

**T. C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
MİKROBİYOLOĞI VE KLİNİK MİKROBİYOLOĞI SERVİS ŞEFLİĞİ**

**HASTANE ENFEKSİYONU ETKENİ OLARAK İZOLE
EDİLEN CANDIDA SUŞLARININ GENOTİPİK VE
FENOTİPİK OLARAK TİPLENDİRİLMESİ**

**Fatih ŞAHİNER
TBP. YZB.**

UZMANLIK TEZİ

**İSTANBUL
2008**

**T. C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
MİKROBİYOLOĞI VE KLİNİK MİKROBİYOLOĞI SERVİS ŞEFLİĞİ**

**HASTANE ENFEKSİYONU ETKENİ OLARAK İZOLE
EDİLEN CANDIDA SUŞLARININ GENOTİPİK VE
FENOTİPİK OLARAK TİPLENDİRİLMESİ**

**Fatih ŞAHİNER
TBP. YZB.**

**Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Haydarpaşa Eğitim Hastanesi'nin
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi Programı
İçin ÖngördüĐü UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıŐtır.**

**TEZ DANIŞMANI
Tunçer HAZNEDAROĞLU
Prof. Dz. Tbp. Kd. Alb.**

**İSTANBUL
2008**

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığına;

“Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olarak İzole Edilen *Candida* Suşlarının Genotipik ve Fenotipik Olarak Tiplendirilmesi” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi’nde Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof. Dz. Tbp. Kd. Alb. Tunçer HAZNEDAROĞLU

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

ONAY:

Tbp. Yzb. Fatih ŞAHİNER’in 14/10/2008 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

M.Zeki BAYRAKTAR
Prof.Tbp. Tümgeneral
Askeri Tıp Fakültesi Dekanı,
Eğitim Hastanesi Baştabibi

TEŞEKKÜR

“Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olarak İzole Edilen *Candida* Suşlarının Genotipik ve Fenotipik Olarak Tiplendirilmesi” konulu uzmanlık tezi GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servis Şefliği'nin 31.10.2005 tarih ve MİK.: 9453-26-05/320 sayılı emri ile verilmiş ve çalışmaya başlanmıştır.

Uzmanlık öğrenciliğim süresince yetişmemde büyük katkıları ve emekleri olan değerli hocalarım Prof.Tbp.Alb. F.Tunçer HAZNEDAROĞLU, Doç.Tbp.Alb. Mustafa ÖZYURT, Doç.Tbp.Yb. Nurittin ARDIÇ'a saygılarımı ve şükranlarımı arz ederim. Bilgi ve tecrübeleri ile eğitimime olan değerli katkılarından dolayı Prof.Tbp.Alb. Şaban ÇAVUŞLU ve Doç.Tbp.Yb. Oral ÖNCÜL'e teşekkürlerimi arz ederim. Tez çalışmalarına olan destek ve yardımlarından dolayı değerli hocamız Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU'na teşekkür ve saygılarımı sunarım. Bilgi birikimi ve deneyimlerini bizimle paylaşan değerli arkadaşımız Dr. Koray ERGÜNAY'a destek ve yardımlarından dolayı sevgi ve saygılarımı sunarım. Kadim dostlukları ile her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Dr. İlhan CEBECİ ve Dr. Batuhan HAZER'e ayrıca teşekkürlerimi sunarım. Aynı dönemde çalışma mutluluğuna eriştiğim Dr. Uğur İLGA ile asistan arkadaşlarım Dr. Tuğrul HOŞBUL ve Dr. Bayhan BEKTÖRE'ye yardımları ve içtenliklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım. En sıkıntılı dönemlerde güler yüzleriyle beni teselli eden Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi'nin tüm personeline sonsuz sevgilerimi sunarım.

Dr. Fatih ŞAHİNER
İstanbul
Ekim 2008

ÖZET

Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olarak İzole Edilen *Candida* Suşlarının Genotipik ve Fenotipik Olarak Tiplendirilmesi

Son on yılda özellikle immünbaskılanmış ve yoğun bakım ünitesi (YBÜ) hastalarında gözlenen kandida enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve antifungal tedavide kullanılan ilaçlar ile ilgili önemli değişiklikler ortaya çıkmıştır. Söz konusu değişimin hastanemizdeki yansımalarının ortaya konulabilmesi, bu bağlamda kandida enfeksiyonlarında etkenin tür düzeyinde tanımlanmasında kullanılan klasik ve moleküler yöntemlerin etkinlikleri ile pratik uygulanabilirliklerinin karşılaştırılması, ampirik antifungal tedavinin yönlendirilmesi ve nihayet hastane enfeksiyonlarının (HE) önlenmesine yönelik politikaların şekillendirilmesine katkı sağlanması bu çalışmanın başlıca amaçlarıdır.

Çalışma sonucunda kandida suşlarından 57 (%74,0)'si HE etkeni olarak tanımlanmıştır. En sık karşılaşılan HE etkeni türler, sıklık sırasına göre *C. albicans* 22 (%38,6), *C. tropicalis* 14 (%24,6), *C. parapsilosis* 13 (%22,8) ve *C. glabrata* 7 (%12,3) olarak tanımlanmıştır. Nozokomiyal kan dolaşımı etkenleri arasında en sık *C. parapsilosis* 10 (%38,5), NÜSE etkenleri arasında ise en sık *C. albicans* 12 (%50) soyutlanmıştır. Tanımlamada CAC besiyeri ve ID 32C API kitlerinin birlikte kullanılması durumunda moleküler test sonuçları ile uyumlu sonuçların alındığı gözlenmiştir.

Diğer taraftan kandidemi etkenleri arasında flukonazole direnç oranı yüksek olan türlerin (*C. krusei* ve *C. glabrata*) saptanmamış olması nedeni ile hastanemiz özelinde kandidemi tedavisinde söz konusu antifungalın ampirik tedavi için iyi bir seçenek oluşturabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, konvansiyonel yöntemler birlikte kullanıldığında moleküler yöntemlere benzer sonuçların alınabildiği, ancak hızlı tanı için etkenin doğrudan klinik örneklerden soyutlanmasına olanak sağlayan, standardize edilmiş, moleküler yöntemlerin gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Hastane Enfeksiyonu, kandida, fenotipik tiplendirme, genotipik tiplendirme.

Destekleyen Kurumlar : Çalışmayı destekleyen kuruluş yoktur.

Yazar Adı : Tbp.Yzb. Fatih ŞAHİNER

Danışman : Prof.Dz.Tbp.Kd.Alb. F.Tunçer HAZNEDAROĞLU

SUMMARY

Phenotypic and genotypic identification of *Candida* strains isolated as hospital infection pathogens.

Important advances have been occurred related to antifungal agents, in treatment of candidiasis, and epidemiology of candida infections, especially in immunocompromised and intensive care unit patients, in last ten years. In this study; bringing up the reflection of this change in our hospital, comparison of conventional and molecular diagnostic methods that are used for identification of candida species and their practicability, establishing a guide for empiric antifungal therapy and finally contributing to form policies about prevention of hospital infections, were aimed.

Out of 57 *Candida* strains (74,0%) was isolated as hospital infection (HI) pathogens at the end of the study. The most isolated *Candida* strains as HI pathogens found as were *C. albicans* 22 (38,6%), *C. tropicalis* 14 (24,6%), *C. parapsilosis* 13 (22,8%) and *C. glabrata* 7 (12,3%), respectively. The most isolated pathogen in nosocomial blood stream infections was *C. parapsilosis* 10 (38,5%) and in nosocomial urinary tract infections was *C. albicans* 12 (50%). When CAC medium and ID 32C API kits were used together similar results were obtained as in molecular methods.

On the other hand, fluconazole has been assessed to be a good choice for empiric therapy of candidemia due to the fact that the strains with high resistance rates to this drug such as *C. krusei* and *C. glabrata* were not determined in our hospital.

In conclusion, similar results were obtained as in molecular methods when conventional methods combined with each others. Although, it should be considered that standardized molecular methods for directly isolation of the fungal pathogens from clinical specimens for rapid diagnosis, are needed.

Key Words : Hospital Infection, *Candida*
phenotypic identification, genotypic identification.

Supported by : None

Author : Captain Fatih ŞAHİNER, M.D.

Counsellor : Colonel Professor
F.Tunçer HAZNEDAROĞLU, M.D.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xiv
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma.....	2
2.2. Candida Cinsinin Genel Özellikleri.....	2
2.2.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri.....	2
2.2.2. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri.....	3
2.2.3. Hücre Yapısı.....	3
2.2.4. Biyolojisi.....	4
2.2.5. Tıbbi Önemi Olan Candida Türleri.....	5
<i>C. albicans</i>	5
<i>C. glabrata</i>	5
<i>C. parapsilosis</i>	6
<i>C. tropicalis</i>	6
<i>C. krusei</i>	6
<i>C. dubliniensis</i>	6
<i>C. lusitaniae</i>	7
2.2.6. Virülans Faktörleri.....	7
2.2.7. Candida Enfeksiyonlarının Patogeneğinde Konağın Rolü.....	9
2.3. Candida Enfeksiyonları ve Epidemiyolojisi.....	9
2.3.1. Kandidemi ve Kateter Enfeksiyonları.....	11
2.3.2. Kandidüri ve Üriner Sistem Enfeksiyonları.....	13
2.3.3. Candida Pnömonisi.....	16

2.3.4. Deri, Mukoza ve Tırnak Kandidiyazı.....	16
2.3.5. Orofarengeal Kandidiyaz ve Kandida Özefajiti.....	16
2.4. Nozokomiyal Enfeksiyonlar.....	17
2.4.1. Nozokomiyal Kandida Enfeksiyonları.....	18
2.5. Kandida Enfeksiyonlarına Tanısal Yaklaşım.....	19
2.5.1. Kandidemi'de Tanı.....	20
2.5.2. Üriner Sistem Kandidozlarında Tanı.....	21
2.5.3. Kandida Pnömonilerinde Tanı.....	21
2.5.4. Deri ve Mukoza Kandidozlarında Tanı.....	22
2.5.5. Orofarengeal Kandidiyaz ve Kandida Özefajitinde Tanı.....	22
2.6. Kandida Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı.....	23
2.6.1. Fenotipik Yöntemler ile Tür İdentifikasyonu.....	23
2.6.2. Kandida Enfeksiyonlarının Tanısında Serolojik yöntemler.....	24
A. Antikor Saptanmasına Yönelik Testler.....	24
B. Antijen Saptanmasına Yönelik Testler.....	25
C. Kandida Metabolitlerinin Gösterilmesi.....	25
2.6.3. Genotipik Tanı ve İdentifikasyon Yöntemleri.....	25
2.6.4 Antifungal Duyarlılık Testleri.....	28
GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Örneklerin Toplanması.....	29
3.2. Hastane Enfeksiyonlarının Değerlendirilmesi.....	29
3.3. Suşların İzolasyonu ve Stoklanması.....	30
3.4. Kullanılan Besiyerleri.....	30
3.4.1. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA, %4 glikozlu).....	30
3.4.2. Sabouraud Dekstroz Broth (SDB)	30
3.4.3. Kromojenik besiyeri CHROMagar <i>Candida</i>	30
3.4.4. Mısır Unu Tween 80 Agar (Corn Meal Agar)	31
3.5. Fenotipik Yöntemler.....	31
3.5.1. Germ Tüp Testi.....	31
3.5.2. Klamidospor Oluşturma.....	31
3.5.3. CAC Besiyerinde Renk Değişimi ve Koloni Morfolojisi.....	32
3.5.4. ID 32C API ile Biyokimyasal Özelliklerin Test Edilmesi.....	33

3.5.5. Yüksek Isıda Üreme Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	34
3.6. Genotipik Yöntemler.....	34
3.6.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar.....	34
3.6.2. DNA Ekstraksiyonu.....	36
3.6.3. PCR ile Tür Spesifik Amplikonların Elde Edilmesi.....	37
3.6.4. RFLP Yöntemi ile Kandida İzolatlarının Tanımlanması.....	39
3.6.5. RFLP Yöntemi ile <i>C. albicans</i> ve <i>C. dubliniensis</i> Ayırımı.....	40
3.6.6. Nükleik Asitlerin Görüntülenmesi.....	40
BULGULAR	42
4.1. Örneklerin Cinsiyete Göre Sayısal Dağılımı.....	42
4.2. Örneklere Göre Türlerin Sayısal Dağılımı.....	42
4.3. Kliniklere Göre, Örnek ve Tür Dağılımı.....	43
4.4. Farklı Örneklerinde Üreme Olan ve/veya Polimikrobiyal Üremesi Olan Hastalar.....	44
4.5. Germ Tüp Pozitifliklerinin Değerlendirilmesi.....	45
4.6. Corn Meal Agarda Morfolojik Yapıların Değerlendirilmesi.....	46
4.7. CAC Besiyerindeki Koloni Görünümlerinin Değerlendirilmesi.....	48
4.8. Yüksek Isıda (45°C'de) Üreme Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	48
4.9. ID 32C API Sonuçları ve Biyokimyasal Deneyler.....	50
4.10. Moleküler Tiplendirme.....	51
4.11. "Hastane Enfeksiyonu" Varlığının Değerlendirilmesi.....	53
4.12. Suşlara Göre Tüm Yöntemlere Genel Bakış.....	55
TARTIŞMA	57
SONUÇ ve ÖNERİLER	73
KAYNAKLAR	78

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AGE	: Agaroz Jel Elektroforezi
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
APACHE	: Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
API	: Analytical Profile Index
ark.	: Arkadaşları
ASK	: Asemptomatik Kandidüri
ATCC	: American Type Culture Collection
BAL	: Bronko Alveolar Lavaj
bp.	: Base pair
CAC	: CHROMagar <i>Candida</i>
CBS	: Centraalbureau voor Schimmelcultures
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	: Santimetre
CMA	: Corn Meal Agar
CO ₂	: Karbondioksit
CWF	: Calcofluor White Fluorescent
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNA'az	: Deoksiribonükleaz
dNTP	: Deoksi ribonükleotid trifosfat
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikasit
EIA	: Enzim İmmüno Assay
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EUCAST	: European Confederation of Antifungal Susceptibility Testing
g	: RCF
GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
GİS	: Gastro İntestinal Sistem
gr/l	: Gram/litre
GTS	: Germ Tube Solution

HCl	: Hidroklorik asit
HE	: Hastane Enfeksiyonları
HEKK	: Hastane Enfeksiyon Kontrol Komitesi
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
ITS	: Internal Transcribed Spacer
KCl	: Potasyum klorür
KDE	: Kan Dolaşımı Enfeksiyonu
KİT	: Kemik İliği Transplantasyonu
KOH	: Potasyum Hidroksit
LA	: Lateks Aglutinasyon
LOK KDE	: Laboratuvar Olarak Kanıtlanmış Kan Dolaşımı Enfeksiyonu
M	: Molar
ME	: Mikroçip Elektroforez
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
mg/ml	: Miligram/mililitre
µl	: Mikrolitre
MLST	: Multi Locus Sequence Typing
mm	: Milimetre
µM	: Mikro mol
mM	: Mili mol, mili molar
MU-Tw80	: Mısır Unu-Tween 80
NaCl	: Sodyum klorür
NASBA	: Nucleic Acid Sequence -Based Amplification
NKDE	: Nozokomiyal Kan Dolaşımı Enfeksiyonları
NNIS	: National Nosocomial Infection Surveillance
NPNEU	: Nozokomiyal Pnömoni
NÜSE	: Nozokomiyal Üriner Sistem Enfeksiyonları
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
pm	: Piko mol
RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA
RCF	: Relative Centrifugal Force

RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RIA	: Radyoimmünoassay
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
RYP	: Rapid Yeast Plus
SAP	: Salgısal Aspartik Proteinazlar
SDA	: Sabouraud Dekstroz Agar
SDB	: Sabouraud Dekstroz Broth
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
SSCP	: Single Strand Conformational Polymorphism
SÜSE	: Semptomatik Üriner Sistem Enfeksiyonu
SVK	: Santral Venöz Kateter
TAE	: Tris Acetate EDTA
TE	: Tris EDTA
TNE	: Tris NaCl EDTA
TPN	: Total Parenteral Nutrisyon
U	: Units, Ünite
UV	: Ultraviolet, Ultraviyole
ÜSE	: Üriner Sistem Enfeksiyonu
vb.	: Ve benzeri / ve benzerleri
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Kandidemi ve KDE etkeni kandida türlerinin bölgesel sıklığı.....	13
2.2. Çeşitli coğrafik bölgelerde sık görülen kandidüri ve ÜSE etkenleri...	15
3.1. Suşların MU-Tw80 agar besiyerine pasajlanması.....	32
3.2. <i>Msp I</i> ve <i>Bln I</i> enzimlerinin DNA üzerindeki hedef bölgeleri.....	35
3.3. PCR ile çoğaltılan bölgelerin fungal genomdaki lokalizasyonları.....	38
4.1. Germ tüp oluşturan maya hücreleri (ışık mikroskobu, x400).....	45
4.2. Germ tüp oluşturan maya hücreleri (gram boyama).....	46
4.3.1. <i>Candida dubliniensis</i> 'in ikili klamidosporeleri.....	47
4.3.2. <i>Candida albicans</i> 'a ait klamidosporeler.....	47
4.3.3. <i>Candida albicans</i> klamidosporeleri ve blastospor kümeleri.....	47
4.4. CAC besiyerinde 36. (sol) ve 72. (sağ) saatlerde <i>C. albicans</i> ve <i>C. dubliniensis</i> kolonileri.....	48
4.5. Çeşitli kandida türlerinin CAC besiyerindeki koloni görünüşleri.....	49
4.6.1. Bazı kandida suşlarının tür spesifik (uzun ve kısa) amplikonları.....	51
4.6.2. Bazı kandida suşlarının tür spesifik kısa ve uzun amplikonları (c) ve uzun ürünlerin <i>Msp I</i> ile kesilmesi sonrası oluşan bantlar (d).....	52
4.6.3. (e,f) Bazı kandidaların tür spesifik amplikonları ve <i>C. dubliniensis</i> uzun ürününün <i>Bln I</i> ile kesimi sonrası oluşan bantlar.....	53

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
3.1. Amplifikasyon için PCR master miksinin hazırlanması.....	38
3.2. Kandida türlerinin beklenen bant uzunlukları (bp.;base pair) (37)....	39
3.3. Kandida türlerine ait beklenen bant uzunlukları (75).....	39
3.4. <i>Candida albicans</i> ve <i>C. dubliniensis</i> türlerine ait bant uzunlukları....	40
4.1. Kandida izole edilen klinik örneklerin, cinsiyete göre dağılımı.....	42
4.2. Klinik örneklerle göre, izole edilen kandida türlerinin dağılımı.....	43
4.3. Kliniklere göre hasta, örnek ve izole edilen türlerin dağılımı.....	44
4.4. Diğer klinik örneklerinde üreme olan kandidemili hastalar.....	45
4.5. Moleküler test sonuçları ve API sonuçlarının karşılaştırılması.....	50
4.6. CDC tanımlamalarına göre HE ve tür dağılımları.....	54
4.7. <i>Candida albicans</i> ve <i>C. dubliniensis</i> suşlarının tanımlanmasında kullanılan yöntemler ve test sonuçları.....	55
4.8. Germ tüp oluşturmeyan suşların tanımlanmasında kullanılan yöntemler ve test sonuçları.....	56

I-GİRİŞ

Son on yılda, hem fungal enfeksiyonların epidemiyolojisi hem de tedavide kullanılan antifungal ilaçlar belirgin olarak değişmiştir. Genellikle immünsüpressif ve immün yetmezlikli hastalar ile kemik iliği transplantasyonu (KİT) uygulanan hastalarda daha sık enfeksiyonlara yol açtığı bilinen *Candida* cinsine ait türler günümüzde özellikle Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ)'nde yatan hastalarda önemi giderek artan patojenler durumuna gelmiştir (54). Kandidemiler tüm nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonları (NKDE) arasında üçüncü, YBÜ'lerinde ortaya çıkan NKDE arasında ise dördüncü sırada yer almaktadır. Modern tanı ve tedavi olanaklarına karşın NKDE % 40-60 gibi yüksek mortalite oranları ile seyretmektedir (12,54).

Hastane enfeksiyonları(HE)'na bağlı morbidite, mortalite ve artan tedavi giderleri rasyonel enfeksiyon kontrol stratejilerinin uygulanmasını zorunlu kılmaktadır. Bu kapsamda yataklı sağlık kuruluşlarının hizmet verdikleri hasta profillerini, hastanenin baskın florasını oluşturan mikroorganizmalar ile bunlara ait direnç paternlerini, klinikler özelinde hastane enfeksiyonu etkenlerinin dağılımlarını ve bu verilerin zaman içindeki değişimlerini bilmesi etkin ve doğru enfeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilmesinin temel koşuludur. Bu da ancak yeterli laboratuvar desteğine dayanan aktif sürveyansla mümkündür (109).

HE'nin erken dönemde tanınması ve hastane enfeksiyonu epidemilerine karşı koruyucu ve sağıtsal önlemlerin zamanında alınabilmesi için geleneksel tanı yöntemlerinin yanında moleküler tanı yöntemlerinin de kullanılması günümüz koşullarında önemli bir gereksinim haline gelmiştir. Yukarıda bildirilen temel bilgiler çerçevesinde bu çalışmanın amacı; hastanemizin YBÜ'leri ve değişik servislerinde yatan hastalarda hastane enfeksiyonu etkeni olarak soyutlanan kandida türlerinin tür düzeyinde tanımlanması amacıyla en uygun geleneksel ve moleküler tanı yöntemlerinin belirlenmesi, birimler bazında dağılım profilinin ortaya konulması, enfeksiyon, kontaminasyon-kolonizasyon ayrımının standartlara uygun olarak yapılması, ampirik antifungal tedavinin yönlendirilmesi ile etkin enfeksiyon kontrol stratejileri ve politikalarının oluşturulmasına katkı sağlanması şeklinde özetlenebilir.

