

156538

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
CANDIDA ALBICANS SUŞLARININ GENOTİPİK DAĞILIMI**

Dr. Zeynep Ceren KARAHAN

**ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER PATOLOJİ ve GENETİK BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nejat AKAR**

2004- ANKARA

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
CANDIDA ALBICANS SUŞLARININ GENOTİPİK DAĞILIMI

Dr. Zeynep Ceren KARAHAN

ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER PATOLOJİ ve GENETİK BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nejat AKAR

Bu tez Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından 20030809104 proje numarası ile desteklenmiştir.

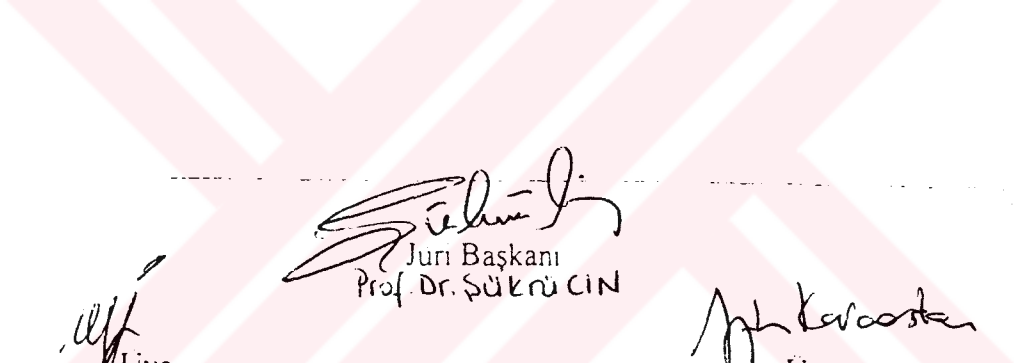
2004- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı

Tezli Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11 / 02 / 2004.


Jüri Başkanı
Prof. Dr. ŞÜKRÜ CİN
Üye
Prof. Dr. Nejat AKAR (Danışman)
Üye
Prof. Dr. Aydın KARAASLAN
Üye
Prof. Dr. Derya AYSEV
Üye
Doç. Dr. Mustafa TEKİN
Dinleyici Listesi ektedir

ÖNSÖZ

Moleküler tanı yöntemleri ile tanışmamı sağlayarak önümde yeni ufuklar açan ve her konuda desteğini gördüğüm değerli hocam, Prof. Dr. Nejat AKAR'a.

Laboratuara geldiğim ilk günden itibaren, attığım her adımda bana yol gösteren sevgili ablam Uzm. Bio. Ece AKAR'a.

Çalışma süşlarının temininde her türlü kolaylığı gösteren, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Cebeci Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı Sorumlusu Prof. Dr. Derya Aysev ve Uzm. Dr. Haluk Güriz ve tüm laboratuvar çalışanlarına; Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölüm Şefi Uzm. Bio. Neriman Balaban ve Uzm. Dr. Altan Çayırılı'ya; İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Bizim Lösemili Çocuklar Vakfı Mikrobiyoloji Laboratuvarı sorumlusu Uzm. Dr. Handan Ağırbaşı'ya; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları ABD Mikrobiyoloji Laboratuvarından Doç. Dr. J. Sedef Göçmen'e; Ankara Refik Saydam Hıfzısıha Enstitüsü Tüberküloz Laboratuvarından Uzm. Dr. Salih Cesur'a.

Birlikte çalışmaktan her zaman büyük mutluluk ve gurur duyduğum bütün çalışma arkadaşlarıma.

Hayatım boyunca attığım her yeni adımda beni yüreklendiren anneme ve babama, çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen eşime ve gösterdiği anlayış için oğluma teşekkür ederim.

Bu tez Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 20030809104 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Şekiller	vi
Tablolar	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Mantarlar	2
1.2 <i>Candida</i> Türleri ve <i>Candida albicans</i>	8
1.3 <i>Candida</i> Enfeksiyonlarının Kliniği	13
1.3.1 Yüzeysel Kandidozlar	13
1.3.2 Derin Kandidozlar	15
1.4 <i>Candida</i> Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı	19
1.5 Mantarların Tiplendirilmesi ve Genotiplendirme	21
1.5.1 Sık Kullanılan Genotiplendirme Yöntemleri	24
1.5.2 25S İntron Analizi ile Genotiplendirme	27
2. GEREÇ ve YÖNTEM	30
2.1 <i>C. albicans</i> Suşları	30
2.2 Genotiplerin PCR Yöntemi ile İdentifikasyonu	30
2.3 Subtiplerin Enzimle Kesim Yöntemi ile İdentifikasyonu	31
2.4 PCR Ürünlerinin Temizlenmesi	33
2.5 DNA Dizi Analizi	34
2.6 İstatistiksel Analiz	35
3. BULGULAR	36
4. TARTIŞMA	41
5. SONUÇ	47
ÖZET	48
SUMMARY	49
KAYNAKLAR	50

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABCT	: ATP Binding Casette Transporters (ATP bağlayan kaset taşıyıcıları)
AP-PCR	: Arbitrarily primed PCR
bç	: baz çifti
BHI	: Brain-heart infüzyon agar
CHEF	: Contour-clamped homogeneous electric field gel electrophoresis
CİE	: Counter immünelektroforez
CMT	: Cornmeal-Tween 80 agar
DM	: Diabetes mellitus (Şeker hastalığı)
ID	: İmmünodiffüzyon testi
KMK	: Kronik mukokutanöz kandidiyaz
LA	: Lateks aglütinasyon
LCR	: Ligase Chain Reaction (Ligaz Zincir Reaksiyonu)
MF	: Major Facilitators (Major fasilitatörler)
NASBA	: Nucleic-acid sequence based amplification
OFAGE	: Orthogonal-field alternation gel electrophoresis
ORF	: Open reading frame (açık okuma bölgeleri)
PCR	: Polimeraz Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PFGE	: Pulsed field gel electrophoresis
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
REA	: Restriksiyon Enzim Analizi
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism
RT-PCR	: Reverse transcription-PCR
SABHI	: Sabouraud dekstroz + Brain-heart infüzyon agar
Sap	: Salgısal aspartik proteinaz
SDA	: Sabouraud dekstroz agar
SDA	: Strand displacement amplification
SSCP	: Single strand conformation polymorphism (Tek iplikçikli konformasyon polimorfizmi)
SSS	: Santral sinir sistemi
TMA	: Transcription mediated amplification
VNTR	: Variable number tandem repeats

ŞEKİLLER

Şekil-1 : 25S intron analizi ile belirlenen genotipler.

Şekil-2 : Ethidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiş, *C.albicans* suşlarının 25SrDNA geninde yer alan aktarılabılır grup-1 intron bölgesinin PCR ürünleri. Moleküler büyüklük belirteci [ϕ X174 HaeIII kesim (Fermentas, Lituanya)] M ile gösterilmiş, ve bantların karşılık geldiği molekül büyüklükleri sağda verilmiştir. 1. ve 2. sıralar genotip A (~450bç) izolatları, 3. ve 4. sıralar genotip B (~840bç) izolatları, 6, 7 ve 8. sıralar ise genotip C (~450bç ve ~840bç) izolatları göstermektedir. 5. sıra, DNA içermeyen negatif kontrol sütunudur.

Şekil-3 : Etidyum bromide ile boyanarak UV altında görüntülenmiş, genotip A *C.albicans* suşlarının PCR ürünleri. Moleküler büyüklük belirteci [ϕ X174 HaeIII kesim (Fermentas, Lituanya)] M ile gösterilmiş, ve bantların karşılık geldiği molekül büyüklüğü sağda verilmiştir. 1-9. sıralar genotip A (~450bç) izolatları içerisinde gözlenen farklı büyüklüklerdeki PCR ürünlerini göstermektedir.

Şekil-4 : Genotip A *C.albicans* izolatlarının HaeIII enzimi ile kesimi. Moleküler büyüklük belirteci [ϕ X174 HaeIII kesim (Fermentas, Lituanya)] M ile gösterilmiş, ve bantların karşılık geldiği molekül büyüklüğü solda verilmiştir. U: Kesilmemiş PCR ürünü (~460bç); 4, 10, 11, 13, 14 ve 15. sıralar: Subtip a (296, 93 ve 71bç ürün); 1, 2 ve 3 sıralar: Subtip-b (297, 110 ve 71bç ürün); 5 ve 7. sıralar: Subtip c, d ve e (~390 ve 71bç ürün); 8.sıra : Subtip f (301 ve 146bç ürün); 12 ve 16. sıralar: Subtip g (318 ve 74bç ürün); 9. sıra: Subtip h (353 ve 71bç ürün).

Şekil-5 : Subtip c, d, e, g ve h Genotip A *C.albicans* izolatlarının MspI enzimi ile kesimi. Moleküler büyüklük belirteci [ϕ X174 HaeIII kesim (Fermentas, Lituanya)] M ile gösterilmiş, ve bantların karşılık geldiği molekül büyüklüğü solda verilmiştir. U: Kesilmemiş PCR ürünü (~460bç). 1.sıra: Subtip e (291 ve 168bç ürün), 2.sıra: Subtip c (291 ve 126 bç ürün), 3.sıra: Subtip d (291, 94 ve 83bç ürün), 4.sıra: Subtip h (352 ve 126bç ürün), 5.sıra: Subtip g (478 bç ürün).

Şekil-6 : a) Subtip b, d ve g'nin insersiyon bölgelerine ait DNA dizi analizi sonuçları. b) Subtip a olarak tanımlanan normal dizi.

Şekil-7 : Genotip A *C.albicans* suşlarında tespit edilen 8 subtipte ait nükleotid dizileri. 1-61 ve 180-460 arası nükleotidler, birkaç noktada tek baz değişimi dışında birbirinden farklılık göstermemektydi. Subtip a, Gen bankasında verilen aktarılabılır grup I intron bölgesi ile aynı diziye taşımaktaydı (Gen bankası ulaşım no: X70659). Diğer subtiplerin Gen bankası ulaşım numaraları AY441784-AY441790'dir. İnsersiyonlar büyük-kalın harflerle, delesyonlar boş karelerle gösterilmiştir. HaeIII kesim noktaları sarı ile, MspI kesim noktaları ise mavi ile belirtilmiştir.

Şekil-8 : *C.albicans* Genotip A subtiplerinin kolay ayrılması amacıyla geliştirilmiş HaeIII ve MspI enzimleri ile kesim şeması.



TABLÖLAR

Tablo-1 : Mantar enfeksiyonları gelişiminde konağa ait risk faktörleri (Molero ve ark., 1998; Blumberg ve ark., 2001; Huang ve ark., 1998; McCullough ve ark., 1999b; Verduyn Lunel ve ark., 1999; Fridkin ve Jarvis, 1996).

Tablo-2 : Genotiplendirme yöntemlerinin kullanım alanları (Soll, 2000; Clemons ve ark., 1997; Luu ve ark., 2001; Scherer ve Stevens, 1987; Fridkin ve Jarvis, 1996; van Belkum, 1999):

Tablo-3 : Genotipleme yönteminin özellikleri (Soll, 2000; Scherer ve Stevens, 1987; Pujol ve ark., 1997)

Tablo-4 : 401 *C.albicans* suşunun genotiplerinin izolasyon yerine göre genotiplerinin dağılımı. (^a) ve (^b) sırasıyla invaziv ve non-invaziv gruba dahil edilen izolatları göstermektedir.

Tablo-5 : 401 *C.albicans* suşunun aktarılabılır grup-1 intron varlığına göre genotiplerinin dağılımı. (^a) ve (^b) sırasıyla invaziv ve non-invaziv gruba dahil edilen izolatları göstermektedir.

Tablo-6 : Genotip A *C.albicans* suşlarının subtiplerinin izolasyon yerine göre dağılımı.

Tablo-7 : Değişik ülkelerde tespit edilen *C.albicans* genotiplerinin dağılımı

1. GİRİŞ

Son yıllarda, özellikle kanser hastalarına daha yoğun kemoterapi protokolleri uygulanmaya başlaması, organ transplantasyonu yapılan hastaların sayısının artması, gerek organ transplantlı gerekse de bağışıklık sistemi ile ilgili defektleri olan hastaların yaşam sürelerinin gitgide uzaması ve AIDS vakalarındaki önlenemez artış, mantar enfeksiyonları sıklığı ve çeşitliliğinde artışa neden olmuştur. Son yıllarda, daha önceleri özel bir öneme sahip bulunmayan virülansı az mantar türleri ile ortaya çıkan enfeksiyonların sayısında artış kavdedilmekle beraber, *C.albicans* hala en sık izole edilen etkidir.

Etken ajanın moleküler yöntemlerle tanımlanması, kısa sürede güvenilir sonuçların alınmasını sağlayarak, hastanın tanısının neredeyse örneğin alındığı gün içerisinde konulmasına imkan verir. Moleküler tiplendirme (genotiplendirme) yöntemleri ise, etkenin epidemiyolojisinin belirlenmesi ve uygun tedavi ve korunma protokollerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu amaçla kullanılan yöntemler, farklı kaynaklardan izole edilen aynı türleri belirleyebildiği gibi, aynı kaynaktan izole edilen aynı, farklı ancak yakın ilişkili veya tamamen farklı türleri de belirleyebilmelidir. Rutin laboratuvar çalışmalarına uygulanabilmesi için, yöntemin kolay, güvenilir, ucuz ve ayırım gücünün yüksek olması gerekir. Bu çalışmada kullanılan 25S intron analizi, bu özellikleri karşılayan ve kullanımı yaygınlaşan bir yöntemdir. Bu yöntemle *C.albicans* genotipleri yanı sıra *C.dubliniensis* de tanımlanabilmektedir. 25S intron genotiplerinin antifungal ajanlara duyarlılık veya invazivlik ile ilişkisi üzerine araştırmalar devam etmektedir.

Bu çalışmada, klinik önemi aşağıda detaylı olarak açıklanacak olan, klinik örneklerden izole edilen *C.albicans* suşlarının 25S intron analizi ile genotiplendirilmesi ve genotiplerle invazivlik arasında bir ilişki olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, etkenin özelliklerinin belirlenmesi yanı sıra, uygun enfeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilmesi ve uygun tedavinin zamanında başlatılması açısından yol gösterici olacaktır.

1.1 Mantarlar

Mantarlar, besin ihtiyaçlarını canlı veya ölü maddelerden elde eden, tüm doğada yaygın olarak bulunan ökaryotik organizmalardır (de Hoog ve Guarro, 1995, s.:1). Doğadaki organik artık materyalin degradasyonunda ve fermentasyonda rol oynarlar. İnsanlarda, birçok dokuda normal flora elemanı olarak bulunurlar, insan sağlığı için önemli olan steroid hormon türevleri ve penisilin gibi antibiyotiklerin üretiminde kullanılırlar. Diğer yandan besin maddelerinde oluşturdıkları hastalıklar ağır ekonomik zararlara neden olurken, insanlarda oluşturdıkları hastalıkların klinik yelpazesi basit kozmetik problemlerden, ölüme sonuçlanabilen ağır sistemik enfeksiyonlara kadar değişebilir (Kobayashi ve Medoff, 1993).

Mantarlar, klorofil taşımazlar, bu nedenle heterotropturlar. Genomları, birden fazla kromozom içerir ve membranla çevrili bir çekirdek içinde yer alır. Bu membran, endoplazmik retikulum ile devam eder. Hücre membranının esas komponentleri lipid, glikoproteinler ve sterollerdir. Mitokondrileri, golgi cisimciğı, endoplazmik retikuluma bağılı ribozomları, mikrotübül- mikroflaman ve ara flamanlardan oluşan bir hücre iskeletleri vardır. Hücre sitoplazması içinde vakuoller, lipid cisimcikleri ve diğer depo inklüzyonları bulunur (de Hoog ve Guarro, 1995, s.:1; Kobayashi ve Medoff, 1993).

Mantarlarda hücre bölünmesi eşeyli veya eşeysiz olarak gerçekleşebilir. Evrimleri sürecinde pek çok mantar, yaşamlarını sürdürebilmek için bu iki bölünme tipinin kombinasyonundan oluşan bir üreme mekanizması geliştirmiştir. Bu tip mantarlara, “Fungi perfecti” adı verilir. Bazı mantarlarda ise yeni konaklar edinme ve çoğalmada mitoz o kadar başarılı olmuştur ki, eşeyli üreme neredeyse kullanılmaz olmuştur. Bu tip mantarlar da “Fungi imperfecti” olarak adlandırılır (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 1-2; Fisher ve Cook, 1998, s.: 2-11).

Mantarların sınıflandırılması ve tanımlanması, bakterilerin sınıflandırılmasından farklı olarak, besinsel ihtiyaçları ve biyokimyasal özelliklerinden çok; morfolojik görünümüne göre yapılmaktadır (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 1-2). Morfolojik özelliklerine göre patojen mantarlar 2 sınıfa ayrılırlar:

a) Küfler (Filamentöz mantarlar):

Mikroskopik olarak, dallanan, t v benzeri filamentler oluşturarak  reven mantarlardır. Bu filamentöz yapılar, “hifa” olarak adlandırılır. Hifaların bir araya gelmesiyle “mi elvm” yapıları oluşur. Hifaların septalı/septasız oluşları ve görünümleri, k f mantarlarının laboratuvar koşullarında birbirlerinden ayırt edilmesinde kullanılır (Kobavashi ve Medoff, 1993).

b) Mavalar (tek hücreli mantarlar):

Mavalar, tek hücreli mantar formları olup; insanlarda, özellikle cilt ve müköz membranlarda normal flora elemanıdır. Sağlam bir hücre duvarları, bazılarının (*Cryptococcus neoformans*) polisakkarit yapıda kapsülleri vardır. Tomurcuklanarak veya ikiye bölünerek çoğalır. Tomurcuklanan dal ana hücreden ayrılabilir, veya ana hücreye bağlı kalarak kendisi tomurcuklanabilir. Belli koşullar altında ortaya çıkan bu hücreler zincirine “yalancı hif” adı verilir (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 1).

Çoğu maya, patojen değil, fırsat cıdır. Konağın savunma mekanizmalarının herhangi bir şekilde zayıflaması sonucunda, doğal bağışıklıktan kurtulan mavalar hastalık oluşturur. Enfeksiyon tipik olarak, müköz membranlar üzerinde lokalize bir lezyon olarak başlar ve yayılır. Normal flora elemanı olmaları nedeniyle, bir mavavı etken olarak kabul edebilmek için ve steril bölgelerden izole edilmesi veya aynı vücut bölgesinden alınan birden fazla örnekten aynı mayanın üretilmesi gereklidir (Fisher ve Cook, 1998, s.: 2-11).

K f-maya avrımı, daha çok laboratuvar koşullarındaki görünüme göre yapılmaktadır. Çoğu önemli fungal patojen 2 avrı formda da bulunabilir. Mantarların, morfolojisi birbirinden farklı olan avrı mikroorganizmalar olarak doğada bulunabilme özelliği, “dimorfizm” olarak adlandırılır. Maya→küf veya küf→maya dönüşümü, sıklıkla serbest yaşavan organizmanın parazit forma dönüşümü ile ilişkilidir. Sistemik enfeksiyon oluşturan mantarların çoğu (*Histoplasmosis*, *Blastomycosis*) doğada k f formunda bulunurken, parazitik formu maya formudur. *Candida* türleri gibi bazı istisnalar ise dokuda k f formunda bulunurken, doğadaki serbest formu maya formudur. Bazı mantarlarda ise dimorfizm gözlenmez: *Aspergillus* türleri daima k f formunda, *C.neoformans* ise daima maya formunda bulunur (Kobavashi ve Medoff, 1993).

Bugüne kadar tanımlanmış 50-250 bin mantar türünün sadece 200 kadarı insanda hastalık etkenidir. Bunların da çoğunu fırsat cı mantarlar oluşturur. Genel olarak mantarlar, doğada yaygın olarak

bulunurlar ve sağ kalım için canlı bir konağa ihtiyaç duymazlar. Yaşamak için canlı konağa ihtiyaç duyan gerçek patojenik mantarların sayısı son derece az olup, sadece birkaç taksonomik grupta yer alır. Bunlar dışında, insanlardaki mantar enfeksiyonları ya çevredeki ekzojen bir kaynaktan köken olarak solunum, sindirim sistemi veya travmatik implantasyon gibi bir yolla insana bulaşır veya kişinin kendi flora elemanları, bağışıklık sisteminin bozulması sonucunda çeşitli hastalık tabloları ortaya çıkarır (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 1-2; deHoog ve Guarro, 1995, s.: 1).

Sağlıklı bireylerde, mantar enfeksiyonlarına karşı doğal direnç son derece iyidir (Romani, 2002). Sağlam mukoza ve cilt yüzeyleri mantar enfeksiyonu gelişimini önlemede ilk önemli engeli oluşturur. Konak direncinde cilt yenilenmesi, ciltte bulunan yağ asitleri ve dşuk pH önemlidir. Yine cilt ve müköz membranların bakteri florası mantarlarla yarışarak aşırı çoğalmalarına engel olur. Normal floradaki bu dengenin antibiyotik kullanımı veya beslenme değişiklikleri ile bozulması, *C.albicans* gibi mayaların çoğalmasına uygun ortam hazırlar. Travma veya yabancı cisimlerle doğal bariyerlerin bütünlüğünün bozulması da mantarların buralardan steril vücut bölgelerine girmelerini kolaylaştırır. Mantarın bir kere dokuya girdikten sonra ne olacağı, organizmanın virülansına, inokulum miktarına ve konağın diğer savunma mekanizmalarının yeterliliğine bağlıdır (Kobayashi ve Medoff, 1993).

Dokulara ulaşan mantarların yayılması, özgün olmayan pek çok mekanizma ile önlenir. Örneğin *C.albicans*'a karşı serumun fungistatik etkisi söz konusudur. Bu etkiden kısmen transferrinler sorumludur. Transferrinler, mikroorganizmaların solunum enzimlerinin yapılması için gerekli olan demiri bağlayarak ortamdaki uzaklaştırır. Beta-globulinler de *Candida* türlerini bağlayarak inflamatuvar hücreler tarafından ortamdaki uzaklaştırılmasını hızlandırır. Enfeksiyonun nlenmesinde önde gelen ve en etkili olan mekanizma ntrofillerce fagositozdur. Hücre içine alınamayacak kadar büyük olan mantarlar ise bağışıklık sisteminin özgün mekanizmaları ile ldrlr. Mantar hücreleri ve bunların hücre dışına salgıladıkları ürünler ileri derecede antijeniktir ve hem hücresel hem de salgısal bağışık yanıtları uyarır. Etkene karşı esas direnç, T-hücre aracılı bağışık yanıtla sağlanır. Bu tip korunmada, T-helper tip 1 (Th1) ve tip 2 (Th2) yanıtları arasındaki denge önemlidir. Th1 tipi bağışık yanıtın ortaya çıkması nötrofil ve makrofajları aktive ederek mantar hücrelerinin öldürülmesini sağlarken, Th2 yanıtları fungisidal efektör hücreleri baskılayarak hastalığın alevlenmesine ve patolojik değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olur. Salgısal bağışık yanıtın ortaya çıkabilmesi için, kompleman sisteminin aktivasyonu ve antikör üretiminin uyarılması gerekir (Pontn ve ark., 2001). Bu nedenlerden ötürü, nötrofil sayısı ve/veya fonksiyon bozukluğu olanlarda (kronik granülomatöz hastalık, myeloperoksidaz eksikliği vb) ve hücresel bağışıklığı baskılanmış bireylerde (AIDS, kemoterapi vb) invaziv ve ağır sistemik mantar enfeksiyonlarının gelişme riski daha yüksektir. Dokuda oluşan hasar çoğunlukla,

etkenin direkt invazyonunun yarattığı yer değişiklikleri ve yaşamsal yapıların hasarlanması gibi mekanik değişikliklere ve bağışık yanıtın toksik etkilerine bağlıdır (Kobayashi ve Medoff, 1993).

