken VITEK 2, kromojenik besiyerleri ile identifikasyonun yanında mısır unlu-tween 80 agarda morfolojilerinin de incelenmesi büyük önem taşımaktadır.

Klinik örneklerden soyutlanan izolatların, MIS' in içerdiği YEAST28 veri tabanına göre yağ asitleri analizleri yapılmıştır. İzolatların içerdikleri yağ asitleri oranlarına göre akrabalık ilişkileri cluster analizi ile belirlenmiştir. Dendrograma göre aynı tür olarak tanımlanan bazı izolatların yağ asidi içeriği bakımından farklı olduğu ve dendrograma oldukça uzak mesafede bağlı olduğu görülmüştür.

İzolatların ITS ve D1/D2 bölgeleri PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilerek oluşan farklı profiller belirlenip gruplandırılmıştır. Farklı bant profillerine bakılarak, 18 izolat dizi analizi yapılmak üzere ayrılmıştır. Dizi analizi verilerine göre; ITS gibi evrensel korunmuşluğa sahip temel gen bölgesinin yanısıra, 26S rDNA D1/D2 bölgesinin kullanılması sonucunda birbirleriyle tutarlı verilerle birlikte, filogenetik yakınlık ilişkileri belirlenmiştir.

CLSI referans yöntemi ve VITEK 2 sistemi kullanılarak antifungal duyarlılıkları saptanmış, flukonazol hariç tüm antifungallerde %100 duyarlılık tespit edilmiş; ancak flukonazol ajanı için izolatların %94,9 oranında duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bazı antifungallerde MİK değerlerinin kullanılan yöntemle göre daha yüksek olduğu görülmüş olup, bazı ajanların duyarlılıklarının farklı yöntemlerle doğrulanması gerektiği düşünülmektedir.

Literatür ve çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre; *C. albicans* en yaygın patojen *Candida* türü olmasına rağmen, non- *C. albicans* türlerinin de fırsatçı infeksiyon ajanı olarak rolü gittikçe artmaktadır. Ülkemizde *Candida* türlerinin etken olduğu infeksiyonların epidemiyolojisi ve antifungal duyarlılık profilleri ile ilgili çalışmalar bulunmakta olup; veriler farklılıklar göstermektedir.

Farklı merkezlerde yapılan çalışmalarda, klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı çalışmanın yapıldığı hasta grubunun özelliklerine ve coğrafi

bölgeye göre değişiklik görülmektedir. Konya’ da 2012-2013 yılları arasında idrar örneklerinden izole edilen 58 *Candida* izolatu ile yapılan çalışmada tür dağılımları sırasıyla; *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr* olarak belirlenmiştir (Özer ve ark. 2016). Kayseri’ de yapılan bir çalışmada; 50 idrar kültüründen soyutlanan *Candida*’ ların 47’ si *C. albicans*, diğerleri *C. glabrata*, *C. krusei* ve *C. tropicalis*; vajinal örneklerden elde edilen 51 *Candida* sp.’ nin 38’ i *C. albicans*, 11’ i *C. glabrata*, diğerleri *C. parapsilosis* ve *C. kefyr* olarak tanımlanmıştır (Sav ve ark. 2013). Ankara’ da 2008-2009 yılları arasında yapılan çalışmada; çeşitli klinik örneklerden en fazla izole edilen tür *C. albicans* (%54,4), sırasıyla *C. glabrata* (%14) ve *C. tropicalis* (%11,4) olduğu ileri sürülmüştür (Erdem ve ark. 2012). Diyarbakır’ da Mart 2015-Şubat 2016 idrar (n:161) ve vajen (n:34) örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin identifikasyonu yapılmıştır. İdrar örneklerin soyutlanan *Candida* sp.’ lerin dağılımı; 100’ ü *C. albicans*, 30’ u *C. tropicalis*, 11’ i *C. glabrata*, 9’ u *C. kefyr*, 8’ i *C. parapsilosis*, 3’ ü *C. lusitaniae*, vajen örneklerinden izole edilenlerin ise; 26’ sı *C. albicans*, 5’ i *C. glabrata* ve 3’ ü *C. krusei* olarak tanımlanmıştır (Özcan ve ark. 2016). Aydın’ da 84 *Candida* izolatu (vajinal örnekleri) ile yapılan bir çalışmada; 45’ i *C. albicans*, 29’ u *C. glabrata*, 7’ si *C. krusei*, 3’ ü *C. kefyr* olarak tanımlanmıştır (Gültekin ve ark. 2005). Edirne’ de 2008 yılında yapılan bir çalışmada; çeşitli klinik örneklerden elde edilen 65 *Candida* türünün %55’ inin *C. albicans*, ikinci en sık izole edilen türün *C. parapsilosis* (%28,9) olduğu saptanmıştır (Yenigün Koçak ve ark. 2011).

Bizim çalışmamız ile, Tekirdağ yöresinde yaşayan hastalara ait bazı (vajinal ve üriner) örneklerden izole edilen *Candida* türleri tanımlanmaya çalışılmıştır. Yapılan araştırmalarla uyumlu olarak, en çok izole edilen tür *C. albicans* (n: 49) olarak saptanmış, izolatlarımızın yaklaşık yarısını non- *C. albicans* türlerinin (sırasıyla *C. glabrata* (n:39), *C. kefyr* ve *C. krusei*) oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca çalışmamızdaki veriler, antifungal duyarlılık oranlarının %94- 100 arasında değiştiğini ve henüz direnç problemi ile karşı karşıya olmadığımızı göstermektedir. Ancak etken olan non- *C. albicans* türlerinin artışı, bu suşlarda direnç varlığı gibi nedenler infeksiyon etkeni olarak soyutlanan suşlarının tanımlanmasının ve antifungal duyarlılık patternlerinin saptanmasının önemini bir kez daha vurgulamaktadır. Bu tür çalışmaların devamlılığı ve verilerin takibi, değişimin saptanması açısından önemlidir. Elde edilecek

veriler ampirik antifungal tedaviler için de katkı sağlayacaktır. Bu çalışmaların gerçekleşmesi ile, kaynakların etkin ve sağlıklı kullanılması sonucu ülke ekonomisi ve optimal antifungal kullanımına katkıda bulunacağı öngörülmektedir.

Öneriler ve gelecekte yapılması planlanan çalışmalar:

Klinik örneklerden izole edilen maya türlerinin hızlı ve doğru olarak tanımlanması oldukça önemlidir. Laboratuvarlarda tanımlama yapılırken tek yöntem tercih edilmemelidir. İdentifikasyonda kromojenik besiyerleri yada sadece otomatize sistem kullanıldığı durumlarda mısır-unlu teweene 80 agar morfolojilerinin incelenmesi büyük önem taşımaktadır.

Klasik yöntemler ile tanımlamada sorun yaşanması durumunda *Candida*' lar için PCR-REA yönteminin kullanılabileceği, ancak seçilen restriksiyon enzimine bağlı olarak bant patternlerinde aynı tür olan izolatlarda bazı farklılıkların izlenebileceğinin gözönünde bulundurulması gerektiği düşünülmektedir.