II-GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

Candida cinsi ile ilgili ilk bilgiler Hippocrates'e kadar uzanır. Galen ve Pepy 1665 yılında pamukçuğu tanımladılar. Pamukçuğun mantar niteliğinde bir etyolojiye sahip olduğunu ilk olarak Berg 1841 ve Bennet 1844 yılında ortaya koymuşlardır. Robin 1853 yılında pamukçuk etkeninin sistemik enfeksiyonlar da yaptığını gözlemiş ve etkene ilk olarak *Oidium albicans* adını vermiştir. Berkhout ise 1923'de *Candida albicans* (*C. albicans*) olarak adlandırmıştır. Zenker 1861'de *Candida* cinsine ait türlerin derin mikoz etkeni olduklarını bildirmiştir. Daha sonraki yıllarda birçok araştırmacı tarafından deriderialtı kandidozları, sistemik ve merkezi sinir sistemi kandidozları tanımlanmıştır (57).

Candida cinsi, bazı türlerinde seksüel formları da bulunabilen ancak genellikle aseksüel tomurcuklanma ile çoğalan mikroorganizmalardır (31). Bir kese içinde bulunmayan eşeysiz üreme yapıları konidyum olarak adlandırılır. Konidyum oluşturan kandida türlerinin tümü Deuteromycota (*Fungi imperfecti*) içinde Cryptococcaceae ailesinde sınıflandırılır. Yaklaşık olarak 200 türü içeren *Candida* cinsi içerisinde *C. albicans* hasta örneklerinden en sık soyutlanan türdür. Son zamanlarda ise *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. guilliermondii* türleri klinik örneklerden giderek artan sıklıkta izole edilmeye başlanmıştır. Daha az sıklıkta olmak üzere *C. lusitanae*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. intermedia*, *C. catenulata*, *C. cifererrii*, *C. haemulonii*, *C. kefyr*, *C. lambica*, *C. norvegensis*, *C. pelliculosa*, *C. pulcherrima*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C. viswanathii* ve *C. zeylanoides* fırsatçı enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkabilen *Candida* cinsinin diğer önemli üyeleridir. Bu sayı ve sıralama zaman içerisinde değişebilmektedir (57,114).

2.2. *Candida* Cinsinin Genel Özellikleri

2.2.1. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Candida cinsine ait türler tek hücreli, çapları 4-6 µm arasında değişen yuvarlak veya oval görümlü, hücre duvarında kitin ve/veya selüloz içeren maya türünde ökaryotik kemoheterotrop organizmalardır. Tomurcuklanma

veya ortadan ikiye bölünme ile çoğalırlar (114). Yapısal olarak blastokonidyum, psödohif ve hifal yapıların yanı sıra bazı türler tek hücreli, kalın duvarlı, yuvarlak geniş yapılar olan klamidospore oluşturabilirler (57).

Gram boyası ile boyandıklarında *Candida* cinsinin tüm türleri gram olumludur (51). Tanıda direkt mikroskopik incelemelerde potasyum hidroksit (KOH), dokudan yapılan preparasyonlarda Calcofluor White Fluorescent (CWF) boyaması kullanılır. Maya hücre duvarındaki kitin ve selüloza nonspesifik bağlanan CWF boyası yeşilden maviye değişen renklerde floresans verir. Mısır Unu-Tween 80 (MU-Tw80) agarda üreyen mayaların mikroskopik görünüşleri de tanımlamada önemlidir (57,114).

2.2.2. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri

Candida cinsinde yer alan türlerinin çoğu yaygın olarak kullanılan mikolojik ve bakteriyolojik kültürlerde iyi ürerler. Koloniler genellikle 24 saatte görünür hale gelirken, belirgin üreme oksijenli/oksijensiz ortamda 48-72 saat arasında gerçekleşir. Mayaların 37°C'de üreyebilmeleri önemli özelliklerindedir. Özellikle patojen olan türler 25-37°C'de, saprofitler ise daha düşük ısı derecelerinde üreyebilirler (114). *Candida* türleri, oksijen varlığında spesifik karbonhidratları tek karbon kaynağı olarak kullanabilirler. *Candida* türleri düzgün veya buruşuk kenarlı, nemli, krem görünümde, maya kokan koloniler oluştururlar (24,57).

Klinik örneklerden soyutlanan *Candida* cinsi mayaların *C. lipolytica* ve bazı *C. krusei* suşları haricinde üreaz enzimleri yoktur. *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* türlerinin üreaz enzimlerinin olması, *C. neoformans*'ın kafeik asit içeren substrata fenol oksidaz enzim aktivitesi göstermesi, *Rhodotorula* türlerinin pigmentli olmaları, *Trichosporon* türlerinin artrospor oluşturmaları ve sayılan türlerin çeşitli biyokimyasal özelliklerindeki farklılıklar onları *Candida* cinsindeki türlerden ayırt etmeye olanak sağlar (15,57).

2.2.3. Hücre Yapısı

Ökaryotik hücreler olduklarından membranla çevrili bir çekirdek içerirler. Çekirdek içinde bir çekirdekçik ve lineer kromozomlar bulunur. Sitoplazmada; mitokondri, golgi aygıtı, vakuoller, çeşitli veziküller ve 80S

ribozomlar yer alır (24).

Moleküllerin transferini sağlayan ozmoenzimler, duvar sentezinde rolü olan kitin sentetaz ve glukon sentetaz ile sinyal transdüksiyonunda rol alan fosfolipaz C, adenilat siklaz, proteaz gibi enzimler membranda bulunurlar. Membran fosfolipitleri fosfatidil kolin, fosfatidil etanolamin, fosfatidil serin ve fosfatidil inositoldür (24).

Hücre duvarı, katı bir yapıdadır. Hücreye şeklini verir, ozmotik basınca bağlı patlamaya karşı koyar, moleküllerin hücre içine ve dışına geçişinde rol alır. *Candida* cinsinin hücre duvarı; konak hücrelere tutunmayı sağlayan antijenik belirteçler bulundurur. Hücre duvarının en temel komponentleri karbonhidratlar (%80-90), proteinler (%5-15) ve lipitlerdir (%2-5). Karbonhidratların %20-30'u mannopteinlerden (mannan), %50-60'ı beta-glukanlardan ve %0,6-9'u kitinden oluşur. *Candida* cinsi maya türlerinin hifal formlarında kitin miktarı, maya formunun üç katı kadar fazladır. Duvarda yer alan katmanlar maya-hif dönüşümü sürecinde sayı ve kalınlık açısından değişir. Ayrıca besin miktarı azaldığında mannan içeren yapıların kaybı ya da yüksek glukoz-galaktoz varlığında en dıştaki mannoptein katmanının ve fibriller tabakanın kalınlığında artış gözlemlenmektedir (24,40).

N-asetil-glukoz aminidaz, asit fosfataz, glukonaz, proteinaz ve bazı reseptörler duvar proteinlerinin en önemlileridir. *Candida* hücre duvarının %1-5'ini; trigliseritler, fosfolipitler ve sterolesterler olmak üzere lipitler oluşturur (24).

2.2.4. Biyolojisi

Candida albicans kromozomal instabilite sonucu genetik değişiklikler gösterebilir. Bu değişikliklerin bir yansıması, maya-hifal form dönüşümü ya da dimorfizmdir. Dönüşüm için dışarıdan gelen ve sinyal niteliğinde olan CO₂, pH, ısı, cAMP, cGMP, N-asetil-glukozamin, prolin, serum, aminoasitler, hatta inokülüm miktarı gibi birincil uyaranlar hücre membranındaki reseptörlerce hücre içine iletilir ve ikincil sinyaller aracılığıyla maya-hif dönüşümü ile bağlantılı genleri aktive eden membran enzimleri etkinlik kazanırlar (24).

Hifal forma dönüşümün ilk basamağı germ tüp oluşumudur. Ana hücrede oluşan 1-5 tümseğin sadece bir veya ikisinden germ tüp gelişir. İlk

septum ana hücreden 1-2 µm uzakta oluşur, uzamakta olan uca doğru sitoplazma akar ve ardında geniş bir vakuol bırakır. Bu arada germ tüpe itilen çekirdek, mitozu takiben ikiye bölünür ve biri ana hücrede kalırken diğeri uzamakta olan hifal uca göç eder. Rejenere sitoplazmanın akışkanlığı sürer ve başlangıçta lineer olan germ tüp, 150-180 dakika sonra dallanmalar gösterir. İkincil sinyaller güçsüz ise tomurcuklanma, hif ya da tomurcuklanma arasında bir iyon akışına yol açacak yeterlilikte ise yalancı hif oluşur (24,41).

Candida albicans kökenlerinde 10^{-4} sıklıkta spontan fenotipik değişim saptanmıştır. Koloni morfolojisinde white-opaque yani düzgün beyaz kolonilerden opak miçelyal kolonilere; ayrıca yıldız koloni, düzensiz kıvrımlı koloni, cüce koloni, halka koloni gibi şekillenmelere dönüşüm olmaktadır. Bunlar geriye dönüşebilir değişikliklerdir. White-opaque değişimde, mikroskopik olarak beyazdan krem renge ve ovalden uzamış hücreye dönen mayalar gözlenir (24).

2.2.5. Tıbbi Önemi Olan Kandida Türleri

C. albicans

Kandidozun en yaygın nedeni *C. albicans*'tır. Akut, subakut ve kronik enfeksiyonlar yapabilir. Krem renginde, yumuşak kıvamlı S tipi düzgün koloniler oluşturur. Ayrıca kanlı agarda yıldız şeklinde çıkıntılar oluşturabilir. Yalancı hif ve bazen gerçek hif oluşturabilir. Bunun etrafında kümeler yapan blastosporlar (3-7x3-14 µm) ve yalancı hiflerin üzerinde geniş duvarlı, kesif refle veren klamidospore oluşturur. En önemli karakteristik özelliği, ana hücreden orijin alan ve orijin aldığı noktada bir boğumlanma veya daralma yapmaksızın birbirine paralel duvarlar tarzında hifal uzantılar gösteren yapılar (germ tüp) ile klamidospore oluşturabilmesidir (12,57,88).

C. glabrata

Özellikle idrar yolu enfeksiyonlarının, yenidoğanlardaki fungemilerin ve immüno-kompromize konaklarda ortaya çıkan enfeksiyonların önemli etkenlerindedir. Krem renginde, yumuşak kıvamlı S tipi düzgün koloniler oluşturur. Küçük oval (2-3 x 4-5 µm) tek tomurcuklu mayalardır. Yalancı ve gerçek hif oluşturmaması ve azollere değişen oranda dirençli olması önemli özellikleridir (51,57,88).

C. parapsilosis

Candida parapsilosis kateterle ilişkili enfeksiyonların ve fungemilerin önemli etkenlerindedir. Kandidemiye neden olan etkenler arasında ilk sıralarda yer alırken, erişkin idrar kültürlerinden nadiren soyutlanır. Hastane personelinin ellerinden en sık izole edilen kandida türüdür (113). Krem renginde, yumuşak ve bazen çevresi dantele şeklinde koloniler yapar. Yalancı hif, bunun etrafında tek tek bazen kümeler yapan blastokonidyumlar ve arada dev hücrelerin bulunması ile karakterizedir (12,57,88).

C. tropicalis

Akut, subakut ve kronik enfeksiyonlara yol açabilir. Özellikle hematolojik malignitesi olan nötropenik hastalarda kandidemi etkeni olarak karşımıza çıkar (113). Krem renginde, yumuşak ve miçelyal koloniler yapar. Yalancı hifler ve bunların etrafında tek tek bazen kümeler halinde blastokonidyumlar ile çiçek tarzında bir görüntü oluştururlar. Germ tüpe benzeyen ancak ana hücreden çıktığı yerde boğumlanma gösteren ve hifal yapıların duvarlarının birbirine paralellik göstermediği yalancı germ tüp yapıları (psödohif) gözlenebilir. Klamidospor oluşturmazlar. Bazı türlerin tekrarlayan pasajlarda kaybolan klamidospore benzeri yapılar oluşturdukları bilinmektedir (12,57,88,120).

C. krusei

Candida tropicalis gibi immüno-kompromize hastalarda önemli kandidoz etkenlerindedir (57,113). Yassı, kuru, donuk ve krem renginde miçelyal koloniler yapar. Yalancı hifler ve üzerinde 'ağaca benzer' dizilimli çapraz görünümde uzun blastokonidyumlar oluşturur. Bazı türleri üreaz pozitifdir. Önemli bir özelliği de flukonazole doğal dirençli olmasıdır (57,88).

C. dubliniensis

Klasik fenotipik identifikasyon yöntemleriyle *C. albicans* olarak tanımlanan ve A serotipine dahil edilen bazı kandida suşlarının farklı özellikler taşıdığına anlaşılması ile 1995 yılında yeni bir tür olan *C. dubliniensis* ortaya çıkmıştır (32,103). Türkiye'de ilk *C. dubliniensis* izolasyonu 1998 yılında yapılmıştır. Takip eden yıllarda, birçok merkezde stoklanmış olan *C. albicans* suşları arasında *C. dubliniensis* varlığını

araştıran çalışmalar yapılmıştır. Bu şekilde ülkemizde bildiri yapılan *C. dubliniensis* suşlarının sayısı günümüzde 21'e ulaşmıştır (32, 76).

Candida dubliniensis'in koloni morfolojisi ve mikroskopik görünümü *C. albicans* ile aynıdır. Germ tüp ve klamidospore oluşturabilir. Klamidospore sıklıkla küme yapmış şekildedir. *Candida albicans*'tan 45°C'de üreyememesi, ksiloz kullanımının ve methyl-D-glukozidaz aktivitesinin olumsuz olması ile ayrılır. İki türün birbirinden ayrılmasında çeşitli moleküler yöntemlerden de yararlanılmaktadır (57,76,92). *Candida dubliniensis*'in önemli bir özelliği de flukonazole karşılaşıncı direnç geliştirebilmesidir (32).

C. lusitaniae

Krem renginde, yumuşak parlak S tipinde koloniler yapar. Yalancı hif, az sayıda, dallanmış ve uzun blastokonidyumlar gözlenir (57). Başta amfoterisin B olmak üzere, birçok antifungale dirençli olabilen *C. lusitaniae* ağır fungemi olgularından soyutlanmıştır (32, 51).

Candida kefyr ve *C. guilliermondii* enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkan diğer önemli türlerdir (12,57,75).

2.2.6. Virülans Faktörleri

İnvaziv fungal enfeksiyonların insidansındaki artış, araştırmaların virülans faktörleri üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur. Doğada bir buçuk milyondan fazla mantar türü yaygın olarak bulunmaktadır ve bunların ancak 150'si memelilerde hastalık oluşturabilmektedir. Sık karşılaşılan enfeksiyonlara yol açanların sayısı ise çok daha azdır. Mantarların yüzeysel enfeksiyonlardan invaziv enfeksiyonlara kadar geniş bir yelpazede hastalık oluşturmalarına neden olan faktörler birden fazladır. Fungal patogenez, enfeksiyon etkeni ile konak faktörlerinin etkileşimi sonucunda ortaya çıkan kompleks bir olaydır (83).

Kandidozların temel özelliği fırsatçı nitelikte olmalarıdır. Konak savunma sistemindeki defektler kandida enfeksiyonlarının gelişmesinde en önemli risk faktörleri arasındadır. Her ne kadar *Candida* cinsi mayalar genel olarak düşük virülanslı mikroorganizmalar olarak değerlendirilseler de özellikle eğitim veren büyük hastanelerde (> 500 yatak) enfeksiyon etkeni olarak izolasyon sıklıklarında artış saptandığı bildirilmektedir (18,31).

Candida cinsi üyelerinin normal vücut ısı ve ateşin yüksek olduğu (38-42°C) dönemlerde üremeyebilme yetenekleri sistemik enfeksiyon oluşturmalarında önemlidir (83). Kandidozlarda etkenin doku hücrelerine bağlanması, kolonizasyon ve enfeksiyonun ilk basamağını oluşturur (31). *Candida* türlerinin aderensini sağlayan yüzey karbonhidrat yapıları mannan, beta-glukan ve kitindir (48). Hücre duvarının mannopteinden zengin dış tabakası adezyonda en önemli rolü oynayan tabakadır. *Candida albicans* suşlarının üretilmesinde yüksek konsantrasyonda şeker içeren besiyerleri kullanıldığında dış tabaka sentezinin arttığı, etkenin epitel hücrelerine daha iyi bağlandığı ve bu suşların fareler için daha virülan oldukları saptanmıştır (31,72). Adezini kodlayan genin inaktivasyonu ile *C. albicans*'ın makrofajlara bağlanmasının ve enfeksiyon oluşumunun önlendiği, yani virülansın azaldığı bildirilmiştir (83).

Candida cinsinde hiflerin konak hücre membranını penetre etme yeteneği virülansta polimorfizmin önemini göstermektedir. *Candida albicans* maya ve hif formunda morfogenez gösteren dimorfik bir maya mantarıdır. Dimorfik mantarlar çoğunlukla konak invazyonunu maya formunda gerçekleştirirler. İstisna bir örnek olarak bazı araştırmacılar tarafından *C. albicans* için doku invazyonunda maya formundan hif formuna dönüşümün önemli olduğu kabul edilmektedir (48,83).

İnvaziv fungal enfeksiyonların gelişiminde hücre ve doku hasarına neden olarak konağın yapısal bariyerlerini bozan proteinaz, fosfataz ve deoksiribonükleaz (DNA'az) enzimleri gibi nekrotik faktörler de önemlidir. Hücre dışına salgılanan enzimlerden en önemlileri salgısal aspartik proteinazlar (SAP1-9) ve fosfolipazlardır (A, B, C, D) (48,83).

Funguslarda genetik yapı değişikliği olmaksızın gen aktivitesinin ekspresyonunun düzenlenmesi koloni morfolojisinde değişikliğe yol açmaktadır. Fenotipik değişim sonucunda hücre morfolojisi, antijenik özellik, adezyon, oksidanlara ve nötrofil etkilerine duyarlılık, antifungal direnç, aspartil proteinaz salgısında aktivite artışı şeklinde bazı özellikler ortaya çıkabilmektedir (48,83).

Candida albicans pH vb. fizyolojik değişikliklere adaptasyon sağlayabilmektedir. Konak adaptasyonu kan ve doku enfeksiyonlarında nötral pH'da maksimum aktivite gösteren PHR1 geni, vajen enfeksiyonlarında ise asit pH'da aktivite gösteren PHR2 geni eksprese edilerek sağlanır (83).

2.2.7. Kandida Enfeksiyonlarının Patogenezinde Konağın Rolü

Candida albicans insanlarda deri/mukoza yüzeylerinin normal kommensal florasının bir üyesi olarak yer alırken, *albicans*-dışı kandida türleri ise geçici olarak florada bulunabilirler. İnsanların çoğunda yaşamları boyunca kandidoza karşı doğal bir direnç vardır. Kandida türlerine direnç konağın doğal savunma yapıları ve kazanılmış immünitinin birlikteliği ile sağlanır (48).

Candida albicans immün yanıtı normal olan bireylerde nadiren doku hasarına yol açarken, immün yanıtı zayıflamış olan kişilerde doku hasarı daha yoğundur. Konaktaki hasarı kandida türlerinin virülans faktörleri ve mantara karşı savunma mekanizmaları aracılığı ile verilen konak immün yanıtı belirler (48).

Kandida enfeksiyonlarının patogenezinde konağa ait faktörler de oldukça önemlidir. Bunlar arasında, mikrobiyal antagonizma, bütünlüğü bozulmamış deri ve mukozalara ait birincil savunma, sıvısal ve hücrel immünite, beslenme durumu ve yaş, konak savunmasını bozan hastalıklar, immüniteyi baskılayan ilaçlar veya radyoterapi, kortikosteroid kullanımı ve sitotoksik kemoterapi gibi diğer immünsüpressif uygulamalar, mukokutanöz kandidozu presipite edici faktörlerin varlığı, DiGoerge sendromu ve AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) gibi durumlar sayılabilir (48).

2.3. Kandida Enfeksiyonları ve Epidemiyolojisi

Candida cinsine ait bazı türlerin normal florada bulunduğu ve sadece %10'unun insan enfeksiyonlarından sorumlu olduğu bilinmektedir. *Candida* cinsi maya türleri primer olarak gastro intestinal sistem (GİS) florasının bir üyesidir. Ayrıca vajende, üretra, deri ve tırnak altında kommensal olarak bulunabilirler. Kandida enfeksiyonlarında etken genellikle endojen kaynaklı olmakla beraber, ekzojen bulaş da mümkündür. Yanık, hematoloji, geriyatri ve YBÜ'leri gibi birimlerde hastadan hastaya geçiş olabilir. Vulvovaginitte

endojen suşlar rol oynamakla birlikte, cinsel eşten de bulaşma mümkündür.

Candida cinsinde 200'den fazla tür bulunmakla beraber insanda en sık hastalığa neden olanı *C. albicans*'tır. Azol grubu antifungal profilaksisi ve invaziv uygulamaların artması kandida türlerinin spektrumunda değişime neden olmuş, kandidemilerde *albicans*-dışı kandida türleri, özellikle de *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* önemli rol oynamaya başlamıştır (84,88,113).

Kandida enfeksiyonları hematojen ve hematojen olmayan enfeksiyonlar olarak iki ana grupta incelenmektedir. Hematojen yolla gelişen kandida enfeksiyonları klinikte kandidemi, endoftalmit, kateter enfeksiyonları, septik tromboflebit, enfektif endokardit, perikardit, enfeksiyöz artrit, osteomyelit, spondilodiskit, menenjit, piyelonefrit, pulmoner kandidiyaz, hepatosplenik kandidiyaz, kronik dissemine kandidiyaz şeklinde ortaya çıkmaktadır. İnvaziv kandidiyaz olguları da hematojen kandida enfeksiyonları içinde incelenmektedir (2).