Konağın bağışıklık sistemi yanısıra, mantarların sahip olduğu bazı özellikler, onların konak dokusu içerisinde varlığını sürdürebilmesini, dolayısıyla gelişme ve çoğalmalarını kolaylaştırır. “Virülans faktörleri” olarak tanımlanan ve patojen mantarlarda bulunan bu özelliklerden bazıları şunlardır:

a) Termotolerans: Patojenik mantarların 40C° üzerindeki sıcaklıkları tolere edebilme özelliğidir (deHoog ve Guarro, 1995,s.:29-30).

b) Fagositoza direnç: Mantar hücrelerince salgılanan melanin ve karoten gibi pigmentler, oksijenik patlama sonucunda ortaya çıkan serbest radikalleri nötralize ederek fagositoza karşı dirençte önemli rol oynar. Hücresel enzimler olan katalaz, hidroperekسيداز ve süperoksit dismutaz ise, hidrojen peroksit ve aşırı reaktif hidroksil iyonlarını indirgemedi benzer fonksiyonlar üstlenirler. Kapsüllü mantarların (*Cryptococcus* ve *Exophiala*) kapsülleri de oksijenik strese karşı koruyucudur. Bazı mantarlar ise (*H.capsulatum*), fagolizozomal aktiviteyi önleyerek makrofajların içerisine çoğalma imkanı bulur (deHoog ve Guarro, 1995,s.:29-30).

c) Moleküler taklit: Konak hücrelerine benzer hücre yapıları sayesinde mantarlar konağın bağışıklık sisteminden kaçabilir. Birçok mantar hücresinin etrafı karbonhidrat-protein kompleksi ile çevrelenmiştir. *C.albicans* türlerinde bulunan mannan oligosakkaritleri makrofaj aktivitesini baskılama yeteneğindedir. Bazı *Candida* türlerinde de insan kompleman reseptörüne benzer bir protein üretilmektedir (deHoog ve Guarro, 1995,s.:29-30).

d) Enzim Salınımı: Mantarların salgıladığı hidrolitik enzimler, konak hücre membranlarının bütünlüğünü veya fonksiyonunu bozarak mantarın konak hücre membranlarından geçişini kolaylaştırır. İnsanda hastalık oluşturan *Candida* türlerinde üretilen enzimler iki başlık altında sınıflandırılır: Peptid bağlarını kıran proteinazlar ve fosfolipidleri hidrolize eden fosfolipazlar. Salgılanan fosfolipaz miktarı, mikroorganizma yanısıra tutulan dokuya göre değişmektedir. Kandan izole edilen *C.albicans* suşlarının idrar veya yaradan izole edilene kıyasla daha fazla fosfolipaz salgıladığı gösterilmiştir (Ghannoun, 2000). Bazı mantar türlerinde düşük molekül ağırlıklı toksinlerin salgılandığı da gösterilmiştir (deHoog ve Guarro, 1995,s.:29-30).

e) Metallerin Rolü: Kanda, laktoferrin aktivitesi nedeniyle serbest demir son derece az bulunur. Bazı mantarlar çok daha yüksek demir konsantrasyonuna ihtiyaç gösterir ve bu nedenle son derece etkin sideroforlar üretirler (deHoog ve Guarro, 1995,s.:29-30).

f) Adezyon: *C.albicans* hücreleri, mannopteinden oluşan dış fibriler tabaka taşır. Bu proteinler, adezyonu ve germ-tüp oluşumunu tetikler. Diğer mantarlar, hidrofobik etkileşimlerle adezyon gösterirler (deHoog ve Guarro, 1995,s.:29-30).

Mantarların oluşturduğu enfeksiyonlar genel olarak “mikozlar” adı altında incelenir. Genel olarak iki grup hasta, mantar enfeksiyonu gelişimi açısından risk altındadır: Bulunduğu bölgenin coğrafi lokalizasyonu açısından risk altında olanlar (endemik mikozlar) ve mantar enfeksiyonlarının gelişimine duyarlılığı arttıracak risk faktörlerini (tablo-1) taşıyanlar. Risk faktörlerinin bazıları, primer olarak konağın bağışıklık sistemini baskılayarak enfeksiyon gelişimine uygun ortam yaratırken, diğerleri enfeksiyon etkeninin vücuda girişini kolaylaştıracak bir yol hazırlar (Fridkin, 1996). Konağın savunma mekanizmalarındaki bozukluğun cinsi ve ciddiyeti, enfeksiyonun niteliğini ve ciddiyetini etkiler (Romani ve ark., 2002). Mikozlar, başlıca 5 grupta incelenir:

a) Yüzeysel Mikozlar: Cilt ve cilt eklerinin en dıştaki ölü tabakalarını tutar. Vücuda girmedikleri için konağın savunma mekanizmalarını uyarmazlar. Sıklıkla kozmetik problemlere neden olurlar (Fisher ve Cook, 1998, s.: 2-11).

b) Kutanöz Mikozlar: Cilt ve cilt eklerinin keratinize dokuları tutulur. Mekanik etkileri ve metabolitleri problem varur. Mantarın kendisinden çok, konağın savunma mekanizmalarının devreye girmesi sonucu ortaya çıkan inflamatuvar yanıt problemlere neden olur (Fisher ve Cook, 1998, s.: 2-11).

c) Subkutanöz Mikozlar: Kas, kemik ve bağ dokusunu tutan mikozlardır. Etken sıklıkla vücuda travmatik inokülasyon ile girer. Bu enfeksiyonlar sıklıkla yaralanma alanı ve çevresinde sınırlı kalmaya eğilimlidir (Fisher ve Cook, 1998, s.: 2-11).

d) Sistemik Mikozlar: Herhangi bir vücut dokusu tutulabilmekle beraber, sıklıkla akciğerler, lenfatik sistem ve dolaşım sistemi tutulur. Sadece 4 mantar türü gerçek patojen olarak kabul edilir: *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Histoplasma* ve *Paracoccidioides*. Bu mantarlar, enfekte edici doz yeterince büyükse bağışıklık sistemi normal olan bireylerde de enfeksiyon oluşturabilir. Çoğunlukla bu enfeksiyon etkenleri inhalasyon ile alınır ve enfeksiyon akciğerlerde başlar (Fisher ve Cook, 1998, s.: 2-11).

e) Fırsatçı Mikozlar: Herhangi bir doku veya organda enfeksiyon oluşturabilir. Tüm dünyada yaygındır. Enfeksiyon oluşumunda konağın bağışıklık sistemini bozan faktörler ön plandadır. Uygun konakta, virülansı düşük olan mantarlar bile enfeksiyon oluşturabilir, ancak bu grupta en sık karşımıza çıkan mantarlar, *Aspergillus*, *Candida*, *Mucor* ve *Rhizopus* türleridir. *Mucor* ve *Rhizopus* gibi mantarlar belli coğrafik bölgelerde bulunurlar, bu nedenle bu tip mantarlarla enfeksiyon oluşabilmesi için, o coğrafik bölgede yaşamak veya o bölgeye seyahat etmek gerekir (Fisher ve Cook, 1998, s.: 2-11).

Tablo-1: Mantar enfeksiyonları gelişiminde konağa ait risk faktörleri (Molero ve ark., 1998; Blumberg ve ark., 2001; Huang ve ark., 1998; McCullough ve ark., 1999b; Verduyn Lunel ve ark., 1999; Fridkin ve Jarvis, 1996).

Genel Risk Faktörleri	Sistemik Enfeksiyonlarda Risk Faktörleri
Mekanik nedenler Travma, Oklüzyon, Uzun süreli kataterizasyon, Parenteral nutrisyon, Yanıklar, Cerrahi müdahale, Yoğun bakım ünitesine hospitalizasyon	Mekanik Nedenler Parenteral tedavi, Santral venöz katater varlığı, Hemodiyaliz şanti varlığı, Periton diyalizi, BOS şanti varlığı, Mekanik ventilasyon, Yaygın yanıklar, Geniş cerrahi, Çok sayıda odak, Abdominal cerrahi, Kalp-akciğer cerrahisi, Yoğun bakım ünitesinde hospitalizasyon
İlaç kullanımı: Geniş spektrumlu antibiyotikler Steroid, Kemoterapötikler, Oral kontraseptifler İv ilaç bağımlılığı	İlaç Kullanımı: Antimikrobiyal tedavi, Kortikosteroid tedavisi, Kemoterapi,
İmmünsüpresyon: AIDS, T-lenfosit ve makrofaj defektleri Nötropeni, Hematolojik malinite Solid organ tümörleri	İmmünsüpresyon: Hematolojik malinite, Graft-versus-Host Hastalığı Solid organ tümörleri, Nötropeni (PNL < 500/mm ³), Organ transplantasyonu
Beslenme Bozuklukları Avitaminoz	Beslenme Bozuklukları Malnutrisyon,
Metabolik Bozukluklar Endokrinopatiler, Şeker hastalığı	Metabolik Bozukluklar Azotemi, Hiperglisemi
Yaş Yenidoğan dönemi Prematürite, Düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlar, Yoğun bakım ünitesinde hospitalizasyon, Santral venöz katater varlığı, Hiperalimentasyon İv yağ emülsiyonu uygulananlar, Geniş spektrumlu antibiyotik uygulanması İleri yaş	Yaş Yenidoğan dönemi İleri yaş
Daha önce tanımlanmış mantar kolonizasyonu	Daha önce tanımlanmış mantar kolonizasyonu

1.2 *Candida* Türleri ve *Candida albicans*

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. Sadece ciltte, diğer *Candida* türlerine (*C.tropicalis* ve *C.guilliermondii*) daha sık rastlanır. Hospitalizasyon, mukozal yüzeylerde *Candida* kolonizasyonunu arttıran önemli bir faktördür. Sağlıklı bireylerin sadece %2-37'sinde mukozal yüzeylerde *C.albicans* kolonizasyonu tespit edilirken, hospitalize hastalarda bu oran %80'lere çıkmaktadır (Verduyn Lunel ve ark., 1999).

Enfeksiyon etkeni olarak izole edilen mantarlar içerisinde *Candida* türleri ilk sırayı almaktadır. Bilinen 200 kadar *Candida* türünün sadece %10 kadarı insanda hastalık oluşturur. *Candida* türlerinin oluşturduğu enfeksiyonlar "kandidoz" olarak adlandırılır ve en sık (%60-75) izole edilen etken *C.albicans*'tır (Verduyn Lunel FM ve ark., 1999). Etken olarak izole edilen genusun diğer üyeleri, *C.tropicalis*, *C.stellatoidea*, *C.parapsilosis*, *C.krusei*, *C.guilliermondii*, *C.glabrata*, *C.kefyr*, *C.viswanathii*, *C.lusitaniae* ve *C.dubliniensis*'tir (Fisher ve Cook, 1998, s.: 197-230). Nozokomiyal fungal enfeksiyonların %78'inden *C.albicans* sorumludur (Fridkin ve Jarvis, 1996). İnsanda hastalık oluşturan *C.albicans* türlerinin çoğu, konağın kendi flora elemanlarıdır. Ancak etken, ekzojen kaynaklardan da vücuda alınabilir (Romani ve ark., 2002). Bu fırsatçı patojenler, çoğunlukla, düşük veya bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde akut veya kronik, derin yerleşimli enfeksiyonlar oluşturabilirse de sıklıkla mukozal, kutanöz veya cilt enfeksiyonları yapar (Richardson ve Warnock, 1997, s.:78).

C.albicans, bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar başta olmak üzere insanlarda pek çok farklı mantar enfeksiyonu tablosundan sorumludur. Oluşturduğu enfeksiyon tablolarının spektrumu, basit kozmetik problemlerden, hayatı tehdit eden ağır sistemik enfeksiyonlara kadar değişebilmektedir (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 78-93, 131-148). Cilt ve mukozayı tutan kronik yüzeysel *C.albicans* enfeksiyonları çoğunlukla altta yatan hücresel bağışıklık sistemine ait bir problemi olan hastalarda (AIDS gibi) sık görülürken, dissemine enfeksiyonlar ağır fagositik sistem defektleri olan hastalarda (nötropenik hastalar, organ transplantasyonu sonrası bağışıklık sistemi baskılananlar ve ağır kemoterapi protokolleri uygulanan kanser hastaları) sıklıkla görülür (Monod ve Borg von Zeppelin, 2002). T-hücre aracılı bağışıklık sistemi, orofaringeal kandidoz, kutanöz ve muhtemelen vajinal kandidoz formlarına karşı korunmada önemli olduğu halde, sistemik formlara karşı direnç için nötrofil veya mononükleer

fagositleri içine alan fonksiyonel bir fagositik cevap gereklidir. Hayvan modellerinde belli epitoplara karşı geliştirilen antikör yanıtının da koruyucu olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle *Candida* türleri ile konak ilişkisi karmaşıktır ve enfeksiyon gelişiminin önlenmesi için, bağışıklık sisteminin hücresel ve salgısal mekanizmalarının sağlam olması gerekir (Calderone ve Fonzi, 2001). Bununla beraber, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda, sağlıklı bireylerde de pamukçuk, gastrointestinal kandidoz ve vajinal kandidoz gibi mukozal *Candida* enfeksiyonlarında artış olmuştur (Monod ve Borg von Zeppelin, 2002).

Kandan izole edilen patojenler içinde *Candida* türleri, %10 ile 4. sırayı almaktadır ve tüm dissemine *Candida* enfeksiyonlarının %50-70'inden *C.albicans* sorumludur (Dalle ve ark., 2000; Richardson ve Warnock, 1997, s.: 132). Kandidemi gelişimi açısından tanımlanan risk faktörleri tabloları'da verilmiştir. Uygun tedavi uygulanmasına rağmen kandidemi mortalitesi hala %35 civarındadır (Romani ve ark., 2002; Calderone ve Fonzi, 2001; Clemons ve ark., 2000; Verduyn Lunel ve ark., 1999). Mortaliteye etkili faktörler arasında, hastanın yaşı, hospitalizasyon yeri, koruyucu tedavi uygulanıp uygulanmaması, bağışıklık sistemindeki defektin ağırlığı, kandidemi süresi ve beraberinde organ tutulumu olup olmadığı bulunmaktadır. Çocuklarda kandidemi mortalitesi %26-27 iken (Kossoff ve ark., 1998; Yamamura ve ark., 1999), yetişkinlerde değişik yayınlarda %39-52 arasında bildirilmektedir (Yamamura ve ark., 1999; Garbino ve ark., 2002; Baran ve ark., 2001). Cerrahi yoğun bakım ünitesinde tedavi gören yüksek riskli hastalarda gelişen kandidemi mortalitesi %40-60 arasında bildirilmiştir. Bu hastalara profilaktik antifungal tedavi başlanması, hem yüzeysel hem de derin kandidoz riskini azalttığı gibi, bu hastalarda mortaliteyi de önemli ölçüde azaltmaktadır (Blumberg ve ark., 2001). Organ transplantasyonları için gereken immünsüpresyon, mantar enfeksiyonu riskini önemli ölçüde arttırmaktadır. Bu risk, böbrek alıcıları için %52'nin altında, kemik iliği alıcıları için %2-30, kalp alıcıları için %10-35, karaciğer alıcıları için ise %28-42 olarak bildirilmektedir. Geçici kandidemi (<24-48 saat) saptanan hastalarda mortalite %37-39 civarındayken, kandidemi süresi uzadıkça mortalite de artmaktadır (Fridkin ve Jarvis, 1996). Biyopsi ile kanıtlanan organ tutulumu olan hastalarda ise mortalite %52'ye çıkmaktadır. Kandidemi gelişen hastalarda ortalama hastanede kalış süresi 30 gün uzamakta ve bakım masrafları ciddi oranda artmaktadır (Verduyn Lunel, 1999).

Konakta *C.albicans* ile ilk karşılaşmada, mikroorganizma dendritik hücreler tarafından tanınır. Dendritik hücreler spesifik T-hücre aracılı bağışıklık mekanizmalarını devreye sokar. Farklı reseptörler ile mikroorganizmanın tanınmasının farklı tipte yanıt oluşturarak farklı enfeksiyon tablolarının oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu farklı tanıma şekilleri, mantarın hücre içine alınması ve

antijen sunum mekanizmalarını etkileyerek konağın cevabını etkilemektedir. Bu cevap değişiminde sitokinler de rol oynamaktadır (Romani ve ark., 2002).

Hematojen olarak yayılan dissemine enfeksiyon oluşturabilmek için *C.albicans*, kan damarlarının içini döşeyen endotel hücrelerini delerek dolaşıma geçmelidir. Endotel hücreleri, *C.albicans*'a karşı lokal inflamatuvar yanıt gelişimini sağlayan en önemli hücrelerdir. Mikroorganizmalar dolaşıma ya bağırsaklar gibi flora elemanı olarak bulunduğu mukozal yüzeylerden veya damar içi kataterlerden geçiş yapar ve endotel hücrelerine tutunurlar. Kendi endositozlarını uyararak endotel hücrelerinin içine alınırlar ve bu hücrelerin ölümüne neden olurlar. Endotelial hücre bütünlüğünün bozulması, mantarın derin dokulara ulaşmasını sağlar. Ayrıca, açığa çıkan subendotelial bazal membrana başka organizmaların tutunmasına da ortam hazırlamış olur. Endotel hücreleri bu esnada pek çok proinflamatuvar sitokin sentezler ve lökosit adezyon moleküllerini eksprese etmeye başlarlar (Clemons ve ark., 2000).

C.albicans'ın, genustaki diğer üyelerle karşılaştırıldığında enfeksiyon etkeni olarak daha sık izole edilmesini, tek başına konağa ait faktörlerle açıklamak zordur. Bu nedenle, *C.albicans*'a ait bazı virülans faktörleri de enfeksiyon gelişiminde eş düzeyde anlamlı görünmektedir. *C.albicans*'a ait önemli virülans faktörleri şunlardır:

a) Dimorfizm (=Morfogenez): Belli çevre koşulları altında *C.albicans* maya formundan hif formuna geçebilir. Mukozal ve derin enfeksiyonlar esnasında maya hücreleri transforme olarak filamanları oluşturur. Doku invazyonu için hif oluşumunun esansiyel olduğu gösterilmiştir (Monod ve Borg von Zeppelin, 2002). Hif oluşumu, bir yandan konak dokularına penetre olmayı kolaylaştırırken, diğer yandan organizmayı makrofajlarca fagositozdan korur (San-Blas ve ark., 2000). Bu iki farklı form, birçok adezyon faktörü ekspresyonu ve hidrolitik faktörlerin salınımı açısından da fark gösterir. Azot veya karbon açlığı, pH ve sıcaklık değişiklikleri, mikroaerofilik şartlar ve bazı kimyasallar (N-asetil-D-glukozamin, aminoasitler, biotin, çinko ve serum gibi) bu dönüşümü tetikler (Monod ve Borg von Zeppelin, 2002; Calderone ve Fonzi, 2001; Molero ve ark.,1998).

b) Çevre değişikliklerine adaptasyon: Değişen çevre koşullarına adaptasyon, bir mikroorganizmanın virülansını belirlemede belki de en önemli parametredir. Bu değişiklikler sıklıkla, hücre yüzey reseptörleri tarafından algılanır ve gen ekspresyonunu modifiye edecek transkripsiyon faktörlerinin aktivitesinde değişiklik sağlayacak sinyal iletim yollarını aktive eder. *C.albicans*'ta Tup1p, Cph1p, Efg1p, Rbf1p gibi transkripsiyon regülatörleri ile, Hst7p, Cla4p ve Cpp1p gibi sinyal iletim

proteinlerinin çevre koşulları değiştiğinde morfolojik değişimi sağladığı belirlenmiştir (Haynes, 2001). De Bernardis ve ark. (1998), *C.albicans*'ın konak dokusunun pH'sında ortaya çıkan değişikliklere göre bazı genlerinin (PHR1 ve PHR2) ekspresyonunu değiştirdiğini göstermiştir. PHR1 ve PHR2 dışında, CHK1 gibi bazı genlerin ekspresyonu da doku seçiminde önemli olabilir (Calderone ve Fonzi, 2001).

c) Fenotipik Dönüşüm (Switching) Sistemi: Karakter kombinasyonları birbirinden farklı fenotipik şekiller arasında *C.albicans* yüksek bir hızda (10^{-2} - 10^{-3}) dönüşüm gösterebilir. Bu dönüşüm, birbiri ile ilişkisiz birçok genin koordine bir şekilde regülasyonu sayesinde gerçekleşir ve koloni morfolojisi, hücre şekli, hücre büyüklüğü, hücre duvar morfolojisi, aspartik proteinaz salgılanması, adherens özellikleri, antijen ekspresyonu, doku afinitesi, hayvan modellerinde virülans ve antifungal ilaçlara karşı duyarlılık gibi birçok fenotipik karakter etkilenir. Bu dönüşüm, koloni morfolojisindeki değişimlerle (beyaz-opak dönüşümü) takip edilmektedir (Monod ve Borg von Zeppelin, 2002; Calderone ve Fonzi, 2001). Son zamanlarda, fenotipik değişimin, transkripsiyon faktörü Efg1p tarafından regüle edildiği gösterilmiştir. Bu dönüşüm sistemi sayesinde *C.albicans*, farklı anatomik lokalizasyonların değişen çevresel koşullara hızlı adaptasyon gösterir (Monod ve Borg von Zeppelin, 2002).

d) Adherens: *C.albicans* ile enfeksiyon gelişimi, yüzeysel dokulara tutunma (adherens) ve burada kolonizasyon ile başlar. Organizmanın konak hücrelere tutunması, konak tarafından mikroorganizmanın uzaklaştırılmasını güçleştirir. Adherenste rol alan moleküllere "adezinler" denir. Adezinler aracılığı ile *C.albicans*, memeli ekstraselüler matris proteinlerine (fibronektin, laminin, fibrinojen, tipI ve tipIV kollajen), ağızda tükrük proteinlerine tutunur (Calderone ve Fonzi, 2001; Calderone ve ark., 2000). *C.albicans*, adherensle ilişkili olduğu gösterilen pek çok molekül taşır ve birbirinden bağımsız olarak işleyebilen farklı bağlanma mekanizmalarını devreye sokabilir. Adherenste en önemli molekül, hücre duvarı mannoproteinleridir. Diğer adezyon faktörleri arasında, çiftleşme esnasında hücrelerin birbirini tanımasını sağlayan agglutinin-benzeri dizi (Als) proteinleri, memeli lökosit integrinlerine benzer bir protein olan Int1p, mantarlarda O- ve N- mannozilasyonu sağlayan Mnt1p ve Pmt1 proteinleri ve *C.albicans* germ tüpleri ile memeli hücreleri arasında stabil tutunma sağlayan Hw1p proteini sayılabilir. Salgısal aspartik proteinazlar (Sap) da adherenste ek görevler üstlenir (Monod ve Borg von Zeppelin, 2002; Calderone ve Fonzi, 2001).

e) Salgısal Hidrolazlar: *C.albicans*, konak hücrelerinin membran bütünlüğünü bozarak hücre yapılarının bozulmasına ve fonksiyon kaybına neden olan, fosfolipazlar ve Sap gibi indüklenebilir hidrolitik enzimler salgılar. Sap'lar özellikle önemlidir ve üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Adherenste Sap'ların, spesifik konak hücrelerinin yüzey proteinlerine karşı ligand olarak görev yapabilecekleri veya

enzimatik etki ile konak hücre yüzeyinde konformasyonel değişiklikler yaratarak kendi tutunmasına daha uygun bir ortam sağlayabileceği üzerinde durulmaktadır (Monod ve Borg von Zeppelin, 2002; Calderone ve Fonzi, 2001).

f) Mannan: Hücre duvarı glikoproteinlerinin en önemli komponenti olan mannan epitopları, bir yandan *C.albicans*'a karşı koruyucu antikor yapımını uyarırken, diğer yandan hücre aracılı bağışıklık mekanizmalarını baskılar (Romani ve ark., 2002). Mannanlar, konak hücrelerini tanıma da önemlidir. Band 3 protein aracılığıyla eritrositlere bağlanan mannanlar, eritrositlerde hemolize neden olur ve açığa çıkan hemoglobini demir kaynağı olarak kullanarak yaşama şansını artırır. Hemoglobin ayrıca, bir yandan *C.albicans*'ta hif formuna dönüşümü uyarırken, diğer yandan *C.albicans*'ın endotelial hücreleri tanımasında önemli olduğu düşünülen fibronektin-bağlayan protein ekspresyonunu artırarak mantarın konak hücrelere tutunmasını kolaylaştırır (Calderone ve ark., 2000).

g) Biyofilm Oluşumu: Biyofilmler, yüzeye tutunmuş organizma toplulukları olarak isimlendirilebilir. Bu toplulukta, ekzopolimerik bir matriks bulunur ve kendine has fenotipik özellikler sergiler. Biyofilm içinde yer alan mikroorganizmaların en önemli fenotipik özelliği, antimikrobiyallere karşı artmış direnç sıklığıdır. Biyofilm içerisindeki *C.albicans* suşlarında Flukonazol direnci 100 kat, Amfoterisin B direnci ise 20-30 kat daha fazladır. Bu nedenle, biyofilm oluşumu izlenen enfeksiyonlar ciddi bir problem oluşturur. *C.albicans* biyofilmlerinde, yüzeye tutunmuş bir maya topluluğu ve bunun üzerinde ekzopolimerik matriks içerisinde yer alan hif hücreleri topluluğu yer alır. *C.albicans* tarafından üretilen hücre dışı materyal içerisinde karbonhidratlar, proteinler ve tanımlanmamış başka komponentler yer alır. Özellikle akımın yavaşlaması gibi statik durumların oluşumu, biyofilm oluşumunu hızlandırır. İlaç direnci, biyofilm içerisindeki mantar hücrelerinin kendi özelliklerine, ekzopolimerik matriksin koruyucu özelliğine ve kontakt-bağımlı gen ekspresyonunun olmasına bağlanabilir (Kumamoto, 2002).

h) Fungal Efflüks Pompaları: Bazı antifungal ilaçlara karşı direnç gelişimini sağlar. Bu pompaların çoğu, önemli transport fonksiyonları olan membran proteinleridir (Haynes, 2001). Ökaryotik hücreler, ilaç direnci sağlayabilecek iki tip efflüks pompası taşır: ATP bağlayan kaset taşıyıcıları (ABCT) ve major fasilitatörler (MF). ABCT, hücreye toksik olan hidrofobik veya lipofilik moleküllerin (azol grubu antifungaller) hücre dışına pompalanmasından sorumludur. MF grubu pompalar ise daha çok hidrofobik molekülleri (tetrasiklinler) hücre dışına pompalar. *C.albicans*'ta bugüne kadar CDR genleri ile kodlanan 13 farklı ABCT grubu efflüks pompası ile MDR1 geni ile kodlanan bir adet MF grubu efflüks pompası tanımlanmıştır (White ve ark., 1998).