Son zamanlarda gen dizi bilgileri etkenlerin tanımlanması amacıyla kullanılmakta ve invitro tanı yöntemlerinin geliştirilmesi için oldukça gereklidir. Çalışmamızda 18 izolat için yapılan dizi analizinde; ITS ve 26S rDNA D1/D2 bölgesinin kullanılması sonucunda birbirleriyle tutarlı verilerle birlikte, filogenetik yakınlık ilişkilerinin yansıtılmasında destekleyici veriler elde edilmiştir. Gelecek çalışmalarda fungal barkotlama ve karşılaştırma için bu bölgelere ilaveten intergenic spacer (IGS) bölgesi kullanılarak, diğer izolatların gen dizi analizlerinin yapılması planlanmıştır.

Son olarak, çalışmamızda flukonazole dirençli veya doza bağımlı duyarlı bulunan izolatların, azollere karşı antifungal dirençten sorumlu ERG11 geninin Real Time PCR ekspresyon seviyeleri araştırılarak direnç ile ilişkili genotiplerin belirlenmesi konusunda çalışmalar yapılacaktır.

KAYNAKÇA

- Abacı, Ö. ve Haliki, A. (2004). *Candida albicans'* in virulans faktörleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2 (9), 1-8.
- Abacı, Ö. ve Haliki, A. (2005). Fungal tanıda polimeraz zincir reaksiyonu. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3 (10), 1-9.
- Abbas, J., Bodey, G.P., Hanna, H.A., Mardani, M., Girgawy, E., Abi-Said, D., Whimbey, E., Hachem, R., Raad, I. (2000). *Candida krusei* fungemia an escalating serious infection in immunocompromised patients. *Arch. Intern. Med.*, 160 (17), 2659-2664.
- Abliz, P., Fukushima, K., Takizawa, K., Nishimura, K. (2004). Identification of pathogenic dematiaceous fungi and related taxa based on large subunit ribosomal DNA D1/D2 domain sequence analysis. *FEMS Immun. Med. Microbiol.*, 40, 41-49.
- Achkar, J.M and Fries, B.C. (2010). *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clinical Microbiology Reviews.*, 23 (2), 253-273.
- Ajenjo, H.M.C., Aquevedo, S.A., Guzman, D.A.M., Poggi, M.H., Calvo, A.M., Castillo, V.C., Leon, C.E., Andresen, H.M., Labarca, L.J. (2011). Epidemiological profile of invasive candidiasis in intensive care units at a university hospital. *Rev. Chilena Infectol.*, 28, 118-122.
- Akalın, H. (2008). Kandidozlerde risk faktörleri ve risk değerlendirmesi. *ANKEM Derg.*, 22(Ek 2), 270-274.
- Aktaş, A.E., Doğruman Al, F., Yiğit, N., Ayyıldız, A. (2001). Kromojenik bir besiyeri olan Biggy Agar' ın *Candida* kökenlerinin tanımlanmasında değerlendirilmesi. *Acta Parasitologica Turcica*, 25, 301-304.

- Alam, M.Z., Alam, Q., Jiman-Fatani, A., Kamal, M.A., Abuzenadah, A.M., Chaudhary, A.G., Akram, M., Haque, A. (2014). *Candida* identification: A journey from conventional to molecular methods in medical mycology. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 1437-1451.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25 (17), 3389-3402.
- Anđ, Ö. (2014). Hastalık etkeni mayalarda patojenliğin evrimi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.*, 44(1), 1-9.
- Arıkan, S. (2002). Antifungal duyarlılık testlerini ne zaman ve nasıl yapalım. *XXX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi*, Antalya, s. 243-246.
- Arıkan, S. and Rex, J.H. (2009). Antifungal ajanlar (Çev: S. Arıkan). P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, M.A. Pfaller (Eds.) (Çev. Eds. A. Başustaoğlu). *Klinik Mikrobiyoloji* 9. Baskı içinde (s: 1949-1960). Ankara: Atlas Kitapçılık.
- Aubertine, C.L., Rivera, M., Rohan, S.M., Larone, D.H. (2006). Comparative Study of the New Colorimetric VITEK 2 Yeast Identification Card versus the Older Fluorometric Card and of CHROMagar Candida as a Source Medium with the New Card. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (1), 227-228.
- Augustyn, O.P.H., Kock, J.L.F. and Ferreira, D. (1992). Differentiation between Yeast Species, and Strains within a Species, by Cellular Fatty Acid Analysis 5. A Feasible Technique? *System Appl. Microbiol.*, 15, 105-115.
- Avcı, M. (2011). Üriner kandida infeksiyonları. *Mantar Simpozyumu-II- Candida*, Kuşadası/ Aydın, s. 46-53.
- Baek, S.C., Chae, H.J., Houh, D., Byun, D.G., Cho, B.K. (1998). Detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis using PCR amplification and Restriction Enzyme Analysis. *International Journal of Dermatology*, 37, 682-686.

- Baixench, M.T., Taillandier, A. and Paugam, A. (2006). Clinical and experimental evaluation of a new chromogenic medium (OCCA®, Oxoid) for direct identification of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. *Mycoses*, 49 (4), 311-315.
- Balcı, O. ve Çapar, M. (2005). Vajinal infeksiyonlar. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi*, 2 (5), 14-20.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. (Eds). (2000). *Yeasts: Characteristics and Identification*, 3rd ed. London: Cambridge University Press.
- Beigi, R.H., Meyn, L.A., Moore, D.M., Krohn, M.A., Hillier, S.L. (2004). Vaginal yeast colonization in nonpregnant women: A longitudinal study. *Obstet. Gynecol.*, 104, 926-930.
- Bengi, A.M, Mevsim, V. ve Yıldırım, E. (2014). Vulvovajinal kandidiyazis tanısına sendromik yaklaşım. *Türk Aile Hek. Derg.*, 18 (4), 175-188.
- Branchini, M.L., Pfaller, M.A., Rhine-Chalberg, J., Frempong, T., Isenberg, H.D. (1994). Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 452-456.
- Borghi, E., Iatta, R., Sciota, R., Biassoni, C., Cuna, T., Montagna, M.T., Morace, G. (2010). Comparative evaluation of the Vitek 2 yeast susceptibility test and CLSI Broth Microdilution Reference Method for testing antifungal susceptibility of invasive fungal isolates in Italy: The GISIA3 Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (9), 3153-3157.
- Borst, A., Theelen, B., Reinders, E., Boekhout, T., Fluit, A.C., Savelkoul, P.H.M. (2003). Use of Amplified Fragment Length Polymorphism analysis to identify medically important *Candida* spp., including *C. dubliniensis*. *J. Clin. Microbiol.*, 41 (4), 1357-1362.
- Botha, A. and Kock, J.L. (1993). Application of Fatty Acid Profiles in the Identification of Yeasts. *Int. J. Food Microbiol.*, 19, 39-51.

- Buckley, H.R. (1989). Identifications of yeasts. E.G.V. Evans and M.D. Richardson (Eds). *Medical Mycology: A Practical Approach* (97-109). Oxford: Oxford University Press.
- Calderone, R.A. and Braun, P.C. (1991). Adherence and receptor relationship of *Candida albicans*. *Microbiol Rev.*, 55 (1), 1-20.
- Calderone, R.A. (2002). Introduction and Historical Perspectives. R.A. Calderone (Ed.). *Candida and Candidiasis* First edition içinde (s. 3-13). Washington DC: ASM Press.
- Cardenes, C.D., Carrillo-Munoz, A.J., Arias, A. Rodríguez-Alvarez, C., Torres-Lana, A., Sierra, A., Arévalo, M.P. (2004). Comparative evaluation of four commercial tests for presumptive identification of *Candida albicans*. *J. Microbiol. Methods.*, 59, 293-297.
- Chemaly, R.F. and Procop, G.W. (2006). Patojen Mantarların Moleküler Yöntemlerle Saptanması ve Tanımlanması (Çev: Z. Sarıbaş ve S. Arıkan). D.H. Persing, F.C. Tenover, J. Versolovic, Y-W. Tang, E.R. Unger, D.A. Relman (Eds.) (Çev. Eds. A. Tekeli ve Ş. Ustaçelebi). *Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar* içinde (s. 551-559). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard-third edition. *CLSI Document M27-A3*. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, third informational supplement. *CLSI Document M27-S3*. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, approved standard-second edition. *CLSI Document M38-A2*. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline, second edition.

