

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK  
MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
CANDIDA ALBİCANS KÖKENLERİNİN  
MOLEKÜLER ANALİZİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. MELAHAT GÜRBÜZ**

**TEZ DANIŞMANI**

**PROF. DR. İLKNUR KALELİ**

**DENİZLİ-2008**

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK  
MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
CANDIDA ALBICANS KÖKENLERİNİN  
MOLEKÜLER ANALİZİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. MELAHAT GÜRBÜZ**

**TEZ DANIŞMANI**

**PROF. DR. İLKNUR KALELİ**

**DENİZLİ-2008**

Prof. Dr. İlknur KALELİ danışmanlığında Dr. Melahat GÜRBÜZ tarafından yapılan “Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* kökenlerinin moleküler analizi” başlıklı çalışma jürimiz tarafından Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.


BAŞKAN : Prof. Dr. İlknur KALELİ

ÜYE : Doç. Dr. Çağrı ERGİN

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Nural CEVAHİR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

06/01/2009

  
Prof. Dr. Zafer AYBEK  
Tıp Fakültesi Dekanı

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
<i>CANDIDA</i> TÜRLERİ VE GENEL ÖZELLİKLERİ.....	2
<i>CANDIDA</i> İNFEKSİYONLARININ PATOGENEZİ VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİ.....	4
Dimorfizm.....	7
Aderans (Tutunma).....	7
Fenotipik Dönüşüm(Switching) ve Antijenik Çeşitlilik.....	8
Enzimler ve Dokuya İnvazyon.....	9
Toksinler.....	9
<i>Slime</i> Üretimi.....	9
Sideroforları Kullanabilme Yeteneği.....	9
<i>CANDIDA</i> TÜRLERİNİN KLİNİK ÖNEMİ VE YAPTIĞI İNFEKSİYONLAR.....	10
<i>CANDIDA</i> İNFEKSİYONLARININ LABORATUVAR TANISI.....	10
<i>CANDIDA</i> TÜRLERİ İÇİN EPİDEMİYOLOJİK TİPLENDİRME YÖNTEMLERİ.....	14
<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP) Restriksiyon enzim analizi .....	16
PZT-RFLP.....	16
<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (AFLP).....	16
<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i> (RAPD) veya <i>Arbitrarily Primed     PCR</i> (AP-PCR).....	16
<i>Repetitive Sequence-based PCR</i> (REP-PZT).....	17
<i>PCR-Single Strand Conformation Polymorphism</i> (PCR-SSCP).....	17
<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE).....	17
<i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST) .....	18

DNA Dizi Analizi (Sekanslama).....	18
25S İtron Analizi.....	18
GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
<i>CANDIDA ALBICANS</i> SUŞLARI.....	20
<i>CANDIDA ALBICANS</i> SUŞLARININ GENOTİPLENDİRMESİ.....	21
DNA Eldesi.....	21
25S İtron Analizi.....	22
Subtiplerin Enzimle Kesim Yöntemi ile identifikasyonu.....	25
İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	29
BULGULAR.....	30
TARTIŞMA.....	35
SONUÇLAR.....	49
ÖZET.....	51
YABANCI DİL ÖZETİ.....	53
KAYNAKLAR.....	55

## TABLolar ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Tablo - 1 <i>Candida</i> infeksiyonlarının gelişiminde konağa ait faktörler .....	5
Tablo - 2 Çalışmada kullanılan primerler .....	22
Tablo - 3 25S intron analizinde kullanılan PCR karışımı.....	23
Tablo - 4 PCR döngüsü ve parametreleri.....	23
Tablo – 5 <i>C.albicans</i> suşlarının kliniklere göre dağılımı.....	30
Tablo – 6 <i>C albicans</i> suşlarının örneklere göre dağılımı.....	30
Tablo – 7 193 <i>C.albicans</i> suşunun genotiplerinin izolasyon yerine göre dağılımı.....	31
Tablo – 8 İnvaziv- non-ınvaziv gruplar arası genotip dağılımı.....	32
Tablo – 9 Steril- non-steril gruplar arası genotip dağılımı.....	32
Tablo – 10 194 <i>C.albicans</i> suşunun aktarılabılır grup-1 intron varlığına göre genotiplerinin dağılımı .....	33
Tablo – 11 Genotip A <i>C.albicans</i> suşlarının subtiplerinin izolasyon yerine göre dağılımı .....	34
Tablo – 12 Değişik ülkelerde tespit edilen <i>C.albicans</i> genotiplerinin dağılımı .....	38

## ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

	Sayfa No
Şekil-1 Etidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiş, <i>C.albicans</i> suşlarının 25S rDNA geninde yer alan aktarılabılır grup-1 intron bölgesinin PCR ürünleri .....	25
Şekil-2 Etidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiş, genotip A <i>C.albicans</i> suşlarının PCR ürünleri .....	26
Şekil-3 Genotip A <i>C.albicans</i> izolatlarının <i>HaeIII</i> enzimi ile kesimi .....	27
Şekil-4 Subtip c, d, e, g ve h Genotip A <i>C.albicans</i> izolatlarının <i>MspI</i> enzimi ile kesimi .....	28
Şekil-5 <i>C.albicans</i> Genotip A subtiplerinin ayrılması amacıyla geliştirilmiş <i>HaeIII</i> ve <i>MspI</i> enzimleri ile kesim şeması .....	29

## KISALTMALAR DİZİNİ

AFL	: Amplified Fragment Length Polymorphism
AIDS	: Acquired Immunodeficiency Syndrome
AP-PCR	: Arbitrarily Primed PCR
BAL	: Bronkoalveolar lavaj
bç	: Baz çifti
bp	: Baz pair
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
ITS	: Internal Transcribed Spacer
kb	: Kilo baz
mDNA	: Mitokondriyal DNA
MLST	: Multi Locus Sequence Typing
PAS	: Periyodik asit-schiff
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PCR-SSCP	: PCR-Single Strand Conformation Polymorphism
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
rDNA	: Ribozomal DNA
REE	: Restriksiyon endonükleaz enzimleri
REP-PCR	: Repetitive Sequence-based PCR
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal RNA
SDA	: Sabouraud dekstroz agar
Taq	: Thermus aquaticus
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
VNTR	: Variable Number Tandem Repeats



## GİRİŞ

Son yıllarda özellikle kanser hastalarına yoğun kemoterapi protokollerinin uygulanması, organ transplantasyonunun yaygınlaşması, yoğun bakım hastalarına uygulanan invaziv girişimler ve çoklu antibiyoterapi gibi etkenler mantar infeksiyonu gelişimi açısından risk altında olan hasta sayısında artışa neden olmuştur. Tedavi protokollerindeki gelişmelere bağlı olarak bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların yaşam sürelerinin giderek uzaması mantar infeksiyonları sıklığında artış meydana getirmiştir. Bunun yanı sıra daha duyarlı tanı yöntemlerinin kullanıma girmesi sonucunda, bu hastalardan izole edilen mantar türlerinin çeşitliliğinde de belirgin bir artış olmuştur. Tüm bunlara rağmen, *Candida* türleri, özellikle de *C.albicans* ilk sıradaki yerini korumaya devam etmektedir.

Etkenin moleküler yöntemlerle tanımlanması, kısa sürede güvenilir sonuç vermesi açısından büyük önem taşır. Moleküler tiplendirme yöntemleri etkenin epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve uygun tedavi ve korunma protokollerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Bir moleküler tiplendirme yönteminin rutin laboratuvar çalışmalarına uygulanabilmesi için kolay, güvenilir, ucuz ve ayırım gücünün yüksek olması gerekir. Bu çalışmada kullanılan 25S intron analizi, bu özellikleri taşıyan ve kullanımı gittikçe yaygınlaşan bir yöntemdir. Bu yöntemle *C.albicans* suşları genotiplendirilebildiği gibi *C.dublinsiensis* ayırımı da dizi analizine gerek kalmadan yapılabilmektedir.

Bu çalışmada, Pamukkale Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde farklı kliniklerde tedavi gören hastalardan gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş olan *C.albicans* suşlarının 25S intron analizi ile genotiplendirilmesi ve saptanan genotiplerle invazivlik arasında bir ilişki olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, etkenin özelliklerinin belirlenmesi yanı sıra, uygun infeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilmesi ve uygun tedavinin zamanında başlatılması açısından yol gösterici olacaktır.

## GENEL BİLGİLER

### **CANDIDA TÜRLERİ VE GENEL ÖZELLİKLERİ**

1987'de Berlin'de 14.Ulusal Botanik Kongresinde, Dixon ve Fromling tarafından yapılan fungus sınıflandırması esas alınarak, tıbbi önemi olan fungusların bu sınıflamadaki yeri belirlenmiş ve *Candida* 'lar, *Deuteromycetes* (Fungi imperfecti) sınıfı içindeki üç takımdan birisi olan *Cryptococcales* takımı içine konulmuştur (1)

Mantarlar ökaryotik, klorofilsiz, absorpsiyonla beslenen, genellikle yuvarlak veya oval şekilde, tomurcuklanarak üreyen canlılardır. Tek hücreli veya çok hücreli olabilirler. Kitin ve selüloz içeren sert hücre duvarına sahiptirler. Morfolojik yapılarına göre maya veya küf görünümündedirler (1).

*Candida*'lar ince duvarlı, oval, kapsülsüz, hareketsiz, gram-pozitif, 1-3 x 4-6 µm boyutlarında, lateral tomurcuklanma (blastospor) ile aseksüel olarak üreyen fakültatif anaerob mayalardır. Maya formu dışında, kültür ve dokularda yalancı hif veya gerçek hif oluşturabilirler. Yalancı hifler tomurcuklanma sırasında meydana gelen uzantının ana hücreden ayrılmaması sonucu gelişir. Yeni hücre ana hücreye bağlı kalarak uzar ve filamentöz bir yapı oluşturur. Gerçek hifler ise maya hücresinden veya hifin bir dalından oluşabilir; boğumlanma göstermez, apikal uzantı tarzında, bölmeli ve düzgün kenarlıdır (1,2). Türlerin çoğu yalancı hif oluşturur. *C.albicans* ve çok seyrek izole edilen *C.dublinskiensis* ve *C.norvegensis* türleri gerçek hif oluşturma özelliğine sahiptir (2,3).

*Candida* 'ların çevresel saprofit olarak bulunan 150'den fazla türü mevcuttur. Bunların %65'inden fazlası 37°C'de üreyememektedir. Bu nedenle *candida* 'ların çok az bir kısmı insanlarda kommensal olarak bulunup enfeksiyona neden olmaktadır. *C.albicans* en sık soyutlanan tür olmakla birlikte *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.krusei*, *C.guilliermondii*, *C.lusitaniae*, *C.kefyr*, *C.dublinskiensis* sıklıkla saptanan türlerdir. Nadiren soyutlananlar ise *C.famata*, *C.utilis*, *C.inconspicua*, *C.lipolytica*,

*C.rugosa*, *C.viswanathi*, *C.haemulonii*, *C.norvegensis*, *C.catemulata*, *C.intermedia*, *C.lambica* ve *C.zeylanoides*'tir (2).

*Candida* türleri Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) ve kanlı agarda, oda ısısında (22-26°C'de) ve 37°C'de kolayca üreyebilirler. Kültür için alınan örnekler hem 26°C'de hem de 37°C'de ayrı ayrı inkübe edildiğinde 37°C'de ürememe saprofitliği ortaya koyan bir özelliktir. Patojen *Candidalar*ın çoğu hem 26°C hem de 37°C'de ürerler. Üretildikleri ortamda neme ihtiyaç duyarlar (%30-40). Üreyebilmeleri için en iyi pH 4.5-5 arasında olmakla birlikte pH 3-7.5 aralığında da üreyebilirler. Oda ısısında ve SDA besiyerinde 24-48 saatte krem renkli, opak, düzgün yüzeyli, 1-2 mm çapta, tipik maya kokusu olan, S tipi koloniler oluştururlar. *Candida* kolonileri, S formundan R formuna kendiliğinden dönüşebilir. R tipi kolonilerin oluşumu daha çok miçellerin miktarının artması ile ilgilidir. *C.albicans* bazen ilk izolasyonda SDA'da buruşuk koloniler oluşturabilir. Bunlar alt kültürlerde S tipi kolonilere dönüşebilmektedir. *C.albicans* kanlı agarda kenarlarında yıldızlı uzantıları olan koloniler oluşturur (1,4).

Mantar kültürlerinde bakterilerin ve hızlı üreyen küflerin üremesini baskılayarak seçicilik sağlamak üzere ilk izolasyon besiyerlerinin bileşimine sikloheksimid, gentamisin, kloramfenikol gibi antibiyotikler eklenebilir. Sikloheksimid bazı mantar türlerinin üremesini baskıladığı için sikloheksimid içermeyen besiyerlerine de ekim yapılması gerekmektedir (5).

Ökaryotik yapıda olan *Candida* türleri; hücre duvarı, sitoplazmik membran, sitoplazma, mitokondri, 80S yapısında ribozom, endoplazmik retikulum, golgi cisimciği ve membran ile çevrili nükleustan oluşur. Bu yapının önemli bir bileşeni olan çok katlı hücre duvarı, değişen ozmotik basınca karşı hücrenin şeklini korumasını sağlayan konak hücreleriyle ilişkide bulunan dinamik bir yapı olup; hücre kuru ağırlığının %30'unu oluşturmaktadır. *Candida* 'ların hücre duvarı mannoproteinler (%20-23), gluklan (%48-60), kitin (%0.6-2.7), protein (%3-6) ve lipitten (%48-60) oluşur. En dışta konak hücreye adezyonu sağlayan protein tabakası bulunur. Bu tabaka N-asetil glukozaminidaz ve asit fosfataz gibi enzimler içerir. Mannoproteinlerdeki farklılıklar *candida* türlerinin

ayrılmasında kullanılır. Ancak, aralarında çapraz reaksiyon görülebilmektedir. Hücre membranı, hücrenin çevreyle kimyasal madde değişimini sağlar. *Candida* 'ların hücre duvarında bulunan lipitler sterol esterleri (zimosterol), serbest sterol (ergosterol), trigliseritler ve fosfolipitlerden oluşmaktadır (6,7). Hücre yapısındaki mitokondrileri diğer ökaryot hücrelere benzemekle birlikte hücre başına düşen mitokondri miktarı respiratuvar aktiviteye bağlı olarak değişmektedir. *Candida* türlerinin sitoplazmasında, içerisinde hidrolitik enzimlerin, iyonların ve metabolitlerin bulunduğu vakuoller yer alır (7).

## **CANDIDA İNFEKSİYONLARININ PATOGENEZİ VE VİRULANS FAKTÖRLERİ**

*Candida* türleri, insanda cilt ve mukoza yüzeylerinde normal flora elemanı olarak bulunur. İnsanlarda, ağız ve gastrointestinal sistem florasının %30-50'sini, sağlıklı kadınların genital sistem florasının %20'sini *Candida* türleri oluşturur. Ağızdan izole edilen *Candida* türlerinin %60-80'i, genital sistemden izole edilenlerin ise %80-90'ı *C.albicans*'tır. İnfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Candida* türleri içerisinde hala en sık izole edilen etken *C.albicans*'tır (8). İnsanda hastalık oluşturan *C.albicans* türlerinin çoğu, konağın kendi flora elemanlarıdır. Ancak etken, ekzojen kaynaklardan da vücuda alınabilir (9). Bu fırsatçı patojenler, çoğunlukla düşükün veya bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde akut veya kronik, derin yerleşimli infeksiyonlar oluşturabilirse de sıklıkla mukozal, kutanöz veya cilt infeksiyonları yapar (10).

*Candida* infeksiyonlarının oluşumunda konağa ve patojene ait faktörler arasındaki denge önemlidir. Konağa ait faktörleri, konağın direnç durumu ve predispozan faktörler olarak sınıflayabiliriz (Tablo-1).

Tablo - 1: *Candida* infeksiyonlarının gelişiminde konağa ait faktörler (7,11,12,13).

KONAĞIN DİRENÇ DURUMU	PREDİSPOZAN FAKTÖRLER
Deri ve mukoza bütünlüğü	İmmünesupresif tedavi
Epidermal proliferasyon	Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı
Fagositoz ve fagositik öldürme mekanizmaları	Düşük doğum ağırlığı
Lizozim	İntravenöz kateter
Laktoferrin	Mekanik ventilasyon
Doğal öldürücü (NK) hücreleri	Parenteral beslenme
Kompleman sistemi	AIDS
T hücre bağımlı immünite	Diyabet
Sitokinler	Ağır cerrahi girişimler
Hümmoral immünite	Maligniteler
	İdrar sondası
	İntravenöz uyuşturucu kullanımı
	Diğer endokrinolojik ve hematolojik hastalıklar

Genellikle kandidoz öncesinde florada bulunan mantarlar sayıca artış gösterip kolonize olur ve sonrasında infeksiyon meydana gelir. Yüzeysel kandidozlarda, *candida* deri ve mukoza bütünlüğünün bozulduğu bölgeden yalancı hücreleri ile doku içerisine girer ve tomurcuklanma ile oluşan blastokonidyumları aracılığıyla dokuya yayılır. Derideki keratinize doku, epidermal langerhans hücreleri, dermal dendritik hücreler, keratinositler ve mikrovasküler endotel hücreleri infeksiyondan korunmada görev alan yapılardır (14). Derin ve sistemik kandidozlarda çoğu kez önce gastrointestinal sistemde kolonizasyon olur ve buradan mukozayı geçerek kana karışan mantar, fagositik etkinliği yetersiz olan hastalarda hemen hemen her organ ve sisteme yerleşebilir (15).