1.3 *Candida* Enfeksiyonlarının Kliniği

Çoğu *Candida* enfeksiyonu, konağın kendi ağız ve gastrointestinal sistem florasındaki endojen mantarlardan köken alır. Bununla beraber başka bir kaynaktan da enfeksiyon etkeni alınabilir. Kullanılan infüzyonların kontaminasyonu ve sağlık çalışanlarının elleri, ekzojen kaynak olarak en sık tespit edilenlerdir (Bart-Delabesse ve ark., 1995; Boerlin ve ark., 1996; Verduyn Lunel ve ark. 1999). Kandidozlar genel olarak, “yüzeysel” ve “derin” olmak üzere iki grupta incelenebilir:

1.3.1 Yüzeysel Kandidozlar:

1- Oral Kandidoz: Klinik olarak 4 ayrı formda karşımıza çıkabilir:

- a) Akut psödomembranöz kandidoz (Pamukçuk): Bebeklerde ve yaşlılarda sıktır. Yanak mukozası, diş etleri ve dil üzerinde beyaz ve kabarık lezyonlar şeklinde görülür. Ağrısızdır.
- b) Akut atrofik kandidoz: Sıklıkla, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisinin bir komplikasyonu olarak karşımıza çıkar. Oral mukozanın herhangi bir yerinde oluşabilir, ağrılıdır.
- c) Kronik atrofik kandidoz (Proteze bağlı stomatit): En sık gözlenen oral kandidoz formudur. Genellikle oral protez kullanımı ile ilişkilidir ve protez kullananların yaklaşık %60'ında gözlenir. Asemptomatiktir, ancak yeni bir protez gerektiğinde anlaşılır. Özellikle sert damağın protez ile temas ettiği kısımlarda kronik eritem ve ödem ile karakterizedir.
- d) Kronik hiperplastik kandidoz (*Candida* Lökoplaki): Malign transformasyona uğrayabilmesi nedeniyle önemlidir. En sık yanakların iç yüzünde, daha nadiren dil üzerinde gözlenir. Sıklıkla asemptomatik olup, sigara içenlerde ve ağız bakımı bozuk olanlarda daha sıktır (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 78-93).

2- Vajinal Kandidoz: Hayatı boyunca kadınların %75'i en az bir kez *Candida* vajiniti atağı geçirir. Bu hastaların en az yarısında bu durum tekrarlar. En önemli etken *C.albicans* olup enfeksiyonların %80'inden sorumludur. Enfeksiyon oluşturabilmek için, vajinal çevrede bazı değişikliklerin ortaya çıkması gerekir. Bu değişikliğe neden olan faktörler arasında, gebelik, şeker hastalığı, sıkı ve sentetik iç çamaşırı kullanımı, antibiyotik tedavisi, demir metabolizması bozuklukları ve oral kontraseptif kullanımı sayılabilir. Klasik belirtileri, ani başlayan yoğun vulval, vajinal kaşıntı, yanma ve vajinal akıntıdır (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 78-93).

3- Penil Kandidoz: Sıklıkla balanit veya balanopostit şeklinde sevreder. Genellikle bu hastalarda altta yatan şeker hastalığı gibi bir predispozan faktör vardır. Hastalar, glans peniste yanma veya irritasyondan şikayet ederler, nadiren subprepusival akıntı gözlenir. Glans peniste yaygın, eritemli makülopapüler lezyonlar sıktır, bazen prepusivumda ödem ve fissür olabilir (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 78-93).

4- Kutanöz Kandidoz: En sık etken *C.albicans*'tır. Lezyonlar, kasıklar ve intergluteal katlantılar gibi cildin katlantı bölgelerinde sıktır. "Yüzeysel kutanöz kandidoz (intertrigo)" lezyonları veziküller ve püstüller şeklinde ortaya çıkar. Sürtünme ile bu veziküller patlayarak sınırları düzensiz eritematöz lezyonlar ortaya çıkartır. Ana lezyonun etrafı çok sayıda küçük papülopüstüllerle çevrilir (uydu lezyonlar). "Parmak aralarının kandidozu", parmak aralarında etrafı eritemle çevrili beyaz yarıklar şeklinde görülür. Özellikle suyla devamlı temas edenlerde veya tırnak travması geçirenlerde sıktır. "Konjenital kutanöz kandidoz", yenidoğanlarda nadir görülen bir tablodur. Vakaların yarısında, annede vajinal kandidoz vardır. Enfeksiyon intrauterin veya intrapartum olarak kazanılır, lezyonlar doğum esnasında veya doğumdan hemen sonra ortaya çıkar. Yüzde ve gövdede eritematöz bir alanda yaygın olarak görülen vezikülopüstüller 24 saat içinde tüm vücuda yayılır. Sıklıkla kabuklanarak kendiliğinden kavbolur. Ancak nadiren, ilerleyerek havatı tehdit eden, derin yerleşimli enfeksiyonlar ortaya çıkabilir. Bu nedenle, tüm cilt bulguları geçene kadar bebeklerin hastanede takip edilmesi gerekir (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 78-93).

5- Tırnak Enfeksiyonları: Onikomikozların %5-10'undan *Candida* türleri sorumludur. Kadınlarda daha sık gözlenir, sıklıkla el parmakları tutulur. En sık etken *C.albicans*'tır. 3 klinik formu vardır:

a) *Candida* paronişi: Tırnağın proksimal ucundan başlar, nadiren van kenarlardan başlayabilir. Tırnak yatağı, kızarıklık, şiş eritemli ve ağrılıdır. Tırnak, yatağından ayrılabilir. Tırnağın proksimal ve lateral kısmında, daha sonra da distalinde beyaz, yeşil veya siyah çizgiler ortaya çıkar. Tırnak opaklaşır, uzunlamasına veya enlemesine kırılmalar, tabakalanmalar ortaya çıkar.

b) Distal *Candida* Tırnak Enfeksiyonları: Onikoliz ve subungual hiperkeratoz ile kendini gösterir. Hemen daima el tırnakları tutulur. Çoğu hastada beraberinde Raynaud fenomeni vardır.

c) Kronik Mukokutanöz Kandidoz (Total Distrofik Onikomikoz): Organizma tırnak yatağını invaze eder, tırnakta kalınlaşma ve hiperkeratoza neden olur (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 78-93).

6- Kronik Mukokutanöz Kandidoz (KMK): Doğuştan immünolojik ve endokrinolojik bozukluğu olan bireylerde gelişen ve *C.albicans* ile ortaya çıkan inatçı veya tekrarlayan mukoza, cilt veya tırnak enfeksiyonlarını içine alan bir grup klinik tabloyu tanımlar. Hastalık sıklıkla hayatın ilk 3 yılında başlar.

İlk tutulan yer ağızdır, daha sonra kafa derisi, gövde, eller ve ayaklarda da lezyonlar ortaya çıkar. Tırnaklar da tutulabilir. KMK, T-lenfosit aktivasyonunun bozulduğu veya makrofaj aktivasyonu için gereken T-hücre faktörlerinin normalden az üretildiği bireylerde sıktır. Bu defektler sıklıkla *C.albicans* için spesifiktir. Ancak, bazı hastalarda diğer organizmalara karşı T-hücre aracılı yanıt da bozulmuştur. Hastaların yaygın kutanöz veya mukozal lezyonları olsa bile, derin yerleşimli enfeksiyon gelişimi nadirdir (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 78-93).

KMK'nın 4 farklı çocukluk çağı formu tanımlanmıştır, bunların ikisi kalıtsaldır (biri otozomal dominant, diğeri otozomal resesif olmak üzere). Üçüncü formu bir grup endokrinolojik bozukluğa (hiperparatiroidizm, hiperadrenalizm, hipertiroidizm vb) eşlik eder. Dördüncü formun tanımlanmış herhangi bir kalıtım paterni yoktur ve endokrinopatilerle de ilişkili değildir (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 78-93).

1.3.2 Derin Kandidozlar:

Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış olan bireylerde gözlenir. Etken, derin dokulara yerleşerek bu organda lokalize kalabilir veya yayılarak disemine kandidoz tablosu oluşturabilir. En sık izole edilen patojen *C.albicans* olmakla beraber, nötrojenik kanser hastalarında *C.tropicalis*, parenteral beslenen hastalarda ise *C.parapsilosis* daha sık gözlenir. Antifungal ilaç kullanımının yaygınlaşması sonucu *C.glabrata* ve *C.krusei* gibi daha dirençli *Candida* türleri ile enfeksiyon sıklığı artmıştır. Çoğu vakada enfeksiyon kaynağı endojendir, ancak insandan insana bulaş da mümkündür. Özellikle yenidoğan ve cerrahi yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalara, hastane personelinin ellerinden bulaş sıktır. Malign bir hastalık ve tedavisi nedeniyle nötrojenik olan hastalarda derin enfeksiyon kaynağı sıklıkla gastrointestinal sistem olup en sık tutulan organlar karaciğer, akciğer ve dalaktır. Cerrahi ve yoğun bakım ünitesi hastalarında ise etken sıklıkla doğal anatomik bariyerlerdeki bozukluk sayesinde dış ortamdan dolaşıma geçme imkanı bulur (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 131-148). Derin kandidoz gelişimi açısından tanımlanmış risk faktörleri tablo-1'de verilmiştir.

1- Özefajit: Sıklıkla AIDS hastaları ile kanser tedavisi alanlarda gelişir. Beraberinde pamukçuk enfeksiyonu sıktır. Hastalarda yutma güçlüğü vardır, yutkunma ağrılıdır. Özefagusta yoğun inflamasyonla beraber beyaz renkli plaklar gözlenir (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 131-148).

2- Gastrointestinal Kandidoz: Kanser hastalarında mide kandidozu sık olmakla beraber, asemptomatik olduğundan hasta hayattayken nadiren tanı konur. Mukozal ülserasyonlarla karakterizedir, perforasyon olması halinde dissemine enfeksiyon tablosu gelişebilir. İntestinal kandidoz, bazı düşükün kanser ve AIDS hastalarında sıktır. Hastada kilo kaybı ve diyare sıktır (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 131-148).

3- Akciğer Kandidozu: Düşkün ve nötrojenik hastalarda ortaya çıkar, ancak hasta hayattayken nadiren tanı alır. Hastalık, etkenin hematogen yayılımı sonucunda ortaya çıkabileceği gibi, akciğerlere endobronşial inokülasyonla da ulaşabilir. Düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlarda ise ağızdan inokülasyonla etken alınır. Hem klinik hem de radyolojik bulguları nonspesifiktir. En güvenilir tanı yöntemi akciğer biyopsisidir (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 131-148).

4- Santral Sinir Sistemi (SSS) Kandidozu: Çok nadirdir. Derin yerleşimli kandidozu olan düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlarda ve ventriküloperitoneal şantı olan nöroşirürji hastalarında menenjit görülebilir. Etken, hematogen yayılım sonucunda veya organizmanın subdural boşluğa direkt inokülasyonu sonucunda santral sinir sistemine ulaşır. Hafif ateşle karakterize, belirsiz bir tablo çizer. Tanı zordur, ancak riskli bir hastada uygun antibiyotik tedavisine rağmen genel durumu bozuluyor ve nörolojik bulgular ortaya çıkıyorsa akla gelmelidir. Primer ajan *C.albicans*'tır. BOS bulguları bakteriyel menenjitteki gibidir. Beyin absesi ve diffüz metastatik ensefalit, diğer SSS kandidozu formlarıdır. Büyük abseler, fokal nörolojik bulgular ortaya koyabilir. Tanı, bilgisayarlı tomografi veya manyetik rezonans görüntüleme sistemi ile konur. Hematogen yayılım sonucu beyne ulaşan mikroorganizmalar, çok sayıda küçük lezyonlar oluşturur, bu hastalarda nörolojik bulgular ortaya çıkmaz (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 131-148).

5- Endokardit, Miyokardit, Perikardit ve Diğer Vasküler Enfeksiyonlar: Fungal endokarditin en sık etyolojik ajanı *Candida*'lardır. Risk altındaki gruplar, altta yatan kapak hastalığı olanlar, protez kalp kapağı olanlar ve intravenöz (iv) ilaç bağımlılarıdır. En sık aort ve mitral kapaklar tutulur, iv ilaç bağımlılarında triküspit kapak tutulumu sıktır. Kalp cerrahisi geçirenlerde endokardit, ameliyattan sonraki 2 ay içinde gelişir. Prognozu kötüdür ve sadece antifungal tedavi uygulanan hastaların %80'i kaybedilir. Erken cerrahi tedavi, hastaların yaşama şansını artırır. Klinik bulguları bakteriyel endokardit ile aynıdır. Ateş, iştahsızlık, kilo kaybı ve çabuk yorulma sıktır. %50-90 hastada kalpte üfürüm duyulur, %30-50 hastada dalak büyümüştür. Büyük vejetasyonlar, büyük damar embolizasyonu ve endoftalmite gelişebilir. Önemli bir komplikasyonu, abse gelişimi ile miyokard infarktüsüdür. *Candida*

enfeksiyonlarının hematojen yayılımı sonucunda nadir bir komplikasyon olarak pürülan perikardit gelişebilir. Belirtiler non-spesifik olup, göğüs ağrısı, perikardiyal effüzyon ve frotman olabilir. Santral ve periferik venlerde septik tromboflebit ve yapay kapak enfeksiyonları da bu gruptaki nadir tablolardır (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 131-148).

6- Renal Kandidoz: Sıklıkla organizmanın hematojen yayılımı sonucunda gelişir. Dissemine kandidozlu hastaların %80 kadarında hastalığa böbrek katılır. Renal abse oluşumu sıktır. Pelvis veya üreterler miçelyum kümeleri ile tıkanır, hidronefroz ve anüriye neden olabilir. En sık semptomları ateş, titreme, bel ve karın ağrılarıdır. Bebeklerde oliguri ve anüri daha sık gelişir (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 131-148).

7- Alt Üriner Sistem Kandidozu: Tüm üriner sistem enfeksiyonlarının %25'inden *C.albicans* sorumludur. Çoğunda enfeksiyon, üretral kataterler veya genital/gastrointestinal yoldan organizmaların lokal yayılımı sonucu ortaya çıkar. Kadınlarda, şeker hastalarında, idrar yollarında anomalisi veya hasarı olanlarda daha sıktır. Bakteriyel enfeksiyonların aksine, kandidüresi olanlar genellikle asemptomatiktir (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 131-148).

8- Peritonit: Periton diyalizinin nadir bir komplikasyonudur. Gastrointestinal perforasyon veya intestinal anastomozlarda sızıntı sonucunda da görülebilir. Cerrahi hastalarında *Candida* peritonitine bakteriyel peritonit de eşlik eder. Klinik bulguları bakteriyel peritonit ile aynıdır. Çoğu hastada ateş, karın ağrısı ve hassasiyeti, bulantı ve kusma vardır. En sık izole edilen etkenler sırasıyla, *C.albicans*, *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis*'tir (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 131-148).

9- İntrauterin Kandidoz: Annenin genital yolundan asendan enfeksiyon ile ortaya çıkar. Önce amniyon sıvısı kontamine olur, bunu fetal enfeksiyon izler. Özellikle intrauterin kontraseptif cihazı olan kadınlarda fetal kandidoz gelişimi sonucu spontan düşükler ortaya çıkabilir. Klinik olarak, umbilikal kord üzerine yayılmış çok sayıda, küçük, sarı-beyaz renkli lezyonlar izlenir. Fetus canlı doğarsa, konjenital kutanöz kandidozun karakteristik lezyonları gelişir (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 131-148).

10- Osteomyelit, Artrit, Miyozit: Nadirdir. Osteomyelit, nötrojenik kanser hastalarında ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerde organizmanın hematojen yayılımının geç bir komplikasyonu olarak ortaya çıkar. Cerrahi veya travma ile organizmanın direkt inokülasyonu sonucunda da gelişebilir. Yetişkinlerde sıklıkla lomber omurlar tutulur. En sık semptom lokal ağrıdır, ateş nadirdir. Osteolitik lezyonlar karakteristiktir. Artrit de sıklıkla hematojen yayılımın bir komplikasyonu olmakla birlikte, aspirasyon,

kortikosteroid enjeksiyonu veya protez eklem replasmanı gibi girişimler esnasında mikroorganizmanın direkt inokülasyonu ile de gelişebilir. Tutulan eklemlerde ağrı ve efüzyon vardır. Sıklıkla büyük eklemler tutulur. Miyozit, nötropenik hastalarda, özellikle dissemine *C.tropicalis* enfeksiyonu olanlarda görülür. Kaslarda hassasiyet ile karakterizedir (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 131-148).

11- Endoftalmit: Göz travmasının tesadüfi bir komplikasyonu olabileceği gibi, organizmanın hematojen yayılımı sonucu da gelişebilen, görmeyi tehdit eden, ciddi bir tablodur. Sıklıkla iv ilaç bağımlılarında ortaya çıkar. Semptomlar arasında görme bozukluğu, göz ağrısı ve gözde uçuşmalar yer alır. Fundoskopik muayenede, tipik, uni veya bilateral, sınırları belirsiz, sarı-beyaz renkli, retinal, koryoretinal veya vitoretinal lezyonlar görülür. Tedavi edilmezse çoğu vaka körlükle sonuçlanır (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 131-148).

12- Dissemine Kandidoz: Tedavi ve prognozu birbirinden farklı olan 3 ayrı klinik tabloyu tanımlar. Çoğu hastada bu tablolar arasında kesin bir sınır gözlenemez.

a) Kandidemi: organ tutulumuna ait bir bulgu olmaksızın, birden fazla kan kültürünün pozitifliği ile karakterizedir. Hem nötropenik, hem de non-nötropenik hastalarda görülebilir.

b) Akut Dissemine Kandidoz: Hem nötropenik, hem de non-nötropenik hastalarda görülebilen, fulminan seyirli, hayatı tehdit eden bir enfeksiyon tablosudur. Geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine cevap vermeyen inatçı ateşle karakterizedir. Nötropenik hastaların %10 kadarında makronoduler kutanöz lezyonlar, non-nötropenik hastaların ise %30 kadarında endoftalmit ile beraberdir. En sık komplikasyonları, beyin ve böbrek abseleri, menenjit, miyozit, miyokardit ve endokardittir. Geç komplikasyonları arasında osteomyelit ve septik artritis yer alır.

c) Kronik Dissemine Kandidoz (Hepatosplenik Kandidoz): Remisyon-indüksiyon tedavisi sonrasında yeterli nötrofil sayısına ulaşan lösemik hastalarda ortaya çıkan sinsi bir hastalıktır. Hastalık genellikle hasta nötropenikken başlar ve antibiyotik tedavisine cevap vermeyen inatçı ateş ile kendini gösterir. Herhangi bir organa ait klinik belirti izlenmez. Nötrofil sayısı normale döndüğü halde ateş devam eder, beraberinde kilo kaybı sıktır. Karın ağrısı, hepatosplenomegali görülebilir. Alkalen fosfataz yükselebilir, ancak diğer karaciğer fonksiyon testleri normaldir. Kesin tanısı tomografide karaciğer ve dalakta çok sayıda ve küçük radyolüsen alanların görülmesi ile konur. Biyopsi dokusunun boyalı preparatlarında etken görülse de vakaların ancak %30'unda organizma üretilir. Kan kültürleri sıklıkla negatiftir. En sık etken *C.albicans*'tır, bunu *C.tropicalis* izler (Richardson ve Warnock, 1997, s.: 131-148).

1.4 *Candida* Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı

Enfeksiyonların tanımlanabilmesi için ilk adım, klinik şüphedir. Özellikle sistemik mantar enfeksiyonlarında, spesifik klinik belirtilerin bulunmaması nedeniyle, mantar enfeksiyonu akla gelmediği takdirde tanı koymak zordur. İleri derecede bağışıklığı baskılanmış bireylerde de klinik tablo çok değişken olabilir, bu hastalarda tipik semptom ve bulgular bulunmayabilir, enfeksiyon varlığına rağmen balgam ve kan kültürleri negatif bulunabilir. Tanıya yönelik uygulanan invaziv girişimler de bu hastalara ek riskler getirir. Ayrıca kandidemili hastaların tanımlanmasını zorlaştıran bazı başka faktörler de vardır: Çoklu antibiyotik tedavisi uygulanması, başka bir vücut bölgesinde lokalize *Candida* enfeksiyonu mevcudiyeti, santral kâterler, nötropeni, katater olmayan hastada kandidüri, çok sayıda lokalizasyonda *Candida* kolonizasyonu ve hemodiyaliz gibi (Stevens ve ark., 2002).