- CLSI Document M44-A2. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2010). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of nondermatophyte filamentous fungi; approved guideline. CLSI document M51-A. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Corpus, K., Hegeman-Dingle, R. and Bajjoka, I. (2004). *Candida kefyr* an uncommon but emerging fungal pathogen: Report of two cases. *Pharmacotherapy*, 24 (8), 1084-1088.
- Colombo, A.L., Nucci, M., Park, B.J., Noue' r, S.A., Arthington- Skaggs, B., da Matta, D.A., Warnock, D., Morgan, J. and Brazilian Network Candidemia Study (2006). Epidemiology of candidemia in Brazil: A nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 2816-2823.
- Crist, A.E., Johnson, L.M. and Burke, P.J. (1996). Evaluation of the Microbial Identification System for identification of clinically isolated yeasts. *J. Clin. Microbiol.*, 34, 2408-2410.
- Como, J.A. and Dismukes, W.E. (1994). Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N. Engl. J. Med.*, 330 (4), 263-272.
- Cooke, V.M., Miles, R.J., Price, R.G., Midgley, G., Khamri, W., Richardson, A.C. (2002). New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (7), 3622-3627.
- Daef, E., Moharram, A., Eldin, S.S., Elsherbiny, N., Mohammed, M. (2014). Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45 (1), 255-262.
- Dalgıç, N. ve İnce, E. (2005). Sistemik etkili antifungal ilaçlar. *Klinik Pediatri*, 4 (3), 90-98.
- de Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M.J. (2000). *Atlas of clinical fungi* 2nd edition. Utrecht: CBS.

- Desnos-Ollivier, M., Bretagne, S., Bernède, C., Robert, V., Raoux, D., Chachaty, E., Forget, E., Lacroix, C., Dromer, F. and the YEASTS group. (2008). Clonal population of flucytosine- resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. *Emerging Infectious Diseases*, 14(4), 557-565.
- Devi, P., Divya Shridhar, M.P, D'Souza, L., Naik, C.G. (2006). Cellular fatty acid composition of marine-derived fungi. *Indian Journal of Marine Sciences*, 35 (4), 359-363.
- Durmaz, R. (2005). Hastane infeksiyonu salgınlarında moleküler biyolojik yöntemler. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 9, 196-202.
- Durmaz, R. (2007). Mikozların epidemiyolojik analizinde moleküler yöntemlerin yeri ve MLST yöntemine özet bir bakış. *İnfeksiyon Dergisi*, 21, 173-179.
- Edwards, J.E. (2010). *Candida* species. G.L. Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin (Eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 7th ed içinde (s. 3225-3240). New York: Churchill Livingstone Inc.
- Elena, R., Simona, E.S., Diana, P., Ionela, S., Cojocaru, M., Tatiana, V. (2015). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of 5.8S rRNA gene. *Romanian Biotechnological Letters*, 20 (4), 10585-10591.
- Ellepola, A.N.B. and Morrison, C.J. (2005). Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J. Microbiol.*, 43, 65-84.
- El Menyawi, I., Wögerbauer, M., Sigmund, H., Burgmann, H., Graninger, W. (2000). Identification of yeast species by fatty acid profiling as measured by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 742, 13-24.
- EL-Mashad, N., Raafat, D., Elewa, A., Othman, W. (2013). Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for characterization of *Candida* species causing onychomycosis. *African J. Microbiol. Research.*, 7(21), 2519-2523.

- Ener, S., Ener, B. ve Akalın, H. (2001). Uzun süren operasyonlardan sonra yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda gelişen invaziv kandida infeksiyonları. *Ege Tıp Dergisi*, 40 (3), 185-189.
- Ener, B. (2011). Türkiye’ de mantar epidemiyolojisi: İzolatların klinik önemi. *1. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi*, Antalya, s. 104-108.
- Erdem, F., Tuncer Ertem, G., Oral, B., Karakoç, E., Demiröz, A.P., Tülek, N. (2012). *Candida* türlerine bağlı nozokomiyal infeksiyonların epidemiyolojik ve mikrobiyolojik açıdan değerlendirilmesi. *Mikrobiyol. Bul.*, 46(4), 637-648.
- Esen, N., Şengönül, A. ve Yuluğ, N. (2004). Rutin laboratuvarında *Candida albicans* tanısı almış izolatlarda üç farklı yöntemle *Candida dubliniensis* araştırılması. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 34, 46-50.
- Espinel- Ingroff , A. and Phaller, M.A. (2009). Duyarlılık Test Yöntemleri: Mayalar ve Küfler (Çev. B. Sancak). P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, M.A. Pfaller (Eds.) (Çev. Ed. A. Başustaoğlu). *Klinik Mikrobiyoloji* 9. Baskı içinde (s: 1972-1986). Ankara: Atlas Kitapçılık.
- Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large sub-unit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 50, 1351-1371.
- FDA. (2001). Antiviral drugs advisory committee briefig document for voriconazole (Oral and intravenous formulations). Newyork, October 4.
- Fidel, P.L., Vazquez, J.A. and Sobel, J.D. (1999). *C. glabrata*; review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (1), 80-86.
- Freydiere, A.M., Buchaille, L. and Gille, Y. (1997). Comparision of three commercil media for direct identification and discrimination of candida species in clinical specimens. *Euro. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 16, 464-467.

- Fromtling, R. A., Rhodes, J.C. and Dixon, D.M. (2003). Taxonomy, classification, and morphology of the fungi. P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, M.A. Pfaller (Eds.). *Manuel of Clinical Microbiology*, 8th ed. İçinde (s. 1653-1658). Washington DC: ASM Press.
- Frutos, R.L., Fernandez-Espinar, M. T. and Querol, A. (2004). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85, 175-185.
- Fujita, S. and Hashimoto, T. (2000). DNA fingerprinting patterns of *Candida* species using *Hinf* I endonuclease. *Int. Jour. of Sys. and Evol. Microbiol.*, 50, 1381-1389.
- Gargeya, I.B., Pruitt, W.R., Simmons, R.B., Meyer, S.A., Ahearn, D.G. (1990). Occurrence of *Clavispora lusitaniae*, the teleomorph of *Candida lusitaniae*, among clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (10), 2224-2227.
- Garner, C.D., Starr, J.K., McDonough, P.L., Altier, C. (2010). Molecular identification of veterinary yeast isolates by use of sequence-based analysis of the D1/D2 region of the large ribosomal subunit. *Jour. of Clin. Microbiol.*, 48, 2140-2146.
- Gençoğlu, G. (2011). Deri ve eklerinin kandida infeksiyonları. *Mantar Simpozyumu–II- Candida*, Kuşadası/ Aydın, s. 56-59.
- Ghannoum, M.A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13 (1), 122-143.
- Ghelardi, E., Pichierri, G., Castagna, B., Barnini, S., Tavanti, A., Campa, M. (2008). Efficiency of Chromogenic Candida Agar for isolation and presumptive identification of pathogenic yeast species. *Eur. Soc. of Clin. Microb. and Inf. Diseases.*, 14, 141-147.
- Gil-Lamaignere, C., Roillides, E., Hacker, J., Müller, F.M.C. (2003). Molecular typing for fungi- a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin. Microbiol. Infect.*, 9(3), 172-185.