Dermisi invaze ederek sistemik dolaşıma katılan *Candida*'lar; polimorfonükleer lökositler, monosit ve eozinofiller ile karşılaşılırlar. Bu hücreler blastokonidya ve yalancı hif formlarını fagosite etme yeteneğine sahiptir. Ayrıca doku makrofajlarının ve yerleşik retikuloendotelyal hücrelerin *Candida*'ları öldürme kapasiteleri bulunmaktadır. Ek olarak trombositlerin de antikandidal aktivitesi bulunmaktadır (4). Fagositik hücreler *Candida*'ları mannoz reseptörü, kompleman reseptörü (CR) ve Fc reseptörü ile tanımaktadır. Myeloperoksidaz, hidrojen peroksit ve süperoksit anyon sistemi fagositlerin *Candida*'ları öldürmede kullandıkları başlıca mekanizmalardır. Ayrıca fagositler kimotripsin benzeri katyonik proteinler üretilip membran geçirgenliğini artırarak etki gösterirler. Oponizasyon, ısıya duyarlı ve dirençli serum opsoninleri, IgG ve kompleman sistemiyle olmaktadır. *Candida* hücreleri, özellikle de yalancı hif formları insan kompleman reseptörleri CR2 ve CR3 ile benzer yüzey molekülleri içermektedir (4,12).

Fagositer hücreler tarafından salgılanan TNF- $\alpha$ , IL-1 ve IL-6 inflamatuvar yanıtı başlatarak mikrobisidal etkiyi artırır. T lenfositler ise bu sürece çeşitli sitokinler salgılayarak etki ederler: Th1; IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  salgılayarak hücrel bağışıklık yanıtını aktive ederken, Th2; IL-4 ve IL-10 salgılayarak antifungal yanıtı inhibe eder. Bu nedenle *Candida* infeksiyonlarında Th1 ve Th2 arasındaki denge önemlidir (12).

*Candida*'lara karşı hümmoral ve hücrel bağışıklık yanıtı gelişmekle birlikte hücrel bağışıklığın rolü daha büyüktür. Genel olarak yüzeysel deri infeksiyonlarında hücrel bağışıklığın, sistemik infeksiyonlarda ise doğal direncin yanında hümmoral bağışıklığın öne çıktığı söylenebilir (4).

*C.albicans*'ın, genustaki diğer üyelerle karşılaştırıldığında infeksiyon etkeni olarak daha sık izole edilmesini, tek başına konağa ait faktörlerle açıklamak zordur. Bu durumda *C.albicans*'a ait virulans faktörleri ön plana çıkmaktadır. *Candida* türlerine ait önemli virulans faktörleri şunlardır:

## **Dimorfizm**

Belli çevresel şartlarda *C.albicans* maya formundan hif formuna geçebilir. Mukozal ve derin infeksiyonlar sırasında maya hücreleri transforme olarak filamanları oluşturur. Doku invazyonu için hif oluşumunun esansiyel olduğu gösterilmiştir. Hif oluşumu bir yandan dokuya penetre olmayı kolaylaştırırken, diğer yandan organizmayı fagositozdan korur (16,17).

## **Aderans (Tutunma)**

Mayaların epitel dokuya yapışma özelliği invazyonda önemli bir faktördür ve kolonizasyon ve infeksiyonda ilk basamaktır. *Candida* kökenleri farklı koşullarda maya, germ tüp, gerçek ve yalancı hif oluşturabilmektedir. Germ tüp ve hif formlarının aderansta maya formuna üstündür ve yine hifal formlar dokuya invazyonda önemli rol oynamaktadır (18,19). Yapılan çalışmalarda adeziv yetenek ile patojenite arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. *Candida* türlerinin invitro şartlarda epitel, endotel, fibrin, fibrinojen, trombosit matriksleri ile akrilik ve teflon gibi inert malzemelere adere oldukları görülmüştür (4,20,21).

Epitel ve endotel yüzeyine aderans ile ilişkili üç mekanizma öne sürülmektedir.

1- Lektin benzeri etkileşim: *Candida* yüzeyindeki proteinler epitel ve endotel hücrelerindeki karbonhidrat yapılarını tanır.

2- Protein-protein ilişkisi: *Candida*'ların yapısında bulunan mannoproteinler konak hücredeki protein ve peptid yapılarını tanımaktadır.

3- Tam olarak tanımlanamayan etkileşim: *Candida* bir ligand aracılığıyla konak hücreye bağlanmaktadır (22).

Mantarın aderansını sağlayan yüzey karbonhidrat yapıları mannan,  $\beta$ -glukan ve kitine karşılık, konakta bunların bağlanabileceği fukos, N-asetilglukozamin ve sialik asit gibi bağlayıcı yapılar vardır. Ayrıca mantarlar konakta bulunan serum proteinleri (serum albumin, fibrinojen, komplemanın C3 kısmı) ve hücre dışı matriks proteinlerini (laminin, fibronektin, kollajen, entaktin ve vitronektin) de tanır (23).

## **Fenotipik Dönüşüm (Switching) ve Antijenik Çeşitlilik**

Birbiri ile ilişkisiz birçok genin koordine bir şekilde regülasyonu sayesinde *C.albicans* farklı fenotipik şekiller arasında yüksek bir hızda ( $10^{-2}$ -  $10^{-3}$ ) dönüşüm gösterebilir. Böylece koloni morfolojisi, hücre şekli, hücre duvar morfolojisi, aspartik proteinaz salgılanması, aderans özellikleri, antijen ekspresyonu, doku afinitesi, hayvan modellerinde virulans ve antifungal ilaçlara duyarlılık gibi birçok fenotipik karakter etkilenir. Bu dönüşüm, koloni morfolojisindeki değişimlerle (beyaz-opak dönüşümü) takip edilmektedir. Bu sayede *C.albicans*, farklı anatomik lokalizasyonlarda değişen çevresel koşullara hızla adaptasyon gösterir (16,17).

İn vivo ve in vitro çalışmalarda hif şeklinde üremenin hücre yüzeyinde eksprese edilen antijenlerde belirgin değişikliğe yol açtığı bildirilmiştir. Aktif infeksiyon sırasında *C.albicans*'da hücre yüzeyinde antijenik değişikliğin olduğu saptanmıştır (24).

**Hücre Duvarı, Yüzey Değişimi ve Hidrofobisite:** Maya hücre duvarının virulanstaki en önemli rolü adezyon basamağında olmaktadır. Yapılan moleküler çalışmalar maya yüzeyinde bulunan ve konak hücreye bağlanmada rol alan ligandın hücre duvarı moleküllerinden mannoprotein olduğunu göstermiştir. Mannan immunojenik ve immunomodulör etkilidir; hücrel immunitiyi inhibe ettiği, sitokin aktivitesi ve lenfosit ilişkilerini bozduğu belirtilmektedir (6).

Germ tüp oluşumu aşamasında hücre yüzey hidrofobisitesi etkilenir. Hidrofobisitenin *C.albicans*'ın plastik yüzeylere ve epitel hücrelerine bağlanma yeteneğini arttırdığı belirtilmektedir (24,25).

## **Enzimler ve Dokuya İnvazyon**

*Candida* türlerinde proteinaz ve fosfolipaz başta olmak üzere, hyalüronidaz, kondroitin fosfataz, kitinaz, esteraz, glukoamilaz, lipaz ve çeşitli glukolitik enzimler dokuya invazyonda rol alan önemli virülans faktörleridir (13).



## **Toksinler**

*C.albicans*'ın maya formunda endotoksin benzeri maddeler ve hemolizin ürettiği gösterilmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı toksinler glikoprotein toksinler ve kandidotoksindir. Glikoprotein toksinler, toksik bileşen olarak glikoz, mannoz gibi karbonhidratlar içerirken; virulan bir *C.albicans* kökeninden izole edilen ve kandidotoksin hücreyi öldürücü ve infeksiyonu arttırıcı özelliğe sahiptir. Düşük molekül ağırlıklı toksinler kandidotoksin üreten bir *C.albicans* kökeninde saptanmıştır (25).

## **Slime Üretimi**

*Candida* türlerinin katetere yapışarak kolonizasyon sonucunda nozokomiyal infeksiyonlara ve fungemilere neden olduğu bilinmektedir. *Candida*'ların kateterlere aderans ve kolonizasyonunda mukopolisakkarit yapıdaki *slime* üretiminin önemli olduğu gösterilmiştir. Kateterde ortaya çıkan biyofilmde mantarın *slime* faktörünün yanı sıra konağın da fibrin ve fibronektininin gerekli olduğu bilinmelidir (13,27,28).

*Slime* üretimi özellikle *C.parapsilosis* için önemli bir virulans faktörü olup, kateter kaynaklı infeksiyonlarda ön plana çıkmaktadır. Bununla birlikte *C.albicans*, *C.glabrata* ve *C.kefyr*'in de *slime* ürettiği saptanmıştır (29).

## **Sideroforları Kullanabilme Yeteneği**

Sideroforlar, depolandığı dokudan veya transferrinden demiri alan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. *Candida*'lar üremek için ihtiyaç duydukları demiri diğer *Candida*'lara ait sideroforlardan veya *Enterobacteriaceae* ailesinin sideroforlarından sağlayabilmektedirler (30).

## **CANDIDA TÜRLERİNİN KLİNİK ÖNEMİ VE YAPTIĞI İNFEKSİYONLAR**

*Candida*'lar fırsatçı patojenler olarak çevresel ve bireysel koşulların konak aleyhine geliştiği durumlarda hafif yüzeysel infeksiyonlardan ağır sistemik infeksiyonlara kadar çeşitli klinik tablolara yol açabilirler. Floralı bölgelerde fizyolojik koşulların değişmesi (aşırı terleme, vajende pH değişikliği vb.), hormonal denge değişimleri, kortikosteroid gibi immun sistemi baskılayıcı ilaçların kullanımı, kanser veya AIDS gibi immun yetmezliğe yol açan hastalıklar *candida* infeksiyonlarının gelişimini kolaylaştırır (4, 31,32). Yüzeysel infeksiyonlar daha çok toplum kökenli infeksiyonlar olduğu halde, derin yerleşimli sistemik infeksiyonlar en sık yoğun bakım ünitelerinde olmakla birlikte hastanede yatan hastalarda daha sık görülmektedir (33).

### **CANDIDA İNFEKSİYONLARININ LABORATUVAR TANISI**

*Candida* türleri normal floranın bir üyesi olarak da bulunabildiklerinden laboratuvarlarda karşılaşılan en büyük sorunlardan birisi klinik örneklerde üretilen *Candida*'nın klinik önemi olup olmadığının belirlenip rapor edilip edilmeyeceğine karar verilmesidir. Bu aşamada verilerin doğru yorumlanabilmesi için iyi bir klinik laboratuvar işbirliğine gereksinim vardır (34).

*Candida* türlerinin tanısında ilk basamak klinik örneklerden hazırlanan direkt preparatların incelenmesidir. Direkt incelemede boyasız hazırlanan nativ preparat yanında potasyum hidroksit (KOH), *Gram*, metilen mavisi, *Wright*, *Giemsa*, kalkoflor beyazı, periyodik asit-*schiff* (PAS) ve methenamin gümüş boyası ile hazırlanan preparatlar incelenebilir. *Candida* türleri dokuda en iyi PAS ve methenamin gümüş boyası ile gösterilebilmektedir (31,35).

Hazırlanan direkt preparatlarda tomurcuklanan maya hücreleri, yalancı ve gerçek hiflerin görülmesi infeksiyon belirteci olarak değerlendirilir (2,15).

*Candida* türlerinin geleneksel tanımlaması morfolojik ve biyokimyasal özellikleri temel alınarak yapılır. Bu temel morfolojik ve biyokimyasal özellikler:

1. Kolonilerin ilk üretilme besiyerindeki görünümü ve rengi
2. Hücrelerin büyüklüğü ve şekli
3. Hif ve/veya yalancı hif oluşumu
4. Germ tüp oluşturma yeteneği
5. Klamidospor oluşturma yeteneği
6. Karbonhidrat kullanımı
7. Nitrat kullanımı
8. Şeker fermentasyonudur (34).

Klinik örneklerden primer izolasyon için en sık kullanılan besiyeri SDA'dır. Primer izolasyon besiyerlerinin bileşimine bakteri ve hızlı üreyen küfleri baskılayarak seçicilik sağlamak için çeşitli antimikrobikler (Sikloheksimid, gentamisin, kloramfenikol vb.) eklenebilir. Uygun besiyerine ekim sonrası 26°C'de ve 37°C'de inkübe edilirler. Patojen *Candida* 'ların çoğu 26°C ve 37°C'de birkaç günde ürerken 37°C'de üreyememe saprofitliği ortaya koyan bir özelliktir. Genellikle 24 saatte oluşan koloniler 48 saatte daha da belirginleşir; SDA'da beyaz-krem renkli, düzgün yüzeyli, 1-2 mm çapında, karakteristik maya kokusu olan koloniler gözlenir. *C.albicans* koyun kanlı agarda yıldız şeklinde saçaklı kenarları olan koloniler oluşturur (1).

Kültürde üreyen maya kolonilerini tanımlamada ilk yöntem germ tüp testidir. Hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve ucuz olan bu test *C.albicans*'ın diğer *candida* 'lardan ayrımını sağlayan basit ve çok değerli bir testtir. Germ tüp yapımı için insan, koyun veya dana serumunda 35-37°C'de üç saatlik inkübasyon gereklidir. Germ tüp, blastospordan orijin alan, başlangıç noktasında daralma olmayan ve uzunluğu boyunca hiç kabarıklık yapmayan paralel uzantılar olarak gözlenir. *C.tropicalis* de hif başlangıçları yapabilir fakat blastokonidyalari daha genişir ve ana hücreden çıkış noktasında darlık bulunmaktadır. Germ tüp testi, antifungal tedavi alan ve immun yetmezlikli hastalarda %5 oranında yanlış negatif sonuç vermektedir. *C.albicans* dışında *C.stellatoidea* ve *C.dublinskiensis* de germ tüp pozitifdir (1,31,36).

Mısırunu-*tween* 80 agar gibi besince fakir ortamlarda maya hücreleri iyi yedek besin depolayan klamidosporlar oluşturur. Bunlar oluşurken hif veya yalancı hifin bir yerinde sitoplazma yoğunlaşır, şişer ve duvarı kalınlaşır. Hiflerin içinde, kenarında veya ucunda gelişebilen, büyük, yuvarlak ve kalın duvarlı bu yapılar, açlığa ve diğer değişik şartlara karşı *candida*'ların canlılığını korumasını sağlarlar (37). Mısırunu-*tween* 80 agarda mayaların oluşturduğu blastokonidya, gerçek ve yalancı hif, klamidosporların yapı ve organizasyonlarına göre tür düzeyinde tanıya gidilmektedir (1). *C.albicans* izolatlarının büyük çoğunluğu (>%90) mısırunu-*tween* 80 agara ekilip 25°C'de 72 saat inkübe edildikleri zaman yalancı ve gerçek hif ile kümeler halinde yuvarlak blastokonidya oluşturur, hiflerin ucunda da türe özgü karakteristik kalın duvarlı "terminal klamidospor" bulunur. *C.tropicalis*, uzun yalancı hifleri boyunca tek tek veya küçük kümeler yapmış blastokonidyalardan oluşur. *C.glabrata* da ise küçük oval blastokonidyalardan oluşur ancak yalancı hif oluşumu görülmez. *C.krusei*, çapraz kibrit çöpleri şeklinde, ağaç benzeri görünüm veren uzun blastokonidyalardan oluşur. *C.parapsilosis*'de kısa yalancı hiflerin çevresinde tek tek veya küçük kümeler yapan blastokonidyalardan oluşur. Türe özgü özelliği, "dev hücre" denilen iri hiflerin bulunmasıdır (15,31,36,37).

*Candida* türlerini, kromojenik substratlar kullanarak oluşan farklı renk ve morfolojiler ile hızlı ve basit şekilde tanımlamayı sağlayan CHROMagar *Candida*, BIGGY agar, *Candida* ID ve *albicans* ID agar gibi besiyerleri bulunmaktadır (38,39).

*Candida*'ların tanımlanmasında kullanılacak diğer testler karbonhidrat asimilasyon ve fermantasyon testleridir. Asimilasyon, mayaların oksijen varlığında karbon kaynağı olarak spesifik bir karbonhidratı kullanma yeteneklerini ortaya çıkarır. Fermantasyon ise karbonhidratların CO<sub>2</sub> ve etanol üretimiyle sonuçlanan anaerobik kullanımıdır (31,37). Maya tanımlaması için Wickerham ve Burton'un geliştirdiği klasik asimilasyon ve fermantasyon testleri uzun zaman almaktadır. Daha hızlı sonuç veren "Microscan Yeast Identification Panel", "Uni-Yeast Tek", "Micro Drop", "Vitek", "API 20 C AUX" gibi hazır ticari sistemler bulunmaktadır. Bunlardan en yaygın kullanılanı

karbonhidrat asimilasyon yöntemiyle 48-72 saatte sonuç veren ve geleneksel yöntemlerle %95 benzerlik gösteren “API 20 C AUX” sistemidir (1,31,37).

Son yıllarda hasta serumu ve vücut sıvılarında *Candida*'ya özgül antikor ve antijenler, metabolitleri ve hücre duvarı bileşenlerini saptamaya yönelik testler geliştirilmiştir. Bu testler özel hasta gruplarında kandideminin doğrulanmasında yardımcıdır (31,34). Kandidoz olgularında antijen ölçümü antikor ölçümüne göre daha yararlıdır (40). Serolojik açıdan antikor tarama testleri kolonizasyon-infeksiyon ayrımını yapamaması, gözlenen çapraz reaksiyonlar ve özellikle immun yetmezlikli hasta grubunda yeterli antikor yanıtı oluşmaması gibi nedenlerle başarısızdır. Antijen testleri ile manan, galaktomannan, asit proteaz, enolaz, *C.albicans*'ın ısıya duyarlı antijenleri gibi sitoplazmik antijenler aranmaktadır. Yeterli duyarlılıkta olmayan bu testlerin diğer tanı yöntemleriyle birlikte kullanılması önerilmektedir (15,35,39,40,41).