Örnek Alınması ve Transportu: Hemen her tür örnekten *C. albicans* izole edilebilir. Örnek alınması ve transportunda uygulanması gereken özel bir prosedür yoktur. Ancak, organizma çoğalmadan ve morfolojisini değiştirmeden önce örneğin direkt mikroskopik muayenesinin yapılabilmesi için transportun hızlı yapılması gerekir (Fisher ve Cook, 1998, s.: 2-3, 13-34).

Mikroskopi: Gram boyalı preparatlarda Gram pozitif maya hücreleri görülür. Blastokonidyalılar ve psöдохif yapıları gözlenebilir. Blastokonidyalılar, tek hücreli, yuvarlak veya oval formlardır. Enfeksiyonu başlatabilmek için blastokonidyalıların bulunması şarttır. Psöдохifler, birbirine bağlı kalmış blastokonidya zincirleridir. Septa izlenmez, ancak yavru hücrenin ana hücreden ayrıldığı yerde birleşme sınırı izlenir (Fisher ve Cook, 1998, s.: 2-3, 13-34).

Kültür: Primer kültür için çok sayıda vasat kullanılabilir (Atlas of Clin Fungi). En sık kullanılan vasatlar modifiye Sabouraud Dekstroz Agar (SDA), Brain-Heart İnfüzyon Agar (BHI) ve SDA ile BHI kombinasyonu olan SABHI'dır. Enfeksiyon tanısını koymada en önemli kriter, normalde steril olan bölgelerden mantarın izolasyonudur. Floralı bölgelerden alınan örneklerde etkeni belirlemek için organizmanın kültürde predominant olarak üremesi ve tekrarlayan kültürlerden de izole edilmesi gerekir. Derin yerleşimli enfeksiyonu olan hastalardan mutlaka kan kültürü alınmalıdır. Ancak yine de, en iyi şartlarda bile, disemine kandidozlu nötropenik hastaların maksimum %50'sinde, endokarditli hastaların ise maksimum %80'inde kan kültürü pozitif bulunur. Akciğer kandidozunu tanımlamada, balgam ve bronkoalveoler lavaj sıvısı çok güvenilir materyaller değildir, en iyi tanı akciğer biyopsisi ile konur. İdrar

kültürlerinde 1×10^4 CFU/ml üreme, üriner sistem kandidozu açısından pozitif kabul edilmelidir (Fisher ve Cook, 1998, s.: 2-3, 13-34; Richardson ve Warnock, 1997, s.:9-19, 140-142).

SDA besiverinde, 24-48 saatte 25-37C°'de oluşan *C.albicans* kolonileri, düzgün yüzevli, beyaz-krem renkli, macunumsu görünümlü ve konveks yapıdadır. Eskiyen kültürlerde koloniler kurur, kabalaşır ve vasata doğru büyüyen gerçek hifler oluşturur. Kolonilerden alınan örneklerin mikroskopik incelemesinde psödohifler üzerinde yerleşmiş blastokonidyalar görülür. Cornmeal-Tween 80 (CMT) agarda üretildiğinde, *C.albicans* çok sayıda klamidyospor oluşturur. Klamidyosporlar ise, zorlayıcı şartlar altında mantarın havatta kalmasını sağlayan yoğun protoplazmalı, büyük, kalın duvarlı veziküllerdir. Depo üniteleri olan bu yapılar çift katlı bir duvar yapısı gösterirler. *C.albicans* identifikasyonu için, germ tüp testinin pozitif olması (serum içinde 3 saatte blastokonidyumlardan filamentöz uzantılar çıkması) ve uygun vasatta klamidyospor oluşturmaya yeterlidir. Germ tüpler, bir aseksüel üreme şekli olup, psödohifin aksine mayadan ayrılma noktasında bir birleşme sınırı göstermez. Biyokimyasal testler, özellikle diğer *Candida* türlerinin ayırt edilebilmesi açısından önemlidir (Fisher ve Cook, 1998, s.: 13-34).

Seroloji: Tek başına kullanılması yanıltıcı sonuç alınmasına neden olur. Çoğu insan, aktif enfeksiyon geçirirse bile, *C.albicans*'a karşı düşük titrede antikor taşır. Ayrıca bağışıklığı baskılanmış konakta enfeksiyon varlığına rağmen serolojik testler negatif veya zayıf pozitif bulunabilir. Bağışıklık sistemi normal olan hastalarda en sık kullanılan serolojik testler, ikili immunodiffüzyon testi (ID), counter immünelektroforez (CIE) ve lateks aglütinasyon (LA) testleridir. Bu yöntemlerin sensitiviteleri %80 civarındadır. En spesifik olanlar CIE ve ID testleridir. İnvaziv kandidoz şüphesi olan immünkompromize hastaların değerlendirilmesinde önerilen test, serum mannan antijenini tespit etmeye yönelik uygulanan Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA) testidir. Testin sensitivitesi %80, spesivitesi ise %98'tir. Aralıklı olarak tekrarlanan testlerde antikor titrelerinde artış görülmesi anlamlıdır (Fisher ve Cook, 1998, s.: 13-34; Richardson ve Warnock, 1997, s.:9-19, 140-142). İki veya daha fazla testin beraber kullanılması tanının güvenilirliğini artırmaktadır (Fisher ve Cook, 1998, s.: 13-34). Son yıllarda glukan için spesifik bir test olan G test kullanımına ilgi artmıştır. Bu test, mantarların hücre duvarında bulunan (1,3)- β -D-glukan koomponentini tespit eder. Testin sensitivitesi %90, spesivitesi %84-100 olarak bulunmuştur (Stevens ve ark., 2002).

Moleküler Tanı: Özellikle invaziv enfeksiyonlarda hızlı tanı konması ve erken tedavi başlatılması açısından önem taşır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarında konvansiyonel yöntemlerle patojenik mantarların identifikasyonu en az 3-4 gün sürer ve hatalı sonuçlar da alınabilir (Luo ve Mitchell, 2002).

İnvaziv kandidozların ise en fazla %58'inde kan kültürlerinden pozitif sonuç alınmaktadır. Bu nedenlerle, tanıda moleküler yöntemlerin kullanımı bu hasta gruplarında önem kazanmaktadır. En sık kullanılan yöntemler, hızlı, kolay, sensitif ve spesifik olması nedeniyle, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniğine dayalı yöntemlerdir (Stevens ve ark., 2002; Luo ve Mitchell, 2002). PCR ile, çok az sayıdaki patojenik fungal DNA çoğaltılabilir ve canlı mantar hücrelerinin üretilmesine ihtiyaç duymaz. Oldukça hızlı bir yöntemdir, örnek alınmasından sonra yaklaşık 4-8 saat içinde sonuç verilebilir (Reiss ve ark., 2000). Hedef olarak seçilen bölgeler, tür veya genus spesifik genomik dizilerdir. Bu bölgeler arasında sıklıkla kullanılanlar, Hsp90, lanosterol demetilaz, aspartik proteinaz, kitin sentaz, aktin genleri gibi tek kopya bulunan genler ve rDNA genleri gibi 50-100 kopya bulunan genlerdir. Mantar spesifik olması ve aynı zamanda azol grubu antifungal ajanların hedefi olması nedeniyle ilgi odağı olmuş bir diğer bölge, P450 lanosterol-14 α demetilaz genidir (Stevens ve ark., 2002). *Candida* türlerinin identifikasyonunda, topoizomeras II genlerine özgü hazırlanmış spesifik primerlerin kullanımı ile nested PCR uygulamasından da klinik örneklerde başarılı sonuç alınmıştır (Kanbe ve ark., 2002). Kültürden alınan kolonilere multiplex PCR uygulanması (Luo ve Mitchell, 2002) veya 28SrDNA genine yönelik özgün oligonükleotid probalar kullanılması (Sandhu ve ark., 1995; Vazquez ve arl., 1993) ile klinik önemi olan mantarların identifikasyonu mümkündür.

Diğer moleküler yöntemler arasında; *Candida* DNA'sını tespit etmeye yönelik uygulanan "reverse line-blot assay", mantarların hücre duvarlarının bir komponenti olan (1,3)- β -D-glukan tespitine yönelik hazır kitler ümit vaad etmektedir (Reiss ve ark., 2000). Real-time PCR, hedef DNA amplifikasyonunu ampikonların tespiti ile kombine eden kapalı, hızlı ve kontaminasyon riskini ileri derecede azaltan bir sistemdir. Bu yöntem, sekans farklılıklarını belirleyebildiği gibi, hedef DNA'nın miktarını da tayin edebilir. Ayrıca, tek bir çalışmada, birden fazla hedef araştırılabilir. (Cockerill,III ve Uhl., 2002). Mantarların, özellikle *Aspergillus* ve *C.albicans* gibi invaziv etkenlerin identifikasyonu ve miktar tayininde bu yöntem başarıyla kullanılmaktadır (Loeffler ve ark., 2002; Pryce ve ark., 2003).

1.5 Mantarların Tiplendirilmesi ve Genotiplendirme:

Genotiplendirme yöntemlerinin geliştirilmesinden önce mantarların tiplendirilmesinde fenotipik özelliklerden yararlanılmaktaydı. Bu şekilde yapılan tiplendirme "biyotipleme" olarak bilinir. Bu yöntemlerde hareket edilen nokta, fenotipik farklılıkların genotipi yansıttığı varsayımıydı (Soll, 2000).

İlk tiplendirme yöntemi olan serotiplendirme, 1950’de Evans (1950) tarafından *C.neoformans*’ta uygulanmıştır. *C.albicans* tiplendirilmesinde de ilk kullanılan yöntemlerden biri serotiplendirme olmuş ve *C.albicans* suşları A ve B olmak üzere iki serotipe ayrılmıştır (Soll, 2000). Serotiplendirmenin en önemli dezavantajları birbirinden farklı birçok suşu aynı tip içinde sınıflandırması (yeterli ayırım gücü olmaması) ve yöntemin tekrarlanabilirliğinin az oluşudur. 1980’lerin başında Odds ve Abbott (1980, 1983), “yeteri kadar fazla sayıda fenotipik karakter değerlendirilir ve sınıflandırma bu karakterlerin kombinasyonuna göre yapılacak olursa, genotip özellikleri yansıtılabilir” düşüncesinden hareketle, ilk kompleks biyotiplendirme protokolünü geliştirmişlerdir. Bu yöntemde farklı deney agarlarında üretilen suşların üreme karakteristiklerini karşılaştırmak için 13 deney (pH 1.4’de üreyebilme, Sap üretimi, flusitozin direnci, borik asit direnci, safranin direnci, üre-sorboz ve sitrat asimilasyonu, yüksek tuz konsantrasyonuna duyarlılık, MacConkey agarda üreyebilirlik, tetrazolyum tuzlarına direnç, sodyum peridata direnç ve setrimide direnç) yapılmıştır. Bu sistemin ayırım gücü oldukça yüksek bulunmuştur, ancak farklı laboratuvarlarda uygulandığında tekrarlanabilirliğinin zayıf olduğu anlaşılmıştır (Odds ve Abbott 1980; Odds ve Abbott, 1983). Daha sonra pek çok biyotiplendirme yöntemi *C.albicans* biyotiplendirilmesinde kullanılmış, ancak hiçbirisi Odds ve Abbott’un protokolü kadar ilgi görmemiştir. Bu yöntemler arasında, morfoloji, rezistotiplendirme, öldürücü maya tiplendirmesi, enzim tiplendirmesi, şeker asimilasyon tiplendirmesi, ilaç duyarlılıklarına göre tiplendirme sayılabilir. Bunların arasında daha fazla kabul gören yöntem, farklı enzim paternlerine göre tiplendirmeye dayanan izoenzim biyotiplendirmesi olmuştur. Şeker asimilasyon tiplendirmesi bugün, hızlı mantar identifikasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır, hatta bu amaca hizmet eden ticari kitler geliştirilmiştir (API gibi). Ancak, özellikle *C.albicans*’ta fenotipik dönüşüm mekanizması olduğundan, antijenite, antifungal ajanlara duyarlılık, boya tutma, Sap salınımı ve karbonhidrat asimilasyonu gibi fenotipik özelliklerinde spontan değişiklikler oluşmaktadır. Bu nedenle biyotiplendirme sistemleri, özellikle *C.albicans* açısından hatalı sonuçlar verebilmektedir. Üreme ortamının pH değişikliği de fenotipik özellikleri değiştirdiğinden, kültürün değerlendirilme zamanı, besiyeri ve çevre şartları gibi parametrelerdeki küçük değişiklikler bile farklı sonuçlar elde edilmesine neden olabilmektedir (Soll, 2000). Sonuç olarak, bu yöntemlerin tekrarlanabilirliği az, test yöntemleri zahmetli olup, sonuçları birçok değişkenden etkilenmektedir (Scherer ve Stevens, 1987).

Organizmanın DNA dizilerinin değerlendirilmesi, yukarıdaki problemlerin üstesinden geldiğinden bugün yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. İlk olarak 1980’lerde, moleküler problemlerin mikrobiyolojide kullanılmaya başlanması ile önce bakteriler, daha sonra da mantarlar tiplendirilmeye başlanmış, zamanla genotiplendirmeye çalışmalarında pek çok farklı yöntem kullanılmıştır: Branched DNA, hybrid capture sistemi, Ligase Chain Reaction (LCR), Polymerase Chain Reaction (PCR), Nucleic-

acid sequence based amplification (NASBA), reverse transcription-PCR (RT-PCR), strand displacement amplification (SDA) ve transcription mediated amplification (TMA). Amplifikasyona dayalı yöntemler, klinik örneklerdeki mikrobiyal patojenleri moleküler yöntemlerle direkt tespit etme olanağı sağlamıştır. PCR amplifikasyonu, mikroplakta hibridizasyon veya real-time tespit ile kombine edilerek sensitivite ve spesivite arttırılmış, sonuç alma süresi kısaltılmıştır (Versalovic ve Lupski, 2002). Bu yöntemler arasında sık kullanılanlara aşağıda değinilmiştir.

Genotiplendirme, mantar hastalıklarının epidemiyolojisini araştırmada önemlidir. Ancak, bugüne kadar herhangi bir genotipleme yöntemi altın standart olarak kabul görmemiştir. Bugüne dek tanımlanan yöntemlerin hepsinin kendine özgü avantaj ve dezavantajları olduğu görülmüştür. Bu çalışmaların çoğunda, izolatlar arasında ayırt edilen farklılıkların mikroevrimi yansıtan ve kısa sürede ortaya çıkan minör değişiklikleri mi gösterdiği, yoksa birbiriyle oldukça ilişkisiz olan suşlardaki majör değişiklikleri mi belirlediği tanımlanmamıştır (Soll, 2000).

Bir insan popülasyonunda etkenin dinamiklerini anlamak, kommensalizm ve enfeksiyon arasındaki kompleks ilişkileri belirlemek, enfeksiyon kaynağını belirlemek ve ilaç dirençli suşların varlığını araştırmak için suşlar arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koyacak genotiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır. Özellikle kommensal mikroorganizmalardan kaynaklanan enfeksiyonların tanımlanmasında, belli suşların belli vücut lokalizasyonlarına speşyalize olduğu durumlarda, hızlı adaptasyon için suşların mikroevrime uğradığı durumlarda, suşlar konaklar arasında bulaşa neden olduğunda bu tiplendirme daha da önemli hale gelmektedir. Bu amaçlara hizmet edecek genotipleme sistemi, birbiriyle ilişkisiz izolatları ayırt edebilmeli, farklı izolatlardaki aynı türü ayırabilmeli, birbiriyle çok benzer olduğu halde aynı olmayan izolatları da belirleyebilmelidir. Yöntem tekrarlanabilir ve ölçülebilir olmalıdır (Soll, 2000). Genotipleme kullanım alanları ve yöntemin bulundurması gereken özellikler tablo-2 ve tablo-3'de verilmiştir. Fenotipik verilerle genotipik veriler arasındaki farklar şu şekilde sıralanabilir:

1- Genotipik düzeyde tanımlanabilen karakterlerin sayısı, fenotipik düzeyde tanımlanabilenlerden daha fazladır. Buna karşılık, tanımlanabilen her fenotipik özelliğin altında yatan bir genotip vardır. Bu nedenle, genotipik özelliklerle sadece filogenetik gruplar belirlenmekle kalmaz, aynı zamanda farklılıklar ölçülerek izolatların birbirinden uzaklığı belirlenebilir.

2- Fenotipik evrimin aksine, genotipik evrim sürekli ve hızlıdır. Genotipte ortaya çıkan her değişiklik fenotipe yansımaz. Örneğin, hücrenin temel, evrensel fonksiyonları ile ilgili genlerde ortaya çıkan dizi değişiklikleri sıklıkla o fonksiyonda değişiklik yaratmadan ortaya çıkar.

3- Moleküler karakterler iyi tanımlanmış olmakla beraber (bir gende 4 nükleotid, bir proteinde 20 aminoasit gibi), birçok fenotipik karakter için değer değişkendir.

4- Birçok farklı genotipik değişiklik fenotipte aynı değişikliğe neden olur. Bu nedenle aynı fenotipik özelliğe sahip iki organizmanın aynı genetik temele dayandığı söylenemez (Olsen ve Woese, 1993).

Tablo-2. Genotiplendirme yöntemlerinin kullanım alanları (Soll, 2000; Clemons ve ark., 1997; Luu ve ark., 2001; Scherer ve Stevens, 1987; Fridkin ve Jarvis, 1996; van Belkum, 1999):

1.	İnatçı kolonizasyonlar veya tekrarlayan enfeksiyonlardan izole edilen suşların aynı olup olmadığının belirlenmesi,
2.	Karışık fungal enfeksiyonlarda etken olarak izole edilen suşlar ile tek etken olarak izole edilen suşlar arasında genotipik farklılık olup olmadığının belirlenmesi,
3.	Belli konak karakteristikleri (yaş, cinsiyet vb) ve anatomik lokalizasyonlar (vajen, ağız, kan vb) ile belli klinik tablolarla (AIDS, DM, oral protez kullanımı, gebelik vb) genotip arasında ilişki olup olmadığının belirlenmesi,
4.	Farklı coğrafik bölgelerden izole edilen suşların yakınlığının araştırılması,
5.	Enfekte eden popülasyonlar içinde 'Selektif avantaj' yaratarak başarılı suşların oluşumuna neden olan evrimsel değişikliklerin (mikroevrim) belirlenmesi,
6.	Daha hızlı mikroevrime uğrayan suşların belirlenmesi,
7.	Enfeksiyon kaynağının endojen/ekzojen olup olmadığının belirlenmesi,
8.	Genotiplerin organizmada izlediği yol ve bu yolu katettiği sürenin belirlenmesi,
9.	Konakta, konaklar arasında, çevreyle konak arasında etkenin izlenmesi,
10.	Nozokomiyal enfeksiyonların kaynağının belirlenmesi,
11.	Virülans ve genotip arasındaki ilişkinin belirlenmesi,
12.	İnvazivlik ile genotip arasındaki ilişkinin belirlenmesi,
13.	İlaç direnci ile genotip arasındaki ilişkinin belirlenmesi,
14.	Uygun enfeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilmesi.

Tablo-3: Genotipleme yönteminin özellikleri (Soll, 2000; Scherer ve Stevens, 1987; Pujol ve ark., 1997)

1.	Stabil olmalı,
2.	Temiz, tartışmasız ve otomatize bilgisayar yardımlı analize uygun kantitatif veri sağlamalı,
3.	Tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü yüksek olmalı, yeterli sayıda suşu birbirinden ayırt edebilmeli,
4.	Uygulaması kolay ve ucuz olmalı,
5.	Çevre koşullarından ve yüksek hızlı genomik düzenlenmelerden etkilenmemeli,
6.	Türler arası genetik yakınlığı belirleyebilmeli,
7.	Aynı izolattaki birbiriyle tamamen ilişkisiz suşları ayırt edebilmeli,
8.	Farklı izolatlardaki aynı veya yakın ilişkili suşları tanımlayabilmeli,
9.	Mikroorganizma popülasyonu içerisindeki mikroevrimsel değişiklikleri ortaya koyabilmeli,
10.	Genetik mesafeyi tanımlayan bağımsız bir başka genotipleme yöntemiyle karşılaştırıldığında geçerliliği gösterilmiş olmalı

1.5.1 Sık Kullanılan Genotiplendirme Yöntemleri

1- Southern Blot Hibridizasyon Yöntemi: Tüm kromozomlarda yayılmış nükleotid polimorfizmlerini ortaya koymaya yönelik bir sistemdir. Allel spesifik oligonükleotid problarla Southern hibridizasyon yöntemine dayanan bu yöntemle farklı polimorfik bölgeler için heterozigotlar ve homozigotlar birbirinden ayrılabilir, çok lokuslu bir genotiplendirme sağlanabilir (Luu ve ark., 2001). Denenen problar içerisinde, özellikle Ca3 probu en sık kullanılan prob olmuştur (Soll, 2000; Pujol ve ark., 1997). Yöntemin tekrarlanabilirliği yüksek ve bilgisayar analizine uygundur. Karşılaştırma sağlamak için bugüne kadar elde edilmiş datayı saklayan veritabanları mevcuttur. Bu yöntem, aynı ve farklı izolatları tamamen birbirinden ayırabildiği gibi, mikroevrim sonucu ortaya çıkan değişiklikleri de belirleyebilme kapasitesine sahiptir (Pujol ve ark., 1997).

2- Multilokus Enzim Elektroforezi: İzoenzim-alloenzim profillerine göre ayırım sağlar (Soll, 2000; Vrioni ve Matsiota-Bernard, 2001; Pujol ve ark., 1997). Belirlenmiş birden fazla lokustaki farklılıkları hedef alır, bu nedenle güvenilir ancak zaman alıcı bir yöntemdir. Hızlı mikroevrime bağlı değişiklikleri ortaya koymada Ca3 probu kadar etkili olmamakla beraber, mikroorganizmaların üreme ve yayılma şekillerini araştırmada faydalı bulunmuştur (Pujol ve ark., 1997, Boerlin ve ark., 1996).

3- Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ve Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR): Rastgele seçilmiş kısa oligonükleotidler (~10bp) kullanılarak modifiye edilmiş bir klasik PCR protokolü uygulanır. Bu rastgele primerler, değişik sayı ve büyüklükte bir dizi ampikon oluşturur. Bu ampikonların agaroz jelde ayrılması ve değerlendirilmesi, bu tiplendirme sisteminin temelini oluşturur. Yöntemi kolay, hızlı ve diğer genotiplendirme yöntemlerinden daha ucuzdur (Becker ve ark., 2000; Soll, 2000). Bu nedenle genotiplendirme çalışmalarında sıklıkla kullanılmıştır (Vrioni ve Matsiota-Bernard, 2001). Ancak, elde edilen bant paternleri; primer-şablon konsantrasyon oranındaki değişimler, amplifikasyon reaksiyonunda uygulanan sıcaklıklar, Taq enzim kaynağının değişmesi ve reaksiyon karışımındaki Mg^{+2} iyon konsantrasyonu gibi faktörlerden etkilendiğinden, yöntemin tekrarlanabilirliği zayıftır (Becker ve ark., 2000; Soll, 2000; Bretagne ve ark., 1997). Daha güvenilir sonuç elde etmek için birden fazla primer ile çalışılmalı ve elde edilen verilerin kombinasyonu ile değerlendirme yapılmalıdır (Soll, 2000).