İnsanlarda hematojen yol dışında gelişen kandida enfeksiyonları ise kutanöz-orofarengeal kandidiyaz, vulvovaginit gibi yüzeysel enfeksiyonlar ile özefajit, sistit, peritonit, trakeit-bronşit gibi derin yerleşimli enfeksiyonları kapsamaktadır. Yüzeysel kandida enfeksiyonlarının en sık rastlanan klinik şekilleri oral kandidiyaz, kronik atrofik stomatit, kronik mukokutanöz kandidiyaz ve vulvovaginittir (2).

Kandidalar özellikle immünsüpressif konaklarda yaşamı tehdit eden prognozu kötü enfeksiyonlara neden olabilmektedir (2). İnvaziv kandidiyaz en sık immünsüpressif konaklarda görülmekle birlikte son 20 yıldır yoğun bakım hastaları gibi kritik hastalarda da önemini arttırdığı gözlenmektedir. Kandida türlerine bağlı kan dolaşımı enfeksiyonu (KDE) olgularının üçte ikisi nozokomiyaldir ve kandida türleri hastanede edinilen kan dolaşımı enfeksiyonlarının ilk dört etkeni arasında yer alırlar (84,101,113).

İnvaziv kandida enfeksiyonlarının gelişmesinde rol oynayan faktörler çok çeşitlidir. En sık bildirilen risk faktörleri (erişkinler için) YBÜ'de uzun süre kalmak, yüksek APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation) skoru (>20), böbrek yetmezliği, hemodiyaliz, uzun süreli ve/veya geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, santral venöz kateter (SVK) varlığı,

parenteral nütisyon, nütropeni, diabetes mellitus (DM), immünsüpressif ilaçlarla tedavi, kanser ve kemoterapi, transplantasyon, ağır akut pankreatit, mekanik ventilasyon, birden fazla anatomik bölgede kandida kolonizasyonu, genel anestezi altında yapılan yoğun cerrahi uygulamaları, özellikle abdominal cerrahi ve üst GİS cerrahisi, operasyonun uzaması veya tekrarı ve intravenöz ilaç bağımlılığıdır. Yenidoğan ve çocuklarda prematür doğum, düşük Apgar skoru, konjenital malformasyonlar ve umbilikal ven kateterizasyonu ek risk faktörleri olarak bildirilmektedir (1,2,39,71,73).

2.3.1. Kandidemi ve Kateter Enfeksiyonları

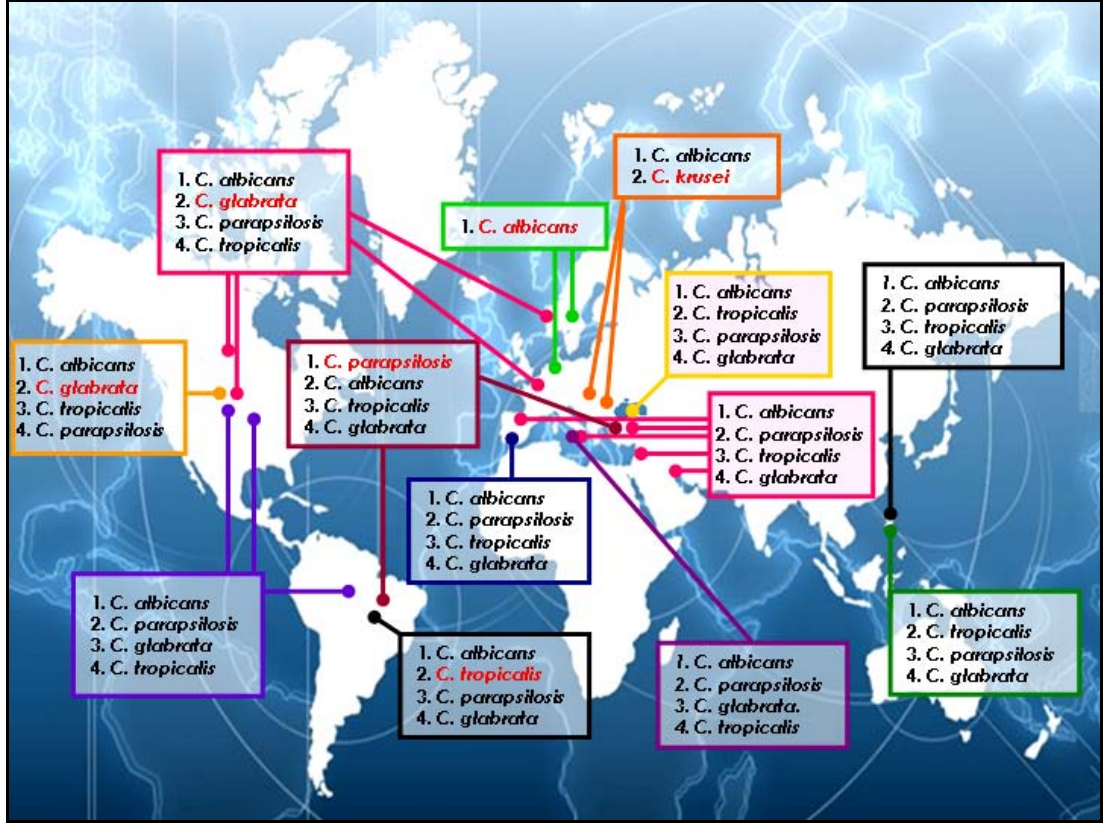
Kandidemi, tanı ve tedavisinde güçlükler olan klinik bir durumdur ve bir ya da daha fazla kan kültüründe en az bir kandida türünün soyutlanması ile karakterizedir. İnvaziv kandidiyazlı hastaların sadece %50-70'inde etken kandan izole edilebilmektedir (5,43,96). Son yıllara kadar kan kültürlerindeki üremeler, yineleyen kültürlerle desteklenmeden önce cilt kontaminasyonu olarak yorumlanmaktaydı. Günümüzde ise, ikinci bir kan kültüründe üremenin beklenmesinin yaşamsal öneme haiz antifungal sağaltımın gecikmesine neden olabileceği düşünülmekte ve tek bir kan kültürü örneğinde soyutlanmış bile olsa, aksi kanıtlanıncaya kadar mevcut üremenin kandidemi olarak değerlendirilmesi ve tedaviye başlanması önerilmektedir (5,39). Venöz kateterden alınmış kan kültürü örneklerindeki üremelerin dahi kolonizasyon lehine değerlendirilmemesi önerilmektedir (43). Kandidemi damar içi kateterlerin çekilmesi ya da değiştirilmesi için endikasyon oluşturmaktadır (5). Kandidemi, invaziv kandidiyazın en sık rastlanan klinik formudur ve kandidemiye bağlı mortalite erişkinlerde %40-60, çocuklarda ise %20 gibi yüksek oranlardadır (5,54).

İnsanda hastalık yapan kandida türlerinin sayısı 17'den fazla olmakla birlikte kandidemilerin %90-95'inden beş tür sorumludur; *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* (113,116). Tüm dünyada kandidemilerden en sık izole edilen tür *C. albicans*'tır (113). Diğer türlerin görülme sıklığı ise bölgelere göre değişmektedir (Şekil 2.1). *Candida glabrata* profilaksi amaçlı flukonazol kullanılan hastalarda ve yaşlılarda giderek artan sıklıkta ortaya çıkmakta ve enfeksiyonları daha ağır

ve ölümcül seyretmektedir. *Candida parapsilosis* daha çok deri ve mukozadan kaynaklanan kandidemilere neden olmakta, kateter ve implantlarda biyofilm oluşturması, hastane ortamında direnç göstermesinin yanı sıra yenidoğan ve bebeklik yaş grubu enfeksiyonlarına neden olmaktadır. *Candida parapsilosis* enfeksiyonlarının bir diğer özelliği de düşük mortalite ile seyretmesidir. Bir YBÜ'nde, yatan hastalara ait kan kültürlerinden (özellikle immün yetmezliği olmayan hastalarda) *C. parapsilosis* üremelerinin olması kateter bakım hataları ve enfeksiyon kontrolünün eksikliği yönünden bir gösterge olarak kabul edilmektedir. *Candida tropicalis* kandidemileri daha çok kanserli, nütropeni ve mukoziti olan, özellikle de flukonazol profilaksisine alınmamış olan hastalarda görülmektedir. Nütropeni olan hastaların *C. tropicalis* ile kolonize olmaları durumunda %60-80 olasılıkla invaziv kandidiyaz geliştiği yapılan klinik çalışmalarda gösterilmiştir (58,87,88,97). *Candida krusei*'ye bağlı kandidemiler ise daha çok hematolojik malignitesi olan ve/veya KİT uygulanan ve flukonazol profilaksisine alınan hastalarda ortaya çıkmaktadır (116).

Günümüzde *albicans*-dışı kandida türlerine bağlı kandidemilerde azol türevlerine ve bazen de amfoterisin B'ye karşı gelişen direnç tedavide sorunlara neden olabilmektedir. Özellikle kateterle ilişkili kandidemilerin sağaltımında kateter etrafında "slime" yapımının kandida suşlarının antifungal duyarlılıklarını olumsuz yönde etkileyeceği bildirilmektedir (5).

Kandidalar kan dolaşımına başlıca GİS mukozası, damar içi kateterler ve piyelonefrit gibi lokalize enfeksiyon kaynaklarından ulaşmaktadır. Nütropenik hasta grubu ile YBÜ hastalarında kandidaların kan dolaşımına en sık GİS mukozasından girdikleri kabul edilmektedir. Olayın fizyopatolojisi, bağırsak florasının normal üyesi olan kandida türlerinin geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı sonucunda aşırı çoğalmaları, ayrıca çeşitli girişim ve tedaviler sonucunda GİS mukozasının zedelenmesinin kan dolaşımına geçişlerini kolaylaştırması şeklinde açıklanmaktadır. Özellikle SVK'li hastalarda, kandida türlerinin damar içi kateter yüzeyinde kolonizasyonunun ve bu yolla kan dolaşımına ulaşmasının önemli bir geçiş yolu olduğu bildirilmektedir (88,113,116).



Şekil 2.1. Kandidemi ve KDE etkeni kandida türlerinin bölgesel sıklığı.

(1,16,21,29,30,60,62,68,71,77,82,90,95,113,117,119).

Not: Dünya geneline göre o bölgede daha sık görülen türler **kırmızı renkli** olarak yazılmıştır.

Kandidemili hastaların %40'ını YBÜ hastaları oluştururken, ilginç bir şekilde %20-30 kadarının poliklinik hastaları olduğu ortaya konmuştur. Evde bakım ve tedavi gören, özellikle de kalıcı SVK'i olan, hasta popülasyonundaki artışın, poliklinik hastalarında kandidemi sıklığının artmasının en önemli nedeni olduğu bildirilmektedir (116).

2.3.2. Kandidüri ve Üriner Sistem Enfeksiyonları

Üriner sistem kandidozları alt ve üst üriner sistem ile böbreğin kandida enfeksiyonlarını içerir. Nozokomiyal Üriner Sistem Enfeksiyonları (NÜSE)'nin %10-15'inde etken *Candida* cinsi mayalardır (61). İdrardan en sık izole edilen maya *C. albicans* (%50-70)'tır, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* diğer önemli fungal NÜSE etkenleridir (Şekil 2.2). *Candida glabrata*, DM'li ve önceden flukonazol kullanımı olan hastalardan daha sık soyutlanmaktadır. *Candida parapsilosis*, erişkin ve çocuklarda kandidemiye en sık neden olan türler arasında olmakla

birlikte, idrar kültürlerinden nadiren izole edilmektedir. *Candida parapsilosis* yenidoğanların idrar kültürlerinde erişkinlere göre daha sık soyutlanır ve bu hasta grubunda genellikle sistemik enfeksiyona eşlik etmektedir (23,26,28, 36,50,61,68,82,86).

Kandidalara bağlı üriner sistem enfeksiyonu (ÜSE) gelişmesinde risk faktörleri olarak; ileri yaş, kadın hastalar, antibiyotik kullanımı, üriner kateter varlığı, diğer girişimsel işlemler, son 60 gün içinde geçirilmiş cerrahi müdahale, DM, maligniteler, yoğun bakım tedavisi görüyor olmak, benign prostat hiperplazisi, nefrolitiazis, böbrek yetmezliği, eşlik eden bakteriyel enfeksiyon, kortikosteroid ve immünsüpressif ilaç kullanımı belirlenmiştir. Pediyatrik hasta grubu için ek olarak üriner sistem anomalileri, prematür doğum gibi risk faktörleri bildirilmiştir (23,26,28,61,86).

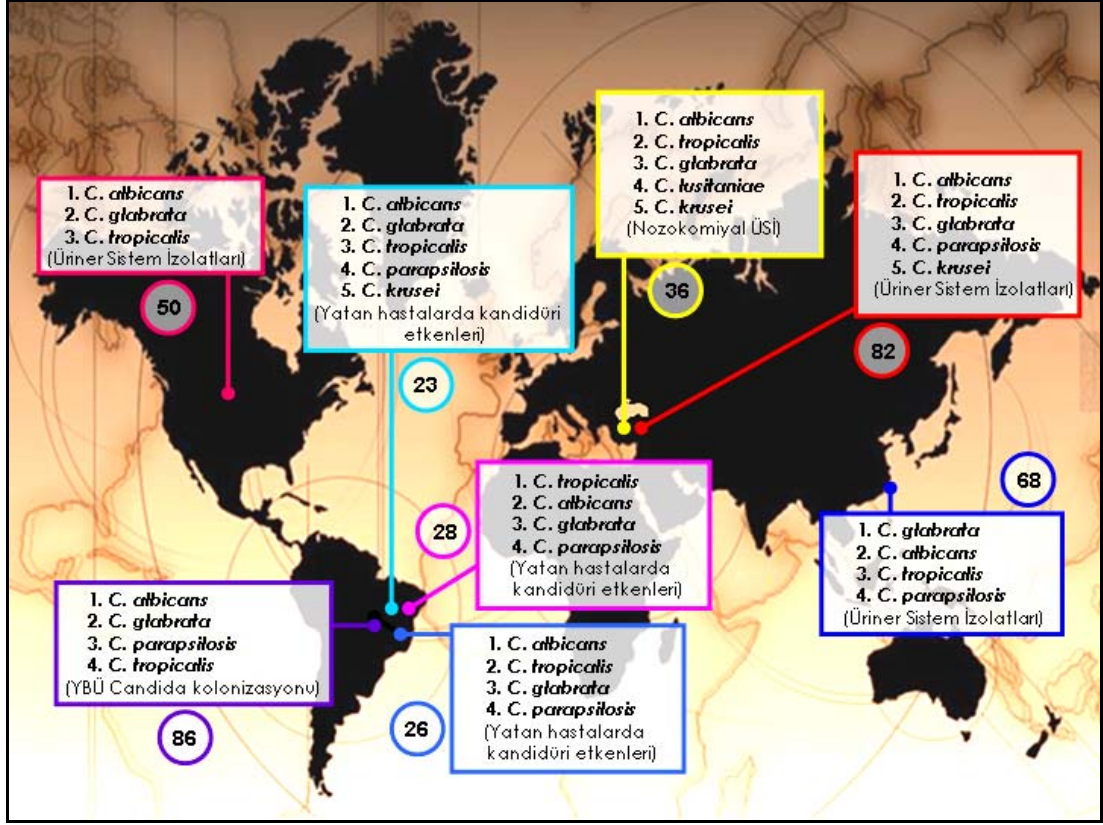
Kontaminasyon

Kandida türleri deride, daha az olmak üzere gastrointestinal ve genital sistemin normal florasında yer alırlar. Özellikle diyabetli hastalarda perianal bölgenin ve mukozaların kolonizasyonu sık görülür. Vulvovaginit ve balanit gibi genital sistem enfeksiyonu varlığında da idrar kontaminasyonu sıktır. Tekrarlanan uygun idrar örneklerinde kandidürinin görülmemesi kontaminasyon kararını verdirebilir. Kontaminasyona bağlı kandidürilerin tedavisi önerilmemektedir (11).

Kolonizasyon

Sağlıklı kişilerde kolonizasyon nadirdir. İdrar sondası bulunan hastalarda, gebelerde, yaşlılarda, DM'ü olan hastalarda, geniş spektrumlu antibiyotik kullananlarda, mesane kateteri olan hastalarda, immünsüpressif tedavi alanlarda, üriner sistem anomalileri ve obstrüksiyonlarında kolonizasyon olasılığının arttığı bildirilmiştir (11).

Diabetes mellituslu kadınlarda vulvestibuler alanda kandida kolonizasyonunu artar. Glukozüri varlığında idrarda fungal üreme daha da artmakta, bozulmuş fagositik aktivite sonucunda mantar invazyonuna karşı konak direnci azalmakta ve nörojen mesane, idrar stazına neden olmaktadır. Ayrıca DM'lu hastaların daha fazla antibiyotik kullandıkları ve daha fazla invaziv girişime maruz kaldıkları bilinmektedir (61).



Şekil 2.2. Çeşitli coğrafik bölgelerde sık görülen kandidüri ve ÜSE etkenleri. (23,26,28,36,50,68,82,86).

Sistit (alt üriner sistem enfeksiyonu)

Kolonizasyon için risk faktörlerini taşıyan hastalarda ateş, dizüri, pollakiüri, idrara sıkışma, lökositoz ile suprapubik hassasiyet gibi yakınma ve fizik muayene bulgularının olması alt üriner sistem kandidozunu düşündürmelidir (11).

Üst üriner sistem enfeksiyonu

Toplayıcı sistem veya üreterin enfeksiyonu olan üst üriner sistemin enfeksiyonları alt üriner sistemden assendan yolla, ya da dissemine enfeksiyonlardan sonra ortaya çıkabilir (11). Assendan yolla oluşan kandida enfeksiyonları hemen her zaman DM veya nefrolitiazisi olan hastada üriner obstrüksiyon ve staz varlığında ortaya çıkar (61).

Renal kandidoz

Renal tutulum parankimal ve/veya dissemine enfeksiyon varlığını gösterir. Dissemine kandidozlu hastaların %80'inde genellikle organizmanın hematogen yayılımı sonucu renal kandidoz gelişir. Geniş spektrumlu

antibiyotik tedavisine rağmen ateşin düşmemesi, nodüler deri lezyonları ve retinal tutulum bulgularının varlığı dissemine kandidozu düşünölmelidir. Bu hastaların çoğunda öüriner sistem semptomları olmaksızın kandidüri vardır. Antifungal tedavi gereklidir (11).

2.3.3. Kandida Pnömonisi

Kandida türleri sıklıkla hastanede yatan hastaların üst solunum yollarında kolonize olarak bulunabileceğı gibi bunların balgam ya da bronko-alveolar lavaj (BAL) kültürlerinden soyutlanabilir. Bu nedenle kandidaların etken olduğı pnömonilerin gerçek insidansını saptamak oldukça zordur. Postmortem çalışmalarda kanserli hastalarda kandida pnömonisi oranının %0,2-0,4 arasında olduğı saptanmıştır (59). Kandida türlerinin akciğere yerleşimi iki mekanizma ile olmaktadır. Primer kandida pnömonisi, üst solunum yollarında kolonize olan kandida türlerinin çoğı kez aspirasyonla akciğere yerleşmesi sonucu meydana gelmektedir. Sekonder kandida pnömonisinde ise invaziv kandidiyaz sırasında mayaların hematojen yayılım sonucunda akciğerin tutulması söz konusudur. Kandida pnömonisi olgularının %40-70'inde *C. albicans* tek başına etkindir, bunu sırasıyla *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* izlemektedir (118).

2.3.4. Deri, Mukoza ve Tırnak Kandidiyazı

Kandida türleri deri, tırnaklar ve mukozalarda enfeksiyonlara yol açarlar. Söz konusu enfeksiyonlar göröldüğü anatomik bölgelere göre; kandida dermatiti, interdigital kandidoz, kandida paronişisi, kandida onikomikozu ve kronik mukokutanöz kandidoz gibi isimler alır. Yüzeyel kandidozlarda etken genellikle endojen kaynaklıdır. Klinikte yüzeyel örneklerden enfeksiyon etkeni olarak en sık *C. albicans* soyutlanmaktadır. *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. krusei* türleri de yüzeyel kandidoz etkenleri olarak saptanabilmektedir (49).

2.3.5. Orofarengeal Kandidiyaz ve Kandida Özefajiti

Normal ağız florasının bir elemanı olan kandida türlerinin enfeksiyon yapması için lokal ve/veya sistemik savunma mekanizmalarında bir bozukluk olması gerekir. Bununla birlikte orofarengeal kandida enfeksiyonları en sık iyatrojenik nedenlere (*geniş spektrumlu antibiyotik ve inhaler kortikosteroid*

kullanımı, kemoterapi vb.) bağılı olarak ortaya çıkmaktadır (14). Orofarengeal kandidiyazisten en sık sorumlu tür *C. albicans*'tır. *Candida dubliniensis* ise HIV (Human Immunodeficiency Virus) ile enfekte hastaların oral kavite lezyonlarından izole edilen önemli diğer bir orofarengeal kandidiyazis etkenidir (76).

Akut HIV enfeksiyonu, H₂ reseptör blokajı yapan ilaçların kullanımı, özefagus motilitesini bozan hastalıklar ve özefagus mukozasında hasara neden olan durumlar özefageal kandidiyaza zemin hazırlar. Özefajit vakalarından en sık izole edilen kandida türü *C. albicans*'tır. Diğer taraftan özellikle antifungal profilaksi uygulanan hastalarda *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* gibi *albicans*-dışı kandida türleri de hastalık yapmaktadır (14).