Çok kısa sürede hayatı tehdit eden klinik tablolara neden olabilen fungal infeksiyonlarda patojenin en kısa sürede tanımlanıp uygun tedaviye başlanması önemlidir. Daha çok biyokimyasal ve morfolojik fenotipin saptanmasına dayanan tanısallık yaklaşımların en önemli dezavantajı deneyimli personel ve zaman gerektirmeleridir. Erken spesifik tanı ve tedavi gereksinimlerine bağlı olarak ön plana çıkan moleküler tanı yöntemleri etyolojik tanıda hız, duyarlılık ve bazı durumlarda da özgüllük artışına neden olmaktadır (42,43).

Moleküler tanı yöntemleri; klinik örnekte *Candida* varlığının ve türünün saptanmasında, epidemiyolojik tiplendirmede, virulans faktörlerinin belirlenmesinde, antifungal direnç genlerinin araştırılmasında, mutasyon incelemelerinde, sınıflandırma ve filogenetik analizlerde kullanılmaktadır. Bu amaçla hibridizasyon yöntemleri, nükleik asit çoğaltma yöntemleri ve restriksiyon enzim analizi gibi moleküler testler kullanılabilir (44).

Yapılan ilk moleküler tanımlama çalışmaları olan ribozomal DNA tekrar bölgesinin *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) analizi ile *Candida*

türlerinin farklı büyüklükte bantlar oluşturduğu gösterilmiştir. İşaretlenmiş DNA problemlerinin kullanıldığı *southern blot* yöntemi ile RFLP'nin duyarlılığı arttırılmıştır. 1990'ların başından itibaren *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tekniği ile çok az miktardaki DNA çoğaltılıp agaroz jelde görüntülenebilmektedir. Bu yöntemle türe özgül DNA ürünlerinin çoğaltılması ve birbirine çok yakın türlerin ayrılabilmesi sağlanmıştır. 2000'li yılların başından itibaren geliştirilen *real time* (eş-zamanlı) cihazların kullanımıyla 10 pg/ml DNA gösterilebilmekte ve örnekteki fungal yük miktarı belirlenebilmektedir (45).

*Candida* türlerinin tanısında kullanılan PCR testi için hedef bölgeler; ön çoğaltma ve ileri tanımlama için kullanılanlar olarak iki gruba ayrılabilir. Ön çoğaltmada tüm mantarlar için ortak, çok tekrarlı ve ileri derecede korunmuş 18S, 5.8S ve 28S rDNA alt üniteleri veya mitokondri DNA'sı (mDNA) kullanılır. İleri tanımlamada *Internal Transcribed Spacer* (ITS1, ITS2), sitokrom p-450 lanosterol-alfa-demetilaz, aspartik proteinaz, aktin, kitin sentetaz ve ısı şok proteini kodlayan gen bölgeleri hedef olarak kullanılmaktadır. Tür tanısında duyarlılığı arttırmak için; *nested* PCR ve multipleks PCR teknikleri kullanılmaktadır. PCR ile çoğaltılan ürünler restriksiyon enzim analizi (RFLP), PCR-hibridizasyon ve baz dizi analizi teknikleri kullanılarak tür ayırımına gidilmektedir (44,46).

## **CANDIDA TÜRLERİ İÇİN EPİDEMİYOLOJİK TİPLENDİRME YÖNTEMLERİ**

Genotiplendirme yöntemleri infeksiyon kaynağının belirlenmesi, yayılımın saptanması, hastane ortamındaki klonların belirlenmesi, relaps-reinfeksiyon ayırımının yapılması, kommensalizm ve infeksiyon arasındaki ilişkinin saptanması, antifungal direnç takibi ve dirençli suşların tanımlanması amacıyla kullanılmaktadır (47).

Moleküler tiplendirme yöntemleri başlıca şu amaçlar için kullanılmaktadır:

1-Salgın araştırmalarında salgınların kaynağı ve yayılma yolları hakkındaki hipotezlerin test edilmesi. Moleküler tiplemenin en fazla gerekli olduğu alan hastane infeksiyonlarının irdelenmesidir.

2-Hastaların epidemiyolojik olarak birbiriyle olan ilişkisinin belirlenmesi

3-Reaktivasyon-reinfeksiyon ayırımı, bir kişiden arka arkaya izole edilen mikroorganizma reinfeksiyonu, reaktivasyonu veya aynı veya benzer organizma ile uyumlu bulaşın varlığını yansıtabilir. Bu durum tedavinin etkinliği, infeksiyon kontrolünün yetersizliği hakkında bilgi vermektedir.

4-Tedavi etkinliğinin belirlenmesi

5-Hastane infeksiyonları ve toplum kaynaklı infeksiyonların ayırt edilmesi

6-Laboratuvar kontaminasyonlarının saptanması

7-İlaç direncinden sorumlu gen(ler) hedef alınarak yapılan tipleme ile dirençli suşların tanımı ve yaygınlıklarının belirlenmesi

8-Toplumdaki epidemik klonların dolaşımı ve zaman içindeki prevalansını izleyerek, epidemiyolojik sörveyans ve kontrol yöntemlerinin değerlendirilmesi

9-Virülanstan sorumlu genlerin belirlenmesi ve bunları taşıyan suşların toplum içindeki yaygınlıklarının ortaya konulması

10-Yüksek riskli hastaların aktif sörveyansı (48,49).

*Candida*'lar için kullanılan genotipik tiplendirme yöntemlerini aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

1. *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) Restriksiyon enzim analizi
2. PCR-RFLP
3. *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP)
4. *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) veya *Arbitrarily Primed PCR* (AP-PCR)
5. *Repetitive Sequence-based PCR* (REP-PCR)
6. *PCR-Single Strand Conformation Polymorphism* (PCR-SSCP)
7. *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE)

8. *Multilocus Sequence Typing* (MLST)
9. DNA Dizi Analizi (Sekanslama)
10. 25S İtron Analizi

### ***Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)***

DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri (REE) ile kesimi sonrası agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve etidyum bromür ile boyanarak görüntülenen bant paternlerinin değerlendirilmesi temeline dayanır (48). RFLP, bakteriyel kromozom ve ekstra-kromozomal DNA'nın veya viral genomun restriksiyon profillerini belirlemede kullanılmaktadır. İşlem dört temel adımda gerçekleşmektedir; DNA'nın izolasyonu, özgün REE ile kesimi, kesilen DNA'nın elektroforezi ve jeldeki DNA parçalarının görüntülenmesi. Bu yöntemdeki en önemli basamak DNA'nın hücre dışına çıkarılması ve saflaştırılmasıdır (50).

### **PCR-RFLP**

Bu yöntemde, PCR ile özgün bir gen bölgesi amplifiye edildikten sonra REE ile kesilerek görüntülenir. Böylece kompleks olmayan bantlar elde edilerek ilişkili ve ilişkisiz izolatlar saptanır (47).

### ***Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)***

AFLP, genomik DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan DNA parçaların bir grubunun selektif amplifikasyonu esasına dayanır. Ekstrakte edilip saflaştırılan DNA iki REE (*EcoRI* ve *MseI* gibi) ile kesilir ve her bir REE için hazırlanmış adaptörler ile ligasyona tabi tutulur. Daha sonra adaptöre uygun baz dizilimi içeren öncüller ile seçilen fragmanların amplifikasyonu yapılır (51).

### ***Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) veya Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR)***

Rastgele seçilen, 9-10 baz çiftlik (bç) kısa primerler kullanılarak farklı DNA bölgelerinin çoğaltılması temeline dayanır (48). Aynı tür içindeki farklı suşlarda



primerlerin bağlanma yerlerinin sayısı ve birbirine uzaklıkları farklı olacağından, amplifiye edilen parçaların jel elektroforezindeki sayı ve büyüklükleri de farklılık gösterecektir. Jel elektroforezindeki her bir izolata ait bant profilleri karşılaştırılır. Bant profilleri benzer izolatlar, farklı primerlerle veya diğer bir tiplendirme yöntemiyle tekrar çalışılmalıdır. Uygulaması kolay olan ve kısa sürede sonuç veren bu yöntemin en önemli dezavantajı standardizasyonu sağlanamadığından tekrarlanabilirlik oranlarının düşük olmasıdır. Yöntemin ayırteediciliği *Repetitive Sequence-based PCR (REP-PCR)*'dan daha az, RFLP'den daha fazladır (48,50).

### ***Repetitive Sequence-based PCR (REP-PCR)***

Bu yöntem temelde RAPD PCR ile benzerdir. Burada DNA içindeki değişken sayıda, tekrarlayan bölgelere yönelik iki primer kullanılarak, bu bölgeler arasında kalan alanlar çoğaltılır ve elde edilen paternler değerlendirilir (47). RAPD'dan daha az amplifiye edilmiş DNA fragmanı oluşur. Bununla birlikte ayırım gücü iyidir ve tekrarlanabilirliği de RAPD ile karşılaştırıldığında daha iyidir (50).

### ***PCR-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP) (tek sarmal yapısal polimorfizm)***

Bu yöntemle DNA'daki tek bir mutasyon bile gösterilebilmekte ve kısa sürede çok sayıda örnek çalışılabilmektedir. 16S rRNA'ya yönelik primerler kullanılarak SSCP'i belirlemek mümkündür. Türler arası farklılıkları ortaya çıkartmada yaygın olarak kullanılan bir yöntem olmakla beraber, farklılıkların belirlenmesinde DNA dizi analizi yapılması gerekliliği nedeniyle kullanım alanı sınırlıdır (50,52).

### ***Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)***

Moleküler tiplendirme yöntemlerinin altın standardı olarak kabul edilen bu yöntemde, az sayıda ve büyük parçalar oluşturan REE ile kesim yapılır, kromozom büyüklüğünde bantlar oluşturulur. Parçalar elektroforez uygulanacak jel içindeki çukurlara yerleştirilir ve belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulur. Daha sonra jel etidyum bromürle boyanarak bant profilleri görünür hale getirilir.

Bilgisayar programları yardımıyla değerlendirilen bant profillerine göre suşların birbirleriyle olan ilişkileri ortaya konulur. Ayrım gücü ve tekrarlanabilirliği yüksek olmasına rağmen; zaman alıcı ve kompleks bir sistem olması, pahalı ekipman grektirmesi kullanımını sınırlandırır ve yöntem geniş örnek gruplarının çalışılmasına da uygun değildir (53).

### ***Multilocus Sequence Typing (MLST)***

MLST; değişik bakteri ve fungusların farklı *housekeeping* genlerinin DNA dizi analizidir. Bu yöntem klasik *multilocus enzyme electrophoresis* metoduna dayanmaktadır. Beş ile yedi *housekeeping* genin dizi analizi sonuçları ile oluşturulan veri tabanı karşılaştırmalar için kullanılır. MLST oldukça pahalı, zaman alıcı ve iş yükü fazla bir uygulamadır (54).

### **DNA Dizi Analizi (Sekanslama)**

Dizi analizi, moleküler yöntemler içinde en klasik olan ve güvenilirliği nedeniyle referans olarak kullanılan bir yöntemdir. Ancak uygulama ve değerlendirmedeki güçlükler, yüksek maliyet ve zaman alıcılık gibi dezavantajları rutin laboratuvarlarda kullanımını güçleştirir (47,50,53).

### **25S İtron Analizi**

*Candida albicans* suşlarının genotiplemesinde REE ile kesim sonrası ürünlerinin elektroforez sonucu görüntülenmesi ile DNA parmak izi elde edilmesi kullanılmıştır. *C.albicans* genomu *EcoRI* ile kesilerek tiplendirilmiştir. Bütün suşlarda ortak olarak ikisi polimorfik, biri dimorfik olan üç ayrı bant gözlenmiştir. Bu bantlar sırasıyla 6-7 kb (polimorfik), 3.7 kb veya 4.2 kb (dimorfik) ve 2.5-3 kb (polimorfik) büyüklüğündedir. Koyu boyanan bu bantları oluşturan gen bölgelerinin genomda birden fazla kopya halinde bulunduğu düşünülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda, *C.albicans*'ın bu dimorfik bölgelerinin rDNA bölgeleri olduğu anlaşılmıştır. Tespit edilen dimorfik bandın büyüklüğüne göre *C.albicans* suşları A (3.7 kb) ve B (4.2 kb) olarak iki genotipe ayrılmıştır (55).

Genotip B'de tespit edilen 4.2 kb'lık banttın 25S rRNA'yı kodlayan gen bölgesindeki 379 bç'lik bir insersiyonun (grup-I intron) sorumlu olduğu anlaşılmıştır (56). Sonraki çalışmalarda 3.7 ve 4.2 kb'lık iki bandı da taşıyan genotip C ve her ikisinde taşımayan genotip D tanımlanmıştır (57).

Grup-1 intronlar, katalitik RNA'lar içerisinde yer alan ve olgun transkript oluşumu esnasında öncü RNA moleküllerinden kendi ayrılmalarını sağlayabilen bölgelerdir. *C.albicans* 25S rRNA geninde bulunan grup-1 intron bölgesi, yaklaşık 379 bç uzunluğunda olup, kendi kendini ayırabilmek için şart olduğu bilinen dizileri taşır ve in-vitro olarak da kendi ayrılmasını katalize edebilir. Bilinen diziler içerisinde, *C.albicans* grup-1 intron konsensus dizisi en farklı olanıdır (58).

McCullough ve arkadaşları grup-I intron bölgesini amplifiye eden primerler kullanarak PCR yöntemi ile *C.albicans* izolatlarını genotiplendirmişlerdir. PCR sonucunda genotip A izolatlar yaklaşık 450 bç, genotip B ve *C.stellatoidea* yaklaşık 840 bç ürün vermişlerdir. Genotip C izolatlar yaklaşık 450 ve 840 bç'lik iki ürün, genotip D izolatlar ise 1080 bç ürün vermişlerdir. Genotip D suşların aslında *C.dublinsiensis* olduğu sonucuna varılmıştır (57). Tamura ve arkadaşları Japonya'daki izolatları aynı yöntemle değerlendirdiklerinde yaklaşık 1400 bç'lik ürün veren yeni bir genotip (genotip E) tespit etmişler ve grup-I intronunda 962 bç'lik insersiyon taşıyan bu yeni genotipinde *C.dublinsiensis* ile aynı taksonda değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varmışlardır (59).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### ***CANDIDA ALBICANS* SUŞLARI**

Çalışmaya 160 hastaya ait 194 *C.albicans* suşu dahil edildi. Bu suşların tamamı Ocak 2007-Ocak 2008 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Merkezinde farklı servislerde yatarak tedavi gören hastalardan Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen örneklerden soyutlandı. Hastaların hepsinde, mantar infeksiyonu gelişimi riskini arttıran predispozan bir faktör (immün supresyon, hematolojik malignite, solid tümör, şeker hastalığı, yanık, immatürite, cerrahi operasyon) bulunmaktaydı. Birden fazla izolatu çalışmaya dahil edilen 26 hastaya ait farklı yatışlarda, farklı zaman dilimlerinde, farklı infeksiyon bölgelerinden izole edilen 60 suş çalışmaya dahil edildi.

### **Suşların tanımlanması**

Kültürde üreyen kolonilerden *C.albicans* tanımlanması, suşların germ tüp oluşturmalarına ve mısırunu-*tween* 80 agarda klamidospor oluşturmalarına göre yapıldı.

**Germ tüp oluşturma deneyi:** Test edilecek koloniden öze ile bir miktar alınarak 1 ml insan serumu olan tüp içerisinde süspanse edildi; 37°C'de 2-3 saat inkübe edildikten sonra süspansiyondan bir damla alınıp lam-lamel arası preparat hazırlanıp mikroskopta incelendi. İncelemede ana hücreden köken alan ve başlangıç noktasında boğumlanma yapmaksızın ve uzunluğu boyunca belirgin kabarık olmayan, filament şeklinde uzantılar gösteren yapılar germ tüp pozitif olarak değerlendirildi.

**Klamidospor oluşumunun incelenmesi:** Mısırunu-*tween* 80 agar plaklarına Dalmau tekniğine uygun olarak ekim yapıldı. Bunun için saf maya kolonilerinden iğne uçlu öze ile bir miktar alınarak birbirine paralel olarak besiyerini yırtmadan ve özeyi dibe kadar batırmadan çizgi ekim yapıldı. Ekim çizgilerinin üzerine lamel kapatılarak 26°C'de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda ekimler ışık mikroskobunda diyafram kapalı olarak 10x, 20x ve 40x büyütmede incelendi. Pseudohiflerin uçlarında

ve yan dallarında görülen büyük, kalın duvarlı, yuvarlak klamidospore ile hif birleşim yerlerindeki blastospor kümeleri *C.albicans* olarak değerlendirildi.

Çalışmaya dahil edilen kökenler, çalışma anına kadar %30 gliserollü brain-heart infüzyon buyyon içerisinde – 20°C’de saklandı.

## ***CANDIDA ALBICANS* SUŞLARININ GENOTİPLENDİRMESİ**

### **DNA Eldesi**

Maya DNA’sını elde etmek için pratik, etkili ve ucuz olan kaynatma yöntemi kullanıldı (60).

- Çalışma öncesinde ilk olarak gliserollü *brain-heart infüzyon broth*’da – 20°C’de saklanan stoklar çözülerek canlandırma pasajı yapıldı.

- Moleküler analizler yapılmadan önce tüm kökenler iki kez SDA plaklarına pasajlandı.