4- Tek iplikçikli Konformasyon Polimorfizmi (SSCP): Türler arasındaki farklılıkları ortaya çıkartmada yaygın olarak kullanılan bir yöntem olmakla beraber, farklılıkların değerlendirilmesinde DNA dizi analizi yapılması gerekliliği nedeniyle kullanımı sınırlı kalmıştır (Bretagne ve ark., 1997).

5- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP): Sferoplastlardan ekstrakte edilen DNA bir veya daha fazla endonükleaz ile muamele edilerek agaroz jel elektroforezinde ayrılır. Oluşan bant paternleri görüntülenerek tiplene yapılır. Ayrım gücünü etkileyen faktörler arasında, agaroz yoğunluğu, elektroforez süresi, uygulanan voltaj ve kullanılan endonükleazın özellikleri yer alır. Kesim noktalarındaki dizi farklılıkları, kesim bölgelerinin sekonder modifikasyonları, tanıma noktalarının ortadan kalkması veya tanıma noktaları arasına giren insersiyon veya delesyonlar sonucunda suşlar arasında varyasyonlar ortaya çıkar. RFLP paterninde gözlenen yoğun bantlardan rDNA dizileri ve daha az olmak üzere mitokondrial DNA dizileri sorumludur. Bu yöntem, özellikle farklı izolatlardaki aynı türleri belirlemede ve farklı türleri birbirinden ayırt etmede faydalıdır. Ancak büyük epidemiyolojik çalışmalara uygun değildir. Daha az yoğun boyanan bantların bulunması nedeniyle, değerlendirmesi güçleşen bu yönteme hibridizasyon problemlerinin dahil edilmesi sayesinde belli sayıda bant değerlendirilmeye alınarak daha güvenilir sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır (Soll, 2000).

6- Elektroforetik Karyotiplleme: Pulsed field gel electrophoresis (PFGE), orthogonal-field-alternation gel electrophoresis (OFAGE) ve bu elektroforetik karyotiplleme yöntemlerinin varyasyonları sayesinde maya genomunun kromozom uzunluğunda fragmanları birbirinden ayrılabilir. Kromozom spesifik DNA problemleri kullanılarak Southern-blot hibridizasyon yöntemiyle spesifik kromozomlar tanımlanabilir. Kullanılan tamponlar, örnek hazırlama yöntemleri ve yürütme şartlarına bağlı olarak tekrarlanabilirliği sorun yaratabilse de optimum şartlar sağlandığında tekrarlanabilirliği yüksek olan bir yöntemdir. Ancak *C.albicans* hücrelerinde spontan kromozomal reorganizasyon gözlemlendiğinden, karyotipik değişiklikleri belirlemek yanıltıcı sonuç verebilir (Soll, 2000). PFGE'nin ayırım gücü de, REA ve RAPD analizine göre daha düşük bulunmuştur (Clemons ve ark., 1997). PFGE'nin bir versiyonu olan contour-clamped homogeneous electric field gel electrophoresis (CHEF) kullanılarak karyotiplleme büyük kromozomal bantların rezolüsyonunu artırarak genotiplendirmede başarılı sonuçlar vermektedir (Huang ve ark., 1998; Vazquez ve ark., 1993). Yöntemin ayırım gücü yüksektir, tekrarlanabilirliği iyidir ve gözlem farklılığı önemli bir sorun oluşturmaz. Ayrıca hibridizasyon tekniklerine gereksinim göstermez ve radyoaktivite kullanmaz (Vazquez ve ark., 1993).

7- Restriksiyon Enzim Analizi: İlk olarak Scherer ve Stevens (1987) tarafından kullanıma sokulmuştur. Sıklıkla kullanılan enzim EcoRI olup, bu yöntem ile *Candida* suşları 3.7kb ve 4.2kb bantların varlığına

göre A ve B olmak üzere iki büyük gruba ayrılmıştır. Yöntem, bol miktarda DNA'ya ihtiyaç göstermekle beraber tekrarlanabilirliği yüksektir (Clemons ve ark., 1997). Yöntemin detayı ileride belirtilecektir.

8-Kısa tekrar dizilerinin belirlenmesi: Kısa tekrar dizileri -ki bunlar VNTR (variable number tandem repeats) veya mikrosatellitler olarak da bilinir- stabil olmayan ve DNA sentezi esnasında, iplikçiklerin kayarak yanlış eşleşmesi sonucu tekrar sayılarında sık sık varyasyon tespit edilen diziler olup, mikroorganizmalarda gen ekspresyonunun regülasyonundan sorumludur. Yetersiz DNA polimeraz aktivitesi ve replikasyon esnasında yetersiz DNA tamiri sonucunda tekrar dizileri artabilir veya azalabilir. Bu diziler genomda yaygın olarak bulunabileceği gibi, belli lokalizasyonlarda sabit de olabilirler. *C.albicans*'ta, çoğu üç nükleotidlik (CAA veya CAG) tekrar dizileri olmak üzere, tiplendirmede kullanılmaya uygun çok sayıda tekrar dizileri içeren bölge tespit edilmiştir. Bu tekrarlar, sıklıkla açık okuma bölgeleri (ORF) içerisinde yer alır ve protein düzeyinde poliglutamin şablonları oluşturur (van Belkum, 1999). Mikrosatellitler yüksek düzeyde polimorfiktir, kodominant olarak kalıtılırlar, kullanıldıkları yöntemlerin tekrarlanabilirliği yüksektir ve doğru karakterizasyon sağlarlar (Dalle ve ark., 2000). Tiplendirme sistemi olarak CEF3 geninde yer alan mikrosatellitlerin kullanımı, güvenilir ve tekrarlanabilir bulunmuştur (Bretagne ve ark., 1997; Dalle ve ark., 2000). Daha sonra yapılan bir başka çalışmada, farklı kromozomlarda yer alan CDC3, EF3 ve HIS3 lokusları multipleks PCR ile değerlendirilmiş ve geniş epidemiyolojik çalışmalarda kullanımı uygun bulunmuştur (Botterel ve ark., 2001).

9- DNA Dizi Analizi: Aslında *C.albicans*'ta genotiplendirmeyi bütün kriterleri ile yerine getirecek tek sistem ancak DNA dizi analizi olabilir. Birçok protein kodlayan bölgelerde DNA dizilerinin karşılaştırılması ile sonuç alınabilir. Ancak çoğunlukla, seçici baskıya daha az maruz kalan, kodlama yapmayan bölgeler değerlendirilmektedir (Soll., 2000). Dizi analizinde, rRNA genleri (Huang ve ark., 1998), mitokondrial sitokrom b geni (Biswas ve ark., 2001) vb kullanılabilir. Ancak yöntem pahalı ve zaman alıcı olduğundan rutin kullanıma uygun değildir. Birden fazla yöntemin beraber kullanılması ile daha güvenilir sonuçlar alınabileceği ileri sürülmektedir (Bart-Delabesse ve ark., 1995).

1.5.2 25S İtron Analizi ile Genotiplendirme

Bir molekülün, filogenetik ilişkileri araştırmada iyi bir ölçüt olabilmesi için, içerdiği bilgiyi yansıtacak uygun bir büyüklüğe sahip olması ve yapısal düzenlenmesinin genotiplendirme çalışmalarına uygun olması gerekir. Genotiplendirmede ribozomal dizilerin kullanımının tercih edilmesinin en önemli nedeni bu kriterleri sağlamasıdır. Bu amaçla, özellikle küçük ribozomal alt üniteyi kodlayan gen dizileri uygun bulunmaktadır. Ribozomal genlerin evrensel fonksiyonlarla ilgili dizileri zaman içinde rastgele bir şekilde değişime uğrayabilirse de, bu yapısal bölümlerden herhangi birinde, kümelenen dizi değişiklikleri de olabilmektedir. Ribozomal DNA genlerinin taşıdığı korunmuş diziler, farklı izolatlardaki aynı türleri belirlemede faydalı iken; değişken diziler, genotiplendirmeye uygun veri sağlar (Olsen ve Woese, 1993).

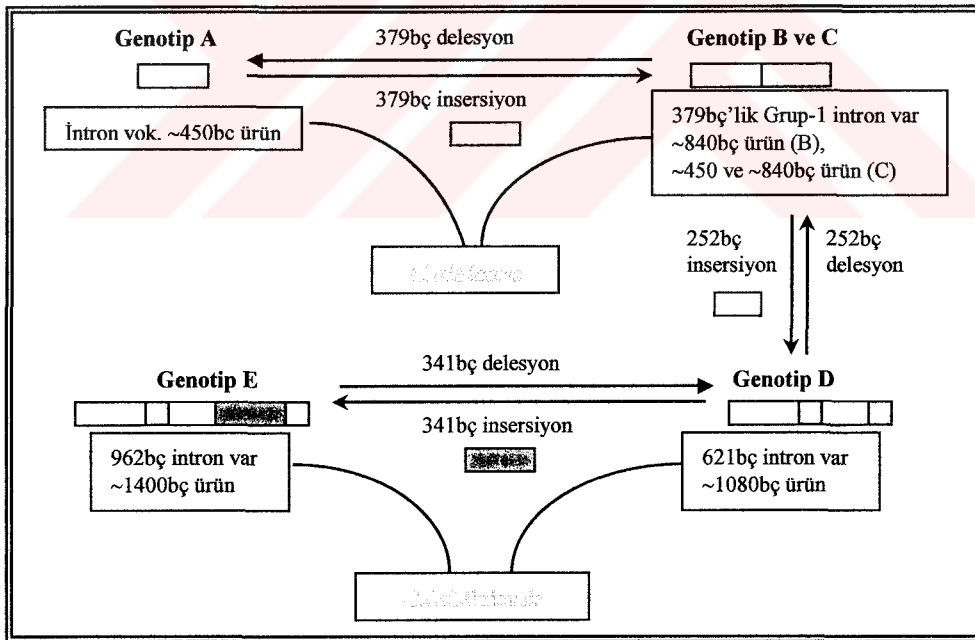
C.albicans suşlarının genotiplendirmesinde kullanılan ilk yöntemlerden biri, *C.albicans* genomunun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi ve ürünlerin standart şartlar altında uygulanan elektroforez sonucunda görüntülenmesi ile DNA parmak izlerinin elde edilmesi olmuştur. Scherer ve Stevens (1987), *C.albicans* genomunu EcoRI enzimi ile muamele ederek, elde ettikleri bantlara göre suşları tiplendirmişlerdir. Bu çalışmada, 100'ün üzerinde bant tespit edilmekle beraber, bütün suşlarda ortak olarak koyu boyanan, ikisi polimorfik, biri dimorfik olmak üzere, 3 ayrı bant gözlenmiştir. Bu bantlar sırasıyla 6-7kb (polimorfik), 3.7 veya 4.2kb (dimorfik) ve 2.5-3kb (polimorfik) büyüklüğündedir. Koyu boyanmaları nedeniyle, bu bantları oluşturan gen bölgelerinin birden fazla kopya halinde genomda bulunduğu üzerinde durulmuş ve *S.cerevisiae*'nin rRNA kodlayan DNA bölgelerine (rDNA) ait problemlerle hibridizasyonunun olumlu sonuç vermesi sonucunda, bu bölgelerin rDNA bölgeleri olduğu anlaşılmıştır. Güvenilir, tekrarlanabilir ve kolay bir yöntem olarak kabul edilen bu yöntem ile tespit edilen dimorfik bandın büyüklüğüne göre, *C.albicans* suşları A (3.7kb) ve B (4.2kb) olmak üzere iki genotipe ayrılmıştır (Scherer ve Stevens, 1987).

Daha sonra kullanımı artan bu yöntemle yapılan genotiplendirme çalışmalarında, genotip B'de tespit edilen 4.2kb'lik banttan, 25S rRNA'yı kodlayan gen bölgesinde 379bp'lik bir insersiyonun (grup-1 intron) sorumlu olduğu anlaşılmıştır (Mercure ve ark., 1993). Aynı yöntemin kullanıldığı sonraki çalışmalarda (McCullough ve ark., 1998; Clemons ve ark., 1997), 3.7 ve 4.2 kb'lik iki bandı da taşıyan genotip C ve ikisini de taşımayan genotip D tanımlanmıştır (McCullough ve ark., 1999).

Grup-1 intronlar, katalitik RNA'lar içerisinde yer alan ve olgun transkript oluşumu esnasında öncü RNA moleküllerinden kendi ayrılmasını sağlayabilen bölgelerdir. *C.albicans* 25S rRNA geninde

bulunan grup-1 intron bölgesi, yaklaşık 379bp 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 (Mercure ve ark., 1997).

Mc Cullough ve ark. (1999), izolatlardaki bu farktan sorumlu olan grup-1 intron bölgesini amplifiye eden primerler kullanarak PCR yöntemi ile *C.albicans* izolatlarını genotiplendirmeyi başarmışlardır. PCR sonucunda, genotip A izolatlar ~450bp ürün verirken, genotip B'ler ve *C.stellatoidea* ~840bp ürün vermişlerdir. Genotip C izolatlar ~450 ve ~840bp'lik iki ürün, genotip D izolatlar ve *C.dubliniensis* ise ~1080bp ürün vermiştir. Bu çalışmada, *C.stellatoidea* tipli izolatlarının aslında *C.albicans* genotip B ile aynı olduğu, genotip D suşların ise aslında *C.dubliniensis* olduğu sonucuna varılmıştır (McCullough ve ark., 1999). Hemen ardından Tamura ve ark (2001), Japonya'daki izolatları aynı yöntem ile değerlendirdiklerinde, ~1400bp ürün veren yeni bir genotip (genotipE) tespit etmişler, grup-1 intronunda 962bp'lik insersiyon taşıyan bu yeni genotipin de *C.dubliniensis* ile aynı taksonda değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varmışlardır (Tamura ve ark., 2001). Yöntem ile belirlenen genotiplerin şeması şekil-1'de görülmektedir.



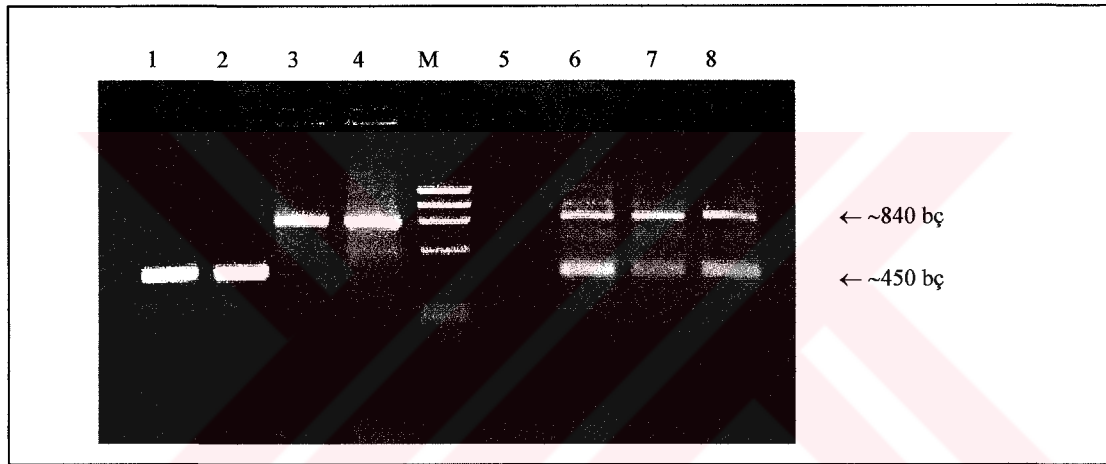
Şekil-1: 25S intron analizi ile belirlenen genotipler.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1 *C.albicans* Suşları: Çalışmaya, 368 hastaya ait 401 *C.albicans* suşu dahil edilmiştir. Bu suşların 156'sı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarlarından, 107'si İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Bizim Lösemili Çocuklar Vakfı Mikrobiyoloji Laboratuvarından, 74'ü Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından ve 64'ü Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen suşların hepsi, 1998-2003 yılları arasında hastanelerin yeni doğan, yoğun bakım, yanık, genel cerrahi, çocuk cerrahisi, çocuk ve yetişkin hematoloji ve çocuk ve yetişkin onkoloji servislerinde yatarak tedavi gören hastalardan temin edilmiştir. Hastaların hepsinde, mantar enfeksiyonu gelişimi riskini arttıran predispozan bir faktör (hematolojik malignite, solid tümör, şeker hastalığı, yanık, inmatürite, cerrahi operasyon) bulunmuştur. Birden fazla izolatu çalışmaya dahil edilen 12 hastanın altısından, farklı yatışlarda, farklı kolonizasyon bölgelerinden izole edilen 21 örnek değerlendirmeye alınırken, diğer altı hastada aynı enfeksiyon/kolonizasyon bölgesinde 2 farklı genotip tespit edilmiş ve bu hastalara ait 12 suş da çalışmaya dahil edilmiştir. 81 kan kültürü izolatu "invaziv grup" içerisinde değerlendirilirken, "non-invaziv" gruba dahil edilen izolatların 60'ı balgam, 28'i yara, 41'i idrar, 43'ü vajen, 46'sı dışkı ve 102'si boğaz kültürlerinden üretilmiştir. Kültürde üreyen kolonilerden *C. albicans* identifikasyonu, suşların germ tüp oluşturmalarına göre ve API 20 CAUX (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Fransa) sistemi kullanılarak yapılmıştır.

2.2 Genotiplerin PCR Yöntemi ile İdentifikasyonu: Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) plaklarında üretilen *C. albicans* kolonilerinden 1 öze alınarak steril bir Eppendorf tüpünde 100 µl steril distile su içerisinde süspanse edilmiştir. Süspansiyon, 95C°'de 5 dakika tutulup buza gömülerek parçalanmış hücrelerden açığa çıkan DNA'nın 5µl'si polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) şablon olarak kullanılmıştır. PCR, literatürde belirtildiği şekilde (McCullough ve ark., 1999) CA-INT-L (5'-ATAAGGGAAGTCGGCAAATAGATCCGTAA-3') ve CA-INT-R (5'-CCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATAGTAGAT-3') primerleri kullanılarak uygulanmıştır. Toplam hacim 100µl olacak şekilde PCR karışımı içerisine, uygun tampon (10mM Tris-HCl, 500mM KCl, %0,8 Nonidet P40) ile birlikte 1U Taq DNA polimeraz (Fermentas, Lituanya), her bir primerden 1µM, 1.5 µM MgCl₂, 200µM dNTP (Fermentas, Lituanya) dahil edilmiştir. PCR amplifikasyonu, otomatik PCR cihazında

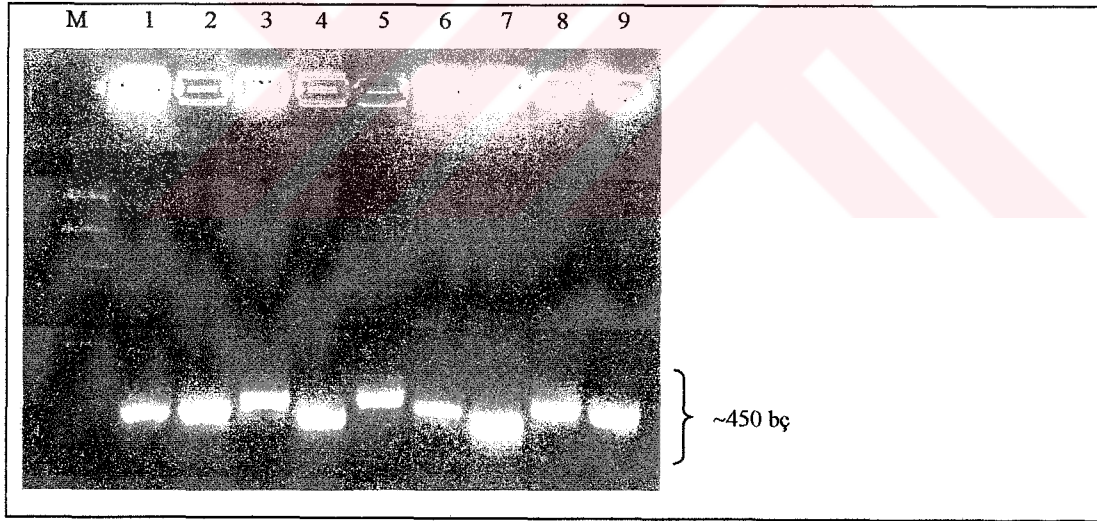
(Techne, İngiltere) şu şartlar altında gerçekleştirilmiştir: 94C°'de 3dakika ilk denatürasyonu takiben, 30 siklus olacak şekilde 95C°'de 1 dakika denatürasyon, 65C°'de 1dakika yapışma, 72C°'de 2.5 dakika uzama. 72C°'de 5 dakika son uzamayı takiben değerlendirmeye kadar PCR ürünleri +4C°'de tutulmuştur. Elde edilen ürün, %3 (wt/vol)'lük agaroz jel (Prona Basica LE Agarose, AB) elektroforezine (Owl USB, A.B.D.) tabi tutulduktan sonra, ethidyum bromid (Sigma, A.B.D) ile boyanarak 302nm'de ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir. Elde edilen ürünün büyüklüğüne göre *C. albicans* genotipleri, ~450bç tek bant Genotip A, ~840bç tek bant Genotip B ve her iki bandı da taşıyanlar Genotip C olarak belirlenmiştir (Şekil-2).



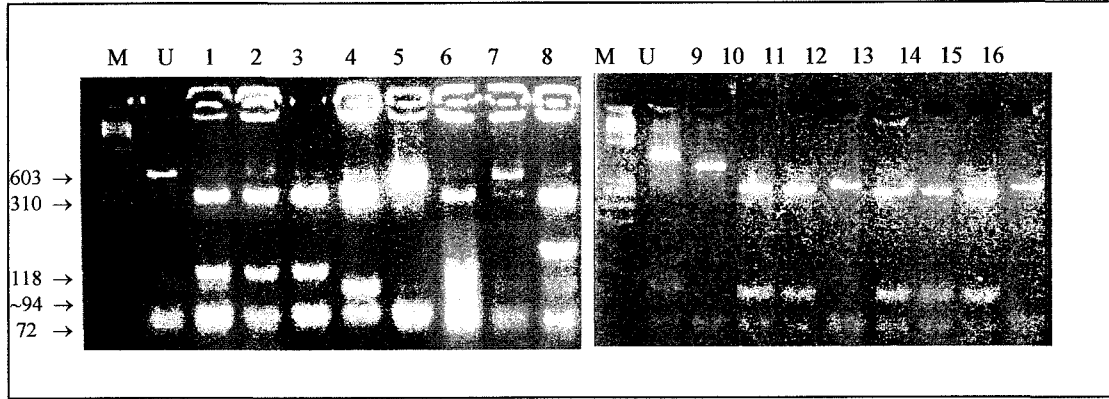
Şekil-2: Ethidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiş, *C.albicans* suşlarının 25SrDNA geninde yer alan aktarılabılır grup-1 intron bölgesinin PCR ürünleri. Moleküler büyüklük belirteci [ϕ X174 HaeIII kesim (Fermentas, Lituanya)] M ile gösterilmiş, ve bantların karşılık geldiği molekül büyüklükleri sağda verilmiştir. 1. ve 2.sıralar genotip A (~450bç) izolatları, 3. ve 4. sıralar genotip B (~840bç) izolatları, 6, 7 ve 8. sıralar ise genotip C (~450bç ve ~840bç) izolatları göstermektedir. 5. sıra, DNA içermeyen negatif kontrol sütunudur.