- Girmenia, C., Pizzarelli, G., Cristini, F., Barchiesi, F., Spreghini, E., Scalise, G., Martino, P. (2006). *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. *J. Clin. Microbiol.*, 44(7), 2458-2464.
- Girmenia, C., Luzi, G., Monaco, M., Martino, P. (1998). Use of voriconazole in treatment of *Scedosporium apiospermum* infection: Case report. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 1436-1438.
- Goldani, L.Z and Santos, R.P. (2010). *Candida tropicalis* as an emerging pathogen in candida meningitis: case report and review. *Braz. J. Infect. Dis.*, 14(6), 631-3.
- Goodway, G.W. (1995). Cell membrane. N.A.R. Gow and G.M Gadd (Eds). *The Growing Fungus* içinde (s. 63-74). London: Chapman and Hall.
- Göker, A. (2011). Genital kandida infeksiyonları. *Mantar Simpozyumu-II- Kandida*, Kuşadası/ Aydın, s. 54-55.
- Graf, B., Adam, T., Zill, E., Gobel, U.B. (2000). Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms. *J. Clin. Microbiol.*, 38, 1782-1785.
- Guarro, J., Gene, J. and Stchigel, A.M. (1999). Developments in Fungal Taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 454-500.
- Gutierrez, J., Morales, P., Gonzalez, M.A., Quindos, G. (2002). *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J. Basic. Microbiol.*, 42, 207-227.
- Gültekin, B., Yazıcı, V. ve Aydın, N. (2005). Vajinal örneklerden izole edilen *Candida* suşlarının dağılımı ve CHROMagar *Candida* besiyerinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol. Bült.*, 39, 319-324.
- Hata, D.J., Hall, L., Fothergill, A.W., Larone, D.H., Wengenack, N.L. (2007) Multicenter evaluation of the new VITEK 2 advanced colorimetric yeast identification card. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 1087-1092.
- Hazen, K.C and Howell, S.A. (2009). *Candida, Cryptococcus* ve tıbbi önemi olan diğer mayalar (Çev: E. Tümbay). P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L.

- Landry, M.A. Pfaller (Eds.) (Çev. Eds. A. Başustaoğlu). *Klinik Mikrobiyoloji* 9. Baskı içinde (s: 1762-1788). Ankara: Atlas Kitapçılık.
- Hawser, S.P., and Douglas J. (1994). Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect. Immun.*, 62, 915-21.
- Hazırolan, G., Yıldırım, D., Baran, I., Mumcuoğlu, İ., Aksu, N. (2015). Yatan hasta örneklerinden izole edilen *Candida* izolatlarının tür dağılımlarının ve antifungal duyarlılık profillerinin belirlenmesi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72 (1), 17-26.
- Helvacı, S., Gedikoğlu, S. ve Mıstık, R. (1992). *Candida albicans* tanısında germ tüp testi. *İnfekt. Derg.*, 6, 141-143.
- Hilmioglu, S., Ilkit, M. and Badak, Z. (2007). Comparison of 12 liquid media for germ tube production of *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Mycoses* 50, 282- 285.
- Horn, D.L., Neofytos, D., Anaissie, E.J., Fishman, J.A., Steinbach, W.J., Olyaei, A.J., Marr, K.A., Pfaller, M.A., Chang, C.H., Webster, K.M. (2009). Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: Data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin. Infect. Dis.*, 48, 1695-1703.
- Houang, E.T.S., Chu, K.C., Koehler, A.P., Cheng, A.F.B. (1997). Use of CHROMagar *Candida* for genital specimens in the diagnostic laboratory. *J. Clin. Pathol.*, 50, 563-565.
- Hugnes, T., Rogers, T. and Haynes, K. (1998). PCR diagnostics in medical mycology. P.D. Bridge, D.K. Arora, C.A. Reddy, R.P. Elander (Eds.). *Application of PCR in Mycology*. UK: CABI Publishing.
- Iyampillai, T., Michael, J.S., Mathai, E., Mathews, M.S. (2004). Use of CHROMagar medium in the differentiation of *Candida* species: Is it cost-effective in developing countries? *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 98, 279-282.
- Ilkit, M. (2000). Yüzeyel mikozların tedavisinde kullanılan antifungal ilaçlar. *ANKEM Derg.*, 14 (3), 280-285.

- İlkit, M., Hilmioğlu, S., Tasbakan, M., Aydemir, S. (2007). Evaluation of Albicans ID2 and Biggy agar for the isolation and direct identification of vaginal yeast isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 762-765.
- İnci, R. (1999). Antifungal ilaçlar. Ş. Ustaçelebi, G. Mutlu, T. İmir, T. Cengiz, E. Tümbay, Ö. Mete (Eds.). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* içinde (s. 1156-1158). Ankara: Güneş Kitabevi.
- Kalkancı, A., Kuştimur, S. ve Arslan, A. (1999). Çeşitli *Candida* kökenlerinin tiplendirilmesinde Biggy agar kullanılması. *İnfeksiyon Derg.* 13, 407-411.
- Kantarcıoğlu, A.S. ve Yücel, A. (2004). *Candida albicans'* da mannan: Çeşitli özellikleri ve önemi. *Cerrahpaşa Tıp Derg.*, 35, 1-11.
- Kaur, R., Dhakad, M.S., Goyal, R., Haque, A., Mukhopadhyay, G. (2016). Identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* species: A comparison of Vitek-2 System with conventional and molecular methods. *Journal of Global Infectious Diseases*, 8 (4):139-146.
- Kılıç, S.Ş. (2005). Kronik mukokütanöz kandidiyazis. *Türkiye Klinikleri Pediatrik Bilimler Dergisi*, 1(5), 83-87.
- Kim, D., Shin, W.S., Lee, K.H., Kim, K., Young Park, J., Koh, C.M. (2002). Rapid differentiation of *Candida albicans* from other *Candida* species using its unique germ tube formation at 39 degrees C. *Yeast*, 19, 957-962.
- Kim, T.H., Kweon, O.J., Kim, H.Y., Lee, M.K. (2016). Identification of uncommon *Candida* species using commercial identification systems. *J. Microbiol Biotechnol.*, 26 (12), 2206-2213.
- Kiraz, N. (2003). Antifungal tedavide yenilikler. *Türkiye Klinikleri Farmakoloji Özel Derg.*, 1(2), 186-193
- Kiraz, N. (2015). Molecular techniques for clinical diagnostic mycology. *Türk Hij. Den. Biyol. Derg.*, 72(3), 263-272.