2.4. Nozokomiyal Enfeksiyonlar

Hastane enfeksiyonları (HE) çağımızın en önemli toplum sağlığı sorunlarından biridir. Hastanelere tedavi için yatan ve iyileşme umudu taşıyan her 100 kişiden 3-10'unda ortaya çıkan HE yüksek morbidite ve mortalite ile seyretmesinin yanı sıra, hastanede kalış süresinin uzaması, ek bakım ve tedavi maliyetleri gibi ağır ekonomik kayıpları da beraberinde getirmektedir (105). Hastane enfeksiyonlarının sözü edilen gerek insan sağlığı, gerekse sosyo-ekonomik yönden bedelleri ağır olan olumsuz etkilerinin önlenmesinde ise hastanelerde etkin enfeksiyon kontrol programlarının uygulanması büyük önem taşımaktadır. Enfeksiyon kontrol programları üç temel öğeden oluşur (25).

1. Düzenli prospektif sürveyans,
2. Hastane enfeksiyonu riskini azaltmaya yönelik düzenlemelerin yapılması, standartların oluşturulması,
3. Hastane personeline sürekli hizmet içi eğitim verilmesi (94)

Enfeksiyon kontrol programının oluşturulması ve sürveyans esas olarak enfeksiyon kontrol doktoru ve enfeksiyon kontrol hemşirelerinden oluşan enfeksiyon kontrol ekibinin işidir (25,94). Hastanelerde enfeksiyon sürveyansının amaçları; enfeksiyon hızının saptanması, sağlık personelinin enfeksiyon kontrol önlemlerine uyumunun sağlanması, salgınların tespit

edilmesi, enfeksiyon kontrol yöntemlerinin etkinliklerinin incelenmesi, hastaneler arasında enfeksiyon oranlarının karşılaştırılması, sağlık hizmetinin kalitesini değerlendiren organizasyonların sürveyans gerekliliği konusunda ikna edilmesi ve sonuç olarak hastane enfeksiyonu oranlarının azaltılması şeklinde özetlenebilir (105).

Sürveyansın temel elemanlarından biri de enfeksiyon kategorilerinin tanımıdır. Zaman içinde toplanan verilerin güvenilirliği ve bunların eski verilerle ya da diğer merkezlerle karşılaştırılması, tanımlar konusunda fikir birliği olmasını gerektirir. Amerika Birleşik Devletleri(ABD)'nde NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance) sistemine katılan hastanelerde uygulanmak üzere 1987 yılında CDC (Centers for Disease Control and Prevention) tarafından bir dizi tanımlar geliştirilmiş ve 1988 yılı Ocak ayından itibaren uygulanmaya başlamıştır. Cerrahi yara enfeksiyonlarının tanımı 1992 yılında gözden geçirilmiş ve yeniden düzenlenmiştir. Son olarak 2002 yılında nozokomiyal pnömoni tanımlarında revizyon yapılmıştır. Bu tanımlar, daha sonra dünyanın her yerinde birçok hastane enfeksiyonu kontrol programına uyarlanmıştır (44,109).

2.4.1. Nozokomiyal Kandida Enfeksiyonları

Nozokomiyal kandida enfeksiyonlarının insidansında son 20 yılda 2-12 kata varan önemli artışlar olduğu bildirilmektedir. Hastane enfeksiyonlarından sorumlu tutulan fungal patojenlerin %80'inden fazlasını *Candida* cinsine ait türler oluşturur. Kandida enfeksiyonlarının tüm HE arasındaki payı ise %5'tir. Kandida türlerinin neden olduğu nozokomiyal enfeksiyonların mortalitesi %30-60 arasında değişkenlik göstermektedir (104).

Geçmişte, ciddi kandida enfeksiyonları için majör risk grubunu nötropenik, transplant alıcısı, sitotoksik ilaç ya da kortikosteroid tedavisi alan hastalar oluşturmaktaydı. Günümüzde yaşam destek sistemlerinin gelişmesi, invaziv girişimlerin yaygınlaşması, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı ve duyarlı yaşlı popülasyonun artışı gibi nedenlerle ciddi kandida enfeksiyonları YBÜ'lerinde daha sık ortaya çıkmaktadır. İnvaziv kandidiyazisli olgularının yarısından fazlasını yoğun bakım hastalarının oluşturduğu bildirilmektedir (2,13,54).

İnvaziv kandidiyaz gelişen hastaların hemen hemen hepsinde zeminde bir veya daha fazla risk faktörünün rol oynadığı görülmektedir (2). “Yoğun Bakım Hastaları” arasında SVK’i olan, parenteral nütrisyon tedavisi uygulanan, cerrahi girişim uygulanan, geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi alan, hemodiyaliz yapılan ve APACHE skoru yüksek olanlar invaziv kandidiyaz yönünden en riskli grubu oluştururlar (54). Diğer önemli bir risk faktörü olarak YBÜ kalış süresi olarak belirlenmiştir, yatış sonrası sekizinci günden itibaren kandida kolonizasyonunda dramatik bir artış olduğu bildirilmektedir (2).

Yapılan genotipleme çalışmalarında ciddi kandidiyaz olgularının çoğunda etkenin endojen kaynaklı olduğu ortaya konulmuş olmakla birlikte ekzojen kaynaklı enfeksiyonlar da bildirilmiştir. Yapılan araştırmalarda ekzojen bulaşın özellikle sağlık çalışanlarının elleri aracılığı ile çapraz kontaminasyon şeklinde olduğu gösterilmiştir (2,22).

2.5. Kandida Enfeksiyonlarına Tanısal Yaklaşım

Kandida enfeksiyonlarının tanısı diğer mikrobiyal enfeksiyonlarda olduğu gibi klinik bulgular ve laboratuvar sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi ile konur. Kandida enfeksiyonlarının tanısında kullanılan başlıca yöntemler (43):

- (i) Klinik örneklerin direkt mikroskopik incelemesi,
- (ii) Kan, vücut sıvıları, dokular ve diğer bölgelerden etken izolasyonu,
- (iii) Tür düzeyinde tanımlama yapılması,
- (iv) Doku örneklerinde kandida ve benzeri etkenlerin saptanması,
- (v) Serolojik yöntemlerle kandida antijen veya antikörlerinin araştırılması,
- (vi) Direkt klinik örnekte veya kültürlerde patojen olduğu düşünülen mayaya ait genetik materyallerin saptanması, şeklinde özetlenebilir.

Tanının ilk aşamasında klinisyenin rolü çok önemlidir. Klinisyen öncelikle enfeksiyonu temsil edecek uygun örneğin alınması konusunda yeterli bilgi ve beceri sahibi olmalıdır. Özellikle bir mantar enfeksiyonundan kuşkulandığını, hasta (ve varsa altta yatan hastalığı) hakkında gerekli bilgiler ile örnek alınan bölgeyi ve alınma zamanını bildirmesi mikrobiyoloji

laboratuvarının uygun inceleme yöntemini seçmesi açısından önemlidir. Ayrıca, örneğin işlenmesi sırasında risk oluşturacak potansiyel bir enfeksiyon varlığında laboratuvarı bilgilendirmek zorundadır (43).

2.5.1. Kandidemi'de Tanı

Kandidemi tanısında "altın standart" yöntem kan kültüründe etkenin soyutlanmasıdır, fakat kan kültürlerinde kandida türlerinin üreme oranı düşüktür. Bununla birlikte liziz santrifüjleme yöntemi gibi mayaların üremesini artıran yöntemlerin kullanılması ile kan kültürü yönteminin duyarlılığı artırılabilir (116). İnvaziv kandidiyaz kuşkusu olan tüm hastalardan kan kültürü alınmalıdır. Örneklerin alınması için hem damar içi kateterler hem de periferik ven kullanılmalıdır. Yaygın kandidozlu nötropenik hastaların ancak % 50-70'inde kan kültürlerinin olumlu olduğu bildirilmiştir (43,96). Bu nedenle kandidemi tanısı için çoğunlukla birden fazla kan örneği alınması gerekli olabilir. Kandida türlerinin soyutlanması amaçlı kan kültür sistemlerinde az sayıda mayayı üretebilecek zengin besiyerleri kullanılmalıdır. Diğer taraftan bu sistemler antimikrobiyal ve/veya fungisidal faktörlerin nötralizasyonu ve kontaminasyonunun en aza indirgenmesi ve mayaların mümkün olan en kısa zamanda saptanmasına olanak sağlayacak özellikleri taşımalıdır (43).

Diğer taraftan kandidemi tanısı için, tutulan organlardan veya deri lezyonlarından alınan biyopsi preparatlarının Gram boyası ile boyanması ve kültüründe kandidaların gösterilmesi ve üretilmesi mümkündür. Özgün antijen-antikor varlığının araştırılması veya moleküler tanı yöntemlerinin kullanılması henüz standardize edilmemiştir (116).

Kandidemilerin saptanmasında arteriyel kanın venöz kandan daha uygun olduğu bildirilmiştir (96). Alınan kan miktarı kandidemi tanısında en kritik faktör olarak kabul edilmektedir. Erişkin hastalardan en az 20-30 ml, yenidoğanlardan ise 1-2 ml kan alınması, üreme olan kültürlerden yapılan pasajların 28-30°C'de inkübe edilerek 1.,2. ve 5. günlerde değerlendirilmesi önerilmektedir (43,96).

Damar içi kateterler, kandideminin en önemli kaynaklarından birini oluşturur (88,113). Damar içi kateter kandidalar için giriş kapısı oluşturabileceği gibi başka bir odaktan, özellikle GİS'den, dolaşıma geçen

kandidaların kolonize olması için uygun bir ortam, hedef oluşturabilirler. Kateterin çekilmesi durumunda hem distal ucundan hem de deri giriş bölgesi kısmından 3-5 cm(santimetre)'lik parçalar kesilerek asepsi kurallarına dikkat edilerek laboratuvara gönderilmelidir (43). Kateter ucu kültürleri yarı kantitatif ve/veya kantitatif olarak besiyerine inoküle edilerek yapılmalıdır. Plak 37°C'de 48 saat süre ile inkübe edildikten sonra üreme yoğunluğu koloni sayımı ile hesaplanmalı ve raporlanmalıdır. Damar içi kateter ucu kültüründe kandida üremesi, üreme yoğunluğundan bağımsız olarak sistemik kandidozun sorgulanmasını gerektiren bir faktör olarak değerlendirilmektedir (43).

2.5.2. Üriner Sistem Kandidozlarında Tanı

Candida cinsine ait türler için üriner sistem kolonizasyonunu enfeksiyondan ayıracak basit bir yöntem bulunmamaktadır. Hastanın risk faktörlerini taşıması ancak semptom ve fizik muayene bulgularının olmaması ve lökositozun bulunmaması alt üriner sistem kolonizasyonunu düşündürür. Kandida nedenli üriner sistem enfeksiyonlarında, bakteriyel olanlardan farklı olarak, piyüri/kandidüri, lökositoz vb. enfeksiyonu düşündüren laboratuvar bulguları açık tanı kriterleri değildir. İdrar sedimentinde psödohipflerin varlığının saptanmasının tanıya katkısının olmadığı gösterilmiştir (11,38). İdrar kültürlerinde üretilen kandidaların koloni sayısının da tanıya katkısı bugün için tartışmalıdır (11). Sonuç olarak idrar yolu kandidozunda kandidürinin tek başına enfeksiyon lehine bir bulgu olarak kabul edilmemesi, dirençli kandidüri saptanması durumunda enfeksiyonu destekleyen laboratuvar bulgularının yetersiz olması nedeniyle tanının klinik, rutin laboratuvar bulguları, mikolojik incelemeler, serolojik, histolojik ve görüntüleme yöntemleri ile birlikte konulması önerilmektedir (11).

2.5.3. Kandida Pnömonilerinde Tanı

Kandida pnömonilerinde tanı oldukça zordur. Balgam ya da BAL sıvısı kültürlerinden kantitatif sayımlarla enfeksiyon tanısı konulan olguların önemli bir bölümünde postmortem doku invazyonuna ilişkin bulgular saptanamamıştır (59). Akciğer dokusunun histolojik olarak incelenmesi kolonizasyonu enfeksiyondan ayırmada en iyi yöntem olarak kabul edilmektedir. Histolojik incelemede tomurcuklanan maya hücreleri veya

psödohifler gibi enfeksiyonun kazanılma yoluna göre farklılık gösteren yapılar saptanabilmektedir (118). Orofarengeal floradaki kandidalar ile kontamine olabileceği için balgam kültürlerinin değerlendirilmesi zordur. Bronkoskopi yolu ile alınan bronş sekresyonlarının kolonizasyon veya enfeksiyonun ortaya çıkarılması açısından daha güvenilir örnekler olduğu bildirilmektedir (43).

2.5.4. Deri ve Mukoza Kandidozlarında Tanı

Deri ve mukoza kandidozlarının tanısı çoğunlukla klinik örneğin mikroskopik incelemesine dayanır. Bu amaçla %10-30'luk potasyum hidroksit (KOH) ile hazırlanan preparatlarda tomurcuklanan blastosporların yanında psödohiflerin görülmesi, tanı için kültürden daha değerli kabul edilmektedir. Direkt incelemede KOH yerine kalkoflor beyazı kullanılmasının duyarlılığı artırdığı bildirilmektedir. Derinin kat yerlerinde *C. albicans*'ın sıklıkla kolonize olması nedeniyle kazıntı örneğinin direkt mikroskopik yöntemle incelemesi ve yoğun blastosporların görülmesi deri kandidozu tanısında kültürden daha değerlidir (43,65).

2.5.5. Orofarengeal Kandidiyaz ve Kandida Özefajitinde Tanı

Orofarengeal kandidiyazda dil ve ağız mukozasında beyaz renkte, kalın plakların oluşması tipiktir. Plaklar kazınınca altından hiperemik, ağrılı ve kanamalı mukoza ortaya çıkar. Histopatolojik olarak plaklar kandida hücreleri, flora bakterileri, nekrotik doku, keratin, epitelyal hücreler ve lökositlerden oluşur. Kesin tanı için, plaklardan kazınarak alınan örneklerin KOH ile direkt veya gram boyama ile incelemesinde psödohif yapmış mayaların görülmesi yeterlidir. Normal florasında yer aldığından ağız kültürlerinde kandidaların üretilmesinin tanısal önemi yoktur. Orofarengeal kandidiyaz tarif edilen bu klasik lezyonlar dışında, dilde atrofi (akut atrofik kandidiyaz), diş etlerinde atrofi (kronik atrofik kandidiyaz), kandida lökoplakisi (kronik hiperplastik kandidiyaz) ve çelitis şeklinde de ortaya çıkabilir (14).

Kandida özefajitinde kesin tanı endoskopik yolla alınan biyopsi ve fırçalama örneklerinde kandida türlerinin gösterilmesiyle konulur. Endoskopide daha çok özefagus alt 1/3 kısmını tutan yaygın, kalın, beyaz eksüdatif plaklar görülmesi tipiktir. Ancak benzer görüntü viral özefajitlerde ve ilaçların neden olduğu özefajit vakalarında da görülmektedir. Özellikle plakla

sağlam dokunun birleşme yerinden alınan biyopsi materyallerinde maya hücrelerinin ve psödohiflerin görülmesi tanı koydurucudur (14).

2.6. Kandida Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı

2.6.1. Fenotipik Yöntemler ile Tür İdentifikasyonu

Kandida türlerinin konvansiyonel identifikasyonu morfolojik ve biyokimyasal özellikleri temel alınarak yapılır (65). Bu amaçla; makroskobik olarak kolonilerin besiyerindeki görünümü ve rengi, mikroskobik olarak hücrelerin morfolojik yapısı, hif ve/veya psödohif oluşumu, germ tüp ve klamidospore oluşturma yeteneği ile biyokimyasal özellikleri incelenir (43).

Germ tüp testi *C. albicans*'ın tanısında hızlı bir testtir ve hem primer hem de saf kültürlerden yapılabilir. Test, *C. albicans* ve *C. dubliniensis* türlerinin %95-97'sinde olumludur (43, 67, 68).

Biyokimyasal testler zor ve zaman alıcı olmakla birlikte bugüne kadar birçok hızlı tanı sistemleri ve bunlara özgül kitler [Rapid Yeast Plus, ID 32C API (Analytical Profile Index), API 20 C AUX vb.] geliştirilmiştir (43).

Kromojenik besiyerleri türe spesifik koloni görünümleri ile hızlı tanıya yardımcı olmakta ve ayırt edici besiyeri olarak rutin mikoloji laboratuvarlarında kullanılmaktadır. CHROMagar-*Candida* (CAC) hazır besiyeri özellikle *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* için tasarlanmıştır. Diğer taraftan CAC besiyerinde *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* türlerinin kolaylıkla soyutlanabildiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (12,46,51,79,81, 89,110).

Pirinç unu (rice meal) veya mısır unu (corn meal) agarda *C. albicans* ve *C. dubliniensis* kökenlerinde klamidospore oluşumu görülür. Bu besiyerlerinden *C. albicans* ve *C. dubliniensis*'in identifikasyonlarında bir ön basamak olarak yararlanılmaktadır. Aynı şekilde mısır unu agarda psödohif ve/veya hif oluşumu kandida türlerinin birbirinden ayrılması amacı ile kullanılmaktadır (12,43,51,66).

Histopatolojik incelemelerde kandida türleri doku kesitlerinde maya hücreleri ve psödohifler ya da sadece maya hücreleri şeklinde görülürler. *Candida albicans* diğer mayalardan, hif ve/veya psödohiflerin görülmesi ile

ayrılır. Maya hücreleri, tomurcuklanma gösteren, yuvarlak veya oval, 4-8 µm boyutunda hücreler olarak görülürler. *Candida glabrata* ise genellikle daha küçük (2-5 µm), oval hücreler şeklindedir ve hifler görülmez (43).

Tüm bu yöntemlerin dışında 42 ve 45°C'de üreme, çeşitli kimyasallara duyarlılığın araştırılması, elektron mikroskobu ile inceleme, çeşitli besiyerlerindeki koloni görünümüleri gibi birçok yöntem tür identifikasyonu amaçlı kullanılmaktadır (12,33,51,92,107).

2.6.2. Kandida Enfeksiyonlarının Tanısında Serolojik yöntemler

Histopatolojik boyama ve kültür yöntemlerinin yanında daha hızlı sonuç veren serolojik testler sağaltıma yanıtın değerlendirilmesinde ve hastalığın prognozunun takibinde kullanılabilir. Serolojik testlerde fungal antijenlere karşı oluşan özgül antikorların araştırılması ya da mantar antijenlerinin ve metabolik ürünlerin ortaya konması amaçlanır (53).

A. Antikor Saptanmasına Yönelik Testler

Kandida türlerine karşı oluşan antikorlar, tüm hücre aglütinasyonu, lateks aglütinasyon (LA), indirekt immünfloresans, radyoimmünoassay (RIA) ve enzim immünoassay (EIA) yöntemleri ile araştırılabilir (12,51). Ancak immün sistemi baskılanmış kişilerde antikor oluşmaması, pozitif antikor varlığının kolonizasyon ve enfeksiyonu ayıramaması, nötralizan antikorların bulunabilmesi, mannan antikorunun dalak ve karaciğer tarafından hızla kandan uzaklaştırılması nedenleriyle antikor aranmasının tanısız olarak duyarlılığı düşüktür (53).

Üzerinde en çok çalışılan antijen olan mannan kan dolaşımına geçtiğinde güçlü bir anti-mannan antikor yanıtı oluşturur. Anti-mannan antikorlar kolonizasyon ve klinik kandidozu ayıramaz. İmmün sistemi baskılanmış hastalardan elde edilen yalancı negatiflik duyarlılığı azaltırken, kolonizasyon nedeni ile elde edilen yalancı pozitif değerler ise özgüllüğü düşürmektedir. Anti-mannan antikorlar, mannan antijen tarama testi ile birlikte uygulandığında özgüllüğün %93, duyarlılığın %80'e yükseldiği bildirilmiştir (53,69).

B. Antijen Saptanmasına Yönelik Testler

İnvaziv kandidozda tanı göstergesi olan antijenler; ısıya duyarlı antijen, mannan ve enolazdır. Mannan, kandida hücre duvarının polisakkarit yapısındaki komponenti olup, antimannan antikörlara bağlandığında serumda kısa bir süre gösterilebilir düzeylerde kalır. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) mannan testi duyarlılığı değişken (%23-100) olup özgülüğü %92-100 arasındadır. Isıya duyarlı antijen testi için 56°C'de ısıya duyarlı *C. albicans* antijeni kullanılır. Lateks partikülleri ve *C. albicans* blastokonidyası ile immünize edilmiş tavşandan alınan poliklonal serumdan oluşur ve duyarlılığı %6-71 arasındadır. Son zamanlarda sitoplazmik bir protein olan enolaz, immünolojik olarak uygun bir antijen olarak değerlendirilmektedir. Enolaz derin organ invazyonu olan ancak fungemisi olmayan hastalarda değerlidir (53).

C. Kandida Metabolitlerinin Gösterilmesi

Kandida metabolitlerinin araştırılmasının invaziv kandidoz için potansiyel bir tanı yöntemi olabileceği bildirilmektedir (12,51). D-arabinitol serumda dolaşan ve idrarda toplanan bir metabolittir. Gaz likit kromatografi yöntemi ile tespit edilebilir. Serumda arabinitol varlığının gösterilmesi kandidemi tanısına yardımcı olabilir. *Candida krusei* ve *C. glabrata* tarafından üretilmez. D-arabinitol/kreatinin oranı kandidozlu olguların 2/3'ünde yükselir (51). Bununla birlikte serumda arabinitol düzeylerinin belirlenmesinin duyarlılığı %50'dir (12). Ayrıca testin özgülük ve duyarlılığı kullanılan yöntemle göre çok değişkenlik gösterdiğinden metabolitlerin saptanmasının tanısallık güvenilirliği şimdilik belirgin değildir (53).

2.6.3. Genotipik Tanı ve İdentifikasyon Yöntemleri

Tanısal mikrobiyolojide amplifikasyon temeline dayalı yöntemlerle hasta örneklerinde aranan patojene ait az sayıdaki hücrenin kısa sürede (saatler içerisinde) saptanması mümkün olabilmektedir (98).