- SDA plaklarında saf olarak üretilen *C.albicans* kolonilerinden bir öze dolusu alınarak (10-20 mg) 2 cc Sabouraud Dekstroz Broth (SDB)’da bir gece 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

- Bu süspansiyondan steril bir Eppendorf tüpüne 1 cc alınarak 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.

- Üst kısımdaki sıvı dışarıya atıldıktan sonra üzerine 200 µl steril distile su eklenerek 15-20 dakika kaynatıldı.

- Sonrasında 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.

- İçerisinde DNA’nın bulunduğu üst kısımdan 150 µl yeni bir steril Eppendorf tüpüne alındı.

## 25S İtron Analizi

25S İtron Analizi için PCR, literatürde belirtildiği şekilde CA-INT L ve CA-INT R primerleri kullanılarak gerçekleştirildi (57). Nükleotid dizisi belirlenen primer dizileri Vivantis® (Canada) firmasına sentez ettirildi (Tablo - 2).

Tablo - 2 : Çalışmada kullanılan primerler

Primer	Nükleotid dizisi
CA-INT L	5'-ATA AGG GAA GTC GGC AAA ATA CCG TAA-3'
CA-INT R	5'-CCT TGG CTG TGG TTT CGC TAG ATA GTA GAT-3'

Reaksiyon ortamı 50 µl hacim içerisinde her bir primerden 100 pmol, 200 µm dNTPmix, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10X reaksiyon tamponu, 1 U Taq DNA polimeraz ve 4 µl kalıp DNA ile oluşturulmuştur (Tablo - 3). PCR amplifikasyonu, otomatik PCR cihazında (MyCycler, Bio-Rad) gerçekleştirildi. 25S intron analizi için PCR döngüsü tablo - 4'de gösterildiği biçimde cihaza programlandı. Amplifikasyonu takiben elde edilen PCR ürünleri görüntülenene kadar - 20°C'de saklandı.

Tablo - 3: 25S intron analizinde kullanılan PCR karışımı

PCR karışımı	Miktar
“Nükleaz free” distile su	25.5 µl
10X PCR buffer	5 µl
dNTP (2 mM)	5 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	8 µl
Taq DNA polimeraz	0.5 µl
Primer 1 (100 pmol)	1 µl
Primer 2 (100 pmol)	1 µl
Kalıp DNA	4 µl
<b>TOPLAM HACİM</b>	<b>50 µl</b>

Tablo - 4: PCR döngüsü ve parametreleri

Başlangıç denatürasyon	94°C	3 dk	
Denatürasyon	94°C	1 dk	} 30 döngü
Primer bağlanması	55°C	1 dk	
Primer uzaması	72°C	2.5 dk	
Ek uzama	72°C	10	

### PCR ürünlerinin gösterilmesi

Sonuçların değerlendirilmesinde agaroz jel elektroforez yöntemi kullanıldı ve 1X TBE içerisinde %2’lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için:

- 1 gram agaroz (Prona Basica LE Agarose, AB) üzerine 50 ml TBE tamponu eklenerek mikrodalgada eritildi.

- 50°C’ye soğuduktan sonra agaroz jel içerisine 3 µl etidium bromid (Metis, Türkiye) ilave edilerek iyice karıştırıldı. Düzgün bir tabaka halinde jel tepsisine dökülüp uygun tarak yerleştirildi ve katılaşması beklendi.

- İyice katılaşan jel, elektroforez tankına (Mini-Sub Cell GT, BioRad) alınıp üzerini örtecek kadar TBE tamponu eklendikten sonra tarak çıkartıldı.

- Her agaroz jelde ilk kuyucuğa moleküler ağırlık standartı (100 bp DNA marker Q-Ladder, Heliosis<sup>®</sup>), diğer kuyucuklara da amplifikasyon ürünlerinden yüklendi. Yükleme yapılırken kullanılan tarak boyutuna uygun olarak belirli oranlarda amplifikasyon ürünü yükleme boyası ile karıştırılıp kuyucuklara yüklendi.

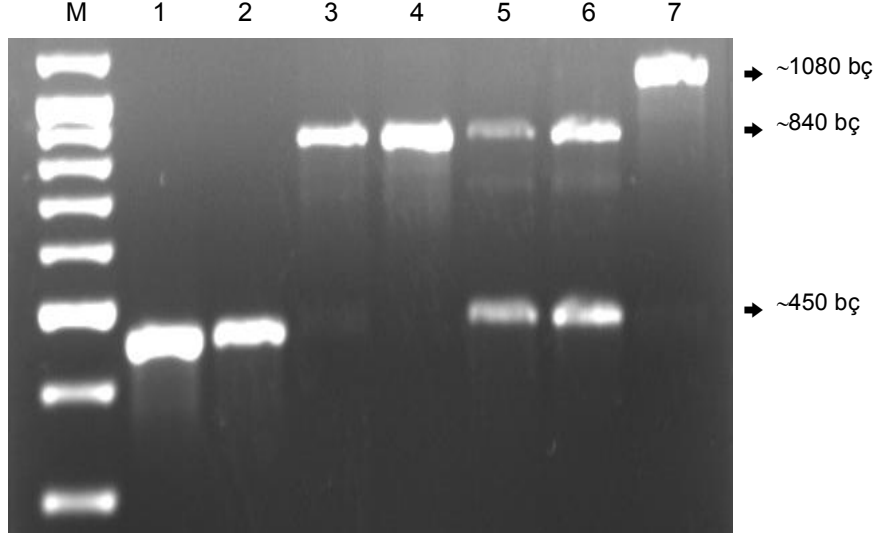
- 100 V’da 60 dakika elektroforez uygulandı.

- Elektroforez sonrası jeldeki bantlar Imaging System GEL LOGIC 2200 (Kodak<sup>®</sup>) görüntüleme sisteminde 280-340 nm dalga boyunda incelendi ve dijital olarak fotoğraflandı.

- Elde edilen bant büyüklükleri, büyüklük “marker”ı ile karışlaştırılarak değerlendirildi.

- Elde edilen ürünün büyüklüğüne göre *C.albicans* genotipleri, ~450 b tek bant Genotip A, ~840 b tek bant Genotip B, her iki bandı da taşıyanlar Genotip C, ~1080 b tek bant Genotip D ve 1400 b tek bant taşıyanlar Genotip E olarak belirlendi (şekil 1).



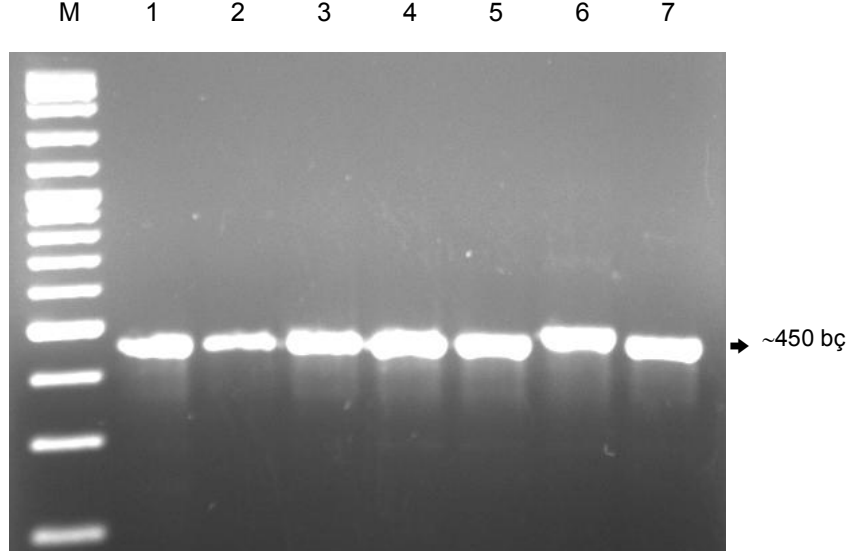


Şekil - 1: Etidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiş, *C.albicans* suşlarının 25S rDNA geninde yer alan aktarılabılır grup-1 intron bölgesinin PCR ürünleri.

Moleküler büyüklük belirteci [100 bp DNA marker Q-Ladder, Heliosis®] M ile gösterilmiş ve bantların karşılık geldiği molekül büyüklükleri sağda verilmiştir. 1. ve 2. sıralar genotip A (~450 bç) izolatları, 3. ve 4. sıralar genotip B (~840 bç) izolatları, 5 ve 6. sıralar genotip C (~450 bç ve ~840 bç), 7. sıra ise genotip D (~1080 bç) izolatları göstermektedir.

### **Subtiplerin Enzimle Kesim Yöntemi ile İdentifikasyonu**

İzolatların genotiplendirilmesi esnasında genotip A izolatların PCR ürünlerinde ağırlık farkı tespit edilmiştir (Şekil 2).



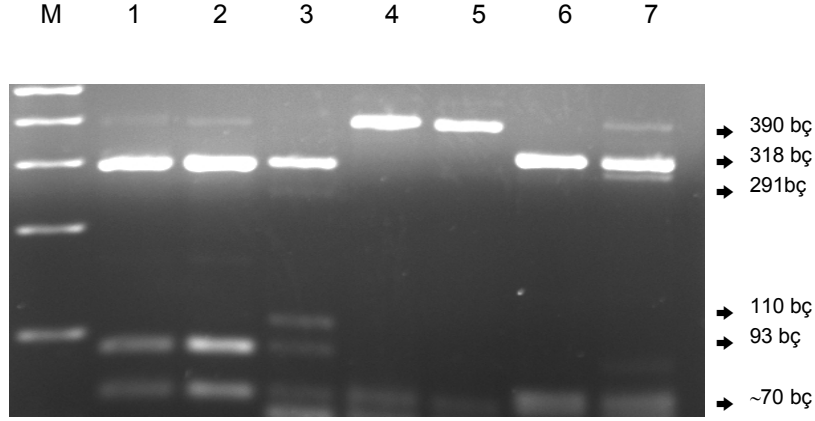
Şekil - 2: Etidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiş, genotip A *C.albicans* suşlarının PCR ürünleri.

Moleküler büyüklük belirteci [100 bp DNA marker Q-Ladder, Heliosis®] M ile gösterilmiş ve bantların karşılık geldiği molekül büyüklükleri sağda verilmiştir. 1-7. sıralar genotip A (~450 bç) izolatları içerisinde gözlenen farklı büyüklüklerdeki PCR ürünlerini göstermektedir.

Bu farklılığın moleküler temelini ortaya koymak amacıyla literatürde de belirtildiği üzere grup-1 intron bölgesi dizisi üzerinde kesim noktası bulunan, sık kullanılan ve nispeten ucuz bir enzim olan *HaeIII* (GG▼CC) restriksiyon endonükleaz enzimi (Takara, Japonya) ile 99 *C.albicans* Genotip A izolatının PCR ürünleri kesildi (61).

Bu amaçla, 25-30 µl PCR ürünü, 10U *HaeIII* enzimi ile uygun tampon (100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl, 10 mM Dithiothreitol) içerisinde bir gece 37°C'de su banyosunda inkübe edildi. Kesim ürünleri %2 (wt/vol)'lük agaroz jel (Prona Basica LE Agarose, AB) elektroforezine (Mini-Sub Cell GT, BioRad) tabi tutulduktan

sonra, etidyum bromid (Metis, Türkiye) ile boyanarak UV kamera (Imaging System GEL LOGIC 2200, Kodak®) ile görüntülenmiştir (Şekil 3).

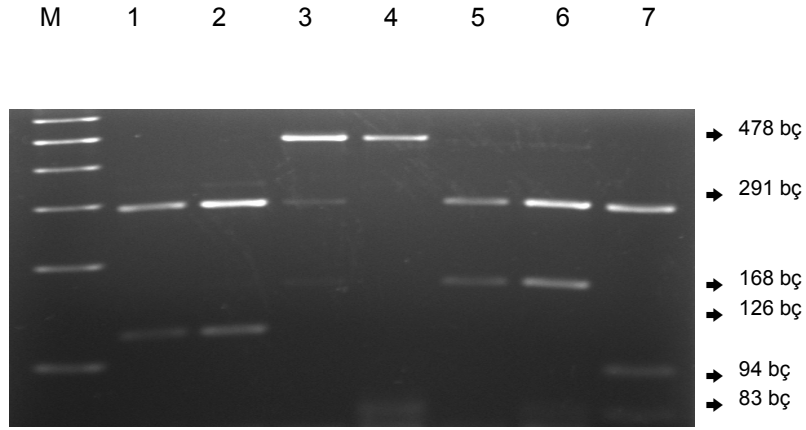


Şekil - 3: Genotip A *C.albicans* izolatlarının *HaeIII* enzimi ile kesimi.

Moleküler büyüklük belirteci [100 bp DNA marker Q-Ladder, Heliosis®] M ile gösterilmiş ve bantların karşılık geldiği molekül büyüklükleri sağda verilmiştir. 1. ve 2. sıralar subtip a (296, 93 ve 71 bç) izolatları, 3. sıra subtip b (297, 110,71 bç) izolatları, 4 ve 5. sıralar subtip c, d ve e (~390 bç ve 71 bç), 6 ve 7. sıralar subtip g (318 ve 74 bç) izolatları göstermektedir.

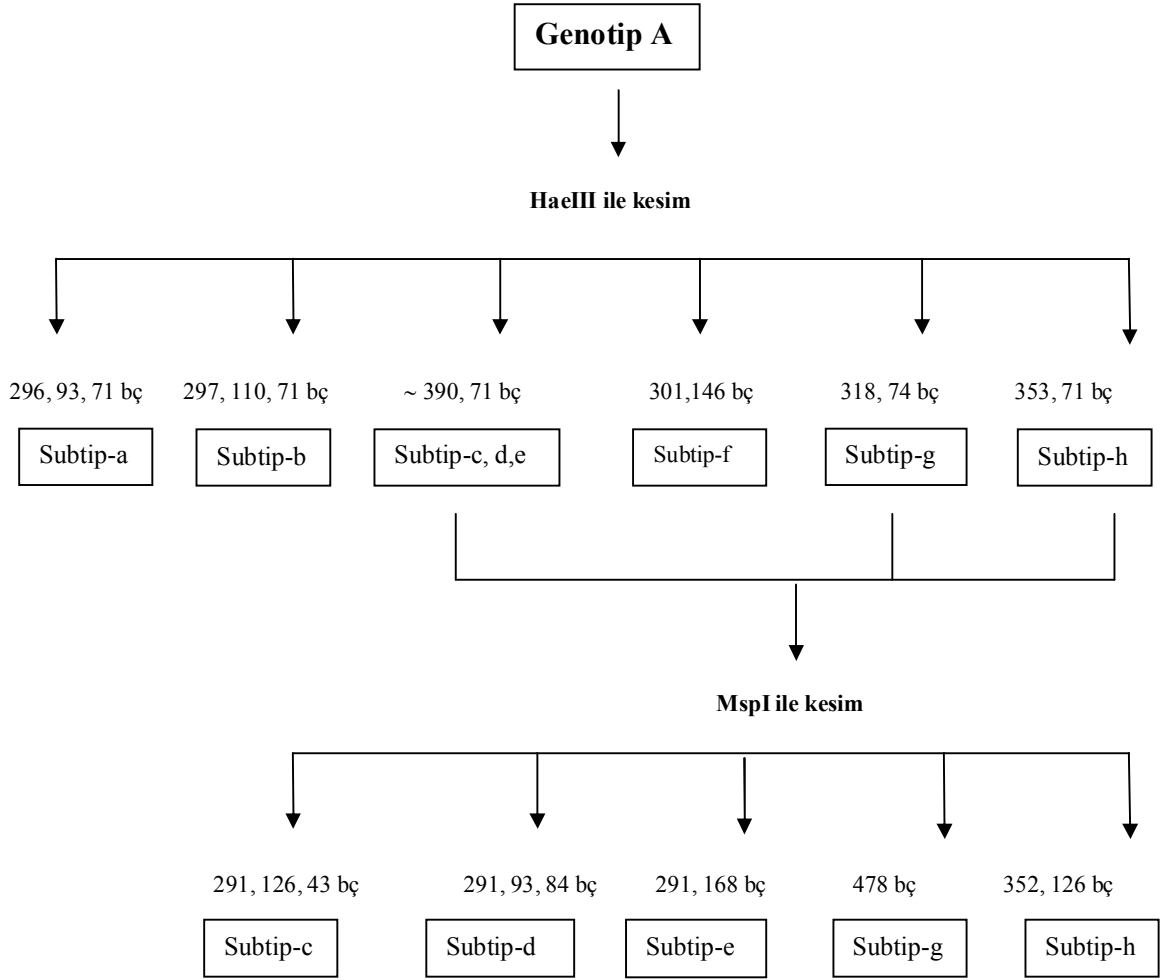
*HaeIII* restriksiyon endonükleaz analizi sonucunda elde edilen kesim paternleri; subtip a: ~296, ~93 ve ~71 bç ürün, subtip b: ~297, ~110 ve ~71 bç ürün, subtip c,d ve e: ~390 ve 71 bç ürün, subtip g: ~318 ve ~71 bç ürün ve subtip h: ~353 ve ~71 bç ürün şeklinde idi (şekil-3). *HaeIII* kesim ile, subtip a, b ve f kolayca ayırt edilmesine rağmen, ~300, ~350 ve ~71 bç ürün veren diğer subtiplerin ayırımı zor olmaktadır. Literatürde daha önceki çalışmalarda DNA dizi analizine tabi tutulduğunda, *HaeIII* ile aynı kesim paterni oluşturan bir grup içerisinde üç farklı diziye ait subtip olduğunun tespit edilmesi üzerine, bu subtipler (subtip c, d, e) ile, *HaeIII* kesimi sonrası benzer bant paternleri oluşturan subtip g ve h'ı ayırt etmek için *MspI* (C▼CGG) restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesim uygulandı.