2.3 Subtiplerin Enzimle Kesim Yöntemi ile İdentifikasyonu: İzolatların genotiplendirilmesi esnasında, genotip A izolatların PCR ürünlerinde ağırlık farkı tespit edilmiştir (Şekil-3). Bu farklılıkların moleküler temelini ortaya koyabilmek amacıyla, DNASIS (Hitachi, Japonya) programı kullanılarak, Gen bankasında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) verilen 25S rRNA geni grup-1 intron bölgesi dizisi (ulaşım numarası: X70659) üzerinde kesim noktası bulunan enzimler araştırılmıştır. Sık kullanılan ve nispeten ucuz bir enzim olan HaeIII (GG[▼]CC) restriksiyon endonükleazı (Quantum, Fransa) için bu dizinin kesim noktaları taşıdığının anlaşılmasının ardından, farklı hastalardan izole edilen 144 *C.albicans* Genotip A izolatının PCR ürünü, HaeIII enzimi ile kesilmiştir. Bunun için, 25-30 µl PCR ürünü, 10U

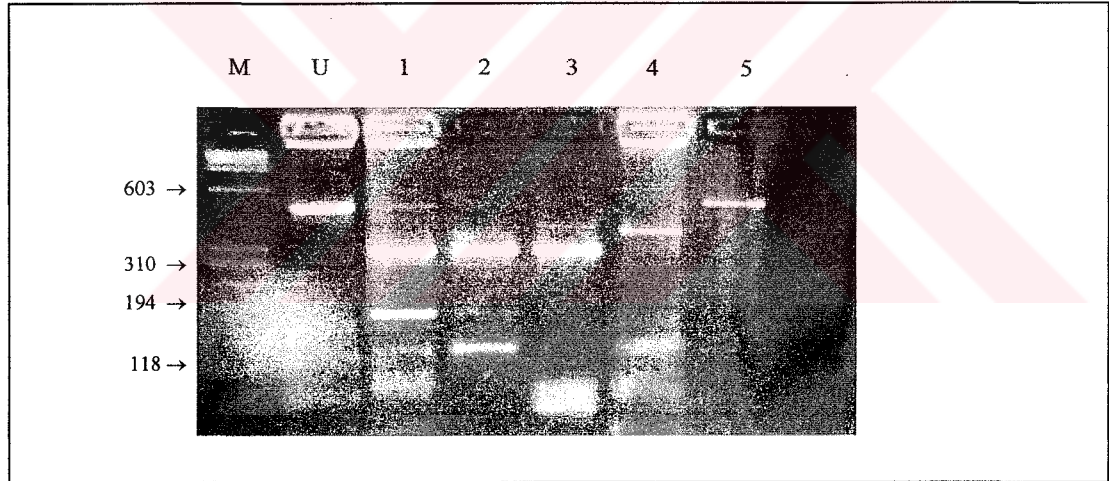
HaeIII enzimi ile uygun tampon (100mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 500mM NaCl, 10mM dithiothreitol) içerisinde bir gece 37C° su banyosunda inkübe edilmiştir. Kesim ürünleri 4%(wt/vol)'lük agaroz jel (2% NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, Maine, ABD ve 2% Prona Basica LE Agarose, A.B) elektroforezine tabi tutulduktan sonra, ethidyum bromid ile boyanarak 302nm'de UV altında görüntülenmiştir (Şekil-4). Farklı bant paterni oluşturan subtipler, DNA dizi analizine tabi tutulduğunda HaeIII ile aynı kesim paterni oluşturan bir grup içerisinde üç farklı diziye sahip subtip olduğunun tespit edilmesi üzerine, bu subtiplerin DNA dizileri ile, HaeIII ile kesim sonucunda benzer bant paternleri oluşturan subtip g ve h'a ait DNA dizileri, DNASIS programına kaydedilerek bu dizileri ayırt edecek bir enzim araştırılmıştır. Bu amaç için MspI (C▼CGG) restriksiyon endonükleazı uygun bulunmuştur. MspI enzimi ile kesim için ise, yine 25-30 µl PCR ürünü, 10U MspI enzimi ile uygun tampon (100mM Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol) içerisinde bir gece 37C° su banyosunda inkübe edilerek kesilmiştir (Şekil-5). Kesim ürünleri 4%(wt/vol)'lük agaroz jel (2% NuSieve GTG, FMC BioProducts, Rockland, Maine, ABD ve 2% Prona Basica LE Agarose, A.B) elektroforezine tabi tutulduktan sonra, ethidyum bromid ile boyanarak 302nm'de UV altında görüntülenmiştir (Şekil-5).



Şekil-3: Ethidyum bromid ile boyanarak UV altında görüntülenmiş, genotip A *C. albicans* suşlarının PCR ürünleri. Moleküler büyüklük belirteci [ϕ X174 HaeIII kesim (Fermentas, Litvanya)] M ile gösterilmiş, ve bantların karşılık geldiği molekül büyüklüğü sağda verilmiştir. 1-9. sıralar genotip A (~450bp) izolatları içerisinde gözlenen farklı büyüklüklerdeki PCR ürünlerini göstermektedir.



Şekil-4: Genotip A *C.albicans* izolatlarının HaeIII enzimi ile kesimi. Moleküler büyüklük belirteci [ϕ X174 HaeIII kesim (Fermentas, Lituanya)] M ile gösterilmiş, ve bantların karşılık geldiği molekül büyüklüğü solda verilmiştir. U: Kesilmemiş PCR ürünü (~460bp); 4, 10, 11, 13, 14 ve 15. sıralar: Subtip a (296, 93 ve 71bp ürün); 1, 2 ve 3 sıralar: Subtip-b (297, 110 ve 71bp ürün); 5 ve 7. sıralar: Subtip c, d ve e (~390 ve 71bp ürün); 8.sıra : Subtip f (301 ve 146bp ürün); 12 ve 16. sıralar: Subtip g (318 ve 74bp ürün); 9. sıra: Subtip h (353 ve 71bp ürün).



Şekil-5: Subtip c, d, e, g ve h Genotip A *C.albicans* izolatlarının MspI enzimi ile kesimi. Moleküler büyüklük belirteci [ϕ X174 HaeIII kesim (Fermentas, Lituanya)] M ile gösterilmiş, ve bantların karşılık geldiği molekül büyüklüğü solda verilmiştir. U: Kesilmemiş PCR ürünü (~460bp). 1.sıra: Subtip e (291 ve 168bp ürün), 2.sıra: Subtip c (291 ve 126 bp ürün), 3.sıra: Subtip d (291, 94 ve 83bp ürün), 4.sıra: Subtip h (352 ve 126bp ürün), 5.sıra: Subtip g (478 bp ürün).

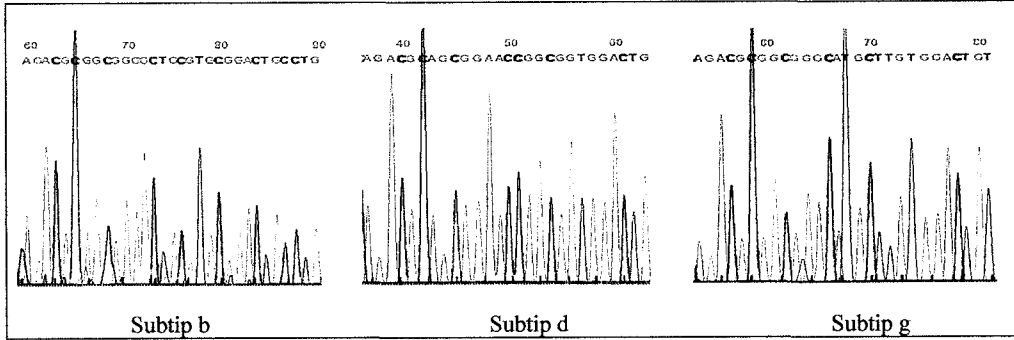
2.4 PCR Ürünlerinin Temizlenmesi: Bu amaçla, Wizard PCR Pürifikasyon kiti (Promega, A.B.D) üreticinin önerileri doğrultusunda kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünü yeni bir Eppendorf tüpe alınmış ve üzerine kit ile birlikte verilen PCR Pürifikasyon tamponundan 100µl ve rezinden 1ml eklenerek karıştırılmıştır. Kit ile beraber verilen kolonlar, pistonu çıkartılmış 2ml'lik enjektörlere takıldıktan sonra

9ml'lik tüplere yerleştirilmiştir. Hazırlanan PCR karışımı tüplere döküldükten sonra, enjektörlerin pistonları takılarak örneğin kolonlardan süzülmesi sağlanmıştır. Enjektörün ağzındaki kolonlar çıkartıldıktan sonra piston geri çekilip kolonlar tekrar yerleştirilmiştir. Tüplere 2ml %80'lik isopropanol konularak piston itilmiş ve kolonlardan tüplere toplanmıştır. Kolonlar, temiz Eppendorf tüplerine takılıp 20sn santrifüjlendikten sonra kolonlar tekrar yeni Eppendorf tüplerine takılarak üzerlerine yaklaşık 50µl distile su konularak maksimum hızda 20sn santrifüjlenmiştir. Elde edilen pürifiye PCR ürünleri DNA dizi analizinde kullanılmıştır.

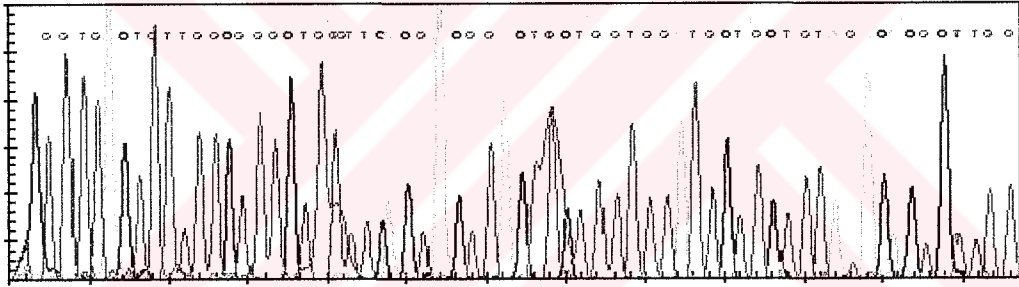
2.5 DNA Dizi Analizi: Bu yöntem, PCR ürünlerinin floresan ile işaretli nükleotidlerle sonlandırılarak nükleotid dizisinin cihaz tarafından belirlenmesi esasına dayanır. Sonlandırmayı, reaksiyon karışımına (premijs) dahil edilen farklı floresan boyalarla işaretlenmiş ddNTP'ler sağlar. ddNTP'lerin 3' ucunda serbest hidroksil grubu bulunmadığından, uzamakta olan PCR ürününe ddNTP bağlandıktan sonra yeni bir baz bağlanamaz. Böylece, pürifiye PCR ürünlerinin şablon olarak kullanıldığı bir PCR reaksiyonu olan "cycle sequencing" esnasında, farklı işaretli nükleotidlerde sonlanmış değişik uzunluklarda PCR ürünleri elde edilir. Bunların cihaz tarafından okunması sonucunda PCR ürünü oluşturulan her bir nükleotid sırasıyla belirlenebilir.

Çalışmamızda tespit edilen farklı subtiplerin nükleotid dizilerinin belirlenmesi için otomatize floresanlı DNA dizi analizi cihazı (CEQ2000 XL, Beckman Coulter, USA) kullanılmıştır. Bunun için 0,2ml'lik kuyucuklar içeren plaklar içerisine 12µl premiks (2µl 10X reaksiyon tamponu, 1µl dNTP karışımı, 2µl ddUTP, 2µl ddGTP, 2µl ddCTP, 2µl ddATP, 1µl polimeraz enzimi), 6µl temizlenmiş PCR ürünü, 2µl primer konularak "cycle sequencing" gerçekleştirilmiştir. Bunun için plaklar, PCR cihazına (Biometra, Almanya) yerleştirilerek 94C°'de 5 dakika ilk denatürasyonu takiben, 30 siklus olacak şekilde 96C°'de 20sn denatürasyon, 50C°'de 20sn yapışma ve 60C°'de 4dk'lık uzama reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Program sonlanır sonlanmaz, reaksiyonun durdurulması için her bir kuyucuğa 5µl durdurma solüsyonu (1,5M NaOAc'den 2µl, 50mM EDTA'dan 2µl, 20mg/ml'lik Glikojenden 1µl) pipetlenmiştir. Yıkama işlemi için, örneklerin üzerine 60µl %95'lik soğuk etanol eklenerek +4C°'de 4000rpm'de 4dk santrifüjlenmiştir. Üstteki kısım döküldükten sonra örneklerin üzerine %70'lik soğuk etanolden 200µl eklenerek +4C°'de 4000rpm'de 2dk santrifüjlenmiş ve üstteki kısım dökülmüştür. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra plak 300rpm'e çıkana kadar ters olarak santrifüjlenerek fazla etanol uzaklaştırılmıştır. Plak, liyofilizatör cihazına (Christ, Almanya) yerleştirilmiş ve yüksek vakum altında örnekler kurutulmuştur. Kuruyan örneklerin üzerine DNA zincirlerini birbirinden ayırtmayı sağlayan formamid içeren örnek yükleme solüsyonundan 25µl konularak üzerleri mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plak DNA dizi analizi cihazına yerleştirilmiş ve cihazın bağlı bulunduğu bilgisayar aracılığı

ile sonuçların çıktıları alınmıştır (Şekil-6). Elde edilen farklı subtiplerin nükleotid dizileri Gen bankasına (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) kaydedilmiştir (ulaşım numaraları: AY441784, AY441785, AY441786, AY441787, AY441788, AY441789, AY441790).



a) İnsersiyon dizileri



b) Normal dizi

Şekil-6: a) Subtip b, d ve g'nin insersiyon bölgelerine ait DNA dizi analizi sonuçları. b) Subtip a olarak tanımlanan normal dizi.

2.6 İstatistiksel Analiz : Gruplar arasındaki farklılığın araştırılmasında, TAD programı içerisinde geniş tablolarda Ki kare testi kullanılmıştır. p değerinin <0.05 bulunduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Değerlendirmeye alınan 401 *C.albicans* izolatının 208'i (%51,9) Genotip A, 65'i (%16,2) Genotip B ve 128'i (%31,9) Genotip C olarak bulunmuştur. Bu yöntemle gösterilebilen ve *C.dubliniensis*'e ait olduğu saptanan genotip D ve E bulunmamıştır. İnvaziv (kan kültürü izolatları) ve non-invaziv (balgam, boğaz, yara, idrar, vajen ve dışkı) izolatlar ayrı ayrı değerlendirildiğinde; 81 invaziv izolatın 53'ü (%65,4) genotip A, 7'si (%8,6) genotip B ve 21'i (%26) genotip C bulunurken, 320 non-invaziv izolatın 155'i (%48,4) genotip A, 58'i (%18,1) genotip B ve 107'si (%33,4) genotip C olarak tespit edilmiştir. Suşların, izole edildiği bölgelere göre dağılımları tablo-4'de verilmiştir.

Tablo-4: 401 *C.albicans* suşunun genotiplerinin izolasyon yerine göre genotiplerinin dağılımı. (a) ve (b) sırasıyla invaziv ve non-invaziv gruba dahil edilen izolatları göstermektedir.

İzolasyon bölgesi	Genotipler [gözlenen (beklenen) sıklıklar]			p
	A	B	C	
Kan (a)	53 (42,0)	7 (13,1)	21 (25,9)	0,007
Balgam (b)	33 (31,1)	13 (9,7)	14 (19,2)	
Boğaz (b)	48 (52,9)	19 (16,5)	35 (32,6)	
Yara (b)	17 (14,5)	3 (4,5)	8 (8,9)	
İdrar (b)	12 (21,3)	10 (6,6)	19 (13,1)	
Vajen (b)	28 (22,3)	5 (7,0)	10 (13,7)	
Dışkı (b)	17 (23,9)	8 (7,5)	21 (14,7)	
İnvaziv (a)	53 (42)	7 (13,1)	21 (25,9)	0,015
Non-invaziv (b)	155 (166)	58 (51,9)	107(102,1)	

Gruplar, aktarılabılır grup-1 intron taşıyıp (genotip B ve C) taşıyamalarına (genotip A) göre değerlendirildiğinde, 81 invaziv izolatın 28'i (%34,6) intron bulundururken, 53'ünün (%65,4) intron taşımadığı tespit edilmiştir. Non-invaziv izolatlarda bu oranlar sırasıyla 165 (%51,6) ve 155 (%48,4) olarak bulunmuştur. Aktarılabılır grup-1 intron varlığına göre izolatların karşılaştırması tablo-5'de görülmektedir.

Tablo-5: 401 *C.albicans* suşunun aktarılabılır grup-1 intron varlığına göre genotiplerinin dağılımı. (a) ve (b) sırasıyla invaziv ve non-invaziv gruba dahil edilen izolatları göstermektedir.

İzolasyon bölgesi	İntron yok (genotip A)	İntron var (genotip B & C)	p
	[gözlenen (beklenen) sıklıklar]		
Kan (°)	53 (42,0)	28 (39,0)	0,001
Balgam (°)	33 (31,1)	27 (28,9)	
Boğaz (°)	48 (52,9)	54 (49,1)	
Yara (°)	17 (14,5)	11 (13,5)	
İdrar (°)	12 (21,3)	29 (19,7)	
Vajen (°)	28 (22,3)	15 (20,7)	
Dışkı (°)	17 (23,9)	29 (22,1)	
İnvaziv (°)	53 (42)	28 (39)	0,006
Non-invaziv (°)	155 (166)	165 (154)	

Genotip A izolatlarında tespit edilen moleküler büyüklük farklarını ortaya koymak üzere yapılan HaeIII restriksiyon endonükleaz analizi sonucunda, genotip A izolatlar içerisinde, 6 farklı kesim paterni tespit edildi (Şekil 4): Tip 1: ~296, ~93 ve ~71bç ürün (Subtip a); Tip 2: ~297, ~110 ve ~71bç ürün (Subtip b); Tip 3: ~390 ve 71bç ürün (Subtip c, d ve e); Tip 4: ~301 ve ~146bç ürün (Subtip f); Tip 5: ~318 ve ~71bç ürün (Subtip g) ve Tip 6: ~353 ve ~71bç (Subtip h) ürün oluşturdu. Farklı kesim paterni gösteren bu izolatların gen dizisini belirlemek amacıyla, her grup içerisinde yer alan PCR ürünleri, otomatize floresanlı DNA dizi analizine tabi tutuldu (Şekil 6). Dizi analizi sonucunda, ~390 ve ~71bç ürün veren Tip 3 grubu içerisinde farklı dizilere sahip 3 ayrı grup (subtip c, d ve e) olduğu anlaşıldı. Sonuç olarak genotip A *C.albicans* izolatları içerisinde 8 ayrı subtip tespit edildi (Subtip a→h). Grupların dizisi, Gen bankasında yer alan *C.albicans* 25S rDNA geni aktarılabılır intron bölgesinin dizisi (Gen bankası ulaşım no: X70659) ile karşılaştırıldı. PCR ile 460bç ürün veren subtip a'nın, daha önce Gen bankasında verilen dizi ile aynı olduğu; yine 460bç ürün veren subtip c ve bir bazlık bir delesyon nedeniyle 459bç ürün veren subtip e'nin ise sadece tek nükleotid değişimleri ile subtip a'dan ayrıldığı anlaşıldı. 478bç ürün veren subtip b, g ve h ile 468bç ürün veren subtip d'nin bu bölgenin çeşitli noktalarında bazı insersiyonlar taşıdığı; 447bç ürün veren subtip f'nin ise 13bç'lik bir delesyon yanı sıra, birçok tek nükleotid değişimi taşıdığı tespit edildi. Subtip b, c, d, e, f, g ve h'nin, orijinal diziyi taşıyan subtip a ile sırasıyla, %88,9; %96,5; %91,6; %95,2; %78,7; %87,4 ve %87'lik dizi benzerliği taşıdığı anlaşıldı. Yeni tanımlanan subtiplerin (b→h) nükleotid dizileri Gen bankasına sırasıyla, AY441784, AY441785, AY441786, AY441787, AY441788, AY441789 ve AY441790 ulaşım numaraları altında sunuldu. Farklı subtiplerin nükleotid dizileri Şekil-7'de verilmiştir.

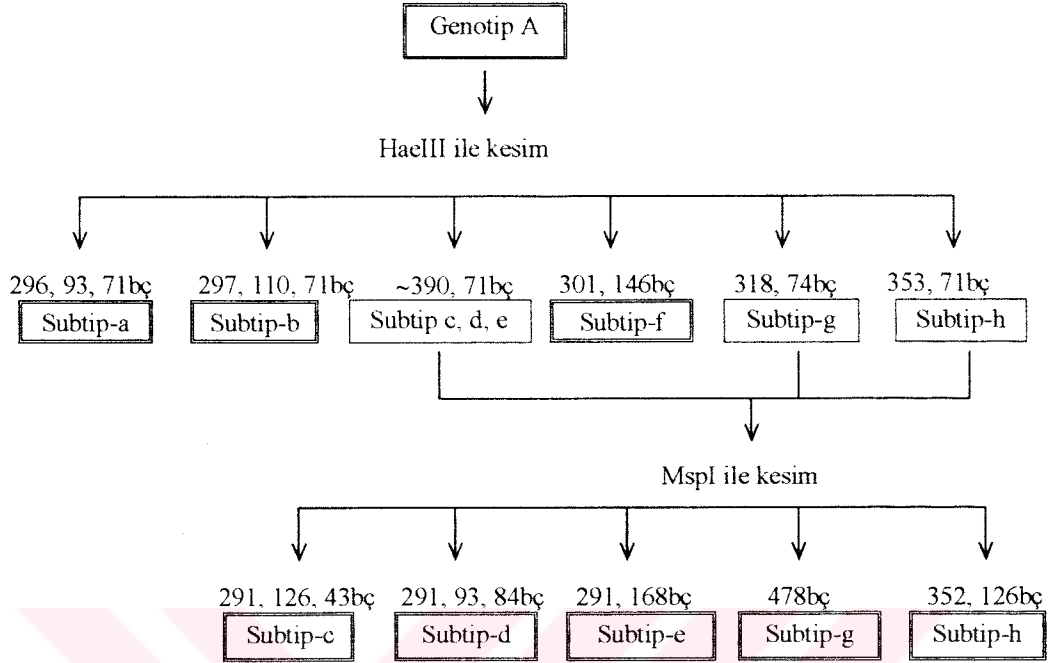
Baz no.	61	71	81	91	92	97	98	104	105	108
a.	g g t g t c t t g g g c c t t g t g t a	g a c g c g g c g g t	g G C T G C G T G C G	g a c t g t t g g c g g g c t g t						
b.	. . . a g t g a g t c .	 g G C T G C G T G C G	 c C . . . t . . . G . . t g							
c.		 t	 a							
d.	 t a c c .	 a a A C C G G C G G T G	 c t a g g a a .							
e.	 g t	 t	 g c . . . t c							
f.	. . . c g g a g t . c t g g g . c t g c	c g g c g c . t . c c	 g g . . . c . c g . a . a c . c							
g.	. . . a g t g a g t c .	 g C A T G C T T G T G	 C . t a . t . . . G . . t g							
h.	. . . a g t g a g t c .	 g G A T G C G T G C G	 C . . a t G . . t g							

Baz no.	109	112	113	115	116	126	136	146	156	162	163
a.	t t c a	c g a	c g g a c t g c t g	g t g g a t g c t g c t g t a g a c a c	g c t t g g t a g g t c t t t a t	g					
b.	c . . t G C	c g g G	 a t	. c . . c . c . . . t c g g	t c . c c T A .						
c.	c . t c	g	c c . . . c	t t c . . . g	a						
d.	c . t g	 c	t c t g g	t t c t							
e.	. . t c	g . g	c c a	a c a							
f.	a . . t	g t g	t t t c t g c g g c	t g c c t g . . g . . g c t t g c g	. c . . t . t t t c a g . c c c						
g.	c . . g G T g . g A t	. c . . g c c t . t c g g	c c c t g T A .								
h.	c . . g G C . . g A a t	. c . . g . c . . . t c g g	t c . t g T A .								