İnvaziv fungal enfeksiyonların erken döneminde doğru ilaç, doğru dozaj ve doğru sürede antifungal tedavi verilmesi ile mortalite ve morbiditenin doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (39,85,116). Tedavinin doğru planlanabilmesinde etkenin tür düzeyinde hızlı tanısı önemlidir (54,75). Bu

nedenle, diğer yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda kandida enfeksiyonlarının tanısında moleküler yöntemlerin kullanılması büyük önem taşımaktadır (64).

Mikolojide moleküler tanı yöntemleri genellikle; hasta örneğinde etkenin varlığını saptama ve/veya tanımlama çalışmalarında, kültür izolatının tür düzeyinde tanımlanmasında, epidemiyolojik amaçlı kaynak araştırma, izolatlar arasındaki genotipik farklılıkların ortaya konması, antifungal direncin belirlenmesi, mutasyon analizleri ile filogenetik (taksonomik) incelemelerde kullanılmaktadır (98).

Mikolojik amaçlar için kullanılan moleküler tanı yöntemleri şu ana başlıklar altında toplanabilir (64);

1. Prob hibridizasyonuna dayalı yöntemler.
2. Genomik DNA (deoksiribonükleik asit) kompozisyon farklılığına dayanan yöntemler;
 - PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)'ye dayalı tiplendirme yöntemleri; Karyotipleme ve RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism),
 - SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism),
 - Heterodupleks analizi.
3. Hedef amplifikasyonuna dayalı yöntemler;
 - PCR(Polymerase Chain Reaction), nested-PCR, Multipleks PCR, Reversed transcription-PCR, Real Time PCR, PCR-RFLP, PCR-EIA, PCR-dizi analizi,
 - RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA),
 - MLST (Multi Locus Sequence Typing),
 - NASBA (Nucleic Acid Sequence -Based Amplification).

Moleküler biyolojik yöntemlerden tanı amacıyla en çok kullanılan yöntem PCR'dir (12,64). Bu yöntemde kandida türlerinin tanısında hedef olarak aktin geni, kitin sentaz geni, aspartil proteinaz genleri, p450 geni, ITS (Internal Transcribed Spacer) ve rRNA (ribozomal ribonükleik asit) gen bölgeleri kullanılmaktadır (19,37,64,98). Bu yöntemde doğrudan klinik örnek işleme alınabileceği gibi, etkenin kültürden soyutlandığı ancak tanımlamanın

doğrulanmasının gerektiği durumlarda, türe özgül primerler kullanılarak veya dizileme yapılarak tanıya gidilebilmektedir (63,64).

Kandida enfeksiyonlarının genetik ve moleküler tanısı ya doğrudan hasta örneğinden ya da kültür ortamından gerçekleştirilebilmektedir (37,75, 76). Çoklukla başvuru moleküler yöntem, genellikle cins düzeyinde nadiren de daha geniş bir filogenetik yelpazede genomik olarak korunmuş gen bölgelerinin bir çift spesifik primer kullanılarak ön amplifikasyonu ile başlar. Böylece ilk basamakta hastanın bir fungus ile enfekte olup olmadığı saptanmış olur. İkinci basamakta ise, ikinci bir moleküler ve genetik yöntem uygulamaya sokularak tür düzeyinde tanımlamaya gidilir. Ön amplifikasyon amacıyla genellikle genom içerisinde kopya sayısının çok olması nedeniyle rDNA (40-80 kopya) ile kopya sayısı rDNA genlerinden daha az olan mitokondriyal DNA (yaklaşık 30 kopya) genleri tercih edilir. Bu bölgeler aynı zamanda mutasyona karşı da korunmuş bölgelerdir. Diğer taraftan rDNA genlerinin korunmuş olması ve türler arasında yeterince farklılık göstermemeleri nedeni ile identifikasyon çalışmaları için uygun olmadığı bildirilmektedir (37,98). Bu nedenle identifikasyon amacıyla ribozomal alt birimleri kodlayan gen bölgelerinin arasına giren ve bir proteini kodlamayan ITS bölgeleri kullanılmaktadır. ITS gen bölgeleri mutasyona açık bölgelerdir. Ön amplifikasyon tekniği olarak PCR dışında NASBA gibi izotermal bir yöntem de kullanılabilir (115). Ön amplifikasyon işlemi ile elde edilen amplicon uygulanabilecek yöntemler ise oldukça çeşitlidir (37,75,76,98). Söz konusu yöntemler içinde en basit olanı cins düzeyinde seçilen bir çift primer ile gerçekleştirilen ön amplifikasyon sonrası tür düzeyinde seçilen ikinci bir primer çifti ile nested PCR yöntemi uygulanmasıdır (20). Bu şekilde hem duyarlılık hem de özgüllük artırılmış olmaktadır. Bazı araştırmacılar (47) elde edilen ön amplifikasyon ürününün baz dizilimini çıkardıktan sonra kıyaslayarak veya dizi analizi yapmaksızın baz dizilim farklılıklarını SSCP tekniği ile kıyaslayarak türler arasındaki farklılıkları saptayabildiklerini bildirmektedirler. Yine spesifik bir gen ön amplifikasyonu sonrasında elde edilen ampliconun RFLP (80) veya RAPD (74) paternlerine bakılarak tür düzeyinde tanımlama yapılabileceğini gösteren çalışmalar da vardır. Bugün

için PCR amplifikasyonu sonrasında uygulanan ikincil moleküler ve genetik yöntemler arasında en geniş identifikasyon paneline sahip olan yöntem olarak prob hibridizasyonu tekniği görülmektedir (35). Yöntemin esası ön amplifikasyon ürününün, tanımlanması amaçlanan türlere spesifik proplar ile hibridize edilmesine dayanır. Ancak yöntemle tanımlanabilen tür sayısı, tasarlanmış olan türe spesifik prob sayısı ile sınırlı kalmaktadır. Ayrıca, değişik türlerde farklı büyüklüklerde amplifikasyon ürünleri oluşmasını sağlayan birden fazla primer çiftinin birlikte kullanıldığı "multipleks PCR" yöntemi ile aynı anda birden çok sayıda tür tanımlanabilmektedir (98).

2.6.4 Antifungal Duyarlılık Testleri

Enfeksiyonlarda etken olarak saptanan mantarların antifungal ilaçlara duyarlılıklarını belirlemek amacıyla standart yöntemlerin geliştirilmesi, mikoloji alanındaki önemli ilerlemelerden biri olmuştur (10). Günümüzde geçerliliği olan referans yöntemler, CLSI ("Clinical and Laboratory Standards Institute") tarafından maya (CLSI, M27-A2) ve küfler (CLSI, M38-A) için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemi, CLSI tarafından *Candida* cinsinde yer alan mayalar (flukonazol, vorikonazol) için geliştirilen disk difüzyon yöntemi ile EUCAST ("*European Confederation of Antifungal Susceptibility Testing*") tarafından CLSI yöntemi modifiye edilerek mayalar için geliştirilen mikrodilüsyon yöntemidir (EUCAST E.Dis 7.1) (10, 34).

III-GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışma, 01.05.2007 tarihinden 31.12.2007 tarihine kadar geçen 8 aylık süre içerisinde GATA (Gülhane Askeri Tıp Akademisi) Haydarpaşa Eğitim Hastanesi'nde çeşitli kliniklerde yatarak tedavi gören, enfeksiyon olasılığı nedeniyle muhtelif örneklemeleri yapılan ve kültürlerinde kandida türleri izole edilen 33'ü erkek, 27'si kadın toplam 60 hastayı kapsamaktadır.

Çalışmada, klinik örneklerinden kandida izole edilen hastalar takibe alınırken her yeni üreme ayrıca değerlendirildi. Hastaların tekrarlı benzer örneklerinden aynı kandida türleri izole edildiğinde değerlendirilmeye sadece biri alındı. Üreme saptanan hastalar hastane enfeksiyonu yönünden CDC tarafından tanımlanan kriterlere göre (44) değerlendirildi.

Çalışmamızda standart suş olarak *Candida albicans* ATCC (American Type Culture Collection) 14053, *Candida parapsilosis* ATCC 90018 ve *Candida dubliniensis* CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) 7987 ile çalışıldı.

3.2. Hastane Enfeksiyonlarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda takip ettiğimiz hastaları CDC kriterleri ve National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System tanımlamalarına göre gruplandırdık. CDC tarafından ortaya konan tanımlamalar, bir enfeksiyonun var olup olmadığını belirlemek veya saptanan enfeksiyonu sınıflandırmak için kullanılmaktadır. NNIS'de enfeksiyon bölgelerini tanımlarken iki terim kullanılır: Majör enfeksiyon bölgeleri ve spesifik enfeksiyon bölgeleri. Buna göre 13 majör enfeksiyon bölgesi ve 49 spesifik enfeksiyon bölgesi tanımlanmıştır (44). Bu tanımlar günümüzde dünyanın birçok yerinde hastane enfeksiyonu kontrol programlarına uyarlanmıştır (109).

Çalışmamızda enfeksiyon surveyansı sırasında, CDC kriterlerine göre enfeksiyon bölgelerine spesifik formlar oluşturuldu. Hastalara ait bilgiler hasta dosyaları, hemşire gözlem formları ve bilgisayar kayıtlarından prospektif olarak elde edilip bu formlara işlendi ve tanımlamalar yapıldı.

3.3. Suşların İzolasyonu ve Stoklanması

Uygun koşullarda alınıp Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Servis Laboratuvarı'na transportu sağlanan klinik örnekler, %5 koyun kanlı agar (KKA) ve Eozin metilen-blue agar besiyerlerine ekildikten sonra uygun ortamlarda 24-72 saatlik süre ile kültür takibine alınarak üremeler değerlendirildi. Kültür için gönderilen materyallerin direkt mikroskopik incelemelerinde veya kültür plaklarındaki şüpheli kolonilerden yapılan gram boyamalarda maya hücreleri görüldüğünde identifikasyona yardımcı olması amacıyla Sabouraud dekstroz agar (SDA) ve CHROMagar *Candida* (CAC) besiyerlerine pasajlar yapıldı. Kan örneklerinden izolasyon BACTEC kan kültür sistemiyle sağlandı. Üreme sinyali veren cihazdaki kan kültür şişelerinden yapılan örneklemede mikroskopik değerlendirme sonrası maya hücresi görülenlerin bahsedilen besiyerlerine subkültürleri yapıldı. İzolatların tümü tek koloni kültürü ile saflaştırılarak % 15 gliserinli buyyon içeren ependorf tüplerinde -80°C'de saklandı. Çalışma öncesi bu stoklardan SDA besiyerlerine pasajlar yapılarak suşlar canlandırıldı ve test prosedürleri uygulandı.

3.4. Kullanılan Besiyerleri

3.4.1. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA, % 4 glukozlu) (Merk)

Besiyeri içeriği: D+ Glukoz 40 gr/l (gram/litre), Pepton 10 gr/l, Agar-agar 15 gr/l. Toz halindeki besiyeri karışımının 65 gramı 1000 ml distile su içerisinde eritildi ve otoklavda 121°C 15 dakika sterilize edilip, steril cam petri plaklarına 4-6 mm (milimetre) kalınlığında döküldü.

3.4.2. Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) (Merk)

Besiyeri içeriği: D+ Glukoz 20 gr/l, Pepton (meat) 5 gr/l, Pepton (kazein) 5 gr/l. Toz halindeki besiyeri karışımının 30 gramı 1000 ml distile su içerisinde eritildi ve cam tüplere beşer ml dağıtıldı. Cam tüpler içindeki besiyerleri otoklavda 121°C'de 15 dakika tutularak sterilize edildi.

3.4.3. Kromojenik besiyeri, CHROMagar *Candida* (BBL-BD, Fransa).

Besiyeri içeriği: Kromopepton 10 gr/l, Glukoz 20 gr/l, Kromojen Miks

2 gr/l, Kloramfenikol 0,5 gr/l, Agar 15 gr/l. 90 mm'lik petrielerde hazırlanmış (ticari) besiyerleri kullanıldı.

3.4.4. Mısır Unu Tween 80 Agar (Corn Meal Agar) (Oxoid)

Besiyeri içeriği: Mısır unu ekstraktı (Corn meal extract) 2 gr/l, Agar 15 gr/l, Tween 80 ~10 ml/l, Distile su 1000 ml. Toz halindeki besiyeri karışımının 17 gramı 1000 ml distile su içerisinde eritildi ve 10 ml Tween 80 eklendi. Son karışım otoklavda 121°C 15 dakika sterilize edilip, steril cam petri plaklarına 4-6 mm kalınlığında döküldü.

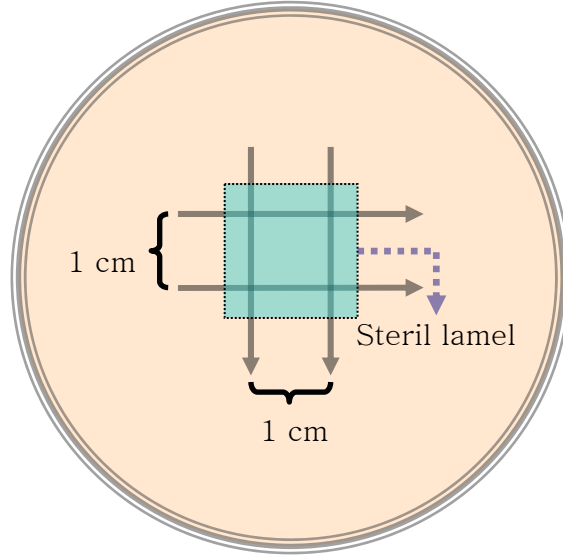
3.5. Fenotipik Yöntemler

3.5.1. Germ Tüp Testi

SDA besiyerlerindeki saf kolonilerden küçük bir parça alınıp 0,5 ml insan plazması veya serumu içeren tüpler içerisine süspanse edildi. Karışım 35°C'de 2 saat inkübe edildikten sonra lam-lamel arası preparat hazırlanıp ışık mikroskopunda x400 büyütmede incelendi. Blastosporlardan köken alan, başlangıç noktasında hiç daralma olmayan, maya hücresinin yarısı genişliğinde ve 3-4 katı uzunluğunda olan filament şeklindeki yapılar germ tüp olarak değerlendirildi. Mikroskopik incelemede germ tüpe benzeyen, ancak ana hücreden boğumlanarak dışa doğru uzama gösteren, hifal yapıların duvarlarının birbirine paralellik göstermediği yapılar da yalancı germ tüp olarak yorumlandı. Çalışmada pozitif kontrol olarak *Candida albicans* ATCC 14053, ve *Candida dubliniensis* CBS 7987 ile kullanılırken negatif kontrol olarak *Candida parapsilosis* ATCC 90018 kullanıldı.

3.5.2. Klamidospor Oluşturma

MU-Tw80 agar besiyerine yaklaşık 1 cm aralıklı 3-4 cm uzunluğunda paralel çizgiler şeklinde ekimler yapıldı ve üzeri steril bir lamel ile kaplandı (Şekil 3.1). Plaklar 27°C'de inkübasyona bırakıldı. Üremeler 48-72 saat sonunda klamidospor, hif ve yalancı hif oluşturma özellikleri yönünden değerlendirildi. Klamidospor oluşturanlar *C. albicans* veya *C. dubliniensis* olarak değerlendirildi. Klamidospor veya hifal yapıların gözlenmediği suşlar *C. glabrata* olarak değerlendirildi.



Şekil 3.1. Suşların MU-Tw80 agar besiyerine pasajlanması.

3.5.3. CAC Besiyerinde Renk Değişimi ve Koloni Morfolojisi

Birden fazla kandida türünün etken olduğu enfeksiyonların tanımlanması amacıyla ilk izolasyon besiyerlerinden CAC besiyerine karışık pasajlar yapıldı ve üretilen mayaların saf koloni pasajları alındı ve stoklandı. Daha sonra SDA besiyerinde bir gece inkübe edilip canlandırılan maya suşlarının her birinden steril 2ml serum fizyolojik içeren cam tüplerin içinde 0,5 McFarland'a eşdeğer oranda maya süspansiyonları hazırlandı. Tüm suşlar CAC besiyerine ekilerek etüvde 37°C'de, aerobik ortamda, inkübasyona bırakıldı. CAC besiyerinde üreyen maya kolonileri 7 gün süreyle, oda ısısında ve ışıktan korunarak muhafaza edildi ve renk, genişlik, koloni çevresindeki renk difüzyonu, gibi özellikleri izlenerek kaydedildi. Birinci, ikinci ve üçüncü günlerde ve 1 hafta sonunda örneklerin fotoğrafları çekildi. CAC besiyerindeki renk değişimleri referans suşlarla karşılaştırıldı. Referans suş olarak *C. albicans* ATCC 14053, *C. parapsilosis* ATCC 90018 ve *C. dubliniensis* CBS 7987 kullanıldı. Ek olarak laboratuvarımızda standart yöntemlerle identifiye edilen bir *C. krusei* suşu kullanıldı.

Açık parlak yeşil renkli koloniler *C. albicans*, koyu mat yeşil renkli koloniler *C. dubliniensis*, çelik mavi koloniler *C. tropicalis*, yassı, kenarları beyazlaşmış toz pembe renkte ve tüylü görümlü koloniler *C. krusei*, parlak

pembe-mor koloniler *C. glabrata* ve parlak beyaz-pembe renkli koloniler *C. parapsilosis* (yüksek olasılıklı) veya diğer kandida türleri olarak tanımlandı (46,81).

3.5.4. ID 32C API ile Biyokimyasal Özelliklerin Test Edilmesi

Hızlı identifikasyon için, çalışılan mayanın tür spesifik karbonhidrat asimilasyon özellikleri için ID 32C API (BioMerieux, Fransa) test kiti kullanıldı. ID 32C stribi her biri dehidrate karbonhidrat substratı içeren 31 küpülden ve karbonhidrat içermeyen bir negatif kontrol küpülünden oluşur. Test edilen karbonhidratlar; D-Galaktoz, Siklohegzimit, D-Sakkaroz (sukroz), N-Asetil-Glukozamin, Laktik asit, L-Arabinoz, D-Selobiyoz, D-Rafinoz, D-Maltoz, D-Trehaloz, Potasyum 2-Ketoglukonat, Metil-alfa-D-Glukopiranozit, D-Mannitol, D-Laktoz, İnositol, D-Sorbitol, D-Ksiloz, D-Riboz, Gliserol, L-Ramnoz, Palatinoz, Eritritol, D-Melibiyoz, Sodyum Glukuronat, D-Melezitoz, Potasyum Glukonat, Levulinik asit, D-Glukoz, L-Sorboz, Glukozamin ve Eskülin ferrik sitrat'tır.

Testin uygulanması:

1. Test işlemi için 24-48 saatlik taze ve saf kültür kullanımı önerilmektedir.

2. API süspansiyon medyumunu (2 ml) içerisine veya katkı maddesi içermeyen 2 ml hacminde hazırlanmış steril distile su içeren bir tüpe öze yardımıyla kültür ortamından bir ya da birkaç koloni aktarılır. 2 McFarland'a eşdeğer süspansiyon elde edilir.

3. API C medyum ampülü açılır ve içine daha önce hazırlanan süspansiyondan 250 µl (mikrolitre) eklenir. Bu son karışım hazırlandıktan hemen sonra kullanılmalıdır.

4. API C medyum ampülü homojenize edilir. Süspansiyondan her küpül içerisine otomatik pipet ile 135 µl eklenir ve stribin kapağı üzerine yerleştirilir.

5. Strip 29°C ± 2°C'de 24-48 saat inkübe edilir. Bazı ventile inkübatörler küpüllerin içindeki medyumun dehidratasyonuna neden olmaktadır. Bu durumda, strip bir kap içinde az miktarda su içeren kapalı

bir kutuya yerleştirilir. Böylelikle nemli bir atmosfer elde edilir ve testlerin kuruması önlenir.

6. Değerlendirme **mini API** cihazında otomatik olarak yapıldı. Okuyucu her kúpülün saptanabilir üremesini araştırır ve bilgileri bilgisayara aktarır ve bilgisayara gönderilen sonuçlar tanımlama yazılımı ile açıklanır. Görsel okuma ile sonuçlar doğrulandı. Her kúpül negatif kontrol (0) ile karşılaştırıldı ve daha bulanık ise pozitif olarak değerlendirildi. Test sonuçları 24.,48. ve 72. saatlerde değerlendirilip sonuçlar karşılaştırıldı.

3.5.5. Yüksek Isıda Üreme Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Germ tüp oluşturan kandida türlerini tür düzeyinde tanımlamak amacıyla (*C. albicans* ve *C. dubliniensis* şeklinde) saf kültürlerden SDA besiyerlerine pasajlar alındı ve besiyeri plakları 45°C'ye ayarlanmış olan etüve alındı. Üremeler 24., 48. ve 72. saatlerde değerlendirildi. Standart suş olarak kullanılan *C. dubliniensis* plağında üreme görülmedi. Üreme olan diğer plaklar *C. albicans* olarak değerlendirildi.

3.6. Genotipik Yöntemler

3.6.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

Bu amaçla çalışmada kullanılan, ticari olarak kullanıma hazır veya laboratuvarında hazırlanan muhtelif sarf malzemeleri ile cihaz ve ekipmanlar aşağıda belirtilmiştir.