*MspI* enzimi (Fermentas, Litvanya) ile kesim için ise, yine 25-30 µl PCR ürünü, 10U *MspI* enzimi ile uygun tampon (100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Dithiothreitol) içerisinde bir gece 37°C'de su banyosunda inkübe edildi. Kesim ürünleri %2 (wt/vol)'lük agaroz jel (Prona Basica LE Agarose, AB) elektroforezine (Mini-Sub Cell GT, BioRad) tabi tutulduktan sonra, etidyum bromid (Metis,Türkiye) ile boyanarak UV kamera (Imaging System GEL LOGIC 2200, Kodak®) ile görüntülenmiştir (Şekil 4). *MspI* ile kesim sonucunda, subtip c: 291 ve 126 bç ürün, subtip d: 291, 94 ve 83 bç ürün, subtip e: 291 ve 168 bç ürün, subtip g:478 bç ürün ve subtip h: 352 ve 126 bç ürün verdiler (şekil-4).



Şekil - 4: Subtip c, d, e, g ve h Genotip A *C.albicans* izolatlarının *MspI* enzimi ile kesimi. Moleküler büyüklük belirteci [100 bp DNA marker Q-Ladder, Heliosis®] M ile gösterilmiş ve bantların karşılık geldiği molekül büyüklükleri sağda verilmiştir. 1. ve 2. sıralar subtip c (291, 126 bç) izolatları, 3 ve 4. sıra subtip g (478 bç) izolatları, 5 ve 6. sıralar subtip e (291, 168 bç), 7. sıra subtip d (291, 94 ve 83 bç) izolatları göstermektedir.

Genotip A subtiplerinin kolay ayrımını sağlayacak *HaeIII* ve *MspI* enzimleri ile kesim sonrası elde edilen ürün paternlerinin gösterildiği şema şekil-5'de verilmiştir.



Şekil - 5: *C. albicans* Genotip A subtiplerinin ayrılması amacıyla geliştirilmiş *HaeIII* ve *MspI* enzimleri ile kesim şeması (61).

## İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesinde “SPSS for Windows Ver.15.0” paket programı kullanıldı. Saptanan genotiplerin, subtiplerin kliniklere ve örneklere göre dağılımında yüzde ve gruplar arasındaki farklılığın araştırılmasında, ki-kare ( $\chi^2$ ) testleri (Pearson chi-square, “Continuity correction”, Fisher’in kesin  $\chi^2$  testi) kullanıldı. İstatistiksel yanılma payı %5 olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ocak 2007-Ocak 2008 tarihleri arasında çeşitli servislerden gönderilen klinik örneklerden izole edilen 194 *C.albicans* suşu çalışmaya alındı.

Çalışmaya dahil edilen suşların servislere göre dağılımı tablo- 5’de verilmiştir. Çalışmaya alınan izolatların 16’sı bronkoalveolar lavaj (BAL), 37’si balgam, 75’i idrar, 28’i kan ve 38’i trakeal aspirat kültürlerinden üretilmiştir (Tablo – 6).

Tablo - 5: *C.albicans* suşlarının kliniklere göre dağılımı

Gönderilen klinik	Sayı	Yüzde
Yoğun bakım birimleri	73	37.5
Cerrahi bilimler	27	14.0
Dahili bilimler	94	48.5
Toplam	194	100.0

Tablo - 6: *C.albicans* suşlarının örneklere göre dağılımı

Örnek	Sayı	Yüzde
BAL	16	8.2
Balgam	37	19.1
İdrar	75	38.7
Kan	28	14.4
Trakeal aspirat	38	19.6
Toplam	194	100.0

Yapılan 25S intron analizi sonucu değerlendirmeye alınan 194 *C.albicans* kökeninin 99’u (%51.0) Genotip A, 57’si (%29.4) Genotip B, 37’si (%19.1) Genotip C,

1'i (%0.5) Genotip D olarak bulunmuştur. Bu yöntemle gösterilebilen ve *C.dublınıensis*'e ait diğer genotip olan Genotip E bulunmamıştır. Genotiplerin izole edildikleri bölgelere göre dağılımları tablo - 7'de verilmiştir.

Tablo - 7: 193 *C.albicans* suşunun genotiplerinin izolasyon yerine göre dağılımı.

İzolasyon bölgesi	Genotipler [n (%)]		
	A	B	C
BAL	5 (31.3)	8 (50.0)	3 (18.8)
Balgam	20 (54.1)	8 (21.6)	9 (24.3)
İdrar	40 (54.1)	26 (35.1)	8 (10.8)
Kan*	9 (32.1)	6 (21.4)	13 (46.4)*
Trakea	25 (65.8)	9 (23.7)	4 (10.5)
Toplam	99 (51.3)	57 (29.5)	37 (19.2)

p = 0.001

\* İleri analizler sonucu farkı oluşturan örneğin kan olduğu saptandı.

İnvazyon ve genotip arasındaki ilişkiyi değerlendirmek açısından örnekler kendi içinde iki şekilde gruplandırılmıştır:

- 1- İnvaziv/ Non-ınvaziv grup
- 2- Steril/ Non-steril grup

İnvaziv (kan kültürü) ve non ınvaziv (bronko alveolar lavaj, balgam, idrar ve trakeal aspirat) izolatlar ayrı ayrı değerlendirildiğinde; 28 ınvaziv izolatın 9'u (%32.1) Genotip A, 6'sı (%21.4) Genotip B ve 13'ü (%46.4) Genotip C bulunurken, 166 non-ınvaziv izolatın 90'ı (%54.2) Genotip A, 51'i (%30.7) Genotip B, 24'ü (%14.5) Genotip C ve 1'i (%0.6) Genotip D olarak tespit edilmiştir (Tablo – 8).

Tablo - 8: İnvaziv – Non-ınvaziv gruplarda genotip dağılımı

Gruplar	Genotipler [n (%)]		
	A	B	C
İnvaziv	9 (32.1)	6 (21.4)	13 (46.4)
Non-ınvaziv	90 (54.5)	51 (30.9)	24 (14.5)

p < 0.001

Steril (kan ve bronkoalveolar lavaj) ve non steril (balgam, idrar ve trakeal aspirat) izolatlar değerlendirildiğinde ise; 44 steril izolatın 14'ü (%31.8) Genotip A, 14'ü (%31.8) Genotip B ve 16'sı (%36.4) Genotip C bulunurken 150 non steril izolatın 85'i (%56.7) Genotip A, 43'ü (%28.7) Genotip B, 21'i (14.0) Genotip C ve 1'i de (%0.6) Genotip D olarak saptanmıştır (Tablo – 9).

Tablo – 9: Steril – Non-steril gruplarda genotip dağılımı

Gruplar	Genotipler [n (%)]		
	A	B	C
Steril	14 (31.8)	14 (31.8)	16 (36.4)
Non-steril	85 (57.0)	43 (28.9)	21 (14.1)

p = 0.001

İnvaziv ve nonınvaziv ile steril ve nonsteril gruplarla genotip dağılımı arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için yapılan istatistik çalışmalarında sadece bir örnekten izole edilen Genotip D gözardı edilmiştir. Buna göre her iki değerlendirilen grupta da intron genotip dağılımları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 8, 9). İnvaziv grupta istatistiksel olarak anlamlı oranda Genotip C baskın bulunurken, nonınvaziv grupta baskın Genotip A idi.

Gruplar, aktarılabılır grup-1 intron taşıyıp (Genotip B, C ve D) taşınamalarına (Genotip A) göre değerlendirildiğinde invaziv grupta yer alan 28 izolatın 19'u (%67.9)



intron bulundururken, 9'unun (%32.1) intron taşımadığı tespit edilmiştir. Non-invaziv izolatlarda bu oranlar sırasıyla 76 (%45.8) ve 90 (%54.2) olarak bulunmuştur. Örnekler steril ve non-steril olarak gruplandırıldığında ise 44 steril izolatta bu oranlar sırasıyla 30 (%68.2) ve 14 (%31.8) bulunurken; non-steril grupta 65 (%43.3) ve 85 (%56.7) olarak saptanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirilmede hem invaziv ve noninvaziv grup ( $p=0.031$ ) hem de steril ve non-steril grup ( $p=0.004$ ) arasında aktarılabılır grup-1 intron varlığı yönünden anlamlı bir fark olduğu gösterilmiştir. Aktarılabılır grup-1 intron varlığına göre izolatların karşılaştırması tablo-10'da verilmiştir.

Tablo - 10: 194 *C.albicans* suşunun aktarılabılır grup-1 intron varlığına göre genotiplerinin dağılımı.

İzolasyon bölgesi	İntron yok (Genotip A)	İntron var (Genotip B C &D)
	Genotipler [n (%)]	
<b>BAL</b>	5 (31.3)	11 (68.8)
<b>Balgam</b>	20 (54.1)	17 (45.9)
<b>İdrar</b>	40 (53.3)	35 (46.7)
<b>Kan *</b>	9 (32.1)	19 (67.9)*
<b>Trakea</b>	25 (65.8)	13 (34.2)
<b>Toplam</b>	99 (51.0)	95 (49.0)

$p = 0.039$

\* İleri analizde farkı oluşturduğu saptandı.

Genotip A izolatlarında moleküler büyüklük farklarına neden olan subtipleri gösterebilmek amacıyla *HaeIII* ve *MspI* endonükleaz enzimleriyle kesim yapıldı. *HaeIII* restriksiyon endonükleaz analizi sonucunda elde edilen kesim paternleri; subtip a: ~296, ~93 ve ~71 bç ürün, subtip b: ~297, ~110 ve ~71 bç ürün, subtip c,d ve e: ~390 ve 71 bç ürün, subtip g: ~318 ve ~71 bç ürün ve subtip h: ~353 ve ~71 bç ürün şeklinde idi (Şekil-3). *HaeIII* kesim ile, subtip a, b ve f kolayca ayırt edilmesine rağmen, ~300, ~350 ve ~71 bç ürün veren diğer subtiplerin ayırımı zor olmaktaydı. Diğer subtipleri kolayca ayırabilmek için *MspI* enzimi ile kesim uygulandı. *MspI* ile kesim sonucunda,

subtip c: 291 ve 126 bç ürün, subtip d: 291, 94 ve 83 bç ürün, subtip e: 291 ve 168 bç ürün, subtip g:478 bç ürün ve subtip h: 352 ve 126 bç ürün verdiler (Şekil-4).

Tespit edilen 99 Genotip A *C.albicans* izolatu, subtiplerinin dağılımına göre değerlendirildiğinde; 84'ünün (%85) subtip a, 3'ünün (%3) subtip b, 3'ünün (%3) subtip c, 1'inin (%1) subtip d, 3'ünün (%3) subtip e, 5'inin (%5) subtip g olduğu bulundu. Çalışmaya alınan kökenler içerisinde subtip f ve subtip h saptanmadı. Genotip A subtiplerinin, izole edildikleri yerlere göre dağılımı tablo-11'de görülmektedir.

Tablo - 11: Genotip A *C.albicans* suşlarının subtiplerinin izolasyon yerine göre dağılımı.

İzolasyon bölgesi	Subtipler								Toplam
	a	b	c	d	e	f	g	h	
<b>BAL</b>	5	0	0	0	0	0	0	0	5
<b>Balgam</b>	19	0	0	0	1	0	0	0	20
<b>İdrar</b>	40	0	0	0	0	0	0	0	40
<b>Kan</b>	3	0	2	0	2	0	2	0	9
<b>Trakea</b>	18	3	1	1	0	0	2	0	25
<b>Toplam</b>	84	3	3	1	3	0	5	0	99

## TARTIŞMA

Kanser hastaları ve organ transplantasyon hastalarına uygulanan yoğun immün süpresif tedavi, yoğun bakım hastalarına uygulanan invaziv girişimler ile çoklu antibiyoterapi ve özellikle HIV ile enfekte olan hasta sayısındaki artış gibi etkenler mantar infeksiyonu gelişimi açısından risk altında olan hasta sayısının da artmasına neden olmuştur (62,63). Tedavi protokollerindeki gelişmelere paralel olarak bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların sağ kalım oranlarındaki artış ve kullanıma giren daha duyarlı tanı yöntemleri sayesinde, bu hastalardan izole edilen mantar türlerinde belirgin bir artış olmuştur. Bununla birlikte, *Candida* türleri, bunlar arasında da *C.albicans* ilk sıradaki yerini korumaya devam etmektedir (8,64).

Son yıllarda özellikle *Candida* türlerinin neden olduğu invaziv mantar infeksiyonları artış göstermektedir. Maya türlerinin dağılımında değişiklik gözlenmekte ve nonalbicans türlerin oranı her geçen gün biraz daha artmaktadır (64,65,66). Messer ve ark. tarafından ABD, Kanada, Latin Amerika ve Avrupa'yı kapsayacak şekilde yapılan geniş kapsamlı bir sürveyans çalışması sonucunda *candida* cinsi mayaların kan dolaşımı infeksiyonlarının en sık nedenleri arasında olduğu saptanmıştır. Bu çalışmanın 2003 yılı verilerine göre %48.7 gibi oldukça yüksek bir oranla *Candida albicans* en sık etken olarak karşımıza çıkarken, bunu sırasıyla *C.parapsilosis* (%17.3), *C.glabrata* (%17.2), *C.tropicalis* (%10.9), *C.krusei* (%1.9) ve diğer daha az görülen *Candida* türleri (%6) izlemektedir (62).

İnfeksiyon etkeninin moleküler tiplendirilmesi, epidemiyolojik çalışmalarda ve uygun infeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde oldukça önemlidir (57). Moleküler tiplendirme sayesinde etken mikroorganizmaların bulaş yolları, vücutta izlediği yol saptanabilir, belli konak karakteristikleri ve belli anatomik lokalizasyonlarla genotipler arasında ilişki kurulabilir ve etkende ilaç direnci gösterilebilir (54).

*C.albicans* genotiplendirmesi amacıyla ilk olarak 1987 yılında Scherer ve ark. RFLP yöntemini kullanarak, *EcoRI* enzimi ile *C.albicans* genomunu kesmişlerdir (55).

Bu çalışmada bütün suşlarda ortak olarak bulunan dimorfik bandın büyüklüğüne göre izolatlar iki büyük gruba ayrılmış: 3.7 kb bant taşıyanlar, genotip A; 4.2 kb bant taşıyanlar, genotip B olarak sınıflandırılmıştır. Daha sonra yapılan hibridizasyon çalışmaları bu bantların rDNA bölgeleri olduğunu ortaya koymuştur. Genotip B'deki 4.2 kb'lık banttan, bu izolatların 25S rDNA geninde taşıdıkları 379 bp büyüklüğündeki aktarılabilir grup-1 intron bölgesinin sorumlu olduğu saptanmıştır. Genotip A izolatların ise bu insersiyon bölgesini taşımadıkları ve artmış flusitozin direncine sahip oldukları ortaya konulmuştur (55,56,57,58). Aynı yöntemle yapılan sonraki çalışmalarda, her iki bantı da taşıyan genotip C izolatları ve bu bantları bulundurmeyen genotip D ve E izolatları tespit edilmiştir.

İlk kez 1999 yılında McCullough ve ark. 25S intron tiplendirme yöntemi ile 439 *C.albicans* suşunu genotiplendirmişlerdir. McCullough ve ark. sadece grup-1 intron bölgesini çevreleyen primerler (CA-INT-L ve CA-INT-R primerleri) kullanarak, RFLP yöntemi ile tespit edilen *C.albicans* genotiplerini belirlemeyi başarmışlardır. Buna göre, aktarılabilir grup-1 intron taşımayan genotip A izolatları 450 bp'lik ürün, bu intronu taşıyan genotip B izolatları 840 bp'lik ürün ve genomunda bazı rDNA kopyalarında bu intronu taşıyıp bazılarında taşımayan genotip C izolatları ise 450 ve 840 bp büyüklüğünde ürünler vermiştir (67).

McCullough ve ark. çalışmalarında %65.8 genotip A, %19.4 genotip B, %12.8 genotip C ve %2 genotip D saptamışlardır. Aynı araştırmada 20 yılı aşkın bir sürede 15 farklı coğrafik bölgeden elde edilen bu 439 suş, coğrafik dağılımlarına ve izole edildikleri zaman dilimine göre değerlendirildiğinde, suşların gerek zaman gerekse coğrafik dağılımlarında anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir. Özellikle 1990 öncesi ve sonrası izole edilen suşların genotip dağılımı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuşlardır ( $p=0.009$ ). Bu çalışmaya göre 1990 öncesi genotip C suşları %5.5'lik bir orana sahipken, 1990 sonrasında bu oran %17'ye ulaşarak bu farka neden olmuştur. Genotip B sıklığı değişmezken, genotip A sıklığı %75.5'den %60.1'e inmiştir (67).

*C.albicans* genotip C izolatları hem genotip A hem de genotip B'ye ait olan iki bandı da taşımaktadır. Bu iki bandın varlığının nedeni, genotip C'nin genomunda 25S rDNA tekrarlarının bazılarında aktarılabılır grup-1 intron bulunurken, bazılarında bulunmaması ile açıklanmaktadır. Bu nedenle, genotip C izolatları, genotip A'dan genotip B'ye veya genotip B'den genotip A'ya geçiş sırasında ortaya çıkan bir ara form olabileceği gibi, genotip A ve B arasında eşeyli üremenin bir sonucu olarak da ortaya çıkıyor olabileceği kanısına varmışlardır (67). Eski izolatlarda nadirken yeni izolatlarda daha sık bulunması, genotip C'nin daha yeni ortaya çıkan bir genotip olduğunu düşündürmektedir. Genotip A izolatlarında, flusitozin ve bunun aktif metaboliti olan 5-fluorourasil direnci diğer genotiplerden daha fazla bulunmuştur. Bu nedenle genotip B'den genotip A'ya geçiş ve dolayısıyla direnç gelişimi esnasında genotip C'nin ortaya çıkması söz konusu olabilir (57).