- Kirkpatrick, W.R., Turner, T.M. and Fothergill, A.W. (1998). Fluconazole disk diffusion susceptibility testing of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 3429-3432.
- Kwon-Chung, K.J. and Bennet J.E. (Eds.) (1992). *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea&Febiger.
- Kocabay, G., Aydın, S., Tiryaki, B., Vatansever, S., Erk, O., Akkaya, V., Güler, K. (2005). *Candida kefyr* ile oluşan pnömoni. *İst. Tıp. Fak. Derg.*, 68, 26-28.
- Kock, J.L.F., Lategan, P.M., Botes P.J., Viljoen B.C. (1985). Developing a rapid statistical identification process for different yeast species. *J. Microbiol. Meth.*, 4, 147-154.
- Koç, A.N. (2007). Mikozların laboratuvar tanısı, etken mantarın tür tanısı ve antifungal direnç analizinde moleküler yöntemlerin yeri. *İnfeksiyon Dergisi*, 21, 165-172.
- Koç, A.N. (2012). Antifungal duyarlılık testleri ve klinik önemi. *ANKEM Derg.*, 26 (Ek 2), 270-276.
- Koneman. E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn W.C. (1997). *Mycology. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th edition içinde (s. 983-1069). Philadelphia: Lippincott.
- Kontoyiannis, D.P. and Lewis, R.E. (2002). Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet*, 359, 1135-1144.
- Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331-371.
- Kurtzman, C.P. (2000). Three new ascomycetous yeasts from insectassociated arboreal habitats. *Can. J. Microbiol.*, 46, 50-58.
- Kurtzman, C.P. (2001). Six new anamorphic ascomycetous yeasts near *Candida tanza waensis*. *FEMS Yeast Res.*, 1, 177-185.
- Kurtzman, C.P. (2014). Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 64, 325-332.

- Kuştimur, S. (1994). *Kandida patogenezinde rol oynayan faktörler. Mikrobiyoloji Bülteni*, 28, 175-181.
- Kuştimur, S. (1999). Antifungal duyarlılık testleri. Ş. Ustaçelebi, G. Mutlu, T. İmir, T. Cengiz, E. Tümbay, Ö. Mete (Eds.). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* içinde (s. 1159-1166). Ankara: Güneş Kitabevi.
- Küçükoğlu, K. (2008). Antifungal tedavide son gelişmeler. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 37 (1), 63-90.
- Larone, D.H. (2011). *Medically Important Fungi* 5th ed. Washington: ASM Press.
- Lee, S.B. and Taylor, J.W. (1992). Phylogeny of five fungus like protoctistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 636-653.
- Leaw, S.N., Chang, H.C., Sun, H.F., Barton, R., Bouchara, J.P., Chang, T.C. (2006). Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 693-699.
- Lehmann, P.F., (1998). Fungal Structure and Morphology. L. Ajello and J.R. Hay (Eds). *Topley and Willson's Microbiology and Microbial Infections*, 9 th ed. içinde (s. 57-58). London: Arnold.
- Loeffler, J., Hebart, H., Schmidt, D., Klingspor, L., Tollemar, J., Schumacher, U., Einsele, H. (2000). Identification of rare *Candida* species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 38, 207-212.
- Loiez, C., Wallet, F., Sendid, B., Courcol, R.J. (2006). Evaluation of VITEK 2 colorimetric cards versus fluorimetric cards for identification of yeasts. *Diagn Microbiol. Infect. Dis.*, 56, 455-457.
- 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. (2007). Molecular identification of unusual pathogenic yeasts isolates by large ribosomal subunit gene sequancing:

- 2 years of experience at the United Kingdom Mycology Reference Laboratory. *Jour. of Clin. Microbiol.*, 45, 1152-1158.
- Maenza, J.R. and Merz, W.G. (1998). *Candida albicans* and related species. S.L. Gorbach, J.G. Bartlett, N.R. Blacklow (Eds). *Infectious Diseases*, 2nd ed. içinde (2313-2322). Philadelphia: WB Saunders Company.
- Martinez, J.P., Luisa Gil, M., Lopez-Ribot, J.L., Chaffin, W.L. (1998). Serologic response to cell wall mannoproteins of *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11, 121-141.
- Mathur, P., Misra, M.C., Rajkumari, N., Xess, I. (2014). Distribution of different yeasts isolates among trauma patients and comparison of accuracy in identification of yeasts by automated method versus conventional methods for better use in low resource countries. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 32 (4), 391-397.
- Matta, D.A., Almeida, L.P. and Machado, A.M. (2007). Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: Results of a multicenter study conducted in Sao Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*, 57(4), 399-404.
- Mayer, F.L., Wilson, D. and Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4 (2), 119-128.
- McCormack, W.M., Zinner, S.H., McCormack, W.M. (1994). The incidence of genitourinary infections in a cohort of healthy women. *Sex Transm. Dis.*, 21, 63-64.
- McGinnis, M. (1980). *Laboratory handbook of medical mycology*. New York: Academic Press.
- McGinnis M.R. and Pasarell L. (1998). In vitro testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voriconazole, itraconazole and amphotericin B, with consideration of phylogenetic implications. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 2353-2355.
- McGinnis, M.R. and Nunn, G.B. (2006) Mantarların Dizi Analizine Dayalı Tanımlanması ve Sınıflandırılması. (Çev: Z. Sarıbaş ve S. Arkan). D.H. Persing,

- F.C. Tenover, J. Versolovic, Y-W. Tang, E.R. Unger, D.A. Relman (Eds). (Çev. Eds. A. Tekeli ve Ş. Ustaçelebi). *Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar* içinde (s. 561-568). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Melhem, M.S.C., Bertolotti, A., Lucca, H.R.L., Silva, R.B.O., Meneghin, F.A., Szesz, M.W. (2013). Use of the VITEK 2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44 (4), 1257-1266.
- Melo, A.S.A. (1998). Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Mycopathologia*, 142 (2), 57-66.
- Metin, D.Y. (2011). İdentifikasyon Testleri ve Antifungal Duyarlılık Testleri. *Mantar Simpozyumu -II- Kandida*, Kuşadası/ Aydın, s. 11-14.
- Messeir, I., Abrantes, P.M.D.S. and Africa, C.W.J. (2012). Strengths and limitations of different chromogenic media for the identification of *Candida* species. *Journal of Microbiology Research*, 2 (5), 133-140.
- Meurman, O., Koskensalo, A. and Rantakokko-Jalava, K. (2006). Evaluation of Vitek 2 for identification yeasts in the clinical laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 12 (6), 576-596.
- MIDI. (2002). *Sherlock Library Generation System Version 4.5 User's Manual*. Newark, Delaware, USA: MIDI, Inc.,
- Mirhendi, H., Makimura, K., Khoramizadeh, M., Yamaguchi, H. (2006). A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. *Jpn. J. Med. Mycol.*, 47, 225- 229.
- Mitchell, T.G. (2010). Mikoloji (Çev: B. Ener). G.F. Brooks, K.C. Carroll, J.S. Butel, S.A. Morse (Eds) (Çev. Eds. O.Ş. Yemen). *Jawetz, Melnick ve Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji* içinde (s. 621-657). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