- **PCR (Polymerase Chain Reaction) ve sarf malzemeleri:**

Taq polimeraz enzimi, (Fermentas®, Litvanya),

Proteinaz K, mililitrede 800 U/ml (Ünite/ mililitre), 18 mg/ml (miligram/ml), (Fermentas®, Litvanya),

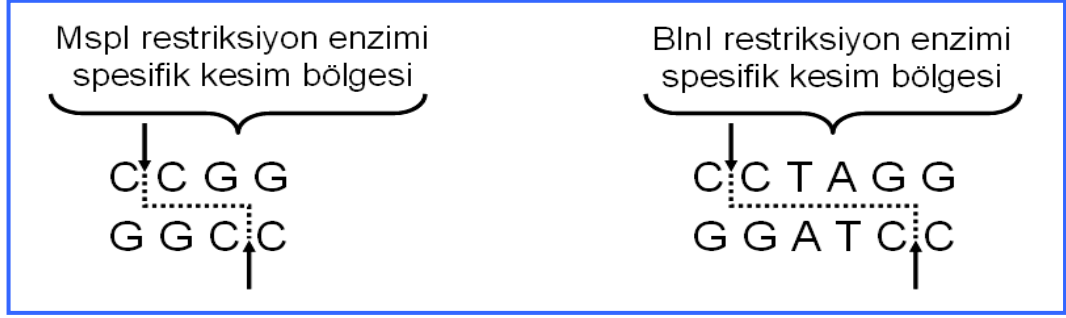
PCR buffer, 10x, (Fermentas®, Litvanya),

MgCl₂ çözeltisi, 25mM (mili molar), (Fermentas®, Litvanya),

dNTP (deoksi ribonükleotid trifosfat) miks, 10mM, (Fermentas®, Litvanya),

Msp I restriksiyon enzimi, (SibEnzyme®, Novosibirsk, Rusya),

Bln I (Avr II) restriksiyon enzimi, (Roche Diagnostics®, Mannheim, Almanya),



Şekil 3.2. *Msp* I ve *Bln* I enzimlerinin DNA üzerindeki hedef bölgeleri.

Muhtelif pipet uçları, 10µl, 200 µl, 1000 µl (Hamilton®, ABD)

Ependorf tüpleri, 0,2 ml, 1,5 ml (BioRad®, İtalya)

PCR pleyt, 0,2 ml, 96 kuyucuk (BioRad®, İtalya)

- **PCR primerleri,** (Iontek®, Türkiye)

ITS1 (ileri) 5`-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3`

ITS3 (ileri) 5`-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3`

ITS4 (ters) 5`-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3`

- **Boya ve çözeltiler**

Tris Acetate EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetikasit) **buffer (TAE), 10X:** 0,4 M (molar) Tris Acetate, 0,01 M EDTA (Sigma®, Almanya)

Tris Acetate EDTA buffer (TAE), 1X: Bir hacim 10X TAE Buffer solüsyonu 9 hacim steril distile su içerisinde sulandırılarak hazırlandı.

10X TNE (Tris NaCl EDTA) **Buffer** (100 mM Tris, 2,0 M NaCl; 10 mM EDTA; pH 7,4) şeklinde stok solüsyon hazırlandı ve sulandırılarak (1X) kullanıldı.

Agaroz base, (Basıca Le Agarose, Prona®, EU): Agaroz jel hazırlamada kullanıldı.

Etidyum bromid (Amresco®, ABD): DNA bantlarının görüntülenmesi amacıyla 10mg/ml'lik etidyum bromid, final konsantrasyon 5µg/ml olacak şekilde agaroz jele ilave edildi.

Loading dye solution, 6X, (Fermentas®, Litvanya): PCR ürünlerinin elektroforez jeline yüklenmesinde kullanıldı.

DNA ladder, (Fermentas®, Litvanya): DNA bantlarının büyüklüklerinin belirlenmesinde 100 bp'lik DNA büyüklük marker'ı olarak kullanıldı.

- **Cihaz ve ekipmanlar**

DNA jel elektroforez cihazı, (BioRad®, İtalya),

Elektroforez güç kaynağı, (BioRad®, İtalya),

Dijital fotoğraf makinesi, (Orite, VC-3010Z, Digital Camera),

Thermal cyclers, (Icycler-BioRad®, İtalya),

UV (ultraviolet) -Transilluminatör, (BioRad 2000®, İtalya),

Vorteks, mini santrifüj cihazı (Microspin FV-2400, Biosan, Litvanya),

Soğutmalı santrifüj, (Eppendorf 5417 R®, Almanya),

Derin dondurucu, -20°C, (Uğur®, Türkiye),

Derin dondurucu, -80°C, (Electrolux®, Lüksemburg),

Mikrodalga fırın, (Arçelik®, Türkiye),

Vorteks, (Nüve®, Türkiye),

Biyoenmniyet kabini, (HERA Safe®, Almanya),

Isı bloğu, (TDB 120, Biosan),

Mini API cihazı, (BioMerieux, France),

3.6.2. DNA Ekstraksiyonu

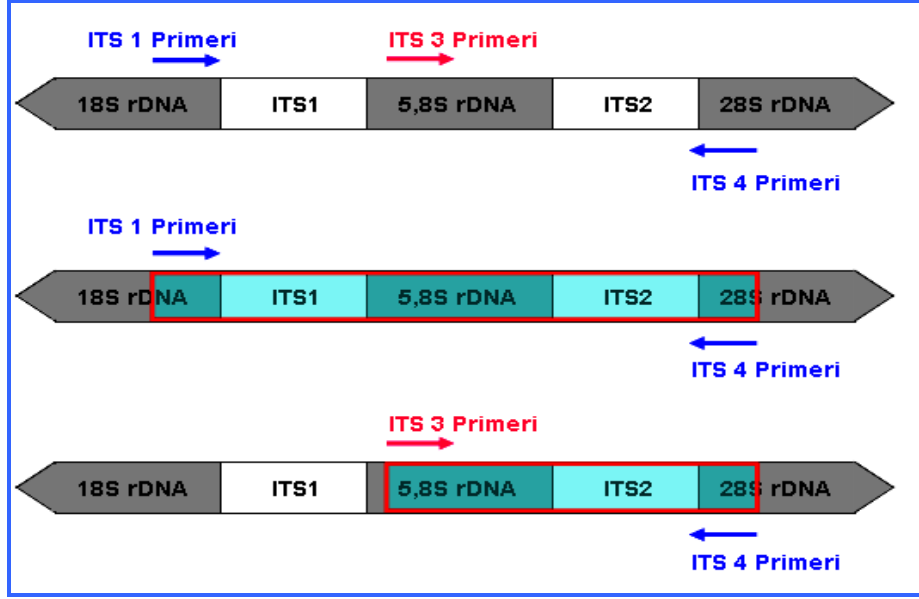
Kandida türlerinin hızlı tanı ve identifikasyonu için PCR bazlı birçok yöntem tanımlanmıştır. Bu çalışmadaki moleküler yöntemlerde kullanılacak DNA'lar aşağıda tanımlanan ekstraksiyon metodu uygulanarak elde edildi.

İlk olarak SDA besiyerine pasajlanmış maya kolonilerinden bir öze dolusu alınarak cam tüp içindeki SDB besiyerine inoküle edildi. SDB besiyeri 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda cam tüpler vortekslendi ve otomatik pipet yardımıyla sıvı besiyerinden 1ml alınarak ependorf tüplerine aktarıldı. Ependorf tüpleri 3000 g'de (RCF; Relative Centrifugal Force) 3 dakika santrifüje edildi. Santrifüj işlemi sonrası üstte kalan kısım döküldü ve dipte kalan pelet üzerine 1 ml Tris EDTA (TE) buffer eklendi. Tüpler tekrar 3000 g'de 3 dakika santrifüje edildi. TE buffer ile yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra pelet üzerine 375 µl TNE (Tris, Sodyum klorür ve EDTA) buffer, 20 µl SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) buffer solüsyonu ve 5 µl proteinaz K'dan oluşan 400 µl'lik karışım eklendi. Karışım kısa süre vortekslendikten sonra ependorf tüpleri ısı bloğunda

56°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kısa bir santrifüj işlemini takiben karışım üzerine örnek miktarı kadar (400 µl) fenol eklendi. Son karışım birkaç kez el ile ters-düz edilerek 11600 g'de 10 dakika santrifüje edildi. Santrifüj işlemi sonunda ependorf tüpündeki karışım üst tabakada nükleik asitler, orta tabakada proteinler ve alt tabakada karbonhidratlar, lipitler ve diğer moleküller olmak üzere 3 tabakaya ayrıldı. Otomatik pipetle orta tabakaya dokunmadan 250-300 µl alınarak yeni bir ependorf tüpüne aktarıldı. Yeni ependorf tüpüne aynı miktar (250-300 µl) kloroform/ izoamil alkol (sırasıyla 24/1 oranında) solüsyonu eklendi ve el ile 4-6 defa ters-düz edildi. Karışım 11600 g'de 10 dakika santrifüje edilerek yine 3 faz oluşturuldu. Bu kez ortadaki tabakanın daha ince olduğu gözlemlendi. Üstteki fazdan 200-250 µl alınarak yeni ependorf tüpüne aktarıldı. Ependorf tüpündeki karışım üzerine 1/10'u kadar (20-25 µl) %0,85'lik NaCl ve 2,5 katı kadar (500-625 µl) %95'lik etanol eklendi. Son karışım -20°C'de 1-18 saat bekletildi. Süre sonunda derin dondurucudan çıkarılan karışım beklemeden 11600 g'de 10 dakika santrifüje edilerek üst kısım döküldü. Pelet üzerine 500 µl %70'lik etanol eklenip 11600 g'de 5 dakika santrifüje edildi. Santrifüj sonrası üst kısım dökülerek ependorf tüpü ısı bloğunda 37°C'de (yaklaşık 1 saat) kurumaya bırakıldı. Son olarak kurduğundan emin olduğumuz nükleik asit içeren tüp üzerine 100 µl steril su veya AE buffer eklenip 37°C'de yaklaşık 30-60 dakika bekletildi. Kullanıma hazır olan ekstraksiyon ürünü +4°C'de saklandı. Eğer 1 haftadan daha uzun süre saklanacaksa -20°C'de bekletildi.

3.6.3. PCR ile Tür Spesifik Amplikonların Elde Edilmesi

Amplifikasyon için hedef bölgeleri 18S, 5.8S, ve 28S rDNA korunmuş bölgeleri olan ITS1, ITS3 ve ITS4 primerleri kullanıldı. ITS1-ITS4 primer çifti, ITS1 ve ITS2 bölgeleri ve bu bölgelere komşu olup aralarında kalan 5.8S rDNA bölgesinin amplifikasyonu için kullanıldı ve uzun ürünler elde edildi. Yine ITS3-ITS4 primer çifti 5.8S rDNA bölgesinin büyük bir kısmı ve buraya komşu ITS2 bölgesinin amplifikasyonu için kullanıldı ve kısa amplifikasyon ürünleri elde edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. PCR ile çoğaltılan bölgelerin fungal genomdaki lokalizasyonları.

PCR master miksinin içine her örnek için ikişer mililitre ekstrakte DNA eklendi. Amplifikasyon 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 54°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama döngüsü içeren 30 siklus ve 72°C'de 7 dakika son uzama döngüsü halinde programlanarak thermal cycler (Icycler-BioRad®İtalya) cihazında gerçekleştirildi. Çalışmada eşzamanlı olarak negatif kontrol amaçlı kalıp DNA içermeyen örnekler kullanıldı.

Tablo 3.1. Amplifikasyon için PCR master miksinin hazırlanması.

Karışım ögesi	µl	Final konsantrasyonu
Su (Nuclease free, steril distile su)	12,6	---
PCR tamponu 10X Taq buffer (Tris/HCl*, KCl**)	5	1 X
25 mM MgCl ₂ (Fermentas® Litvanya)	5	1,25 µM (mikromol)
dNTP karışımı (Fermentas® Litvanya)	15	Her dNTP'den 0,2 mM
Primer 1 (ITS4) (İontek® Türkiye)	5	50 pM (piko mol)
Primer 2 (ITS1 veya ITS3) (İontek® Türkiye)	5	50 pM
Taq DNA polimeraz (Fermentas® Litvanya)	0,4	1,25 U
Hedef DNA (Ekstrakte DNA)	2	---
Toplam	50	

*HCl: Hidroklorik asit, **KCl: Potasyum klorür.

Tablo 3.2. Kandida türlerinin beklenen bant uzunlukları (bp.;base pair) (37).

<u>Tür</u>	<u>Uzun Ürünler</u>	<u>Kısa ürünler</u>
<i>C. albicans</i>	529–535 (532) bp.	335–342 (339) bp.
<i>C. glabrata</i>	869–879 (874) bp.	412–418 (415) bp.
<i>C. guilliermondii</i>	598–607 (603) bp.	375–380 (378) bp.
<i>C. krusei</i>	496–503 (500) bp.	332–338 (335) bp.
<i>C. parapsilosis</i>	511–521 (516) bp.	308–314 (311) bp.
<i>C. tropicalis</i>	517–524 (521) bp.	326–331 (329) bp.

Jel elektroforez işlemi %1,5 agaroz jelde 4,8 volt/cm'da 1XTAE buffer (0,1 M Tris, 0,09 M borik asit, 1 mM EDTA) içinde 1 saat bir süre ile gerçekleştirildi. Çalışmada ürünlerin bant büyüklüklerini tespit için 100-bp'lik bir DNA marker eşzamanlı olarak yürütüldü. Elektroforez işlemi sonrası saptanan ürünler fotoğraflandı.

3.6.4. RFLP Yöntemi ile Kandida İzolatlarının Tanımlanması

ITS1-ITS4 primer çiftinin kullanılmasıyla elde edilen uzun ürünler *Msp* I restriksiyon enzimi ile kesilerek *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, ve *C. guilliermondii* türlerinin varlığı araştırıldı.

Tablo 3.3. Kandida türlerine ait beklenen bant uzunlukları (75).

<u>Tür</u>	<u>Uzun ürünlerin büyüklükleri</u>	<u><i>Msp</i> I ile kesim ürünleri</u>
<i>C. albicans</i>	535 bp.	297 ve 238 bp.
<i>C. glabrata</i>	871 bp.	557 ve 314 bp.
<i>C. guilliermondii</i>	608 bp.	371,155 ve 82 bp.
<i>C. krusei</i>	510 bp.	261 ve 249 bp.
<i>C. parapsilosis</i>	520 bp.	520 bp.
<i>C. tropicalis</i>	524 bp.	340 ve 184 bp.

Yukarıda tanımlanan PCR yöntemi ile elde edilen uzun ürünler *Msp* I enzimi ile aşağıda tanımlanan yöntem ile kesildi. Bir ependorf tüpü içine PCR ürününden 20 µl aktarıldıktan sonra üzerine 2 µl su, 2,5 µl enzime ait tampon ve 0,5 µl *Msp* I enziminden (10 U) oluşan karışım eklendi. Bu son karışım ısı

bloğunda 37°C'de iki saat inkübe edildi. Daha sonra kesim ürünleri % 1,8'lik agaroz jelde TAE buffer içinde 100 volt'ta yaklaşık 45 dakika süreyle yürütüldü. Eş zamanlı olarak bant uzunluklarını belirlemek için 100-bp'lik DNA marker da birlikte yürütüldü. Elektroforez işlemi sonrası saptanan ürünler fotoğraflandı.

3.6.5. RFLP Yöntemi ile *C. albicans* ve *C. dubliniensis* Ayırımı

Hem ITS1, ITS3 ve ITS4 primerlerinin kullanılmasıyla elde edilen uzun ve kısa bant büyüklüklerinin karşılaştırılması, hem de *Msp* I restriksiyon enzimi ile uzun ürünlerin kesimi sonrası oluşan bantların büyüklüklerindeki farklılıkların gözlenmesi *C. albicans* ve *C. dubliniensis* türlerini birbirinden ayırmada yetersiz kaldı. Bu iki türü birbirinden ayırmak için *Bln* I (*Avr* II) enzimi ile uzun ürünlerin kesilmesine dayanan RFLP yöntemi kullanıldı (76). Bu enzim *C. albicans*'a ait 532 bp. uzunluğundaki amplifikasyon ürününü kesmezken, *C. dubliniensis*'e ait 535 bp. uzunluğundaki ürünü 335 bp. ve 200 bp.'lik iki ayrı ürüne ayırmakta ve identifikasyona olanak sağlamaktadır.

Tablo 3.4. *Candida albicans* ve *C. dubliniensis* türlerine ait bant uzunlukları.

<u>TÜR</u>	<u>Uzun ürünler</u>	<u><i>Bln</i> I (<i>Avr</i> II) ile kesim ürünleri</u>
<i>Candida albicans</i>	532 bp.	532 bp.
<i>Candida dubliniensis</i>	535 bp.	335 ve 200 bp.

Daha sonra kesim ürünleri % 2'lik agaroz jelde TAE buffer içinde 100 volt'ta yaklaşık 45 dakika yürütüldü ve etidyum bromid ile boyanarak PCR ürünleri görüntülendi.

3.6.6. Nükleik Asitlerin Görüntülenmesi

Amplifiye edilen PCR ürünlerini saptamak amacıyla agaroz jel elektroforez yöntemi kullanıldı. Elektroforez için istenilen oranlarda (% 1,5 - 1,8 - 2,0) agaroz jeller hazırlandı. Bunun için istenilen miktarda agaroz tartılarak steril bir cam kaba (erlen) konuldu. Üzerine 1XTAE (tris acetate EDTA) buffer 40 ml eklenerek karıştırıldı. Mikrodalga fırında 400 watt'ta 1 dakika kadar tutuldu. Eriyen agaroz soğutulduktan sonra (yaklaşık

70°C'ye kadar) DNA bantlarının görülebilmesi için içersine bir floresan boya olan etidyum bromid (10 µl) eklenip karıştırılarak elektroforez cihazının yatay kalıbına döküldü. Hemen tarak yerleştirilerek jel üzerinde örneklerin yükleneceği gözler açıldı. Polimerleşme (katılaşma) olduktan sonra tarak jele zarar vermeden çıkarıldı. Daha sonra jel, elektroforez tankı içersine yerleştirildi ve tankın içi jelin üzerini kaplayacak şekilde 1X TAE buffer ile dolduruldu. Böylece jel elektroforez için hazır duruma geldi. Elektroforez öncesinde 20 µl hacmindeki her örneğe 2 µl jel yükleme solüsyonu (loading dye solution) karıştırılarak sırasıyla jelde bulunan kuyucuklara pipetlendi. İlk göze 100 bp'lik DNA ladder (DNA moleküler ağırlık marker'ı) yüklendi. Elektroforez işlemi, yürütülecek ampikonlara göre 100 volt'ta 40 dakika -1 saat sabit akımda elektrik verilerek gerçekleştirildi.

Süre bitiminde yürütülen DNA bantlarının büyüklüklerini belirleyebilmek için jel elektroforez cihazından alınarak görüntüleme cihazına (UV-Transilluminatör) aktarıldı. Oluşan bantlar 312 nanometre dalga boyundaki UV ışığı altında okundu. Negatif kontrollerde şüpheli veya kontamine pozitif bantların olmadığından emin olunduktan sonra görünen bantlar size marker ile mukayese edilerek değerlendirildi. Bantlar dijital fotoğraf makinesi ile görüntülendi.

IV- BULGULAR

4.1. Örneklerin Cinsiyete Göre Sayısal Dağılımı

Çalışmamızda 60 hastaya ait 72 klinik örnekten toplam 77 kandida suşu izole edildi. Hastaların 33 (%55,0)'ü erkek, 27 (%45,0)'si kadın idi.

Tablo 4.1. Kandida izole edilen klinik örneklerin, cinsiyete göre dağılımı.

Örnek	Erkek (33)	Kadın (27)	Toplam (60)	İzolat sayısı
Kan	14	13	27	29
İdrar	11	13	24	24
Vasküler kateter	4	2	6	6
Yara	2	1	3	5
Aspirasyon kateter ucu	2	1	3	4
Oral sürüntü	1	1	2	2
Balgam	2	-	2	2
BAL	1	-	1	1
Aspirasyon Mayisi	1	-	1	1
Periton sıvısı	-	1	1	1
İnguinal sürüntü	1	-	1	1
Apse	-	1	1	1
Toplam	39 örnek	33 örnek	72 örnek	77 izolat

4.2. Örneklerle Göre Türlerin Sayısal Dağılımı

Yetmişiki klinik örneğin 69 (%95,8)'unda tek kandida türü izole edilirken, bir kan kültüründen üç (*C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*), bir yara kültüründen üç (*C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis*) ve bir aspirasyon kateter ucu kültüründen ise iki farklı kandida türü (*C. albicans* ve *C. glabrata*) soyutlandı. Örneklerden izole edilen kandida türlerinin dağılımı Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Klinik örneklerle göre, izole edilen kandida türlerinin dağılımı.

Klinik örnek (izolat sayısı)	<i>C.albicans</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.glabrata</i>	<i>C.lusitaniae?</i> <i>C.intermedia?</i>
Kan (29)	8	12	8		1
İdrar (24)	12	1	4	7	
Vasküler kateter (6)	3	2	1		
Yara (5)	2	2		1	
Asp. kateter ucu (4)	2		1	1	
Oral sürüntü (2)	2				
Balgam (2)	2				
BAL (1)	1				
Asp. Mayisi (1)	1				
Periton sıvısı (1)	1				
İnguinal sürüntü (1)	1				
Apse (1)				1	
Toplam (77)	35	17	14	10	1

4.3. Kliniklere Göre, Örnek ve Tür Dağılımı

Çalışma kapsamında YBÜ tedavisi sırasında nozokomiyal fungal enfeksiyon gelişen 47 (%78,3) hasta ile kliniklerde fungal enfeksiyon ortaya çıkan 13 (%21,7) hasta olmak üzere toplam 60 hasta değerlendirmeye alındı.

Hastalar ilk kandida üremesi saptandıktan sonra takibe alındılar. Hastalardan 41 (%68,3)'inin tüm tedavi süreçleri ilk yattıkları klinikte tamamlanırken, 19 (%31,7) hasta birden fazla klinikte izlendi. Bu 19 hastadan birinin iki ayrı klinikte farklı türlerin etken olduğu kandida enfeksiyonları geçirdiği saptandı. Bu hastanın Deniz ve Sualtı Hekimliği kliniğinde tedavi gördüğü dönemde kan kültürlerinde *C. parapsilosis* üremesi oldu, bu hasta yenidoğan YBÜ'ne nakledildikten sonraki kan ve idrar kültürlerinde *C. albicans* üredi. İki ayrı kandidemi epizodu geçiren bu hasta Tablo 4.3'de mükerrer olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Kliniklere göre hasta, örnek ve izole edilen türlerin dağılımı.