McCullough ve ark. bu çalışmadaki suşları, izole edildikleri farklı coğrafik bölgelere göre değerlendirdiklerinde, bazı bölgelerden izole edilen suşlar arasında herhangi bir fark bulunmazken, ABD ve İsrail izolatlarının anlamlı fark gösterdiğini tespit etmişlerdir. Tüm coğrafik bölgelerle kıyaslandığında ABD'de genotip C çok nadirken (%3.4), İsrail izolatlarında %53.3 gibi oldukça yüksek bir oranda saptanmıştır. Bu sonuçlar genotip dağılımının değişik coğrafi bölgelerde de farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır (67).

Tablo-12 çeşitli ülkelerden izole edilen suşların genotip dağılımlarını göstermektedir.

Tablo-12: Değişik ülkelerde tespit edilen *C.albicans* genotiplerinin dağılımı.

Ülke (Kaynak)	Yıl	n	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	E (%)
İspanya (67)	1999	54	32 (59.3)	15 (27.8)	7 (12.9)	0	0
Fransa (67)	"	21	14 (66.7)	3 (14.3)	4 (19)	0	0
Zimbabve (67)	"	19	12 (63.2)	6 (31.6)	1 (5.2)	0	0
Singapur (67)	"	23	8 (34.8)	7 (30.4)	7 (30.4)	1 (4.3)	0
Japonya (67)	"	52	30 (57.7)	9 (17.3)	12 (23)	1 (1.9)	0
Avustralya (67)	"	23	14 (60.9)	3 (13)	2 (8.7)	4 (17.4)	0
İsrail (67)	"	30	6 (20)	6 (20)	16 (53.2)	2 (6.8)	0
Kolombiya (67)	"	20	16 (80)	2 (10)	2 (10)	0	0
ABD (67)	"	88	66 (75)	8 (20.5)	3 (3.4)	1 (1.1)	0
Japonya (59)	2001	301	172 (57.1)	66 (21.9)	56 (18.6)	5 (1.7)	2 (0.7)
Japonya (68)	2006	41	31 (75.6)	6 (14.6)	4 (9.8)	0	0
İrlanda (69)	2002	39	27 (69.2)	5 (12.8)	4 (10.3)	3 (7.7)	0
Hindistan (70)	2006	55	39 (70.9)	4 (7.3)	12 (21.8)	0	0
Malezya (71)	2005	221	167 (75.6)	48 (21.7)	4 (1.8)	2 (0.9)	0
Türkiye (72)	2004	301	151 (50.2)	54 (17.9)	96 (31.9)	0	0
Türkiye (73)	2007	110	36 (32.7)	36 (32.7)	38 (34.5)	0	0
Bu çalışma	2008	194	99 (51.0)	57 (29.4)	37 (19.1)	1 (0.5)	0

Yapılan çalışmalarda farklı bölgelerden veya yıllar içerisinde aynı bölgeden izole edilen suşların genotip dağılımlarının farklılık gösterebileceği bildirilmiştir (57,59,69,72). Örneğin Tamura ve ark. 1999-2000 yıllarında Japonya'da farklı hastanelerden topladıkları 301 *C.albicans* izolatında %57.1 genotip A, %21.9 genotip B, %18.6 genotip C ve %2.4 genotip D ve E (*C. dubliniensis*) saptarken, Hattori ve ark. yine Japonya'da 2005 yılında 41 izolatlık daha küçük bir grupta %75.6 genotip A, %14.6 genotip B ve %9.8 genotip C saptamışlardır (59,68).

Bizim çalışmamız ile Türkiye’den daha önce yapılmış çalışmaların genotip dağılım oranları arasında tam bir uyum görülmemektedir. Genotip A oranları Karahan ve arkadaşlarının çalışmasıyla benzer saptanırken, genotip B ve genotip C dağılımlarında ters bir ilişki göze çarpmaktadır (72). Hastanemiz izolatlarında genotip B sıklığı ortalamanın üzerinde bir değer olup, Singapur ve İspanya’dakine yakın oranlarda saptanmıştır. Genotip C sıklığı ise ne İsrail’deki, ne de ülkemizden yapılan diğer iki çalışmadaki kadar yüksek bulunmuştur. Ancak genotip A dağılımı İsrail ve Singapur haricinde diğer ülkelerden biraz daha düşük bulunmakla birlikte Karahan ve arkadaşlarının çalışması ile uyumlu bulunmuştur. Koyuncu ve arkadaşlarının çalışmasında ise her üç genotip arasında dengeli bir dağılım bulunmuştur (73). Bu şekildeki dağılım ise literatürde sadece Singapur’da saptanmıştır (67).

Bu sonuçlar, genotip A’da azalma ve B’de artış olmakla birlikte bölgesel verilerimizin genotip dağılımı açısından arada bir değer gösterdiğini ortaya koymaktadır. Çalışmamıza dahil edilen suşlar, Karahan ve ark ile Koyuncu ve arkadaşlarının çalışmalarından daha sonraki bir zaman dilimini kapsadığından genotip dağılım şeklinin de değişiklik göstermesi olasıdır. Yine farklı bölgelerde, farklı hastanelerden ve farklı hasta gruplarından izole edilen suşların klonal kökenlerinin farklı olması da böyle bir fark doğurmuş olabilir.

Genotip D ve daha sonra Japonya’dan izole edilen genotip E’nin, yapılan dizi analizi çalışmaları sonrasında aslında *C. dubliniensis* oldukları ortaya konmuştur (57,59). Bu çalışmalarda *C. dubliniensis*’e ait olan genotip D sıklığı yaklaşık %2, genotip E sıklığı ise %0.7 olarak bulunmuştur. Pek çok ülkede yapılan az sayıda taramalarda bu iki genotipe rastlanmazken, en yüksek genotip D oranları %17.4 ile Avustralya ve %7.7 ile İrlanda izolatlarında bulunmuştur (67). Genotip E sadece Japonya’dan Tamura ve ark. tarafından bildirilmiştir (59).

Sonradan tanımlanmış bir *Candida* türü olan *C. dubliniensis* aynen *C.albicans* gibi germ tüp pozitifdir ve klamidyospor oluşturmaktadır. Rutin uygulamada kullanılan besiyerlerinde, *C.albicans* ve *C.dubliniensis* kolonilerinin görünüşleri arasında fark

yoktur. Fenotipik özellikleri ile *C.albicans*'tan ayrımı oldukça güçtür. *C.dublinsiensis* ilk olarak 1995 yılında İrlanda'da AIDS hastalarının orofaringeal örneklerinden izole edilmiştir. Daha sonraları dünya çapında yaygın olarak yapılan retrospektif taramalarla en eski örneğin 1957 yılına ait olduğu ortaya konmuştur. *C.dublinsiensis* HIV (+) bireylerde %27, AIDS hastalarında %32 oranında ağız mukozasından izole edilirken, bu oran normal popülasyonda yalnızca %3 olarak bulunmuştur. Ağızda normal floranın bir üyesi olarak bulunabilen *C.dublinsiensis*, sıklıkla diğer *Candida* türleri, özellikle de *C.albicans* ile birlikte infeksiyon oluşturmaktadır. Ancak, özellikle HIV pozitif bireylerde tek başına da infeksiyon etkeni olabilmektedir (74).

Bizim çalışmamızda sadece bir tane, immun sistemi baskılanmış, hematolojik maligniteli bir hastanın idrar kültüründen infeksiyon etkeni olarak izole edilen Genotip D tespit edilmiş olup, Genotip E'ye rastlanmamıştır. Bu kadar düşük bulunmasının temel nedeni, özellikle bu etken için risk grubu olan HIV pozitif olduğu bilinen hastaların çalışma grubunda yer almaması olabileceği gibi HIV pozitifliği ile yakın ilişkisi gösterilen bu *Candida* türünün, bizim toplumumuzda henüz önemli bir etken olmaması şeklinde açıklanabilir. Bununla birlikte diğer bir faktör de temelde flora elemanı olarak bulunduğu ağız mukozası örneklerinin değerlendirme dahilinde olmaması olabilir.

Millar ve ark. 25S intron analizini kullandıkları çalışmalarında, çalışma grubunda fenotipik yöntemle *C.albicans* olarak yanlış tanımlanan 3 *C.dublinsiensis* kökenini başarıyla saptayan yöntemin, primer tanı laboratuvarlarında bulunmayan dizi analizine gerek kalmaksızın *C.albicans* *C.dublinsiensis* ayrımını yapmakta faydalı olabileceği üzerinde durmuşlardır (69).

Tay ve ark. rutin mikrobiyolojik tetkiklerle *C.albicans* olarak yanlış tanımlanan sistemik kandidozlu HIV negatif iki hastada CA-INT-R ve CA-INT-L primerlerini kullanarak yaptıkları 25S intron analizi sonucunda genotip D (*C.dublinsiensis*) suşu tanımlamışlardır (71).



2002 yılında ülkemizden yapılan bir çalışmada Dolapçı ve ark.ları maya mantarı izole edilen 98 kan kültürünü değerlendirmişlerdir. Bu örnekler içerisinde germ tüp testi pozitif olan 64 örneği, mısıunu-*tween* 80 agarda klamidospore oluşumu, 42°C ve 45°C’de SDA’da üreme, Staib agarda koloni morfolojisi ve hücre içi  $\beta$ -D-glukozidaz aktivitesi açısından değerlendirilmiş ve aralarında *C.dublınıensis*’e rastlamamışlardır (75).

Tekeli ve ark. yaptıkları çalışmada 2001-2004 yılları arasındaki tümü HIV negatif olduğu bilinen hastaların kan kültürlerinden izole edilen 67 *Candida* spp. örneğini değerlendirmişlerdir. Germ tüp pozitif ve klamidospore oluşturan 38 *C.albicans* kökeni arasından, fenotipik yöntemleri kullanarak ve sonrasında moleküler yöntemle de doğrularak bir tane *C.dublınıensis* saptamışlardır. Çalışmalarında, DUBF ve DUBR primerlerini kullanarak yaptıkları PCR sonucunda 288 bç’de amplifikasyon ürünü saptamışlardır. Bu izolat ülkemizden kandidemi etkeni olarak bildirilen ilk *C.dublınıensis* kökenidir (76).

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de stok kültürlerde *C.dublınıensis* varlığını göstermeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Açıkgöz ve ark. yaptıkları çalışmada 2001-2002 yılları arasında tümü HIV negatif hastalardan izole edilip stoklanmış 600 vajinal *Candida* izolatu içerisinde sadece bir tane (%0.17) *C.dublınıensis* saptamışlardır. Fenotipik yöntemlerle tanımladıkları kökeni ID-32C kiti (bioMerieux Vitek) ile *C.dublınıensis* olarak isimlendirdikten sonra DNA dizi analizi yöntemiyle de doğrulamışlar (77).

Kantarcıoğlu ve ark. ise 129 *C.albicans* kökenini fenotipik olarak inceleyerek üç tane *C. dublınıensis* izolatu tespit etmişlerdir. Bunlardan iki tanesi, iki ay arayla aynı hastanın oral kavite lezyonundan izole edilen kökenler olup, diğeri ise bir başka maligniteli hastanın balgamından izole edilmiş bir kökenidir (78). Bu sonuçlar *C.dublınıensis*’in Türkiye’de sık rastlanan bir etken olmadığını göstermektedir. Çalışmamızda saptadığımız %0.5’lik oran da bu durumu destekler niteliktedir.

Klinik seyri belirlemek, mortalite ve morbiditeyi azaltabilmek amacıyla *C.albicans* genotiplerinin antifungal direnç paternini ve kan dolaşımını invaze etme yeteneklerini araştırmaya yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda birbiri ile çelişen sonuçlar elde edilmiştir.

Luu ve ark. çalışmalarını, bir patojenin mutasyona uğrayıp klonal seleksiyondan geçtikten sonra, atası olan genotip için uygun olmayan mikroçevreleri araştırdığı ve buralara geçtiği hipotezi üzerine kurmuşlardır. Bu mikroçevrelerde evrim, konaklar arasında bulaş açısından genotipe bir üstünlük sağlamaz. Bunun kanıtlanması için, hem yüzeyel alanlardan hem de dolaşımdan örnek alınması, bu tip bir mikroevrimle ortaya çıkan genetik değişikliğin belirlenmesi ve yüzeyel doku ve dolaşımdaki bu farklı izolatların karşılaştırılması gerekir (79).

*C.albicans* popülasyonlarının klonal olduğu gösterilmiştir, ancak her popülasyon kendi içinde mikroevrime uğramaktadır (80). Üremenin klonal modeline göre, *C.albicans*'ın birbirinden bağımsız olarak üreyen farklı klonal soylardan oluşması gerekir. Eğer bu klonlar, konak adaptasyonu veya virülans gibi çeşitli özellikler açısından farklılıklar gösteriyorsa, tıbbi araştırmalara belli klonların konu olması gerekir. Bu nedenle, mikroorganizmanın konak adaptasyon mekanizmaları ve virülans faktörlerinin araştırılmasında, *C.albicans* alt popülasyonları ile klinik özellikler arasında bağlantı kurulması esastır. Bu tip korelasyonların kurulabilmesi ancak, uygun genetik belirteçlerin kullanılması ile mümkün olabilir. Bir genetik belirtecin klinik mikrobiyoloji açısından yararlı olabilmesi için, stabil olması, kullanımının kolay olması, ayırım gücünün yüksek olması ve geniş serilere uygulanabilir olması gereklidir (81).

Daha önce yapılan çalışmalarda, 25S intron analizi ile belirlenen genotip A suşlarının flusitozin ve bunun metaboliti olan 5-fluorourasile daha dirençli olduğu gösterilmiştir (57). Genotip A *C.albicans* suşlarında görülen bu dirençten, genotip A'ların grup-1 intron taşımamalarının sorumlu olduğu gösterilmiştir. Baz analoglarının, bu intronun arasına girip sekonder yapısını bozarak intronun kendi kendini ayırma mekanizmasını önlediği sonucuna varılmıştır. Bu intronun varlığı, *C.albicans*'ta

flusitozin duyarlılığına katkıda bulunan bir faktör olarak belirtilmiştir. İntron taşımayan genotip A suşları, ilacın kromozomal DNA, ribozomal RNA ve mRNA içerisine girerek oluşturduğu etkilerin sonucunda değişen düzeylerde duyarlılık göstermektedir (56). Ancak, genotip A içerisinde duyarlı suşların, genotip B ve C içerisinde de dirençli suşların bulunması nedeniyle, bu mekanizmanın flusitozin direncini belirlemede çok fazla önemli olmayabileceği, henüz tanımlanmamış başka mekanizmaların daha önemli olabileceği üzerinde durulmaktadır (59).

İnvazivlik ile genotip arasındaki ilişkiyi gösterebilmek amacıyla birçok farklı genotiplendirme yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler, birbiriyle çelişen sonuçlar ortaya koymuştur. *C.albicans* ile ortaya çıkan infeksiyonların çoğu endojen floradan köken almaktadır. Normal flora üyesi olarak bulunan invaziv popülasyonların varlığı, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde infeksiyon gelişme riskini ve bu infeksiyonun ciddiyetini önceden belirleyebilir.

Lunel ve ark. kısa tekrar dizilerini (VNTR) kullanarak kolonizasyondan invazyona geçişi araştırmışlardır. Ancak değerlendirilen VNTR'ler açısından kolonizan ve invaziv kökenler arasında anlamlı bir fark saptamamışlardır. Bununla birlikte VNTR içeren genlerle patojenite arasında anlamlı ilişki olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (82).

Dalle ve ark. da elongasyon faktör-3'ü kodlayan CEF genindeki polimorfik mikrosatellit lokusu çalışmışlardır. Majör genotipler açısından invaziv ve non-invaziv suşlar arasında anlamlı bir fark bulmazken, minör genotiplerden 135-135'i sadece kan kültürlerinden izole etmişlerdir. Bu sonuçlar ışığında kesin bir yargıya varamamakla birlikte, kompleks bir kolonizan popülasyonda yer alan bazı alt popülasyonların dolaşımı invaze edebileceği sonucuna varmışlardır (81).

Buna zıt bir görüş olarak da Boerlin ve ark. multilokus enzim elektroforezi ve Ca3 probu ile yaptıkları genotiplendirme çalışmaları sonucunda *C.albicans*

popülasyonlarının klonal olarak çoğaldığı ve invaziv kandidiazis ile ilişkili bir alt popülasyon olmadığı sonucuna varmışlardır (83).

Luu ve ark. da nükleotid polimorfizm temeline dayalı çok lokuslu bir genotiplendirme sistemi kullanarak ağız mukozası ve kan kültürü izolatlarını karşılaştırmışlar. Her iki grupta da yüksek klonal çeşitlilik bulmakla birlikte iki grup arasında allel sıklığında anlamlı fark bulamamışlardır. Buradan yola çıkarak da bu fırsatçı patojen için invazivlik potansiyelinin yaygın olduğunu ve invaziv infeksiyon gelişiminde konağa ait faktörlerin daha önemli olduğunu ileri sürmüşlerdir (79).

Millar ve ark. 21 invaziv ve 18 invaziv olmayan izolatu CA-INT-R ve CA-INT-L primer çiftini kullanarak 25S intron analizi ile incelemişlerdir. İnvaziv grupta %71.5 genotip A, %9.5 genotip B, %9.5 genotip C, ve %9.5 genotip D saptarken, noninvaziv grupta bu genotipleri sırasıyla %66.7, %16.7, % 11.1 ve %5.5 oranında bulmuşlardır. İki grup arasında genotip sıklığı ve dağılımı açısından anlamlı fark bulunmaması nedeniyle 25S intron bölgesinin invazivliği değerlendirmede uygun bir lokus olmadığı sonucuna varmışlardır (69).