- Molero, G., Diez-Orejas, R., Navarro-Garcia, F., Monteoliva, L., Pla, J., Gil, C., Sanchez-Perez, M., Nombela, C. (1998). *Candida albicans*: Genetics, dimorphism and pathogenicity. *Internati. Microbiol.*, 1, 95-106.
- Momani, O.M. (2000). Cost-effectiveness and efficacy of CHROMagar Candida medium in clinical specimens. *East. Mediterr. Health J.*, 6, 968-978.
- Moreira, D. and Paula, C.R. (2006). Vulvovaginal Candidiasis. *Int. J. Gynecol. Obstet.*, 92, 266-67.
- Murray P.R, Baron E.J, Pfaller M.A. (Eds.). (2007) *Manual of Clinical Microbiology 9th ed.* Washington DC: Amerikan Society for Microbiology.
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S. and Pfaller, M.A. (2014). Fırsatçı Mikozlar. Çev. E. Tümbay). *Tıbbi Mikrobiyoloji* 6. Baskı içinde (Çev. Ed. A. C. Başustaoğlu) (s.751-774.) Ankara: Atlas Kitapçılık.
- Nadeem, S.G., Hakim, S.T. and Kazmi, S.U. (2010). Use of CHROMagar Candida for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings. *Libyan J. Med.*, 5, 10.3402/ljm.v5i0.2144.
- Neppelenbroek, K.H., Seo, R.S., Urban, V.M., Silva, S., Dovigo, L.N., Jorge, J.H., Campanha, N.H. (2014). Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: A review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Diseases*, 20, 329-344.
- Nayman Alpat, S., Özgüneş, İ., Ertem, O.T., Erben, N., Doyuk Kartal, E., Tözün, M., Usluer, G. (2011). Kandidürisi olan hastalarda risk faktörlerinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 45(2), 318-324.
- Nucci, M., Queiroz-Telles, F., Tobo' n, A.M., Restrepo, A., Colombo, A.L. (2010). Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin. Infect. Dis.*, 51, 561-570.

- Odds, F.C. and Bernaerts, R. (1994). CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 1923-1929.
- O'Donnell, K. (1993). *Fusarium and its near relatives*. D.R. Reynolds and J.W. Taylor (Eds.). The fungal holomorph: Mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics içinde (s. 225-233). Wallingford UK: CAB International.
- Özcan, K., İlkit, M., Ateş, A., Turac-Biçer, A., Demirhindi H. (2010). Performance of Chromogenic Candida Agar and CHROMagar Candida in Recovery and Presumptive Identification of Monofungal and Polyfungal Vaginal Isolates. *Medical Mycology*, 48, 29-34.
- Özcan, N., Ezin, Ö., Akpolat, N., Bozdağ, H., Mete, M., Gül, K. (2016). Klinik örneklerde saptanan *Candida* türlerinin MALDI-TOF MS ile tiplendirilmesi. *Dicle Tıp Dergisi*, 43 (3), 390-394.
- Özer T.T., Durmaz, S. ve Yula E. (2016). Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from urine culture. *J. Infect. Chemother.*, 22, 629-632.
- Özkütük, A. (2011). *Kandida* infeksiyonlarında serolojik tanı. *Mantar Simpozyumu -II- Kandida*, Kuşadası/ Aydın, s. 15-25.
- Öztürk, T., Özseven, A.G., Sesli Çetin, E., Kaya S. (2003). Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarının tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının araştırılması. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 14 (1), 17-22.
- Öztürk, Ş.B. (2011). *Kandida* ve biyofilm. *Bamçag Bülteni*, 2, D28-32.
- Pappas, P.G. (2006). Invasive candidiasis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 20 (3), 485-506.
- Pappas, P.G., Alexander, B.D., Andes, D.R., Hadley, S., Kauffman, C.A., Freifeld, A., Anaissie, E.J., Brumble, L.M., Herwaldt, L., Ito, J., Kontoyiannis, D.P., Lyon, G.M., Marr, K.A., Morrison, V.A., Park, B.J., Patterson, T.F., Perl, T.M., Oster, R.A., Schuster, M.G., Walker, R., Walsh, T.J., Wannemuehler, K.A., Chiller, T.M. (2010). Invasive fungal infections among organ transplant recipients:

- Results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin. Infect. Dis.*, 50, 1101-1111.
- Passos, X.S., Sales, W.S., Maciel, P.J., Rodrigues Costa, C., Carvalho Miranda, K., Lemos, J.A., Batista, M.A., Rodrigues Silva, M.R. (2005). *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100 (8), 925-928.
- Peltroche-Llacsahuanga, H., Schmidt, S., Lutticken, R., Haase, G. (2000). Discriminative power of fatty acid methyl ester (FAME) analysis using the Microbial Identification System (MIS) for *Candida (Torulopsis) glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 38, 213-221.
- Peng, C.F., Lee, K.M. and Lee, S.H. (2007). Characterization of two chromogenic media of Candida ID2 and CHROMagar Candida for preliminary identification of yeasts. *J. Biomed. Lab. Sci.*, 19 (2), 63-69.
- Peterson, J.F., Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Rinaldi, M.G., Riebe, K.M., Ledeboer, N.A. (2011). Multicenter comparison of the Vitek 2 Antifungal susceptibility test with the CLSI Broth Microdilution Reference Method for testing caspofungin, micafungin, and posaconazole against *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 49 (5), 1765-1771.
- Pfaller, M.A. (1995). Epidemiology of candidiasis. *J. Hosp. Infec.*, 30 (Suppl), 329-338.
- Pfaller, M.A., Houston, A. and Coffmann, S. (1996). Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *J. Clin. Microbiol.*, 34 (1), 58-61.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Procop, G.W., Rinaldi, M.G. (2007). Multicenter Comparison of the VITEK 2 Antifungal Susceptibility Test with the CLSI Broth Microdilution Reference Method for Testing Amphotericin B, Flucytosine, and Voriconazole against *Candida* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (11), 3522-3528.

- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Gibbs, D.L., Newell, V.A., Nagy, E., Dobiasova, S., Rinaldi, M., Barton, R., Veselov, A., and the Global Antifungal Surveillance Group. (2008). *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program, 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (2), 515-521.
- Pincus, D.H., Orena, S. and Chatellier, S. (2007). Yeast identification-past, present and future methods. *Medical Mycology*, 45, 97-121.
- Rahmanalı-Onur, A. (2009). *Mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen maya mantarlarının VITEK 2 Compact System ile identifikasyonu ve antifungal duyarlılıklarının tespiti*. Uzmanlık Tezi. Diyarbakır: Dicle Üniversitesi.
- Ramani, R. and Chaturvedi, V. (2000). Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44 (10), 2752-2758.
- Rex, J.H., Pfaller, M.A., Walsh, T.J, Chaturvedi, V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M.A., Gosey, L.L., Odds, F.C., Rinaldi, M.G., Sheehan, D.J., Warnock, D.W. (2001). Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14 (4), 643-658.
- Richards, M.J., Edwards, J.R., Culver, D.H., Gaynes, R.P. (2000). Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, 21, 510-515.
- Rodrigues, C. F., Silva, S. and Henriques, M. (2014). *Candida glabrata*: A review of its features and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 33, 673-688.
- Rodriguez-Tudela, J.L., Berenguer, J., Martinez-Suarez, J.V., Sanchez, R. (1996). Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2 % glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards Reference Microdilution Method M27-P for in vitro susceptibility testing of