Baz no.	164	166	176	177	179	182	183	193	203	213	222
a.	g c c g t c c g g g g c a	c g t t t a	a c g a t c a a c t t a g a a c t g g t	a c g g a c a a g g g g a a t c t g a c							
b.	 g c t t . . g G . . a . .										
c.	a c c c . . .										
d.											
e.	 a t c . . .										
f.	c g g		 a . c . g								
g.	a g c t t . . t A . a a . . .										
h.	a g c t t . . t A . . a										

Şekil-7: Genotip A *C.albicans* suşlarında tespit edilen 8 subtip e ait nükleotid dizileri. 1-61 ve 180-460 arası nükleotidler, birkaç noktada tek baz değişimi dışında birbirinden farklılık göstermemektedir. Subtip a, Gen bankasında verilen aktarılabılır grup-1 intron bölgesi ile aynı diziyi taşımaktaydı (Gen bankası ulaşım no: X70659). Diğer subtiplerin Gen bankası ulaşım numaraları AY441784-AY441790'dir. İnsersiyonlar büyük-kalın harflerle, delesyonlar boş karelerle gösterilmiştir. HaeIII kesim noktaları sarı ile, MspI kesim noktaları ise mavi ile belirtilmiştir.

HaeIII kesim ile, subtip a, b ve f kolayca ayırt edilmesine rağmen, ~300-350 ve ~71bp ürün veren diğer subtiplerin ayırt edilmesi zor olmaktadır. Diğer subtipleri kolayca ayırabilmek için, bu subtiplerin nükleotid dizileri üzerinde ayırım sağlayabilecek bir başka enzim DNASIS programı kullanılarak araştırıldı. Sonuçta, MspI enzimi, c, d, e, g, ve h subtiplerini kolayca ayırt edebilecek özellikte bulundu. Msp I ile kesim sonucunda, subtip c: 291 ve 126bp ürün, subtip d: 291, 94 ve 83bp ürün, subtip e: 291 ve 168bp ürün, subtip g: 478bp (kesim noktası taşımaz) ve subtip h: 352 ve 126bp ürün verdiler (Şekil 5). Elde edilen verilere göre, genotip A subtiplerinin kolay ayırt edilmesini sağlamak üzere bir kesim şeması geliştirildi: Şekil 7.



Şekil-8: *C. albicans* Genotip A subtiplerinin kolay ayrılması amacıyla geliştirilmiş HaeIII ve MspI enzimleri ile kesim şeması.

Değerlendirilen 144 genotip A *C. albicans* izolatu, subtiplerinin dağılımına göre değerlendirildiğinde, 75'inin (%52,1) subtip a, 21'inin (%14,6) subtip b ve 28'inin (%19,4) subtip c olduğu bulundu. Bu subtipler, çalışmaya katılan bütün hastanelerdeki hasta örneklerinden izole edildi. Subtip d, sadece 9 (%6,2) kan kültürü izolatında tespit edildi. Bu hastaların hepsi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanelerinin farklı kliniklerinde (3'ü Cebeci Genel Cerrahi Kliniği, 3'ü Çocuk Hastalıkları Hematoloji-Onkoloji Kliniği, 2'si Çocuk Hastalıkları Yenidoğan Kliniği ve 1'i Çocuk Cerrahisi Kliniği) yatarak tedavi gören hastalardan izole edilmişti. Subtip e ve f'ye ait dörder izolat (%2,8) tespit edildi. Subtip e, sadece İstanbul Üniversitesi Bizim Lösemili Çocuklar Vakfı'nda yatan hastalarda bulunurken, subtip f hem bu üniteden, hem de Ankara Üniversitesi hastanelerinde yatan hastalardan izole edildi. Subtip g olarak bulunan 2 (%1,4) idrar izolatu, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesinde yatan 2 ayrı hastadan izole edildi. Subtip h olarak bulunan tek izolat (%0,7) ise İstanbul Üniversitesi Bizim Lösemili Çocuklar Vakfı'nda tedavi gören bir hastaya aitti. Genotip A subtiplerinin, izole edildikleri yerlere göre dağılımı tablo-6'da görülmektedir.

Tablo-6: Genotip A *C.albicans* suşlarının subtiplerinin izolasyon yerine göre dağılımı.

İzolasyon Bölgesi	Subtipler [n (%)]								Toplam
	a	b	c	d	e	f	g	h	
Kan	12 (33,3)	3 (8,3)	11 (30,6)	9 (25)	-	-	-	1 (2,8)	36
Balgam	12 (42,8)	3 (10,7)	11 (39,3)	-	1 (3,6)	1 (3,6)	-	-	28
Boğaz	8 (53,3)	5 (33,3)	-	-	2 (13,3)	-	-	-	15
Yara	10 (71,4)	1 (7,1)	1 (7,1)	-	-	2 (14,3)	-	-	14
İdrar	5 (55,6)	1 (11,1)	1 (11,1)	-	-	-	2 (22,2)	-	9
Vajen	20 (71,4)	4 (14,3)	4 (14,3)	-	-	-	-	-	28
Dışkı	8 (57,1)	4 (28,6)	-	-	1 (7,1)	1 (7,1)	-	-	14
Toplam %	75 (52,1)	21 (14,6)	28 (19,4)	9 (6,2)	4 (2,8)	4 (2,8)	2 (1,4)	1 (0,7)	144

4. TARTIŞMA

Kanser hastalarına ve organ alıcılarına uygulanan tedavi protokollerindeki gelişmeler ve özellikle AIDS vakalarındaki artış, mantar enfeksiyonu gelişimi açısından risk altında bulunan hasta sayısının artmasına neden olmuştur (Sandhu ve ark., 1995). Gerek bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların sağ kalım oranlarındaki artış, gerek daha duyarlı tanı yöntemlerinin kullanıma girmesi sonucunda, bu hastalardan izole edilen mantar türlerinde belirgin bir artış olmuştur. Bununla birlikte, *Candida* türleri, özellikle de *C.albicans*, ilk sıradaki yerini korumaya devam etmektedir (Verduyn Lunel ve ark., 1999; Fridkin ve Jarvis, 1996).

Enfeksiyon etkeninin moleküler tiplendirilmesi, epidemiolojik çalışmalarda ve uygun enfeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde önemlidir (McCullough ve ark., 1999; Pfaller, 1995). Moleküler tiplendirme sayesinde etken mikroorganizmaların bulaş yolları, vücutta izlediği yol belirlenebilir, belli konak karakteristikleri ve belli anatomik lokalizasyonlarla genotipler arasında ilişki kurulabilir ve etkende ilaç direnci gösterilebilir (Scherer ve Stevens, 1987).

İlk kez McCullough ve ark. (1999), 25S ribozomal tiplendirme yöntemi ile 439 *C.albicans* suşunu genotiplendirmiş ve genotip sıklıklarını şöyle bulmuşlardır: Genotip A: %65,8, genotip B: %19,4, genotip C: %12,8 ve genotip D: %2. Aynı araştırmacılar, bu 439 suşu coğrafi dağılımlarına ve izole edildikleri zaman dilimine göre değerlendirdiklerinde, suşların gerek zaman, gerekse coğrafi konuma göre dağılımlarında anlamlı fark olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmaya göre, 1990'dan önce, genotip C suşları %5,5'lik bir orana sahipken, 1990 sonrasında bu oranda anlamlı bir artış (%17) gözlenmiştir. Genotip B sıklığı değişmezken, genotip A sıklığı %75,5'den %60,1'e inmiştir (McCullough ve ark., 1999a). *C.albicans* genotip C izolatları hem genotip A hem de genotip B'ye ait iki bandı da taşımaktadır. Bu iki bandın varlığının nedeni, genotip C'nin genomunda 25SrDNA tekrarlarının bazılarında aktarılabılır grup-1 intron bulunurken, diğerlerinde bulunmaması ile açıklanmaktadır. Bu nedenle, genotip C suşları genotip A'dan genotip B'ye veya genotip B'den genotip A'ya geçiş sırasında ortaya çıkan bir ara form olabileceği gibi, genotip A ile B arasında eşeyli üremenin bir sonucu olarak da ortaya çıkıyor olabilir (McCullough ve ark., 1999). Eski izolatlarda genotip C nadirken, yeni izolatlarda daha sık bulunması, genotip C'nin nispeten yeni ortaya çıkan bir genotip olduğunu göstermektedir. Genotip A izolatları, flusitozin ve bunun aktif metaboliti olan 5-fluorourasile diğer genotiplerden daha dirençli

bulunmuştur (McCullough ve ark., 1999). Bu nedenle genotip B'den genotip A'ya geçiş ve dolayısıyla direnç gelişimi esnasında genotip C'nin ortaya çıkıyor olması söz konusu olabilir.

Aynı suşlar, izole edildikleri coğrafi bölgelere göre değerlendirildiklerinde, A.B.D dışındaki ülkelerde gözlenen genotip C izolatlarının sıklığı anlamlı bir fark yaratmaktadır. Afrika, Güney Amerika, Avrupa, Asya ve Avustralya'dan izole edilen suşlar arasında herhangi bir fark bulunmazken, A.B.D. ve İsrail izolatlarının anlamlı fark gösterdiğini tespit etmişlerdir: A.B.D.'de genotip C çok nadir (%3,4), İsrail izolatlarının %53,3'ü bu genotipe dahil edilmiştir. Bu sonuçlar, genotip dağılımının değişik coğrafi bölgelerde farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Çeşitli ülkelerden izole edilen suşların genotip dağılımı tablo-7'de görülmektedir.

Tablo-7: Değişik ülkelerde tespit edilen *C.albicans* genotiplerinin dağılımı

Ülke	Literatür	n	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)	E (%)
İspanya	McCullough 1999b	54	32 (59,3)	15 (27,8)	7 (12,9)	0	0
Fransa	"	21	14 (66,7)	3 (14,3)	4 (19)	0	0
Zimbabve	"	19	12 (63,2)	6 (31,6)	1 (5,2)	0	0
Singapur	"	23	8 (34,8)	7 (30,4)	7 (30,4)	1 (4,3)	0
Japonya	"	52	30 (57,7)	9 (17,3)	12 (23)	1 (1,9)	0
Japonya	Tamura 2001	301	172 (57,1)	66 (21,9)	56 (18,6)	5 (1,7)	2 (0,7)
Avustralya	McCullough 1999b	23	14 (60,9)	3 (13)	2 (8,7)	4 (17,4)	0
İsrail	"	30	6 (20)	6 (20)	16 (53,2)	2 (6,6)	0
Kolombiya	"	20	16 (80)	2 (10)	2 (10)	0	0
A.B.D.	"	88	66 (75)	8 (20,5)	3 (3,4)	1 (1,1)	0
İrlanda	Millar 2002	39	27 (69,2)	5 (12,8)	4 (10,3)	3 (7,7)	0
Türkiye	Bu çalışma	401	208 (51,9)	65 (16,2)	128 (31,9)	0	0

Bizim sonuçlarımız, Türkiye'de de genotip C sıklığının İsrail kadar olmasa da diğer ülkelerden daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Genotip B sıklığı ortalama bir değer gösterirken, genotip A sıklığı İsrail ve Singapur haricinde diğer ülkelerden biraz daha düşüktür. Bu sonuçlar, Türkiye'nin genotip dağılımı açısından arada bir değer gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Genotip D ve daha sonra Japonya'dan izole edilen genotip E'nin, dizi analizi çalışmaları sonucunda aslında *C.dubliniensis*'e dahil edilmeleri gerektiği ortaya çıkmıştır (McCullough ve ark.,

1999; Tamura ve ark., 2001). Bu çalışmalarda *C.dubliniensis*'e ait olan genotip D sıklığı yaklaşık %2, genotip E sıklığı ise %0,7 olarak bulunmuştur. En yüksek genotip D oranları Avustralya (%17,4) ve İrlanda izolatlarında (%7,7) verilmiştir. *C.dubliniensis*, yeni tanımlanmış bir *Candida* türü olup, *C.albicans* gibi klamidyospor oluşturur ve germ tüp pozitifdir. Fenotipik özellikleri ile *C.albicans* 'tan ayırt edilmesi çok zordur. İlk kez 1995 yılında İrlandalı AIDS hastalarının ağızlarından izole edilmiş olmakla beraber, retrospektif araştırmalar en eski örneğin 1957 yılına ait olduğu ortaya konmuştur. *C.dubliniensis*, HIV (+) bireylerin %27, AIDS hastalarının %32'sinin ağız mukozalarından izole edilirken, sağlıklı popülasyonda bu oran %3 olarak bulunmuştur. Ağızda normal flora elemanı olarak bulunabilen *C.dubliniensis*, sıklıkla diğer *Candida* türleri, özellikle de *C.albicans* ile beraber enfeksiyon oluşturur. Ancak, en azından HIV (+) bireylerde tek başına da enfeksiyon etkeni olarak izole edilmektedir (Sullivan ve Coleman, 1998). Bizim çalışmamızda *C.dubliniensis*'e ait olan genotip D ve E'nin tespit edilmemesi, çalışma grubumuzda HIV (+) olduğu bilinen hasta olmamasına bağlı olabileceği gibi, HIV pozitifliği ile yakın ilişkisi gösterilen bu *Candida* türünün, bizim toplumumuzda önemli bir etken olmaması şeklinde açıklanabilir. Dolapçı ve ark.larının (2002) Türkiye'de yaptığı bir çalışmada, mantar izole edilen 98 kan kültürü değerlendirilmiş, germ tüp testi pozitif bulunan 64 örneğin hiçbirinde *C.dubliniensis*'e rastlanmamıştır. Bu sonuçlar, Türkiye'de *C.dubliniensis*'in sık rastlanan, önemli bir etken olmadığını göstermektedir.

Klinik seyri belirlemek ve morbidite ve mortaliteyi azaltabilmek amacıyla *C.albicans* genotiplerinin antifungal direnç paterni ve kan dolaşımına invaze olma yetenekleri pek çok araştırmacı tarafından araştırılmış ve birbiri ile çelişen sonuçlar alınmıştır (Dalle ve ark., 2000; McCullough ve ark. 1999; Millar ve ark., 2002; Stevens ve ark., 1990; Mercure ve ark., 1993; Luu ve ark., 2001; Lunel ve ark., 1998; Lockhart ve ark., 1995). Levin ve Bull (1994), bir patojenin mutasyona uğrayıp klonal seleksiyondan geçtikten sonra, atası olan genotip için uygun olmayan mikroçevreleri araştırdığını ve buralara geçtiğini ileri sürmüştür. Bu mikroçevrelerde evrim, konaklar arasında bulaş açısından genotipe bir üstünlük sağlamaz, zira bu seri konağın dışına çıkamaz. Bu önerenin doğruluğunun kanıtlanması için, hem yüzeysel alanlardan, hem de dolaşımdan örnek alınması, bu tip bir mikroevrimle ortaya çıkan genetik değişikliğin belirlenmesi, ve bu farklı izolatların yüzeysel doku ve dolaşım için uygunluklarının karşılaştırılması gerekir (Luu ve ark., 2001). *C.albicans* popülasyonlarının klonal olduğu gösterilmiştir, ancak her popülasyon kendi içinde mikroevrime uğramaktadır (Lockhart ve ark., 1995). 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 anlaşılmasında, *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 belirteçin klinik mikrobiyoloji açısından yararlı olabilmesi için, stabil olması, kullanımının kolay olması, ayırım gücünün yüksek olması ve geniş serilere uygulanabilir olması gereklidir (Dalle ve ark., 2000).

25S intron analizi ile belirlenen genotip A suşlarının flusitozin ve bunun metaboliti olan 5-fluorourasile daha dirençli olduğu gösterilmiştir (McCullough ve ark., 1999). 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 faktördür. İntronu taşımayan genotip A suşları, ilacın kromozomal DNA, ribozomal RNA ve mRNA içerisine girerek oluşturduğu etkilerin sonucu olarak değişen düzeylerde duyarlılık göstermektedir (Mercure ve ark., 1997). Ancak, genotip A içerisinde duyarlı suşların, genotip B ve genotip C içerisinde ise dirençli suşların bulunması nedeniyle, bu mekanizmanın flusitozin direncini belirlemede çok fazla önemli olmayabileceği, başka ek mekanizmaların daha önemli olduğu üzerinde durulmaktadır (Tamura ve ark., 2002).

İnvazivlik ile genotip arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için birçok farklı genotiplendirme yöntemi çalışılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler, birbiriyle zıt sonuçlar doğurmuştur. *C.albicans* ile ortaya çıkan enfeksiyonların çoğu, endojen floradan köken almaktadır. Bu nedenle, normal flora içerisinde yer alan invaziv popülasyonların varlığı, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde enfeksiyon gelişme riskini ve bu enfeksiyonun ciddiyetini önceden belirleyebilir. Lunel ve ark. (1998), kısa tekrar dizilerini (VNTR) kullanarak kolonizasyondan invazyona geçiş ile ilişkili bir özellik araştırmışlar, ancak kolonizan ve invaziv suşlar arasında değerlendirilen VNTR'ler açısından anlamlı bir fark tespit etmemişlerdir. Bununla birlikte VNTR içeren genlerle patojenite arasında ilişki kuran araştırmacılar da bulunmaktadır (Lunel ve ark., 1998). Dalle ve ark. (2000) da, elongasyon faktör-3'ü kodlayan CEF genindeki polimorfik mikrosatellit lokusu çalışmışlar, major genotipler açısından invaziv ve non-invaziv suşlar arasında anlamlı bir fark bulmazken, minör genotipler içerisinde genotip 135-135'i sadece kan kültürlerinden izole etmişlerdir. Bu sonuçlarla, kesin bir yargıya varamamakla beraber, kompleks bir kolonizan popülasyonda yer alan bazı alt popülasyonların dolaşımı invaze edebileceği sonucuna varmışlardır (Dalle ve ark., 2000). Buna karşılık Boerlin ve ark. (1996), multilokus enzim elektroforezi ve Ca3 probu ile yaptıkları genotiplendirme çalışmaları sonucunda *C.albicans* popülasyonlarının klonal olarak çoğaldığı ve invaziv kandidiyaz ile ilişkili bir alt popülasyon olmadığı sonucuna varmışlardır. Luu ve ark. (2001) da, spesifik oligonükleotidlerle Southern hibridizasyona

dayalı çok lokuslu bir genotiplendirme sistemi kullanarak ağız mukozası ve kan kültürü izolatlarını karşılaştırmışlar ve iki grup arasında anlamlı fark bulamamışlardır. Bu nedenle, invaziv enfeksiyon gelişiminde, konağa ait faktörlerin daha önemli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

25S intron analizini kullanarak 21 invaziv ve 18 non-invaziv suşu karşılaştıran Millar ve ark. (2002), iki grup arasında anlamlı fark bulamamışlar ve 25S intron bölgesinin invazivliği değerlendirmede uygun bir lokus olmadığı sonucuna varmışlardır. Ancak bizim verilerimiz, bu sonucun aksine, farklı anatomik lokalizasyonlardan izole edilen suşların genotipik dağılımının gruplar arasında anlamlı fark oluşturduğunu ($p=0,007$) ve invaziv ve non-invaziv gruplar arasında anlamlı bir fark olduğunu ($p=0,015$) göstermektedir. İnvaziv izolatlar arasında genotip A daha sık gözlenirken (invaziv izolatlarda %65,4, non-invaziv izolatlarda %48,4), non-invaziv izolatlarda intron taşıyan genotip B ve C daha sıktır. İntron varlığına göre invaziv ve non-invaziv izolatlar karşılaştırıldığında, fark daha da anlamlı hale gelmektedir: $p= 0,006$. Bu sonuçlar, belli genotiplerin belli anatomik bölgelere daha sıklıkla yerleşebileceğini ve özellikle intron bulundurmeyen genotip A'nın kan dolaşımını invaze etme yeteneğinin diğer genotiplerden daha fazla olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, 25S intron bölgesi, ilaç direnci yanı sıra, invazivliği belirlemede de önemli bir lokus olabilir.

Çalışmamız esnasında, genotip A izolatları arasında tespit edilen farklı subtipler de izole edildikleri bölgelere göre değerlendirilmişlerdir. Değerlendirilen 144 genotip A izolatı içerisinde 128'inin (%88,9) farklı hastanelerde yatan hastalardan izole edilmeleri nedeniyle yaygın subtipler olduğu düşünülen subtip a, b, c ve f'ye ait olduğu gözlenmiştir. Bu subtipler farklı kolonizasyon ve enfeksiyon bölgelerinden izole edilebilmektedir. Subtip c, subtip a ile %96,5 dizi homolojisine sahip olması nedeniyle subtip a'dan köken almış olabilir. Dokuz kan kültürü izolatında tespit edilen subtip d, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanelerinin değişik bölümlerinde yatarak tedavi gören hastalardan izole edilmiştir. Bunlar, tüm kan kültürü izolatlarının %25'ini oluşturmaktadır. Subtip e, g ve h, aynı bölümlerde tedavi gören hastalardan izole edildiğinden, bu bölümlere ait suşları gösteriyor olabilir. Subtip g ve h, subtip d ile sırasıyla %96,2 ve %95,2 dizi benzerliği göstermesi nedeniyle, subtip b'den tek baz değişimleri ile köken alan tipler olabilirler. Subtip e ise, subtip a ile %95,2'lik bir benzerlik göstermektedir ve bu iki subtip sadece tek nükleotid değişiklikleri nedeniyle birbirleriyle farklı bulunmuştur. Bu sonuçlar, genotip A içerisinde, birbirinden farklı diziye sahip en az 8 subtip olduğunu ve orijinal dizi taşıyan subtip a ile diğer subtiplerin %78 (subtip f) ile %96,5 (subtip c) arasında değişen dizi benzerlikleri olduğunu ortaya koymaktadır.

Tespit edilen subtipler arasında subtip d, sadece kan kültürlerinden izole edilmiş olması nedeniyle özel bir önem göstermektedir. Ancak, bu hastalara ait kolonizan suşların bulunmaması ve diğer hastanelerde yatan hastalardan da bu subtipin izole edilmemiş olması nedeniyle, subtip d'nin kaynağı (endojen veya ekzojen) ve invazivliği ne derece belirlediği hakkında kesin bir sonuca varmak zordur. Bununla birlikte bu sonuçlar, enzimle kesim ile belirlenen subtiplerin, epidemiyolojik araştırmalarda kullanılabileceğini, farklı hastane departmanlarına ait farklı suşları ortaya koyabileceğini göstermektedir.



SONUÇ

- 1- Türkiye'den izole edilen *C.albicans* suşlarında genotip dağılımı, diğer ülkelerden farklıdır. Genotip A, İsrail ve Singapur haricinde diğer ülkelere kıyasla daha az, genotip C ise İsrail haricinde diğer ülkelerden daha sıktır.
- 2- Diğer ülkelerde *C.dublinsiensis*'e ait genotip D ve E izole edilirken, bizim izolatlarımızda bu genotiplere rastlanmamıştır. Bu nedenle, en azından şimdilik, *C.dublinsiensis* ülkemiz açısından önemli bir patojen olarak görülmemektedir.
- 3- Bu çalışmada, daha önce aynı yöntemle yapılan Millar ve ark. (2002) larının çalışmasının aksine, genotip ile invazivlik arasında ilişki bulunmuştur. Genotip A suşları, diğer suşlara göre daha invaziv görünmektedir. Bu farktan grup-1 intron bölgesinin mevcudiyeti sorumlu tutulabilir.
- 4- Genotip A içerisinde birbirinden farklı nükleotid dizisi gösteren 8 ayrı subtip bulunmuştur. Enzimle kesim yöntemi ile belirlenebilen bu subtiplerin invazivlikle kesin bir ilişkisinin olup olmadığı veya epidemiyolojik araştırmalar açısından uygunluğu, daha geniş boyutlu araştırmalarla değerlendirilmelidir.