Tay ve ark. 213 hastadan izole ettikleri 221 *C.albicans* izolatını CA-INT-R ve CA-INT-L primer çiftini kullanarak genotiplendirmişlerdir. Steril olmayan alanlardan alınan klinik örneklerden elde edilen 178 *C.albicans* izolatının 138'ini genotip A, 38'ini genotip B ve 2'sini genotip C olarak tanımlamışlardır. Steril örneklerden elde edilen 43 klinik izolatu 29'unu genotip A, 10'unu genotip B, 2'sini genotip C ve 2'sini de genotip D olarak tanımlamışlardır. *C.albicans* genotiplerinin dağılımını steril ve nonsteril örneklerde benzer olarak bulmuşlardır. Genotip A'yı baskın genotip olarak belirlemişlerdir (71).

Millar ve ark. yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların çeşitli anatomik bölgelerinden izole ettikleri *C.albicans* izolatlarında CA-INT-R ve CA-INT-L primer çiftini kullanarak, genotiplerin sıklığını ve dağılımını araştırmışlardır. Çalışmaya dahil

ettikleri 65 izolattan 4 farklı genotip elde etmişlerdir. *C.albicans* genotiplerinin bu çalışmada incelenen vücut alanlarında eşit dağılım gösterdiğini belirtmişlerdir (84).

Qi ve ark. oral maya taşıyıcılığında konak yaşının belirleyici bir faktör olup olmadığını araştırmışlardır. Aynı bölgeden gelen kişilerden belirli bir zaman diliminde ağız mukozasından örnekler almışlar, taşıyıcılığın ve türlerin sıklığının belirlenmesinde CHROMagar *Candida* besiyerini kullanmışlar. Bütün *C.albicans* suşlarının CA-INT-R ve CA-INT-L primer çiftini kullanarak PCR ile genotiplerini saptamışlar. *Candida* türlerinin sıklığının ve *C.albicans*'ın genotipik dağılımının yaş grupları ile değişiklik gösterdiğini, yaş arttıkça *C.albicans* sıklığının azalıp, non-albicans türlerin arttığını belirtmişlerdir. Sağlıklı genç bireylerin oral kavitelerinde genotip A'yı baskın olarak bulmuşlardır (85).

Karahan ve ark. invaziv ve invaziv olmayan infeksiyonlardan elde ettikleri 301 *C.albicans* izolatını 25S rDNA geninin aktarılabılır grup-1 intron alanına göre tasarlanmış CA-INT-R ve CA-INT-L primer çiftini kullanarak genotiplendirmişlerdir. 81 invaziv izolatın 53'ünü genotip A, 8'ini genotip B, 20'sini genotip C ve 220 invaziv olmayan izolatın 98'ini genotip A, 46'sını genotip B, 76'sını genotip C bulmuşlardır. *C.dublınıensis*'i gösteren D ve E genotiplerine rastlamamışlardır. Farklı anatomik lokalizasyonlardan izole edilen suşların genotipik dağılımının anlamlı fark oluşturduğu ve invaziv ve non-invaziv gruplar arasında genotip dağılımı açısından anlamlı bir fark olduğunu belirlemişlerdir. İnvaziv izolatlar arasında genotip A daha sık gözlenirken (invaziv izolatlarda %65.4, non-invaziv izolatlarda %44,6), non-invaziv izolatlarda intron taşıyan genotip B ve C baskın genotipler olarak belirlenmiştir. İntron varlığına göre invaziv ve non-invaziv izolatları karşılaştırdıklarında, farkın daha da anlamlı olduğunu saptamışlar. Elde ettikleri sonuçlara göre, belli genotiplerin belli anatomik bölgelere daha sıklıkla yerleşebileceği ve özellikle intron bulundurmayan genotip A'nın kan dolaşımını invaze etme yeteneğinin diğer genotiplerden daha fazla olabileceği yargısına varmışlardır. 25S intron bölgesinin, ilaç direnci yanı sıra invazivliği belirlemede de önemli bir lokus olabileceğini belirtmişlerdir (72).

Koyuncu ve ark. çalışmalarında invaziv ve non-invaziv olarak gruplandıkları toplam 110 *C.albicans* izolatını 25S rDNA'daki grup-1 intron bölgesini hedefleyen iki farklı primer çifti (CA-INT-R ve CA-INT-L ile CaL-SU-F ve CaL-SU-R primerleri) kullanarak genotiplendirmişlerdir. Her iki primer çifti ile uygulanan PCR ile alınan sonuçların uyumlu olduğunu saptamışlardır. İnvaziv örneklerle invaziv olmayan örnekler karşılaştırıldığında; kan izolatları arasında genotip B ve C'nin, oral izolatlar arasında ise genotip A ve C'nin daha sık olduğunu gözlemlemişler. Ancak gruplar arasında genotip dağılımı açısından istatistiksel olarak bir fark bulamamışlardır (73).

Bu çalışmada, izolasyon bölgesine göre suşların genotip dağılımı değerlendirildiğinde istatistik olarak anlamlı bir fark saptanmıştır (Tablo-7,  $p=0.001$ ). Örnekler kendi arasında invaziv-noninvaziv ve steril-non steril olarak gruplandırıldığında da genotip dağılımı açısından farklılık olduğu gözlenmiştir (Tablo-8, 9,  $p<0.001$  ve  $p=0.001$ ). Her iki kategoride de invaziv ve steril örneklerde genotip C yaygın olarak saptanırken, noninvaziv ve nonsteril örneklerde genotip A hakimiyeti izlenmiştir. Aktarılabılır grup-1 intron taşıyıp taşıyamalarına göre değerlendirildiğinde ise, hem invaziv ve noninvaziv grup hem de steril ve nonsteril grup arasında anlamlı fark saptanmıştır (sırasıyla  $p=0.031$  ve  $0.004$ ).

Koyuncu ve ark. da yaptıkları çalışmada, istatistiksel olarak anlamlı bulmamış olmakla birlikte, bizim sonuçlarımızda olduğu gibi kan izolatları arasında genotip B ve C'nin, invaziv olmayan izolatlar arasında da genotip A'nın daha sık olduğunu saptamışlardır (73). Elde ettiğimiz sonuçlara göre, belli genotiplerin belli anatomik bölgelere daha sıklıkla yerleşebileceği, özellikle de intron bulunduran genotip B ve C'nin kan dolaşımını invaze etme yeteneğinin diğer genotiplerden daha fazla olabileceği yargısına varabiliriz (Tablo-10,  $p=0.039$ ).

Farklı coğrafik bölgelerde, farklı hasta popülasyonlarında zaman içerisinde genotip dağılımlarının değişebildiği yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir (57,59,69,72). Her ne kadar biz bu çalışmada belli genotiplerin belli anatomik lokalizasyonlardan daha sıklıkla izole edildiğini saptadıysak da, aksini gösteren de pek çok yayın mevcuttur

(69,70,73). Bu da farklı lokalizasyonlardaki genotip dağılımının değişkenliğinin daha çok konak kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmaya dahil edilen *C.albicans* kökenlerinden 60 tanesi, 26 hastaya ait tekrarlayan veya farklı infeksiyon bölgelerinden izole edilen örnekleri içermektedir. Bu örnekler incelendiğinde aynı hastaya ait farklı örneklerde aynı genotipin yaygın olarak saptandığını görmekteyiz. Aynı hastada, aynı *C.albicans* genotipine farklı zamanlarda ve farklı infeksiyon bölgelerinde rastlandı. Kan kültüründe Genotip C saptanan iki hastanın idrar örneklerinde de Genotip C saptanırken, kanında genotip A saptanan iki hastanın idrar ve trakea kültürlerinde de aynı genotip saptandı. Yine aynı şekilde kanda Genotip B saptanan bir hastada da hem idrar hem de trakeasından Genotip B izole edildi. Ancak bunun yanı sıra diğer örneklerinde üreme olmaksızın sadece kan kültürlerinde her üç genotipinde saptandığı hastalar mevcuttu. Sadece invaziv örneklerde değil non invaziv örnekler içinde de benzer birliktelik gözlemlendi. Örneğin aynı hastalara ait idrar-trakea, BAL-balgam veya balgam-trakea gibi örnek çiftlerinde de aynı genotipler saptandı. Bu veriler de endojen floradan kaynaklanan infeksiyonu destekler nitelikteydi.

Çalışmamızda, kan kültürlerinden izole edilen ve invaziv örneklerde istatistiksel olarak fark yaratan Genotip C izolatları, belirli bir zaman diliminde yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole edilmiştir. İnsanda hastalık oluşturan *C.albicans* türlerinin çoğu, konağın kendi flora elemanlarıdır. Ancak etken, ekzojen kaynaklardan da vücuda alınabilir. Diğer örneklerinden izole edilmemiş olmakla birlikte yalnızca kan örneklerinden izole edilmesi nedeniyle bu kökenlerin ekzojen bir kaynaktan yayılmış olabileceğini de düşünebiliriz.

Çalışmamız esnasında, Genotip A izolatları arasındaki farklı subtipler de izole edildikleri bölgelere göre değerlendirilmiştir (Tablo-11). Değerlendirilen 99 Genotip A izolatu içerisinde 84 (%84.8) gibi oldukça yüksek bir oranda subtip a izole edilmiştir. Oldukça baskın olarak saptanan subtip a izolatları farklı izolasyon bölgelerinden ve yaygın olarak tüm hasta gruplarından izole edilmiştir. Çalışmamızda BAL ve idrar izolatlarından sadece subtip a izole edilmiştir. Subtip b ve d ise sadece trakeal aspirat

örneklerinde gösterilmiştir. Kan kültürü izolatlarında subtip a ile birlikte daha az olmakla birlikte subtip c, e ve g de saptanmıştır.

Sonuç olarak, hastanemize ait bu veriler, farklı anatomik lokalizasyonlardan izole edilen suşların genotipik dağılımının gruplar arasında anlamlı fark oluşturduğunu ve invaziv olan ve olmayan örnekler arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. Hastanemizde invaziv izolatlarda intron bulunduran Genotip B ve C anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur. Ancak klinik örneklerinden *C.albicans* izole edilen hastalarda bu yöntemle genotiplendirme yapılması, birbiriyle çelişen sonuçlar vermesi nedeniyle invazivliği değerlendirmek için tek başına yeterli görünmemektedir.

25S intron genotipleme yönteminin bir ek avantajı da, henüz ülkemiz için çok yaygın ve önem arz eden bir etken olmamakla birlikte, fenotipik yöntemlerle *C.albicans* izolatları içerisinde yanlış tanımlanan *C. dubliniensis* kökenlerini dizi analizine gerek kalmaksızın ayırabilmesidir.

Bir moleküler tiplendirme yönteminin rutin laboratuvar çalışmalarına uygulanabilmesi için kolay, güvenilir, ucuz ve ayırım gücünün yüksek olması gerekir. Bu çalışmada kullanılan 25S intron analizi, bu özellikleri taşıyan ve kullanımı gittikçe yaygınlaşan bir yöntemdir. Subtiplerle anatomik lokalizasyon ve invazivlik arasındaki ilişkinin belirlenmesi, genotiplerle antifungal duyarlılık ve virülans faktörleri arasında bağlantı olup olmadığının araştırılması için suş sayısı ve çeşitliliğinin artırılarak daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Böylece etkenin epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesi ile uygun tedavi ve korunma protokolleri geliştirilmesine katkıda bulunulabilir.



## SONUÇLAR

- 1- Ocak 2007- Ocak 2008 tarihleri arasında farklı servislerden gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 194 *Candida albicans* suşu çalışmaya alındı.
- 2- Suşların 73'ü (%37.5) yoğun bakım birimlerinden, 27'si (%14.0) cerrahi bilimlerden ve 94'ü (%48.5) dahili bilimlerden gönderilen örneklerden izole edildi.
- 3- Suşların 75'i (%38.7) idrar, 38'i (%19.6) trakeal aspirat, 37'si (%19.1) balgam, 28'i (%14.4) kan, 16'sı (%8.2) bronkoalveolar lavaj kültürlerinden izole edildi.
- 4- Yapılan 25S intron analizi sonucu değerlendirmeye alınan 194 *C.albicans* kökeninin 99'u (%51.0) Genotip A, 57'si (%29.4) Genotip B, 37'si (%19.1) Genotip C, 1'i (%0.5) Genotip D olarak tespit edildi.
- 5- Hastanemizden izole edilen *C.albicans* suşlarının genotip dağılımı, diğer ülkelerden hatta ülkemizin değişik bölgelerinden de farklılık göstermektedir.
- 6- 25S intron genotipleme yöntemiyle gösterilebilen ve *C.dublinsiensis*'e ait olan Genotip D bir örnekte saptanırken, diğer bir genotip olan Genotip E bulunmamıştır.
- 7- Genotiplerin izole edildikleri bölgelere göre dağılımı incelendiğinde istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır (p=0.001).
- 8- 28 invaziv (kan kültürü) izolatın 9'u (%32.1) Genotip A, 6'sı (%21.4) Genotip B ve 13'ü (%46.4) Genotip C bulunurken, 165 non-invaziv (bronko alveolar lavaj, balgam, idrar ve trakeal aspirat) izolatın 90'ı (%54.5) Genotip A, 51'i (%30.9) Genotip B, 24'ü (%14.5) Genotip C olarak tespit edilmiştir. İnvaziv ve noninvaziv izolatlar arasında genotip dağılımı açısından fark saptanmıştır (p<0.001).

9- Kırkdört steril (kan ve bronkoalveolar lavaj) izolatin 14'ü (%31.8) Genotip A, 14'ü (%31.8) Genotip B ve 16'sı (%36.4) Genotip C bulunurken, 149 non steril (balgam, idrar ve trakeal aspirat) izolatin 85'i (%57.0) Genotip A, 43'ü (%28.9) Genotip B, 21'i (14.1) Genotip C olarak saptanmıştır. Steril ve nonsteril izolatlarda genotip dağılımı açısından fark saptanmıştır (p=0.001).

10- İnvaziv ve steril örneklerde Genotip C yaygın olarak saptanırken, noninvaziv ve nonsteril örnekler arasında Genotip A hakimiyeti saptanmıştır.

11- Örnekler, aktarılabılır grup-1 intron taşıyıp (Genotip B, C ve D) taşıyamalarına (Genotip A) göre değerlendirildiğinde 28 invaziv izolatin 19'u (%67.9) intron bulundururken, 9'unun (%32.1) intron taşımadığı tespit edilmiştir. Non-invaziv izolatlarda bu oranlar sırasıyla 76 (%45.8) ve 90 (%54.2) olarak bulunmuştur. İki grup arasında aktarılabılır grup-1 intron varlığı yönünden anlamlı bir fark saptanmıştır (p=0.031).

12- Kırkdört steril izolattan 30'unda (%68.2) aktarılabılır grup-1 intron saptanırken, 14'ünde (%31.8) saptanmamıştır. Non-steril grupta ise bu oranlar sırasıyla 65 (%43.3) ve 85 (%56.7) olarak bulunmuştur. İki grup arasında aktarılabılır grup-1 intron varlığı yönünden anlamlı bir fark saptanmıştır (p=0.004).

13- Aktarılabılır grup-1 intron taşıyan genotipler invaziv ve steril örneklerden daha sıklıkla izole edilmiştir. İntron varlığı invazyonla ilişkili bulunmuştur.

14- Genotip A izolatlarının subtiplerini gösterebilmek amacıyla *HaeIII* ve *MspI* endonükleaz enzimleriyle kesim yapıldı. Restriksiyon endonükleaz analizi sonucunda 99 Genotip A *C.albicans* izolatu, subtiplerinin dağılımına göre değerlendirildiğinde; 84'ünün (%85) subtip a, 3'ünün (%3) subtip b, 3'ünün (%3) subtip c, 1'inin (%1) subtip d, 3'ünün (%3) subtip e, 5'inin (%5) subtip g olduğu bulunmuştur. Genotip A izolatlar içerisinde belirgin bir subtip a hakimiyeti gözlenmiştir.

## ÖZET

### **Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida albicans* Kökenlerinin Moleküler Analizi** **Dr. Melahat Gürbüz**

Son yıllarda özellikle HIV enfeksiyonu, kemoterapi, transplantasyon gibi nedenlere bağımlı immün sistemi baskılanmış hasta sayısında artış olması mantar enfeksiyonları sıklığında artışı da beraberinde getirmiştir. Etkenler arasında, *Candida* türleri, özellikle de *C.albicans* ilk sıradaki yerini korumaya devam etmektedir.

Bu çalışmada, Pamukkale Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 194 *C.albicans* suşu 25S rDNA'daki grup-1 intron bölgesini hedefleyen CA-INT-R ve CA-INT-L primer çifti kullanılarak tiplendirildi. Genotip A, B, C ve D sıklıkları sırasıyla %51.0, %29.4, %19.1 ve %0.5 olarak tespit edildi. Bu yöntemle gösterilebilen ve *C.dubliniensis*'e ait diğer genotip olan Genotip E bulunmadı. İnvaziv (kan kültürü, n=28) ve non-ınvaziv (bronko alveolar lavaj, balgam, idrar ve trakeal aspirat, n=166) izolatlar ayrı ayrı değerlendirildiğinde; genotip sıklıkları sırasıyla Genotip A %32.1-%54.2, Genotip B %21.4-%30.7 ve Genotip C %46.4-%14.5 olarak tespit edildi. İnvaziv grupta istatistiksel olarak anlamlı oranda Genotip C baskın bulunurken, non-ınvaziv grupta Genotip A baskın idi ( $p<0.001$ ). Aktarılabılır grup-1 intron taşıyıp taşıyamalarına göre değerlendirildiğinde, ınvaziv ve non-ınvaziv grup arasında anlamlı fark saptandı ( $p=0.031$ ).