- amphotericin B, flucytosine and fluconazole against *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40, 1998-2003.
- Rousselle, P., Freydiere, A., Couillerot, P., de Montclos, H., Gille, Y. (1994). Rapid identification of *Candida albicans* by using Albicans ID and fluoroplate agar plates. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 3034-3036.
- Saghrouni, F., Ben Abdeljelil, J., Boukadida, J., Ben Said, M. (2013). Molecular methods for strain typing of *Candida albicans*: A review. *Journal of Applied Microbiology*, 114 (6), 1559-1574.
- Samaranayake, Y.H. and Samaranayake, L.P. (1994). *Candida krusei*: Biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J. Med. Microbiol.*, 41, 295-310.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanguinetti, M., Porta, R., Sali, M., La Sorda, M., Pecorini, G., Fadda, G., Posteraro, B. (2007). Evaluation of VITEK 2 and RapID yeast plus systems for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 45 (4), 1343-1346.
- Santos, M.S., Souza, E.S., Junior, R.M.S., Talhari, S., Souza, J.V.B. (2010). Identification of fungemia agents using polymerase chain reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Braz. Jour. of Med. and Biol. Res.*, 43, 712-716.
- Saraçlı, M.A. (2002). *Candida* infeksiyonlarının laboratuvar tanısında moleküler ve genetik tanı yöntemleri. *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu*, Eskişehir, s. 133-143.
- Saraçlı, M.A. (2007). DNA Chip Teknolojisi ve Mikolojide Uygulama Alanları. *İnfeksiyon Dergisi*, 21, 181-184.
- Sardi, J.C.O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A.M., Mendes Giannini, M.J.S. (2013). *Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm

- formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62, 10-24.
- Satiou, N. and Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.
- Sav, H., Demir, G., Atalay, M.A., Koç, A.N. (2013) Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin değerlendirilmesi. *Türk Hij. Den. Biyol Derg.*, 70 (4), 175 -180
- Schaller, M., Borelli, C., Korting, H.C., Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 48, 365-377.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109 (16), 6241-6246.
- Schutter, M.E. and Dick, R.P. (2000). Comparison of Fatty Acid Methyl Ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. *Published in Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64, 1659-1668.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L. and Goodwin, A.C. (2007). Antimicrobial susceptibility testing protocols. New York: CRC Press.
- Scorzetti, G., Fell, J.W., Fonseca, A., Statzell-Tallman, A. (2002). Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res.*, 1497, 1-23.
- Segal, E. and Elad, D. (1998). *Candida* species and *Blastoschizomyces capitatus*. L. Ajello and J.R. Hay (Eds). *Topley and Willson's Microbiology and Microbial Infections*, 9 th ed. içinde (s. 423-460). London: Arnold.
- Shea Y.R. (2009). Mantarların saptanması ve identifikasyonu için algoritmalar (Çev: B. Ener). P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, M.A. Pfaller (Eds.) (Çev. Eds. A. Başustaoğlu). *Klinik Mikrobiyoloji* 9. Baskı içinde (s: 1745-1761). Ankara: Atlas Kitapçılık.

- Sheehan, D.J. Hitchcock, C.A. and Sibley, C.M. (1999). Current and emerging azole antifungal agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12 (1), 40-79.
- Shin, J.H., Nolte, F.S., Holloway, B.P., Morrison, C.J. (1999). Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5' exonuclease assay using fluorescent DNA probes. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 165-170.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.*, 36, 288-305.
- Singh, G., Raksha and Urhekar, A.D. (2013). Candidal infection: Epidemiology, pathogenesis and recent advances for diagnosis. *Bulletin of Pharmaceutical and Medical Sciences*, 1(1), 1-8.
- Singh, S. (2014). Molecular-genetic approaches for identification and typing of pathogenic *Candida* yeasts: A review. *International Journal of Innovative Research in Science Engineering and Technology*, 3 (9), 16199-16211.
- Sobel, J.D., Faro, S., Force, R.W., Foxman, B., Ledger, W.J., Nyirjesy, P. R., Reed, B.D., Summers, P.R. (1998). Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic and therapeutic considerations. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 178, 203-211.
- Sobel, J. D. (2006). The emergence of *non-albicans Candida* species as causes of invasive candidiasis and candidemia. *Curr. Infect. Dis. Rep.*, 8, 427-433.
- Staib, P. and Morschhauser, J. (2007). Chlamydospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* an enigmatic developmental programme. *Mycoses*, 50, 1-12.
- Stevens, D.A. and Bennett, J.E. (2000). Antifungal agents. G.L.Mandell, J.E. Bennett, R. Dolin (Eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases* 5th ed. içinde (s. 448-459). New York: Churchill Livingstone.

- Sugar, A.M. and Lyman, C.A. (1998). *A Pratical Guide to Medically Important Fungi and the Diseases They Cause*. Newyork: Lippincott-Raven Publishers.
- Sugita, T., Nakajima, M., Ikeda, R., Matsushima, T., Shinoda, T. (2002). Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 1826-1830.
- Sullivan, D.J., Westerneng, T.J., Haynes, K.A., Bennett, D.E., Coleman, D.C. (1995). *Candida dubliniensis* sp. nov.: Phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* , 141 (7), 1507-1521.
- Sullivan D.J. and Coleman D.C. (2002). Molecular approaches to identification and typing of *Candida* Species. R.A. Calderone (Ed.). *Candida and Candidiasis* First edition içinde (s. 427-441). Washington DC: ASM Press.
- Sullivan, D.J., Moran, G. P., Pinjon, E., Al- Mosaid, A., Stokes, C., Vaughan, C., Coleman, D.C. (2003). Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS*, 4, 369-376.
- Susever, S. ve Yeğenoğlu, Y. (2011). İnvazif mantar infeksiyonlarının tanımlanmasında moleküler yöntemlerin öneminin konvansiyonel yöntemler ile karşılaştırılarak değerlendirilmesi. *Mikrobiyol. Bül.*, 45(2), 325-335.
- Şenol, Ş. (2011). Gastrointestinal Sistemi Tutan Kandida İnfeksiyonları. *Mantar Simpozyumu-II- Kandida*, Kuşadası/ Aydın, s. 60-63.
- Tamura, K. and Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 10, 512-526.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30, 2725-2729.

- Tarr, S. (2004). *Yeasts from Lesotho – their classification and possible applications*. Doctorate thesis. South Africa: University of the Free State.
- Taverna, C.G., Bosco-Borgeat, M.E., Murisengo, O.A., Davel, G., Boité, M.C., Cupolillo, E., Canteros, C.E. (2013). Comparative analyses of classical phenotypic method and ribosomal RNA gene sequencing for identification of medically relevant *Candida* species. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 108 (2): 178-185.
- Telefoncu, A., Küfrevioğlu, Ö.İ. ve Pazarlıoğlu, N., (2003). Biyoinformatik I, yağ asit profillerine göre mikroorganizmaların tanısı ve karakterizasyonu. İzmir.
- Teng, L.J., Hsueh, P.R., Liaw, S.J., Ho, S.W., Tsai, J.C. (2004). Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 37, 327-334.
- Tortorano, A.M., Kibbler, C., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., Grillot, R. (2006). Candidaemia in Europe: Epidemiology and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 27, 359-366.
- Trama, J.P., Adelson, M.E., Raphaelli, I., Stemmer, S.M., Mordechai, E. (2005). Detection of *Candida* species in vaginal samples in a clinical laboratory setting. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, 13, 63-67.
- Trost, A., Graf, B., Eucker, J., Sezer, O., Possinger, K., Göbel, U.B., Adam T. (2004). Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. *J. Microbiol. Methods.*, 56 (2), 201- 211.
- Trtkovaa, J. and Raclavsky, V. (2006). Molecular-genetic approaches to identification and typing of pathogenic *Candida* yeasts. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.*, 150 (1), 51-61.
- Tsang, C.S.P., Chu, F.C.S., Leung, W.K., Jin, L.J., Samaranayake, L.P., Siu, S.C. (2007). Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Med. Microbiol.*, 56, 1393-1398.