Sonuç olarak, kültürlerinden *C.albicans* izole edilen hastalarda bu yöntemle genotiplendirme hasta açısından ek yararlar sağlayabilir. Genotip A kolonizasyonu tespit edilen ve riskli grupta yer alan hastalarda klinik izlemde sepsis gelişim riski açısından daha dikkatli olunmalı, etken olarak genotip A izole edildiği bilinen hastalarda, antifungal duyarlılık sonuçları gelene kadar flusitozin başlanmamalıdır.

ÖZET

Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida albicans* Suşlarının Genotipik Dağılımı

Son yıllarda, özellikle kanser ve transplantasyon hastalarına daha yoğun kemoterapi protokolleri uygulanması, AIDS hastalarının sayısındaki artış ve bağışıklığı baskılanmış bireylerin daha uzun süre yaşatılabilmesi sonucunda, bu hastalarda tespit edilen mantar enfeksiyonlarında önemli bir artış olmuştur. Etkenler arasında *C. albicans* ilk sırayı almaktadır. Etkenin moleküler tiplendirmesi, epidemiyolojik çalışmalar ve uygun tedavi ve korunma protokollerinin geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada, McCullough ve ark. (1999) tarafından geliştirilen 25S intron analizi yöntemi kullanılarak, 81'i invaziv (kan kültürü izolatu) ve 320'si non-invaziv (balgam, yara, idrar, vajen, dışkı ve boğaz kültürü izolatları) olmak üzere toplam 401 *C. albicans* suşu, 25S rDNA geninde aktarılabılır grup-1 intron varlığına göre tiplendirilmiştir.

Genotip A, B ve C sıklıkları sırasıyla %51,9, %65 ve %31,9 olarak tespit edilmiştir. *C. dubliniensis*'e ait olan genotip D ve E bulunmamıştır. İnvaziv ve non-invaziv izolatlarda tespit edilen genotip sıklıkları sırasıyla; Genotip A: %65,4-%48,4; Genotip B: %8,6-%18,1; Genotip C: %26-%33,4 olarak bulunmuştur. Tespit edilen genotipler, izole edildikleri bölgelere göre karşılaştırıldıklarında gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,07$). İnvaziv ve non-invaziv izolatlar karşılaştırıldığında invaziv izolatlarda genotip A sıklığı, non-invaziv izolatlarda ise genotip B ve C sıklıkları anlamlı yüksek bulunmuştur ($p=0,015$). Aktarılabılır grup-1 intron varlığına göre gruplar karşılaştırıldığında, gerek izole edildikleri yere göre ($p=0,001$), gerek invaziv/ non-invaziv olmaları açısından ($p=0,006$) gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur. Bu sonuçlar, değerlendirilen bu bölgenin invazivliği belirlemede önemli olabileceğini ve grup-1 intron varlığının, flusitozin direnci yanısıra invazivlik açısından da bir öneme sahip olabileceğini göstermektedir.

Çalışmada, genotip A izolatları arasında farklı moleküler büyüklüklere sahip alt gruplar olduğu gözlemlenmiş ve restriksiyon endonükleaz ve DNA dizi analizi yöntemleri ile bu subtipler belirlenmiştir. Subtiplerin kolayca belirlenmesi için HaeIII ve MspI enzimleri ile bir tiplendirme şeması geliştirilmiştir. Elde edilen verilerle, genotip A içerisinde 8 subtip (subtip a→h) ayırt edilmiş ve bu subtiplerin dizileri Gen bankasına girilmiştir. PCR ile 460bp ürün veren subtip a'nın daha önce Gen bankasında verilen dizi ile aynı olduğu; yine 460bp ürün veren subtip c ile bir bazlık bir delesyon taşıması nedeniyle 459bp ürün veren subtip c'nin sadece tek nükleotid değişimleri ile subtip a'dan ayrıldığı anlaşılmıştır. 478bp ürün veren subtip b, g ve h ile 468bp ürün veren subtip d'nin bu bölgenin çeşitli noktalarında bazı insersiyonlar taşıdığı; 447bp ürün veren subtip f'nin ise 13bp'lik bir delesyon yanısıra, birçok tek nükleotid değişimi taşıdığı tespit edilmiştir. Subtipler, hastaların yattığı hastaneler ve izolasyon yerleri göz önüne alınarak değerlendirildiğinde, bütün hastanelerden izole edilen subtip a, b, ve c'nin izolatların %86,1'ini oluşturduğu gözlenmiştir. Tüm izolatların %6,2'sini oluşturan subtip d sadece kan kültürlerinden izole edilmiş olup tüm kan kültürü izolatlarının %25'ini oluşturmaktadır. Bu subtip, invazivlik açısından özel bir öneme sahip gibi görünmektedir. Subtip e ve g aynı hastane ünitelerinde yatmakta olan hastalardan izole edilmiştir. Subtip h'nin da sadece bir hastadan izole edilmiş olması nedeniyle bu üç subtipin genel karşılaşılan subtipler olmaktan çok, mikroevrim geçiren ve aynı hastane departmanında enfeksiyon oluşturan suşlar olabileceği üzerinde durulmuştur.

Sonuç olarak, genotip dağılımı açısından Türkiye, özellikle genotip C suşlarının sıklığından kaynaklanan kendine has bir dağılım göstermektedir. İnvaziv izolatlarda genotip A'nın anlamlı şekilde daha yüksek bulunması, bu genotipin izole edildiği hastalarda tedaviyi yönlendirirken flusitozin direnci ve invazyon riskinin göz önünde bulundurulması gerekliliğini göstermektedir. Genotip A subtipleri içerisinde yer alan farklı subtiplerin klinik veya epidemiyolojik önemini ortaya koymak için daha detaylı çalışmalar yapılması uygun olacaktır.

Anahtar Sözcükler
endonükleaz analizi.

: *Candida albicans*, DNA dizi analizi, Genotiplendirme, PCR, Restriksiyon

SUMMARY

Genotypic Distribution of Clinical Isolates of *Candida albicans*

With the emergence of more aggressive chemotherapy protocols to cancer patients and transplant recipients, and the increase in the number of AIDS patients and long term survival of these immunosuppressed patients, an increase in the number of fungal infections was observed, with *Candida albicans* as the leading ethiological agent. Molecular typing of the infectious agent is especially important for epidemiological studies and for the development of appropriate infection control strategies. In this study, a total of 401 *C. albicans* isolates, 81 invasive (blood culture isolates) and 320 non-invasive (sputum, wound, urine, vagen, feaces and throat culture isolates), were genotyped according to the presence of the transposable group 1 intron in the 25S rDNA gene according to the method developed by McCullough et al. (1999).

The frequencies of genotypes A, B and C were found to be 51.9%, 65% and 31.9% respectively. Genotypes D and E which belong to *C. dubliniensis* were not found. When the isolates were evaluated as invasive and non-invasive, the genotype frequencies were found as follows: Genotype: 65.4%-48.4%; Genotype B: 8.6%-18.1%; Genotype C: 26%-33.4%. Statistically significant differences were observed between the isolation sites ($p=0.07$) and between invasive and non-invasive isolates ($p=0.015$), genotype A being more prevalent among invasive isolates and genotypes B and C being more prevalent among non-invasive isolates. When the groups were compared according to the presence of the group 1 intron, the differences became even more significant ($p=0.001$ and $p=0.006$ respectively). These results show that, this region can be important in determining invasiveness and the presence of group 1 intron may have an importance in determining invasiveness besides resistance to flucytosine.

In this study, different subgroups with slightly different molecular wights were observed among genotype A isolates. These groups were identified by restriction endonuclease and sequence analyses and an easy differentiation scheme using HaeIII and MspI restriction endonucleases was made. As a result, 8 different subtypes (subtype a→h) were identified among genotype A isolates and the sequences of these subtypes were submitted to the Genbank. Subtype a, which gives a 460bp PCR product, was found to carry the same sequence with the previously submitted sequence. The 460bp subtype c and 459bp subtype e (which carries a 1bp deletion), differed from subtype a with single base substitutions. The 478bp subtype b, h and h, and 468bp subtype d were found to carry some insertions among their sequences. Subtype f, which gives a PCR product of 447bp, was found to carry a 13bp deletion among with many single base substitutions. When the subtypes were evaluated according to their isolation sites and the hospitals which they were recovered; subtypes a, b, and c were found to account for 86.1% of the isolates, and recovered from various infection sites of the patients hospitalized in different hospitals. Subtype d was recovered only from blood cultures and this subtype accounted for 6.2% of all isolates, and 25% of blood culture isolates. This subtype may be important for its invasive nature. Subtypes e and g were obtained from patients hospitalized in the same department and subtype h was isolated from only one patient. These three subtypes were thought to be strains causing infection in the same hospital department with microevolutionary changes.

As a result, the genotypic distribution of *C. albicans* isolates has a unique pattern in Turkey, the main difference being the high frequency of genotype C isolates. Among invasive isolates, genotype A was found to be significantly more prevalent; for this reason in determining the therapy protocols of patients with genotype A *C. albicans* as the ethiological agent, resistance to flucytocine and risk for invasiveness must be taken into consideration. In order to understand the role of different genotype A subtypes in different infection types and their importance in epidemiological studies, more sophisticated and large scale studies must be performed.

Key Words : *Candida albicans*, DNA sequence analysis, Genotyping, PCR, Restriction endonuclease analysis.

KAYNAKLAR

- BARAN, J.JR. MUCKATIRA, B. KHATIB, R. (2001). Candidemia before and during the fluconazole era: prevalence, type of species and approach to treatment in a tertiary care community hospital. *Scand J Infect Dis.* **33**: 137-139.
- BART-DELABESSE, E., VAN DEVENTER, H., GOESSENS, W., POIROT, J.L., LIORET, N., VAN BELKUM A., DROMER, F. (1995). Contribution of molecular typing methods and antifungal susceptibility testing to the study of a candidemia cluster in a burn care unit. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 3278-3283.
- BECKER, K., BADEHORN, D., DEIWICK, G., PETERS, G., FEGELER, W. (2000). Molecular genotyping of *Candida* species with special respect to *Candida (Torulopsis) glabrata* strains by arbitrarily primed PCR. *J. Med. Microbiol.* **49**: 575-581.
- BISWAS, S.K., YOKOYAMA, K., WANG, L., NISHIMURA, K., MIYAJI, M. (2001). Typing of *Candida albicans* isolates by sequence analysis of the cytochrome b gene and differentiation from *Candida stellatoidea*. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1600-1603.
- BLUMBERG, H.M., JARVIS, W.R., SOURCIE, J.M., EDWARDS, J.E., PATTERSON, J.E., PFALLER, M.A., RANGEL-FRAUSTO, M.S., RINALDI, M.G., SAIMAN, J., WIBLIN, R.T., WENZEL, R.P., AND THE NEMIS STUDY GROUP. (2001). Risk factors for *Candidal* bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: The NEMIS prospective multicenter study. *Clin. Infect. Dis.* **33**: 177-186.
- BOERLIN, P., BOERLIN-PETZOLD, F., GOUDET, J., DURUSSEL, C., PAGANI J.L., CHAVE, J.P., BILLE, J. (1996). Typing *Candida albicans* oral isolates from human immunodeficiency virus-infected patients by multilocus enzyme electrophoresis and DNA fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1235-1248.
- BOTTEREL, F., DESTERKE, C., COSTA, C., BRETAGNE, S. (2001). Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 4076-4081.
- BRETAGNE, S., COSTA, J.M., BESMOND, C., CARSIQUE, R., CALDERONE, R. (1997). Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of the elongation factor 3 gene of *Candida albicans* as the basis for a typing system. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1777-1780.
- CALDERONE, R.A., FONZI, W.A. (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *TRENDS Microbiol.* **9**: 327-335.
- CALDERONE, R., SUZUKI, S., CANNON, R., CHO, T., BOYD, D., CALERA, J., CHIBANA, H., HERMAN, D., HOLMES, A., JENG, H.W., KAMINISHI, H., MATSUMOTO, T., MIKAMI, T., O'SULLIVAN, J.M., SUDOH, M., SUZUKI, M., NAKASHIMA, Y., TANAKA, T., TOMPKINS, G.R., WATANABE, T. (2000) *Candida albicans*: adherence, signaling and virulence. *Medical Mycology.* **38 Suppl 1**: 125-137.
- CLEMONS, K.V., CALICH, V.L.G., BURGER, E., FILLER, S.G., GRAZIUTTI, M., MURPHY, J., ROILIDES, E., CAMPA, A., DIAS, M.R., EDWARDS, JR. J.E., FU, Y., FERNANDES-BORDIGNON, G., IBRAHIM, A., KATSIFA, H., LAMAINERE,

- C.G., MELONI-BRUNERI, L.H., REX, J., SAVARY, C.A., XIDIEH, C. (2000). Pathogenesis I: Interactions of host cells and fungi. *Medical Mycology*. **38 Suppl 1**: 99-111.
- CLEMONS, K.V., FEROZE, F., HOLMBERG, K., STEVENS, D.A. (1997). Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotyping methods. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1332-1336.
- COCKERILL, III. F.R., UHL, J.R. (2002). Applications and Challenges of Real-time PCR for the clinical microbiology laboratory. In: Rapid Cycle Real-time PCR. Methods and Applications. Microbiology and Food Analysis. Ed: Reisch, U., Wittwer, C., Cockerill, F. Germany: Springer-Verlag, p.: 3-27.
- DALLE, F., FRANCO, N., LOPEZ, J., VAGNER, O., CAILLOT, D., CHAVANET, P., CUISENIER, B., AHO, S., LIZARD, S., BONNIN, A. (2000). Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic mikrosatellite locus. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 4554-4559.
- DE BERNARDIS, F., MÜHLSCHLEGEL, F.A., CASSONE, A., FONZI, W.A. (1998). The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* **66**: 3317-3325.
- DE HOOG, G.S., GUARRO J. (1995). Atlas of Clinical Fungi. Spain: Universitat Rovira i Virgili.
- DOLAPCI, I., TEKELI, A., GOCMEN, J.S., AYSEV, D., GURIZ, H. (2002). Investigation of *Candida dubliniensis* in *Candida* spp. positive hemocultures. *APMIS*. **110**: 391-395.
- EVANS, E.E. (1950). The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. A serologic classification by means of the capsular and agglutination reactions. *J. Immunol.* **64**: 423-430.
- FISHER, F., COOK, N.B. (1998). Fundamentals of Diagnostic Microbiology. USA: W.B. Saunders Company.
- FRIDKIN, S.K., JARVIS, W.R. (1996). Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**: 499-511.
- GARBINO, J., KOLAROVA, L., ROHNER, P., LEW, D., PICHNA, P., PITTET, D. (2002). Secular trends of candidemia over 12 years in adult patients at a tertiary care hospital. *Medicine*. **81**: 425-433.
- GHANNOUM, M.A. (2000). Potential role of Phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 122-143.
- HAYNES, K. (2001) Virulence in *Candida* species. *TRENDS Microbiol.* **9**: 591-596.
- HUANG, Y.C., LIN, T.Y., PENG, H.L., WU, J.H., CHANG, H.Y., LEU, H.S. (1998). Outbreak of *Candida albicans* fungemia in a neonatal intensive care unit. *Scand. J. Infect. Dis.* **30**: 137-142.
- KANBE, T., HORII, T., ARISHIMA, T., OZEKI, M., KIKUCHI, A. (2002). PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. *Yeast*. **19**: 973-989.
- KOBAYASHI, G.S., MEDOFF, G. (1993). Introduction to the Fungi and Mycoses. In: Mechanisms of Microbial Disease. Ed: Schaechter, M., Medoff, G., Einstein, B.I. 2nd Ed. USA: Williams & Wilkins. p: 562-568
- KOSSOFF, E.H., BUESCHER, E.S., KARLOWICZ, M.G. (1998). Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **17**: 504-508.
- KUMAMOTO, C.A. (2002). *Candida* biofilms. *Current Opin Microbiol.* **5**: 608-611.
- LEWIN, B.R., BULL, J.J. (1994). Short-sighted evolution and virulence of pathogenic microorganisms. *Trends Microbiol.* **2**: 76-81.

- LOCKHART, S.R., FRITCH, J.J., MEIER, A.S., SCHRÖPPEL, K., SRIKANTHA, T., GALASK, R., SOLL, D.R. (1995). 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.* **33**: 1501-1509.
- LOEFFLER, J., HEBART, H., HENKE, N., SCHMIDT, K., EINSELE, H. (2002). Quantification and Speciation of Fungal DNA in clinical specimens using the LightCycler Instrument. In: Rapid Cycle Real-time PCR. Methods and Applications. Microbiology and Food Analysis. Ed: Reisch, U., Wittwer, C., Cockerill, F. Germany: Springer-Verlag, p: 179-186.
- LUNEL, F.V., LICCIARDELLO, L., STEFANI, S., VERBRUGH, H.A., MELCHERS, W.J.G., MEIS, J.F.G.M., SCHERER, S., VAN BELKUM, A. (1998). Lack of consistent short sequence repeat polymorphisms in genetically homologous colonizing and invasive *Candida albicans* strains. *J. Bacteriol.* **180**: 3771-3778.
- LUO, G., MITCHELL, T.G. (2002). Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 2860-2865.
- LUU, L.N., COWEN, L.E., SIRJUSINGH, C., KOHN, L.M., ANDERSON, J.B. (2001). Multilocus genotyping indicates that the ability to invade the bloodstream is widespread among *Candida albicans* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1657-1660.
- MCCULLOUGH, M.J., CLEMONS, K.V., DEL PALACIO, A., STEVENS, D.A. (1998). Epidemiology of *Candida albicans* isolates from heroin addicts analyzed by DNA typing. *Med. Mycol.* **36**: 213-217.
- MCCULLOUGH, J.M., CLEMONS, K.V., STEVENS, D.A. (1999). Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 417-421.
- MCCULLOUGH, M.J., CLEMONS, K.V., STEVENS, D.A. (1999a). Molecular epidemiology of the global and temporal diversity of *Candida albicans*. *Clin. Infect. Dis.* **29**: 1220-1225.
- MERCURE, S., COUSINEAU, L., MONTPLAISIR, S., BELHURNEUR, P., LEMAY, G. (1997). Expression of a reporter gene interrupted by the *Candida albicans* group 1 intron is inhibited by base analogs. *Nucleic Acids Research* **25**: 431-437.
- MERCURE, S., MONTPLAISIR, S., LEMAY, G. (1993). 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.* **21**: 6020-6027.
- MILLAR, B.C., MOORE, J.E., XU, J., WALKER, M.J., HEDDERWICK, S., McMULLAN, R. (2002). Genotypic subgrouping of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by 25S intron analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* **35**: 102-106.
- MOLERO, G., DíEZ-OREJAS, R., NAVARRO-GARCÍA, F., MONTEOLIVA, L., PLA, J., GIL, C., SÁNCHEZ-PÉREZ, M., NOMBELA, C. (1998). *Candida albicans*: Genetics, dimorphism and pathogenicity. *Internatl. Microbiol.* **1**: 95-106.
- MONOD, M., BORG-VON ZEPPELIN, M. (2002). Secreted Proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. In: Fungal allergy and pathogenicity. Ed: Breitenbach, M., Cramer, R., Lehrer, S.B. Basel: Karger. p: 114-128.
- ODDS, F.C., ABBOTT, A.B. (1980). A simple system for the presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. *Sabouraudia*. **18**: 301-317.

- ODDS, F.C., ABBOTT, A.B. (1983). Modification and extension of tests for differentiation of *Candida* species and strains. *Sabouraudia*. **21**: 79-81.
- OLSEN, G.J., WOESE, C.R. (1993). Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J.* **7**: 113-123.
- PFALLER, M.A. (1995). Epidemiology of fungal infections: The promise of molecular typing. *Clin. Infect. Dis.* **20**: 1535-1539.
- PONTON, J., OMAETXEBARRIA, M.J., ELGUEZABAL, N., ALVAREZ, M., MORAGUES, M.D. (2001). Immunoreactivity of the fungal cell wall. *Medical Mycology*. **39 Suppl 1**: 101-110.
- PRYCE, T.M., KAY, I.D., PALLADINO, S., HEATH, C.H. (2003). Real-time automated polymerase chain reaction (PCR) to detect *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* DNA in whole blood from high-risk patients. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **47**: 487-496.
- REISS, E., OBAYASHI, T., ORLE, K., YOSHIDA, M., ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M. (2000). Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Medical Mycology* **38 Suppl 1**: 147-159.
- PUJOL, C., JOLY, S., LOCKHART, S.R., NOEL, S., TIBAYRENC, M., SOLL, D.R. (1997). Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2348-2358.
- RICHARDSON, M.D., WARNOCK, D.W. (1997). *Fungal Infection. Diagnosis and Management*. 2nd ed. England: Blackwell Science.
- ROMANI, L., BISTONI, F., PUCCETTI, P. (2002). Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *TRENDS Microbiol.* **10**: 508-514.
- SAN-BLAS, G., TRAVASSOS, L.R., FRIES, B.C., GOLDMAN, D.L., CASADEVALL, A., CARMONA, A.K., BARROS, T.F., PUCCIA, R., HOSTETTER, M.K., SHANKS, C.G., COPPING, V.M.S., KNOX, Y., GOW, N.A.R. (2000). Fungal morphogenesis and virulence. *Medical Mycology*. **38 Suppl 1**: 79-86.
- SANDHU, G.S., KLINE, B.C., STOCKMAN, L., ROBERTS, G.D. (1995). Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2913-2919.
- SCHERER, S., STEVENS, D.A. (1987). Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 675-679.
- SOLL, D.R. (2000). The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin. Microbiol Rev.* **13**: 332-370.
- STEVENS, D.A., ODDS, F.C., SCHERER, S. (1990). Application of DNA typing methods to *C. albicans* epidemiology and correlation with phenotype. *Rev. Infect. Dis.* **12**: 258-266.
- SULLIVAN, D., COLEMAN, D. (1998). *Candida dubliniensis*: Characteristics and Identification. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 329-334.
- TAMURA, M., WATANABE, K., MIKAMI, Y., YAZAWA, K., NISHIMURA, K. (2001). Molecular characterization of new clinical isolates of *Candida albicans* and *C.dubliniensis* in Japan: Analysis reveals a new genotype of *C.albicans* with group I intron. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 4309-4315.
- VAN BELKUM, A (1999). The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 306-311.

- VAZQUEZ, J.A., BECKLEY, A., DONABEDIAN, S., SOBEL, J.D., ZERVOS, M.J. (1993). Comparison of restriction enzyme analysis versus pulsed-field gradient gel electrophoresis as a typing system for *Torulopsis glabrata* and *Candida* species other than *C.albicans*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2021-2030.
- VERDUYN LUNEL, F.M., MEIS, J.F.G.M., VOSS, A. (1999). Nosocomial fungal infections: Candidemia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **34**: 213-220.
- VERSALOVIC, J., LUPSKI, J.R. (2002). Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. *TRENDS Microbiol.* **10 (10 Suppl)**: 15-21
- VRIONI, G., MATSIOTA-BERNARD, P. (2001). Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. *J. Infect.* **42**: 50-56.
- WHITE, T.C., MARR, K.A., BOWDEN, R.A. (1998). Clinical, cellular, molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 382-402.
- YAMAMURA, D.L., ROTSTEIN, C., NICOLLE, L.E., IOANNOU, S. (1999). Candidemia at selected Canadian sites: results from the Fungal Disease Registry, 1992-1994. Fungal Disease Registry of the Canadian Infectious Disease Society. *C.M.A.J.*, **160**: 493-499.