Klinik	Hasta sayısı	Örnek sayısı	Toplam izolat sayısı	Klinik örneklerden İzole edilen türlerin sayısal dağılımı				
				<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. lusitanae</i> ? <i>C. intermedia</i> ?
Genel Cerrahi	12	16	18	4	4	8	1	1
İç hastalıkları	11	15	16	7	6	1	2	
Anestezi YBÜ	6	6	6	4			2	
Nöroşirürji	6	6	6	2		3	1	
Çocuk Hastalıkları	3*	5	5	5				
Hematoloji	4	5	5	3	1		1	
Kardiyoloji	4	4	4	4				
Nefroloji	3	3	5	3		1	1	
Yanık	3	3	3	1		2		
Deniz sualtı	2*	2	2		1	1		
Nöroloji	2	2	2	1	1			
Onkoloji	2	2	2			1	1	
Endokrinoloji	1	1	1				1	
KBB	1	1	1	1				
KDC	1	1	1		1			
Toplam	61* (60)	72	77	35	14	17	10	1

* Her iki klinikte farklı periyotlarda kandidemi epizotu geçiren bir hasta

4.4. Farklı Örneklerinde Üreme Olan ve/veya Polimikrobiyal Üremesi Olan Hastalar

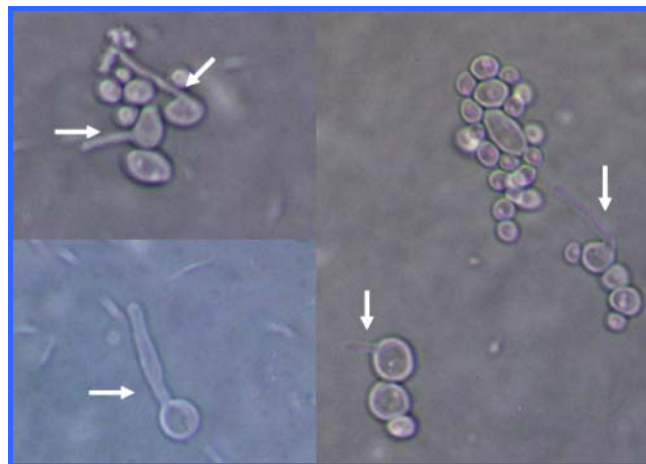
Hastalardan 48 (%80,0)'inde tek örnekte üreme (veya aynı örneğinde aynı türe ait tekrarlayan üremeler) oldu. Birden fazla örneğinde üreme olan veya bir örnekte polimikrobiyal üremesi olan 12 (%20,0) hastadan birinin hem oral hem inguinal sürüntü kültürlerinde *C. albicans* üredi, bir hastanın yara kültüründen üç farklı tür (*C. parapsilosis*, *C. glabrata* ve *C. albicans*) izole edilirken diğer bir hastanın aspirasyon kateter ucu kültüründe *C. glabrata* ve *C. albicans* olmak üzere iki ayrı suş soyutlandı. Kandidemi gelişen sekiz hastanın farklı örneklerinde (muhtemel odak) aynı kandida türü izole edildi (Tablo 4.4). Bu 12 hastanın 10'unda hastane enfeksiyonu varlığı klinik ve laboratuvar olarak doğrulandı.

Tablo 4.4. Diğer klinik örneklerinde üreme olan kandidemili hastalar.

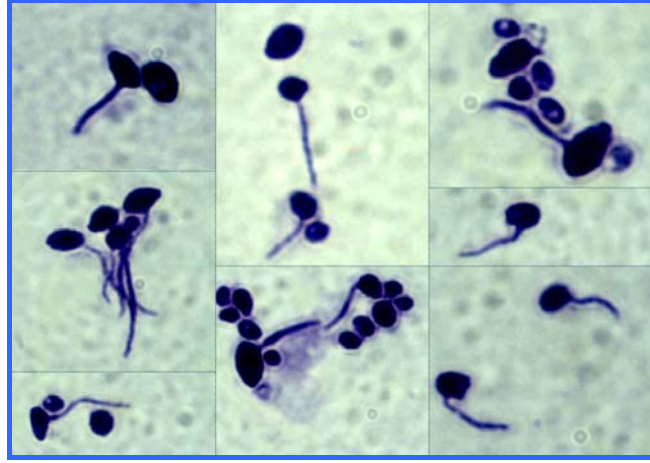
	Kan	Vasküler kateter	İdrar	Aspirasyon kateter ucu	Hastane Enfeksiyonu
1	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.parapsilosis</i>			Katetere bağlı KDE
2	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.parapsilosis</i>			Katetere bağlı KDE
3	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.tropicalis</i>			Katetere bağlı KDE
4	<i>C.albicans</i>		<i>C.albicans</i>		Sekonder KDE
5	<i>C.tropicalis</i>		<i>C.tropicalis</i>		Sekonder KDE
6	<i>C.tropicalis</i>		<i>C.albicans</i>	<i>C.tropicalis</i>	Sekonder KDE+ASK
7	<i>C.albicans</i> <i>C.parapsilosis</i> <i>C.tropicalis</i>	<i>C.albicans</i>			Primer KDE + Katetere bağlı KDE (polimikrobiyal kandidemi)
8	<i>C.tropicalis</i>		<i>C.albicans</i>		Primer KDE+ASK
9	<i>C.albicans</i>		<i>C. albicans</i>		Sekonder KDE

4.5. Germ Tüp Pozitifliklerinin Değerlendirilmesi

Klinik örneklerden soyutlanan suşların 35 (%45,5)'inde insan serumu kullanılarak yapılan germ tüp testinin sonuçları pozitif olarak değerlendirildi. Farklı hastalara ait serumların rastgele kullanılmasıyla yapılan ilk germ tüp deneyinde bu 35 suştan 5 (%14,3)'inde germ tüp oluşumu gözlenmedi. Daha sonra tüm suşlar *C. albicans* standart suşunun pozitif kontrol olarak kullanıldığı hasta serumlarıyla germ tüp oluşumu yönünden tekrar incelendiğinde 35 suşun tamamı germ tüp pozitif olarak değerlendirildi. *Candida dubliniensis* standart suşu da germ tüp pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 4.1. Germ tüp oluşturan maya hücreleri (ışık mikroskobu, x400).

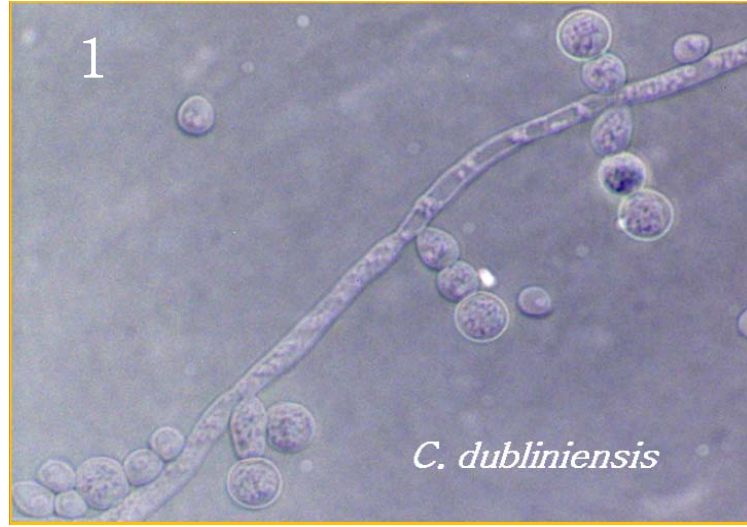


Şekil 4.2. Germ tüp oluşturan maya hücreleri (gram boyama).

4.6. Corn Meal Agarda Morfolojik Yapıların Değerlendirilmesi

Corn Meal Agar (CMA)'da üreyen, germ tüp pozitif 35 (%45,5) izolatın tamamı klamidospor ve psödohif yapılar oluştururken bazı izolatların çiftler halinde ve yoğun klamidospor oluşturdukları gözlemlendi (Şekil 4.3.2 ve 4.3.3). *Candida dubliniensis* suşunun da çok sayıda ve ikili klamidosporlar oluşturduğu saptandı (Şekil 4.3.1). Bu nedenle izolatların *C. albicans* veya *C. dubliniensis* olarak tür düzeyinde identifikasyonunun yalnızca klamidospor oluşumları incelenerek yapılması mümkün olmamıştır.

CMA besiyerinde psödohif ve klamidospor yapılar oluşturmayan 10 (%13,0) kandida izolatı morfolojik olarak *C. glabrata* olarak tanımlanmıştır. Diğer izolatların 14 (%18,2)'ü yoğun psödohif oluştururken klamidospor yapılar göstermediği ve psödohif yapıları üzerinde yer yer az sayıdaki blastospor kümelerinin varlığı ile *C. tropicalis* olarak değerlendirildi. Onyeddi klinik izolatın *C. tropicalis* ve *C. albicans* izolatlarından farklı olarak daha kısa psödohif yapılar ile az sayıda blastospor yapılar gösterdiği ancak klamidospor oluşturmadıkları gözlemlendi. Bu izolatlar dev hücre yapıları gözlenmemesine rağmen morfolojik olarak *C. parapsilosis* olarak değerlendirildi. Kandida izolatlarından biri ise özellik arz etmediğinden morfolojik olarak değerlendirilemedi. CMA besiyerinde üreme özelliklerinin değerlendirilmesi ile hastanemizdeki en sık soyutlanan dört kandida türünün birbirinden ayırt edilmesi mümkün oldu.

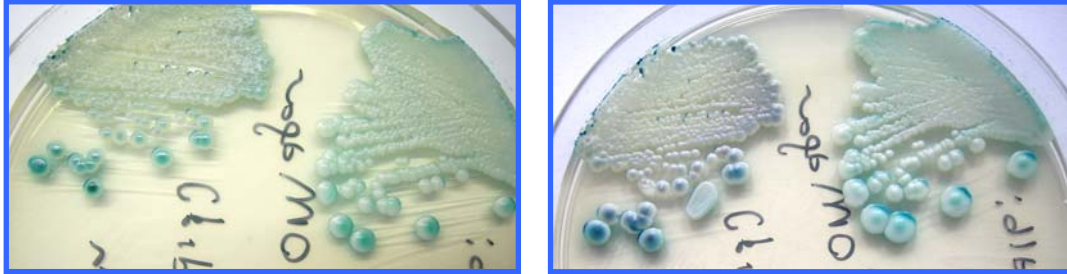


Şekil 4.3.1. *Candida dubliniensis*'in ikili klamidosporları.
4.3.2. *Candida albicans*'a ait klamidosporlar. **4.3.3.** *Candida albicans* klamidosporları ve blastospor kümeleri

4.7. CAC Besiyerindeki Koloni Görünümlerinin Değerlendirilmesi

CHROMagar *Candida* besiyerine pasajlanan izolatların koloni renk ve görünümlerinin değerlendirmeleri sonrası; açık parlak yeşil renkli koloni oluşturan izolatlar *C. albicans*, çelik mavi renkli koloniler oluşturan izolatlar *C. tropicalis*, parlak pembe-mor görünümlü koloni oluşturan izolatlar *C. glabrata*, pembemsi parlak beyaz renkli koloniler oluşturan izolatlar *C. parapsilosis* veya diğer kandida türleri şeklinde değerlendirildi (Şekil 4.5) CHROMagar *Candida* besiyerindeki kolonilere ait renk farklılıklarının değerlendirilmesi sonrası; İzolatların 35 (% 45,5)'i *C. albicans*, 14 (%18,2)'ü *C. tropicalis*, 10 (%13,0)'u *C. glabrata* olarak tanımlandı. Diğer 18 (%23,4) izolat tür boyutunda tanımlanamadı ve diğer kandida türleri şeklinde değerlendirildi.

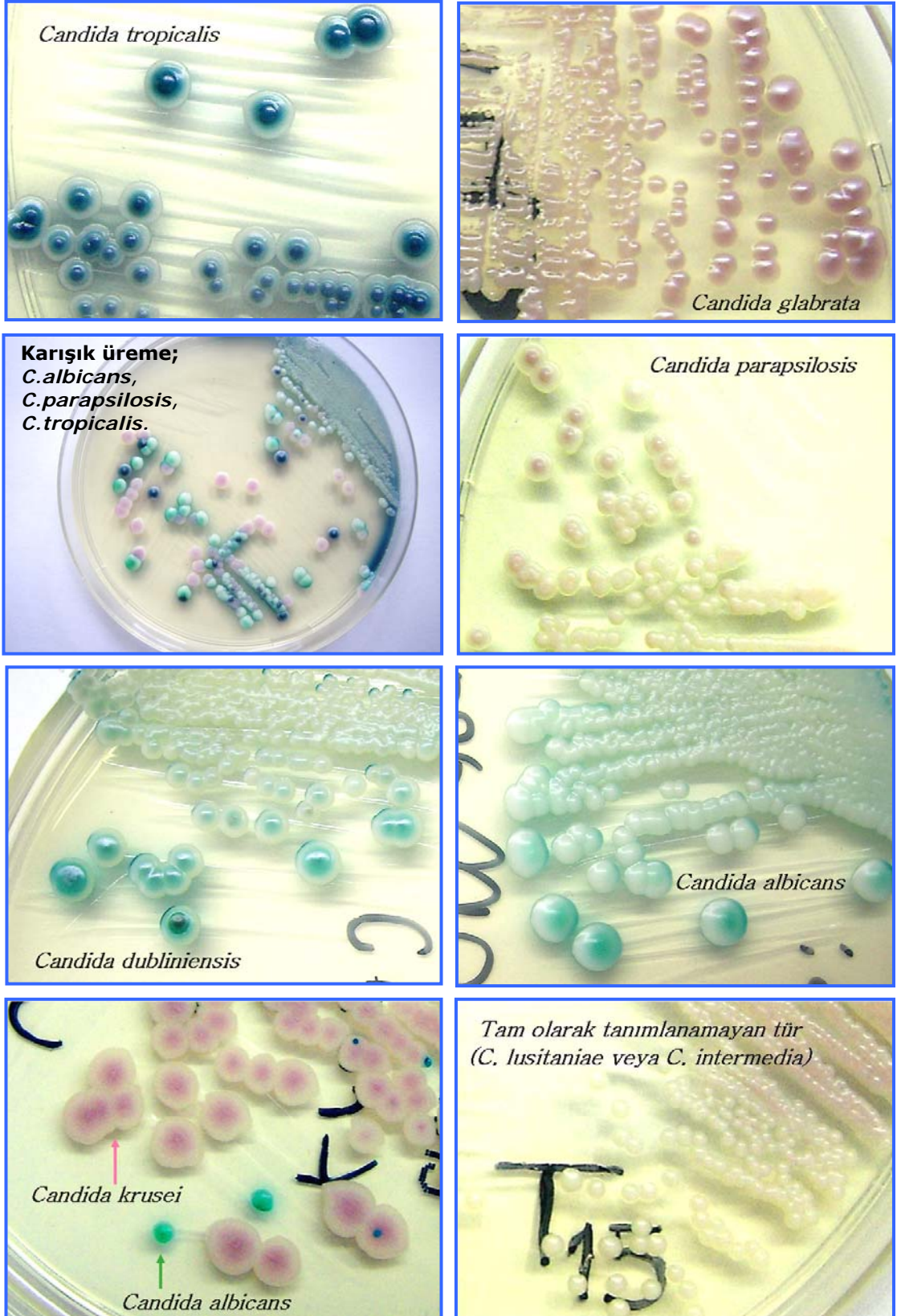
Candida dubliniensis standart suşu 24. ve 36. saatlerde *C. albicans* kolonilerinden tam olarak ayırt edilemeyen yeşil renkli parlak koloniler oluşturdu. İnkübasyon süresi uzatıldıkça koyu-yeşil renkli, mat görünümlü kolonilere dönüştü. Bu şekli ile *C. dubliniensis* olarak tanımlandı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. CAC besiyerinde 36. (sol) ve 72. (sağ) saatlerde *C. albicans* ve *C. dubliniensis* kolonileri.

4.8. Yüksek Isıda (45°C'de) Üreme Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Germ tüp oluşturan kandidaların identifikasyonu amacıyla 45°C'de üreme özellikleri incelendi. Üremeler 24., 48. ve 72. saatlerde değerlendirildi ve 72 saat sonunda +, ++ ve +++ olarak değerlendirildi. Kontrol olarak kullanılan *C. dubliniensis* plağında üreme görülmedi. Germ tüp testi pozitif olarak değerlendirilen türlerden 9 (%25,7)'u göreceli olarak daha zayıf (+) ürediler. Sonuçta hastanemizde izole edilen germ tüp oluşturan tüm kandida türleri *C. albicans* olarak tanımlandı.



Şekil 4.5. Çeşitli kandida türlerinin CAC besiyerindeki koloni görünüşleri.

4.9. ID 32C API Sonuçları ve Biyokimyasal Deneyler

CHROMagar *Candida* besiyerindeki üremelerde *C. albicans* olarak değerlendirilen (i) MU-Tw80 agarda klamidospore oluşturan (ii) germ tüp pozitif (iii) 45°C’de üreyebilen (iv) suşların fenotipik olarak *C. albicans* olduğu kabul edildiğinden, randomize olarak seçilen kontrol amaçlı üç izolat dışındakiler API ile değerlendirmeye alınmadı. ID 32C API testi *C. albicans* dışındaki türlerin tanısı için kullanıldı. ID 32C API testinin 24., 48. ve 72. saat sonuçları moleküler yöntemlerle karşılaştırıldığında en iyi sonuçların 48. saatte elde edildiği görüldü. ID 32C’nin duyarlılığını 24. saatte % 72,9 (35/48), 48. saatte % 95,8 (46/48) ve 72. saatte % 87,5 (42/48) olarak saptadık (Tablo 4.5).

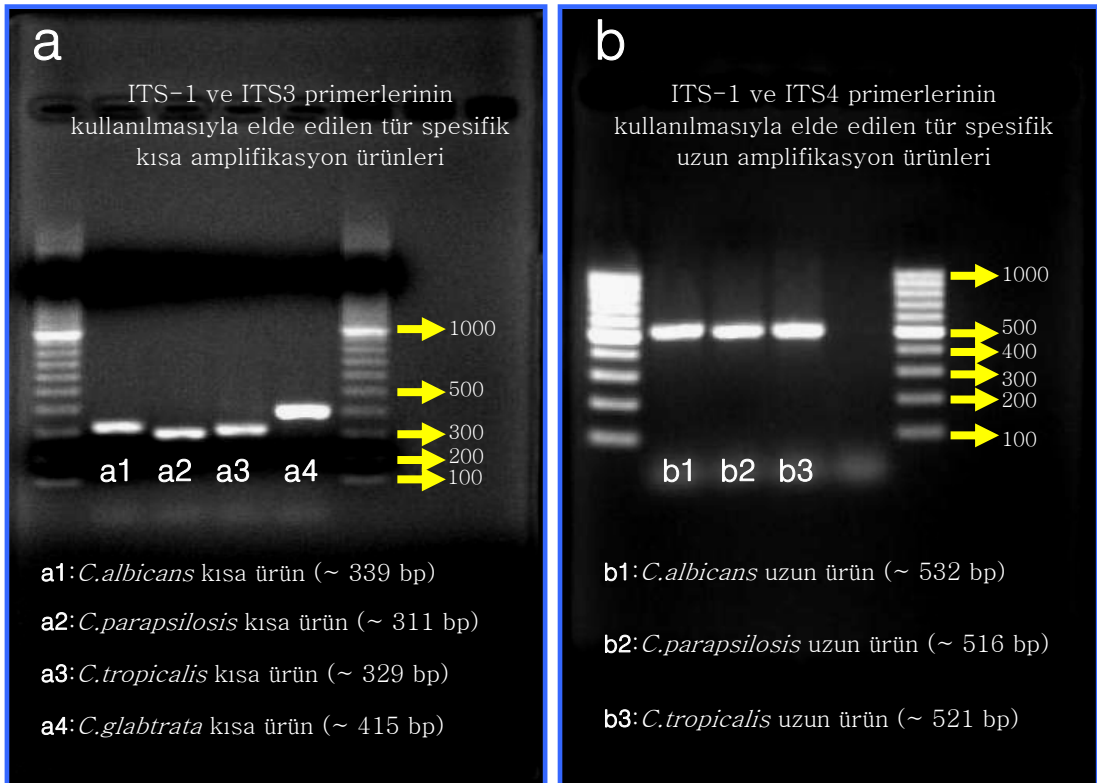
API testi yapılan 48 suşun 46 tanesi (% 95,8) 48. saatte moleküler test sonuçları ile uyumlu olarak tanımlandı. *Candida tropicalis* suşlarından biri 24. ve 72. saatlerde ilk olasılık olarak *C. tropicalis* şeklinde tanımlanmasına karşın 48’inci saatte ikinci seçenek olarak tanımlandı. Sonuçta bu tür *C. tropicalis* olarak değerlendirildi. Bir kandida türü ise API ile 24. ve 72. saatlerde hiç tanımlanamazken 48. saatte ise ilk ihtimal olarak *C. intermedia* ve ikinci ihtimal olarak *C. lusitaniae* şeklinde ancak “unacceptable profile” şeklinde tanımlandı.

Tablo 4.5. Moleküler test sonuçları ve API sonuçlarının karşılaştırılması.