Sonuç olarak hastanemizde ınvaziv izolatlarda, intron bulunduran Genotip B ve C anlamlı şekilde daha yüksek bulundu. Klinik örneklerinden *C.albicans* izole edilen hastalarda bu yöntemle genotiplendirme yapılması, birbiriyle çelişen sonuçlar vermesi nedeniyle ınvazivliği değerlendirmek için tek başına yeterli görünmemektedir. 25S intron genotipleme yönteminin ek bir avantajı da, fenotipik yöntemlerle *C.albicans*

izolatları içerisinde yanlış tanımlanan *C.dublınıensis* kökenlerini dizi analizine gerek kalmaksızın ayırabilmesidir.

Genotiplerle anatomik lokalizasyon ve invazivlik arasındaki ilişkinin belirlenmesi, antifungal duyarlılık ve virülans faktörleri arasında bağlantı olup olmadığının araştırılması için suş sayısı ve çeşitliliğinin arttırılarak daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Böylece etkenin epidemiyolojik özelliklerinin belirlenmesi ile uygun tedavi ve korunma protokolleri geliştirilmesine katkıda bulunulabilir.

Anahtar Sözcükler: *Candida albicans*, Genotiplendirme, PCR, 25S

## SUMMARY

### Molecular Analysis of *Candida albicans* Isolates from Clinical Specimens

Dr. Melahat Gurbuz

The increasing population of immunocompromised patients due to HIV infection, chemotherapy, organ transplantation and the common use of indwelling intravascular devices have significantly increased the incidence of fungal infections. *Candida* species, especially *Candida albicans* is still the most frequently isolated pathogen.

In this study, a total of 194 *C.albicans* strains, isolated from various clinical specimens sent from Research and Training Center of Pamukkale University, were genotyped by using CA-INT-R and CA-INT-L primer pairs designed to span the region that includes the side of the transposable group-1 intron in the 25S rDNA gene. The frequencies of Genotypes A, B, C and D were found as 51.0%, 29.4%, 19.1% and 0.5%, respectively. Genotype E, the other genotype which represents *C.dubliniensis* was not found. When invasive (blood culture isolates, n=28) and non-invasive (broncho alveolar lavage, sputum, urine and tracheal aspirate, n=166) isolates were compared, the genotype frequencies were as follows; Genotype A: 32.1%-54.2%, Genotype B: 21.4%-30.7% and Genotype C: 46.4%-14.5%. Statistically significant difference was observed between invasive and non-invasive groups ( $p<0.001$ ), genotype C was more prevalent among invasive isolates whilst genotype A in non-invasive ones. When compared according to the presence of the group-1 intron, significant difference has been found between invasive and non-invasive groups ( $p=0.031$ ).

As a result, Genotype B and C which carry group-1 intron were found significantly more prevalent among invasive isolates in our hospital. Genotyping *C.albicans* isolates from clinical specimens of patients only by using this method, was not seem to be an adequate marker to determine invasiveness with those conflicting

outcomes. The additional advantage of 25S intron analyse was the differentiation of *C.dublinsiensis* from *C.albicans* isolates, without the need for sequence analysis.

Large scale studies must be performed on isolates from various clinical specimens in order to understand the relation between anatomical localization and invasiveness, and association between antifungal susceptibility and virulence factors. It may contribute to develop appropriate therapy and conservation protocols by determining epidemiological features of the ethiological agent.

Key Words: *Candida albicans*, Genotyping, PCR, 25S

## KAYNAKLAR

- 1- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: Lippincott, 1997: 983-1069.
- 2- Calderone RA. Taxonomy and biology of *Candida*. In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. 1<sup>th</sup> ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2002: 15-27.
- 3- Rinaldi GM. Biology and pathogenicity of *Candida* species. In: Bodey PG, editor. *Candidiasis, pathogenesis, diagnosis and treatment*. New York: Raven Pres, 1993: 1.
- 4- Edwards JE. *Candida* species. In: Mandell GL, Benett JE, Dolin R, editors. *Principles and Practise of Infectious Diseases*. 5<sup>th</sup> ed. Pennsylvania: Churchill Livingstone, 2000: 2656-2674.
- 5- Rodriguez-Todela JL, Martinez-Suarez JV. Improved medium for voriconazole susceptibility testing of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38: 45-48.
- 6- Herrera JR, Elorza MV, Valentin E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* 2006;6: 14–29.
- 7- Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. *Medical mycology*. Zinsser Microbiology. 20<sup>th</sup> ed. Connecticut: Appleton and Lange, 1992: 1071-1157.
- 8- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007;20: 133-163.

- 9- Romani L, Bistoni F, Puccetti P. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol* 2002;10: 508-514.
- 10- Richardson MD, Warnock DW. Fungal infection. Diagnosis and Management. 2<sup>nd</sup> ed. England: Blackwell Science, 1997: 78.
- 11- Fridkin SK, Jarvin VR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev* 1996;9: 499-511.
- 12- Romani L. Immunology of invasive candidiasis. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. 1<sup>th</sup> ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2002: 223-241.
- 13- Yücesoy M. *Candida* türlerinin virulans faktörleri ve konağa ait faktörler. *Dokuz Eylül Üniv Tıp Fak Derg* 1999;13: 377-388.
- 14- Sohnle PG, Bhatti M, Wagner DK. Immunology of cutaneous Candidiasis. In: Calderone RA, editor. *Candida and Candidiasis*. 1<sup>th</sup> ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2002: 211-221.
- 15- Tümbay E. *Candida* türleri. Editörler: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 1081-1086.
- 16- Yücel A, Kantarcıoğlu S. *Candida*'ların patojenlik belirtgenleri. *Cerrahpaşa J Med* 2000;31: 172-186.
- 17- Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001;9: 327-335.



- 18- Brown AJP. Expression of growth form-specific factors during morphogenesis in *Candida albicans*. In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. 1<sup>th</sup> ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2002: 87-93.
- 19- Arıkan S. Mantarlarda pleomorfizm. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Bodrum: Kongre Kitabı, 2003: 77-86.
- 20- İnci R. Mantarların yapıları, üreme özellikleri ve sınıflanması. Editörler: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 1015-1021.
- 21- Öztaş M. *Pityriasis versicolor* ve *Candida* infeksiyonları. 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Ankara: Kongre Kitabı, 2001: 85-89.
- 22- Hostetter MK. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. Clin Microbiol Rev 1994;7: 29-42.
- 23- İnci R. *Candida* infeksiyonlarının patogeneğinde konağın rolü. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir: Kongre Kitabı, 2002: 71-83.
- 24- Ener B. *Candida* infeksiyonlarının patogenezi: Etkenin rolü. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir: Kongre Kitabı, 2002: 65-70.
- 25- Glee PM, Sundstrom P, Hazen KC. Expression of surface hydrophobic proteins by *C.albicans* in vivo. Infect Immun 1995;63: 1373-1379.
- 26- Ghannoum MA, Abu-Elteen KH. Pathogenicity determinants of *Candida*. Mycoses 1990;33: 268-282.
- 27- Douglas JL. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol 2003;11: 30-36.

28- Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. FEMS Yeast Res 2006;6; 979-986.

29- Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP, Ryang DW. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J Clin Microbiol 2002;40: 1244-1248.

30- Dexter HH. Acquisition, transport and storage of iron by pathogenic fungi. Clin Microbiol Rev 1999;12: 394-404.

31- Larone DH. Yeast and yeast like organisms. Medically Important Fungi: A Guide to Identification. 4<sup>th</sup> ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2002: 109-143.

32- Kuştimur S. *Candida* patogenezinde rol oynayan faktörler. Mikrobiyol Bül 1994;28: 175-181.

33- Yücel A, Kantarcıoğlu S. Hastane kaynaklı mikozların epidemiyolojisi. Cerrahpaşa J Med 2001;3: 259-269.

34- Hilmioğlu S. *Candida* infeksiyonlarının laboratuvar tanısı: Klasik tanıda izlenecek yol ne olmalı? *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir: Kongre Kitabı, 2002: 125-133.

35- Mers WG, Roberts GD. Algorithms for detection and identification of fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2003: 1668-1685.

36- Yıldırım ŞT. Mantar İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı. Editörler: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 1129-1144.

37- Yücel A, Kantarcıoğlu S. Some important changes in taxonomy of *Candida albicans*. Cerrahpaşa J Med 2000;30: 236-246.

38- Willinger B, Hillowoth C, Selitsch B, Manafi M. Performance of *Candida* ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar *Candida*. J Clin Microbiol 2001;39: 3793-3795.

39- Alam FF, Mustafa AS, Khan ZU. Comparative evaluation of (1, 3)- $\beta$ -D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. BMC Infect Dis 2007;7: 103-111.

40- Çerikçioğlu N. Mantar İnfeksiyonlarında Seroloji ve Deri Testleri. Editörler: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 1145-1158.

41-Reiss E, Obayashi T, Orle K, Yoshida M, Zancope-Oliveira RM. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. Med Mycol 2000;38(Suppl-1): 147-159.

42- Costa MRE, Lacaz CDS, Kawasaki M, Camargo ZP. Conventional versus molecular diagnostic tests. Med Mycol 2000;38(Suppl-1): 139-145.

43- Saraçlı MA. Mikoza'nın Moleküler Tanısı: Neredeyiz? 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Konya: Kongre Kitabı, 2005: 33-45.

44- Hughes T, Rogers TR, Haynes K. PCR Diagnostics in medical mycology. In: Bridge PD, Arora DK, Reddy CA, Elander RP, editors. Applications of PCR in mycology. CABI Publishing, 1998: 267-287.

- 45- Kalkancı A. Etken Mantarların Klinik Örnekte Moleküler Yöntemlerle Gösterilmesi ve Tanımlanması. 4. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara: Kongre Kitabı, 2006: 132-143.
- 46- Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of Candidemia: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. J Clin Microbiol 2002;40: 2483-2489.
- 47- Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. Clin Microbiol Rev 2000;13: 332-370.
- 48- Arbeit RD. Laboratory Procedures for the Epidemiologic Analysis of Microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, editors. Manual of Clinical Microbiology. 8<sup>th</sup> ed. Washington DC: American Society for Microbiology press, 2003: 116-139.
- 49- Durmaz R. Moleküler epidemiyolojinin prensipleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Editör: Durmaz R. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 139-147.
- 50- Yağcı A. RFLP ve PCR bazlı tipleme yöntemleri. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Editör: Durmaz R. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 149-160.
- 51- Taylor WJ, Geiser MD, Burt A. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. Clin Microbiol Rev 1999;1: 126-146.
- 52- Garcia-Hermoso D, Cabaret O, Lecellier G, Desnos-Ollivier M, Hoinard D, Raoux D, Costa JM, Dromer F, Bretagne S. Comparison of microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing for DNA-based typing of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2007;45: 3958-3963.

- 53- Lemaignere CG, Roillides E, Hacker J, Müller MC. Molecular typing for fungi a critical review of possibilities and limitations of currently and future methods. Clin Microbiol Infect 2003;9: 172-185.
- 54- Hoşoğlu S. Moleküler epidemiyolojide temel yöntemler. 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara: Kongre Kitabı, 2004: 60-63.
- 55- Scherer S, Stevens DA. Amplification of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. J Clin Microbiol 1987;25: 675-679.
- 56- Mercure S, Montplaisir S, Lemay G. Correlation between the presence of a self-splicing intron in the 25S rDNA of *C.albicans* and strains susceptibility to 5-fluorocytosine. Nucleic Acids Res. 1993;21: 6020-6027.
- 57- McCullough MJ, Klemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. J Clin Microbiol 1999;37: 417-421.
- 58- Mercure S, Cousineau L, Montplaisir S, Belhurneur P, Lemay G. Expression of a reporter gene interrupted by the *Candida albicans* group1 intron is inhibited by base analogs. Nucleic Acids Res 1997;25: 431-437.
- 59- Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, Yazawa K, Nishimura K. Molecular characterization of new clinical isolates of *C.albicans* with group 1 intron. J Clin Microbiol 2001;39: 4309-4315.
- 60- Balaban N, Karahan ZC, Mumcuoğlu İ, Çayırılı A, Kuştimur S. *Candida albicans* 25S intron genotipleri ile antifungal duyarlılıkları arasındaki ilişkinin araştırılması. Mikrobiyol Bült 2007;2: 245-251.

61. Karahan ZC, Akar N. Subtypes of genotype A *Candida albicans* isolates determined by restriction endonuclease and sequence analyses. *Microbiol Res* 2005;160: 361-366.
- 62- Messer SA, Jones RN, Fritsche TR. International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2003). *J Clin Microbiol* 2006;44: 1782-1787.
- 63- Richardson M, C. Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(suppl 4): 5-24.
- 64- Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* 2007;45: 321-346.
- 65- Diekema DJ, Messer SA, Brueggemann AB, Coffman SL, Doern GV, Herwaldt LA, Pfaller MA. Epidemiology of Candidemia: 3-year results from the emerging infections and epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol* 2002;40: 1298-1302.
- 66- Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari MP, Rosso R, Pallavicini FB, Viscoli C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* 2006;6: 21-26.
- 67- McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular epidemiology of the global and temporal diversity of *Candida albicans*. *Clin Infect Dis* 1999;29: 1220-1225.
- 68- Hattori H, Iwata T, Nakagawa Y, Kawamoto F, Tomita Y, Kikuchi A, Kanbe T. Genotype analysis of *Candida albicans* isolates obtained from different body locations of patients with superficial candidiasis using PCRs targeting 25S rDNA and ALT repeat sequences of the RPS. *J Dermatol Sci* 2006;42: 31-46.

- 69- Millar BC, Moore JE, Xu J, Walker MJ, Hedderwick S, McMullan R. Genotypic subgrouping of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by 25S intron analysis. *Lett Appl Microbiol* 2002;35: 102-106.
- 70- Kumar CPG, Hanafy AM, Katsu M, Mikami Y, Menon T. Molecular analysis and susceptibility profiling of *Candida albicans* isolated from immunocompromised patients in South India. *Mycopathologia* 2006;161: 153-159.
- 71- Tay ST, Chai HC, Na SL, Ng KP, Soo-Hoo TS. Molecular subtyping of clinical isolates of *Candida albicans* and identification of *Candida dubliniensis* in Malaysia. *Mycopathologia* 2005;159: 325-329.
- 72- Karahan ZC, Güriz H, Ağırbaşı H, Balaban N, Göçmen JS, Aysev D, Akar N. Genotype distribution of *Candida albicans* isolates by 25S intron analysis with regard to invasiveness. *Mycoses* 2004;47: 465-469.
- 73- Koyuncu E, Dolapçı İ, Karahan C, Tekeli A, Akan ÖA. İnvaziv ve invaziv olmayan örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarının genotip dağılımı. *Ankara Univ Tıp Fak Mecm* 2007;60: 53-56.
- 74- Sullivan D, Coleman D. *Candida dubliniensis*: Characteristics and identification. *J Clin Microbiol* 1998;36: 329-334.
- 75- Dolapci I, Tekeli A, Gocmen JS, Aysev D, Guriz H. Investigation of *Candida dubliniensis* in *Candida* spp. positive hemocultures. *APMIS* 2002;110: 391-395.
- 76- Tekeli A, Akan OA, Koyuncu E, Dolapci I, Uysal S. Initial *Candida dubliniensis* isolate in *Candida* spp. positive haemocultures in Turkey between 2001-2004. *Mycoses* 2006;49: 60-64.

77- Acikgoz ZC, Sancak B, Gamberzade S, Misirlioglu M. Prevalence of *Candida dubliniensis* among the stored vaginal *Candida* isolates in a Turkish hospital. *Mycoses* 2004;47: 393-396.

78- Kantacıoğlu SA, Yücel A. The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strains among *Candida albicans* isolates from immunocompromised or otherwise debilitated HIV-negative Turkish patients. *Rev Iberoam Micol* 2002;19: 44-48.

79- Luu NL, Cowen LE, Sirjusingh C, Kohn LM, Anderson JB. Multilocus genotyping indicates that the ability to invade the bloodstream is widespread among *Candida albicans* isolates. *J Clin Microbiol* 2001;39: 1657-1660.

80- Lockhart SR, Fritch JJ, Meier AS, Schröppel K, Srikantha T, Galask R, Soll DR. Colonizing populations of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo microevolution through C1 fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and C1 sequencing. *J Clin Microbiol* 1995;33: 1501-1509.

81- Dalle F, Franco N, Lopez J, Vagner O, Caillot D, Chavanet P, Cuisenier B, Aho S, Lizard S, Bonnin A. Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. *J Clin Microbiol* 2000;38: 4554-4559.

82- Lunel FV, Liciardello L, Stefani S, Verbrugh HA, Melchers WJG, Meis JFGM, Scherer S, Van Belkum A. Lack of consistent short sequence repeat polymorphisms in genetically homologous colonizing and invasive *Candida albicans* strains. *J Bacteriol* 1998;180: 3771-3778.

83- Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Goudet J, Durussel C, Pagani JL, Chave JP, Bille J. Typing *Candida albicans* oral isolates from human immunodeficiency virus infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1996;34: 1235-1248.



84- Millar BC, Xu J, McMullan R, Walker MJ, Hedderwick S, Moore JE. Frequency and distribution of group 1 intron genotypes of *Candida albicans* colonising critically ill patients. Br J Biomed Sci 2005;62: 24-27.

85- Qi QG, Hu T, Zhou XT. Frequency, species and molecular characterization of oral *Candida* in hosts of different age in China. J Oral Pathol Med 2005;34: 352-356.