- Tümbay, E. ve Karakartal, G. (1994). Sistemik *Candida* infeksiyonları. E. Tümbay (Ed.). *Candida infeksiyonları, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları*. Bornova: Bilgehan Yayınevi.
- Tümbay, E. (1999). *Candida* Türleri. Ş. Ustaçelebi, G. Mutlu, T. İmir, T. Cengiz, E. Tümbay, Ö. Mete (Eds.). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* içinde (s. 1081-1086). Ankara: Güneş Kitabevi.
- Uzun, Ö. (2006). Dissemine kandidiyazis. M. Akova ve H. Akan (Eds.). *İmmün Sistemi Baskılanmış Hastalarda İnvaziv Fungal İnfeksiyonlar* içinde (67-84). Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi.
- Üstek, D., Abacı, N., Sırma, S., Çakiris, A. (2011). Yeni nesil DNA dizileme. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 1 (1), 11-18.
- Vargas, K.G., Srikantha, R., Holke, A., Sifri, T., Morris, R., Joly, S. (2004). *Candida albicans* switch phenotypes display differential levels of fitness. *Medical Science Monitor*, 10 (7), 198-206.
- Vasquez, J.A. and Sobel, J.D. (2003). Candidiasis. W.E. Dismukes, P.G. Pappas, J.D. Sobel (Eds.). *Clinical Mycology* içinde (s. 143-187). New York: Oxford University Press.
- van Asbeck, E.C., Clemons, K.V. and Stevens, D.A. (2009). *Candida parapsilosis*: A review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(4), 283-309.
- Viljoen, B.C., Kock, J.L.F. and Lategan, P. M. (1986). The influence of culture age on the cellular fatty acid composition of four selected yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, 132, 1895-1898.
- Viudes, A., Peman, J., Canton, E., Salavert, M., Ubeda, P., Lopez-Ribot, J. L., Gobernado, M. (2002). Two cases of fungemia due to *Candida lusitanae* and a literature review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 21, 294-299.

- Viviani, M.A., Marie, S., Graybill, J.R., Yamaguchi, H., Anaissie, E., Caillot, D. (1998). New approaches to antifungal chemotherapy. *Med. Mycol.*, 36 (1), 194-206.
- Wahyuningsih, R., Freisleben, H.J., Sonntag, H.G., Schnitzler, P. (2000). Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (8), 3016-3021.
- Weems, J.J. (1992). *Candida parapsilosis*: Epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations and antimicrobial susceptibility. *Clinical Infectious Diseases*, 14, 756-766.
- White, P.L., Archer, A.E. and Barnes, R.A. (2005). Comprison of non-cultur-based methods for detection of systemic fungal infections, whit an emphasis on invasive *Candida* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 43, 2181-2187.
- White, T.C. (1997). Antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *ASM News*, 63, 427-433.
- White, T.C., Marr, K.A. and Bowden, R.A. (1998). Clinical, celluler and moleculer factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11 (2): 382-402.
- White, T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribozomal RNA genes for phylogenetics. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (Eds.). *PCR protocols: A guide to methods and applications* içinde (s. 315-322). San Diego, Calif: Academic Press.
- White T.C. (2009). Antifungal ajanlara direnç mekanizmaları (Çev: M. Yücesoy). P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry, M.A. Pfaller (Eds.) (Çev. Eds. A. Başustaoğlu). *Klinik Mikrobiyoloji* 9. Baskı içinde (s: 1745-1761). Ankara: Atlas Kitapçılık.
- Williams, D.W., Wilson, M.J., Lewis, M.A., Potts, A.J. (1995). Identification of *Candida* species by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of intergenic spacer regions of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 2476- 2479.

- Willinger, B., Halloworth, C., Selitsch, B., Manafi, M. (2001). Performance of *Candida* ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar *Candida*. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 3793-3795.
- Willke, A. (2007). Kandidoz: Nasıl değerlendirilmeli ne yapılmalı. *İnfeksiyon Dergisi*, 21(Ek), 117-122.
- Wingard, J.R. (1994). Infections due to resistant *Candida* species in patients with cancer who are receiving chemotherapy. *Clin. Infect. Diseases.*, 19 (1), 49-53.
- Xu, J., Vilgalys, R., Mitchell, T.G. (1998). Colony size can be used to determine the MIC of fluconazole for pathogenic yeasts. *J. Clin. Microbiol.*, 36 (8), 2385-2385.
- Xu, J. (2016). Fungal DNA barcoding. *Genome*, 59, 913-932 .
- Yang, Y.L. (2003). Virulence factors of *Candida* species. *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, 36, 223-228.
- Yeğenoğlu, Y. (2012). Antifungal direnci gösteren mantarlar. *ANKEM Derg.*, 26 (2), 254-260.
- Yenigün Koçak, B., Kuloğlu, F., Doğan Çelik, A., Akata, F. (2011). Bir üçüncü basamak hastanesinde erişkin kandidoz olgularının epidemiyolojik özellikleri ve risk faktörlerinin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol. Bul*, 45(3), 489-503.
- Yıldıran, Ş.T. (1999). Mantar infeksiyonlarında laboratuvar tanı. Ş. Ustaçelebi, G. Mutlu, T. İmir, T. Cengiz, E. Tümbay, Ö. Mete (Eds.). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* içinde (s. 1129-1144). Ankara: Güneş Kitabevi.
- Yıldıran, S.T. (2001). Nozokomial fungal infeksiyonlar. 2. *Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi*, Ankara, s. 141-45.
- Yılmaz, E. (2011). SSS ve oftalmik kandida infeksiyonları. *Mantar Simpozyumu-II-Kandida*, Kuşadası/ Aydın, s. 26-31.
- Yiş, R. (2007). *Candida türlerinin restriksiyon enzim analizi ile identifikasyonu*. Uzmanlık Tezi. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi.

- Yücel, A. ve Kantarcıoğlu, S. (1999). *Candida albicans*' in taksonomisindeki önemli bazı değişiklikler. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 30 (3), 236-246.
- Yücel, A. ve Kantarcıoğlu, A.S. (2000). *Candida*' ların patojenlik belirtgenleri. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 31, 172-186.
- Yücel, A. ve Kantarcıoğlu, A.S. (2001). *Candida albicans* kökenlerinde bazı virulans faktörlerinin (fosfolipaz, çimleme borusu ve aderens) ve aralarındaki korelasyonun belirlenmesi. *İnfek. Derg.*, 15, 517-25.
- Yücesoy, M. (2000). Sistemik mantar infeksiyonlarında kullanılan antifungal ilaçlar. *ANKEM Derg.*, 14 (3), 286-297.
- Yücesoy, M., Oztek, A.O. and Marol, S. (2005). Comparison of three differential media for the presumptive identification of yeasts. *Clin. Microbiol. Infect.*, 11, 245-247.
- Yücesoy, M. and Marol, S. (2003). Performance of CHROMagar Candida and BIGGY agar for identification of yeast species. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2, 1-7.
- Zepelin, M.B., Kunz, L. and Ruchel, R. (2007). Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: Results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. *J. Antimicrob. Chemother.*, 60 (4), 424- 428.

www.indexfungorum.org (01.04.2017)

http://www.melkonian.uni-koeln.de/research_phylogeny_about.htm (01.04.2017)

<https://www.studyblue.com/notes/n/yeast-molecular-taxonomy/deck/9823159>
(01.04.2017)