ID 32C API SONUÇLARI	MOLEKÜLER TEST SONUÇLARI İLE UYUMLU SUŞ SAYISI			MOLEKÜLER TEST SONUÇLARI
	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT	
<i>C. albicans</i> (3)	3	3	3	<i>C. albicans</i> (3)
<i>C. parapsilosis</i> (17)	9	17	17	<i>C. parapsilosis</i> (17)
<i>C. tropicalis</i> (14)	12	13 (+1*)	11(+1*)	<i>C. tropicalis</i> (14)
<i>C. glabrata</i> (10)	10	10	9	<i>C. glabrata</i> (10)
<i>C. lusitaniae</i> ? <i>C. intermedia</i> ? (1)	0	1**	0	<i>C. lusitaniae</i> ? <i>C. intermedia</i> ?(1**)
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	1	1	1	<i>C. albicans</i>
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	1*	1	1*	<i>C. dubliniensis</i>
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	0	1	1	<i>C. parapsilosis</i>
Toplam (48)	35(+1*)	46 (+1*)	42 (+2*)	
ID 32C API testinin duyarlılığı	%72,9	%95,8	%87,5	
*Doğru tanımlamayı ikinci seçenek olarak verdi. **Bir tür hem moleküler yöntemlerle hem API ile <i>C. lusitaniae</i> veya <i>C. intermedia</i> şeklinde inkomplet olarak tanımlanabildi.				

4.10. Moleküler Tiplendirme

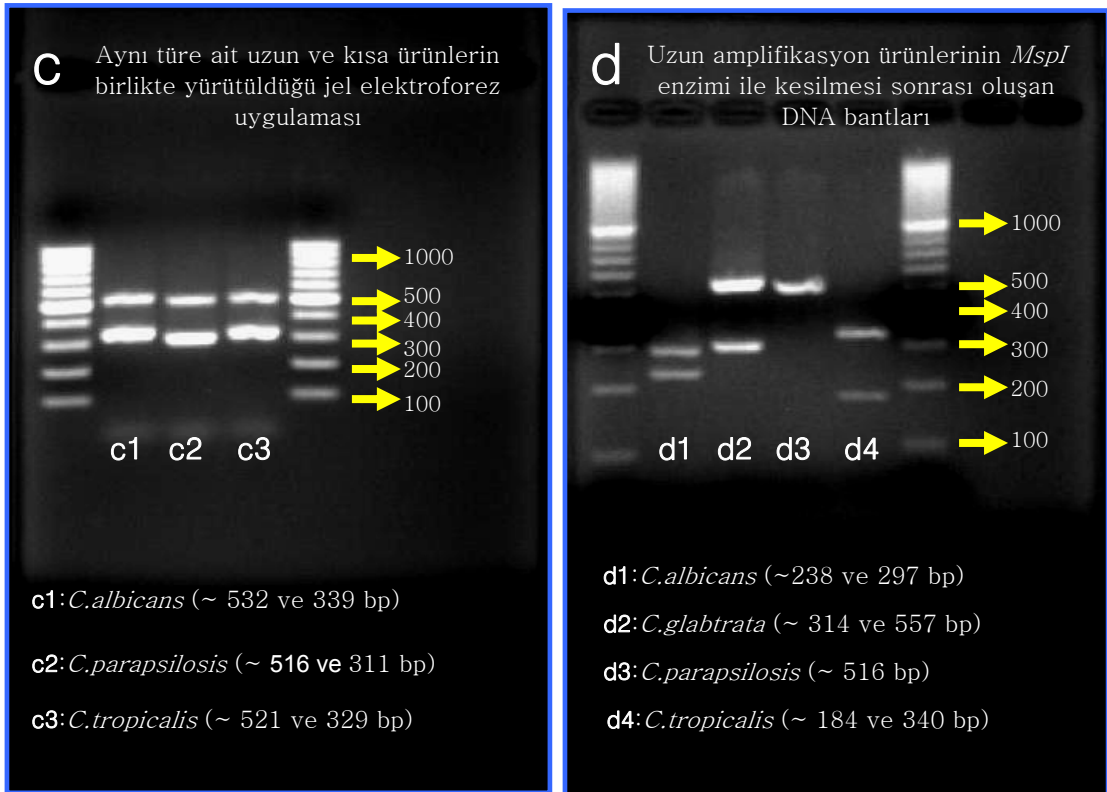
Üç farklı primer kullanılarak iki farklı ürünün (uzun ve kısa) elde edildiği bu yöntemle 20 kandida türü ve diğer mantarlara ait 13 türün ayırt edilebildiği gösterilmiştir (37). Bazı türleri birbirinden kolaylıkla ayırt edebilen bu yöntemle amplicon uzunlukları birbirine yakın olan bazı türlerin ayırımı zor olmaktadır. Klinik örneklerden izole ettiğimiz 77 suşun 66 (%85,7)'sı *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* idi. Uzun ve kısa ürünlerinin amplicon uzunlukları birbirine yakın olduğundan jel elektroforezi sonrası bu üç türün birbirinden tam olarak ayırımı mümkün olamadı (Şekil 4.6.1 **a1-a2-a3**, **b1-b2-b3** ve 4.6.2 **c1-c2-c3**). Bu yüzden bu üç türün birbirinden daha kolay ayırt edilmesi için PCR-RFLP yöntemi uygulandı. *Candida glabrata*'nın ampliconları ise diğer üç türe göre daha büyük olduğundan kolaylıkla ayırt edildi (Şekil 4.6.1 **a4**, 4.6.3 **f1**). Türlerden biri uzun ve kısa amplifikasyon ürünlerinin uzunluklarına göre 33 tür içinde *C. lusitaniae* veya *C. intermedia* şeklinde inkomplet olarak tanımlandı (Şekil 4.6.3 **e1-e2**).



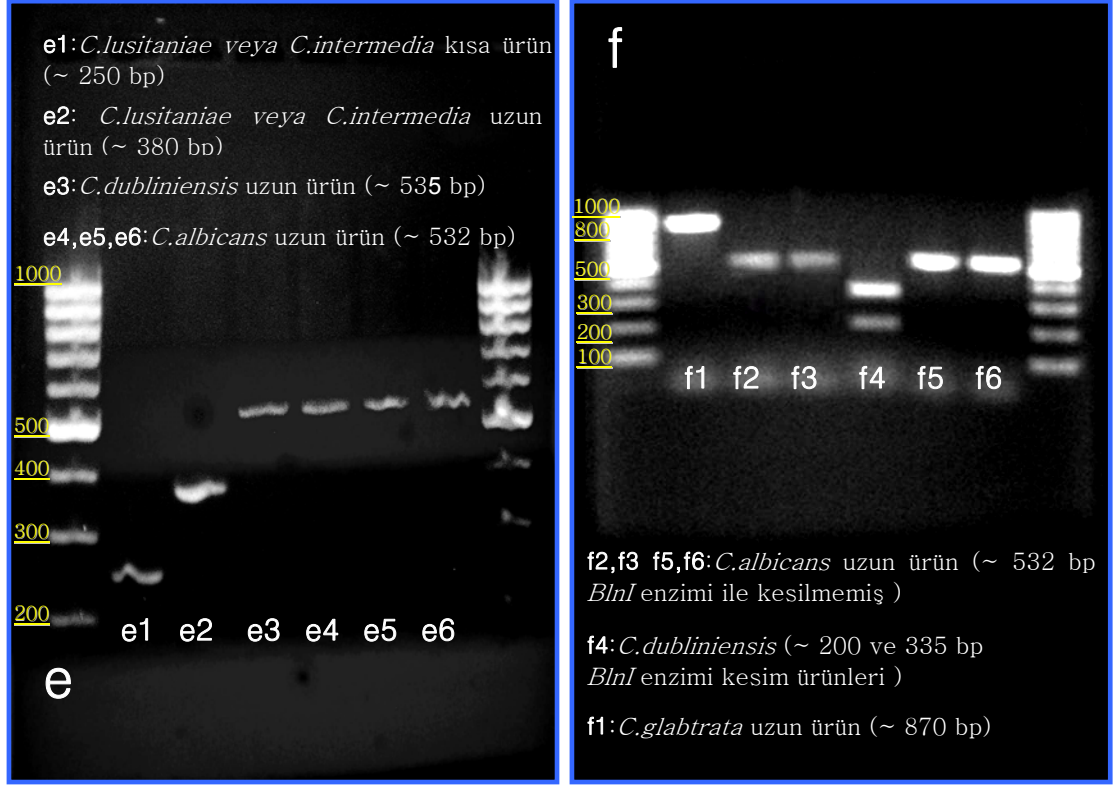
Şekil 4.6.1. Bazı kandida suşlarının tür spesifik (uzun ve kısa) ampliconları.

Uzun ürünlerin *Msp* I enzimiyle kesilmesi sonrası klinik kaynaklı 77 suşun 76 (%98,7)'sı, yani *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* türlerinin tamamı tür düzeyinde tanımlandı. Bu yöntem *C. dubliniensis* standart suşunu *C. albicans* suşlarından ayırmada yetersiz kaldı (Şekil 4.6.2 **d1-d2-d3-d4**)

C. dubliniensis ve *C. albicans* türlerini ayırmak için uzun amplifikasyon ürünlerinin *Bln* I (*Avr* II) enzimi ile kesildiği PCR-RFLP yöntemi kullanıldı. *Candida dubliniensis* ve *C. albicans* standart suşları ile 45°C'de üreme deneyinde diğerlerine göre nispeten zayıf üreyen dokuz *C. albicans* türüne ait (toplam 11 tür) uzun amplifikasyon ürünlerinin *Bln* I (*Avr* II) enzimi ile kesilmesi ve jel elektroforezinde yürütülmesi sonrası klinik izolatlarımız arasında *C. dubliniensis* suşu olmadığı belirlendi (Şekil 4.6.3 **e3-e4-e5-e6** ve **f2-f3-f4-f5-f6**).



Şekil 4.6.2. Bazı kandida suşların tür spesifik kısa ve uzun ampikonları (**c**) ve uzun ürünlerin *Msp* I ile kesilmesi sonrası oluşan bantlar (**d**).



Şekil 4.6.3. (e,f). Bazı kandidaların tür spesifik ampliconları ve *C. dublinsiensis* uzun ürününün *BlnI* ile kesimi sonrası oluşan bantlar.

4.11. “Hastane Enfeksiyonu” Varlığının Değerlendirilmesi

Aktif sörveyans yöntemi ile takip edilen hastalar CDC kriterleri ve NNIS tanımlamalarına göre hastane enfeksiyonu varlığı yönünden değerlendirildi. Hastaların 19’unda laboratuvar olarak kanıtlanmış kan dolaşımı enfeksiyonu (LOK KDE), altısında semptomatik üriner sistem enfeksiyonu (SÜSE), birinde nozokomiyal pnömoni (NPNEU) ve birinde de “Deri ve Mukoza Kandidozu” tanımlandı. Bir hasta iki ayrı hastane enfeksiyonu epizodu geçirdi. Sayılan 28 hastanın ikisinde (hastane etkeni olarak tanımlanan türden farklı bir kandida türünün etken olduğu) ve bu hastaların dışındaki 15 hastada asemptomatik kandidüri (ASK) varlığı saptandı. Sonuç olarak hastaların 43 (%71,7)’ünde hastane enfeksiyonu varlığı tanımlandı. Geriye kalan 17 hastanın 13’ündeki üremeler kandida kolonizasyonu (6 solunum yolları, 5 vasküler kateter, 2 yara) olarak değerlendirildi. İki hastadaki üreme kontaminasyon, iki hastadan soyutlanan kandida suşları ise toplumdan edinilmiş etkenler olarak tanımlandı.

Sadece ASK'si olan hastalara tedavi başlanmadı. Hastane enfeksiyonu olan hastalardan üçünde kandida üremeleri olduğunda hastalar kaybedildiği, bir hasta da taburcu olduğu için antifungal tedavi başlanma imkanı olmadı. Geriye kalan 24 hasta çeşitli antifungal ilaçlar (altı hasta amfoterisin B, 14 hasta flukonazol, iki hasta amfoterisin B ve flukonazol, bir hasta ketokonazol krem + amfoterisin B + kaspofungin, bir hasta amfoterisin B + flukonazol + vorikonazol) ile tedavi edildi. Antifungal ilaçlarla tedavi edilen bu hastaların 14'ünde tedaviye olumlu yanıt alınırken 14 hasta kaybedildi. Kandidemi etkeni olarak soyutlanan 29 suşun 26'sı nozokomiyal KDE etkeni olarak, üç tanesi ise kateter kolonizasyonuna bağlı geçici kandidemi olarak tanımlandı. Söz konusu 26 KDE'nun 22'si primer KDE, dördü sekonder KDE (üçü ÜSE'na, biri pnömoniye sekonder) olarak tanımlandı.

Tablo 4.6. CDC tanımlamalarına göre HE ve tür dağılımları.

	Klinik Üremelerin Sınıflandırılması	CDC Tanımlaması	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. lusitanae</i> ? <i>C. intermedia</i> ?	Toplam izolat
Hastane Enfeksiyonu	Kan Dolaşımı ve Kateter Enfeksiyonları	LOK KDE	5	6	10		1	22
		Katetere bağlı KDE (Kateter izolatları)	1	1	2			4
		Sekonder KDE	2	2				4
	ÜSE	Semptomatik ÜSE	4	1		2		7
		Aseptomatik kandidüri	8	3	1	5		17
	Pnömoni	Pnömoni		1				1
	Deri ve YDİ	Deri ve YDE	2					2
Hastane Enfeksiyonu Toplam Sayı			22	14	13	7	1	57
Hast. enf. olmayanlar	Kolonizasyon	Solunum Yolları kolonizasyonu	6			1		7
		Vasküler Kateter kolonizasyonu	3		2			5
		Yara kolonizasyonu	2		1	1		4
	Kontaminasyon	Apse, GİS kontaminasyonu				1		1
		Oral flora kontaminasyonu	1					1
	Toplum Kaynaklı	Hastaneye yatıştan sonraki İlk 24 saat içinde alınan örnekte üreme	1		1			2
Hastane Enfeksiyonu olmayanlar Toplam Sayı			13		4	3		20
Tüm Klinik Örneklerden İzole Edilen Türlerin Toplam Sayıları			35	14	17	10	1	77

YDİ; Yumuşak Doku Enfeksiyonu. GİS; Gastro İntestinal Sistem.

4.12. Suşlara Göre Tüm Yöntemlere Genel Bakış

Not: Toplam 79 suş (üç standart suş ve 76 klinik izolat) aşağıdaki tablolarda test sonuçlarıyla beraber gösterilmektedir. İnkomplet olarak tanımlanan kandida türü tabloda yer almazken, standart suşlar koyu renkli olarak gösterildi.

Tablo 4.7. *Candida albicans* ve *C. dubliniensis* suşlarının tanımlanmasında kullanılan yöntemler ve test sonuçları.

Suş No	CHROMagar	Germ Tüp	Klamidospor ve psödohif	45°C'de üreme	Moleküler testler
1	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	++	<i>C. albicans</i>
5	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+	<i>C. albicans</i>
7	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+++	<i>C. albicans</i>
9	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	++	<i>C. albicans</i>
10	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+++	<i>C. albicans</i>
11	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+++	<i>C. albicans</i>
12	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	++	<i>C. albicans</i>
15	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+	<i>C. albicans</i>
16	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	++	<i>C. albicans</i>
19	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	++	<i>C. albicans</i>
20	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+++	<i>C. albicans</i>
21	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+++	<i>C. albicans</i>
22	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	++	<i>C. albicans</i>
25	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+	<i>C. albicans</i>
26	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	++	<i>C. albicans</i>
28	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	++	<i>C. albicans</i>
31	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+++	<i>C. albicans</i>
35	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+++	<i>C. albicans</i>
36	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+	<i>C. albicans</i>
38	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+++	<i>C. albicans</i>
39	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ (az sayıda) / +	++	<i>C. albicans</i>
40	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+++	<i>C. albicans</i>
43	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+	<i>C. albicans</i>
45	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+	<i>C. albicans</i>
49	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+++	<i>C. albicans</i>
50	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+++	<i>C. albicans</i>
58	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+++	<i>C. albicans</i>
60	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+	<i>C. albicans</i>
63	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	++	<i>C. albicans</i>
64	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	++	<i>C. albicans</i>
65	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+	<i>C. albicans</i>
66	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+	<i>C. albicans</i>
71	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	++	<i>C. albicans</i>
74	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	+++	<i>C. albicans</i>
78	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	++	<i>C. albicans</i>
79	<i>C. albicans</i>	Pozitif	+ / +	++	<i>C. albicans</i>
3	<i>C. dubliniensis</i>	Pozitif	+ / +	++	<i>C. dubliniensis</i>

Tablo 4.8. Germ tüp oluşturmeyan suşların tanımlanmasında kullanılan yöntemler ve test sonuçları.

Suş No	CHROMagar	Germ Tüp	Klamidospor ve psödohip	ID 32C API	Moleküler testler
4	<i>C. glabrata</i>	Negatif	- / -	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
8	<i>C. glabrata</i>	Negatif	- / -	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
13	<i>C. glabrata</i>	Negatif	- / -	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
14	<i>C. glabrata</i>	Negatif	- / -	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
17	<i>C. glabrata</i>	Negatif	- / -	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
30	<i>C. glabrata</i>	Negatif	- / -	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
59	<i>C. glabrata</i>	Negatif	- / -	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
72	<i>C. glabrata</i>	Negatif	- / -	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
75	<i>C. glabrata</i>	Negatif	- / -	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
76	<i>C. glabrata</i>	Negatif	- / -	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>
2	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
6	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
23	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
24	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
32	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
34	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
51	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
52	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
54	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
55	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
56	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
57	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
61	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
62	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
73	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
80	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
18	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
67	<i>Candida sp.</i>	Negatif	- / +	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
27	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	- / +	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
29	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	- / +	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
33	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	- / +	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
37	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	- / +	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
41	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	- / +	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
42	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	- / +	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
46	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	- / +	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
47	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	- / +	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
48	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	- / +	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
53	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	- / +	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
68	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	- / +	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
69	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	- / +	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
70	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	- / +	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
77	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	- / +	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>

V- TARTIŞMA

Günümüzde invaziv fungal enfeksiyonlar için risk altındaki popülasyonun giderek arttığı gözlenmektedir. Özellikle nozokomiyal fungal enfeksiyonların %80'inden fazlasından sorumlu olan kandida türleri hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonları arasında 4. sırada yer alan önemli patojenler olmaya devam etmektedir. Diğer taraftan görülme sıklıkları coğrafi bölgelere göre önemli farklılıklar göstermekle birlikte *albicans*-dışı kandida türlerinin etken olduğu enfeksiyonların insidanslarında artış olduğu bildirilmektedir (2,113).

ABD'nde NNIS'e kayıtlı yaklaşık 180 hastanede 1980-1990 yıllarını kapsayan nozokomiyal enfeksiyon etkenlerinin saptanmasına yönelik bir araştırmada; *Candida* cinsine ait türlerin *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, enterokoklar ve KNS'ları takiben altıncı sırada yer aldığı saptanmıştır. Aynı araştırma sonucunda hastane enfeksiyonu etkeni olarak soyutlanan 27.200 fungal patojenin 19.621 (%72,1)'ini kandida türlerinin oluşturduğu saptanmıştır. Kandida türleri arasında *C. albicans* (%76) büyük oranla ilk sırada yer alırken, daha az sıklıkla *C. tropicalis*'in (%7), *C. parapsilosis* (%2,5) ve diğer türlerin etken olarak izole edildiği bildirilmiştir (121). Bu araştırmanın sonuçlarının yayımlanmasını takip eden dönemlerde kandida türlerinin tüm HE arasındaki oranları artmaya devam ederken, *C. albicans*'ın kandida türleri arasındaki sıklığı azalmış, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* başta olmak üzere *albicans*-dışı kandida türlerinin oranları artış göstermiştir. Tayvan'da yapılan bir çalışmada 1981'den 1993'e kadar geçen sürede nozokomiyal kandidemilerin görülme sıklığının 27 kat arttığı bildirilmiştir (68).

Günümüzde kandida enfeksiyonları özellikle YBÜ'nde tedavi gören hastalarda mortalitesi yüksek enfeksiyonlara neden olmaktadır (54). Örneğin 1992 yılında 17 Avrupa ülkesini içeren bir çalışmada, 1417 YBÜ'nde saptanan invaziv kandida enfeksiyonlarının tüm nozokomiyal enfeksiyonların %17'sini oluşturduğu saptanmıştır (2). Ülkemizde yapılan çalışmalarda da kandida türlerine bağlı HE özellikle YBÜ'lerinde en sık görülen enfeksiyonlar arasında bildirilmektedir (4,17,100). Bayram ve ark. (17) Cerrahi YBÜ'ndeki

hastane enfeksiyonu etkenleri arasında kandida türlerini %15'lik oran ile ikinci sık etken olarak bildirmişlerdir.

Hastanemizde, Hastane Enfeksiyon Kontrol Komitesi (HEKK) aktif sürveyans ekibinin çalışmaları kapsamında 2007 yılı genel değerlendirme raporuna göre bir yıllık dönem içinde YBÜ'lerinde toplam 421 hastane enfeksiyonu epizotu tespit edilmiş, en sık hastane enfeksiyonu etkenleri sırasıyla *Acinetobacter spp.* 87 (%20,7), KNS 57 (%13,5), *Candida spp.* 52 (%12,4), *E.coli* 51 (%12,1), *Pseudomonans spp.* 49 (%11,6) ve *Enterococcus spp.* 36 (%8,6) olarak saptanmıştır. Aynı raporda YBÜ'leri genelinde kandida türlerinin NKDE arasında üçüncü sırada, NÜSE etkenleri arasında *E.coli*'den sonra ikinci sırada yer aldığı, NKDE'nin %14,0 (30/214)'ünden ve NÜSE'nin ise %22,4 (17/76)'ünden sorumlu oldukları belirlenmiştir. Aynı raporda hastane enfeksiyonu etkeni olarak soyutlanan 52 kandida türünün enfeksiyon bölgelerine göre dağılımları ise sıklık sırasına göre NKDE 30 (%57,7), NÜSE 17 (%32,7), pnömoni 4 (%7,7) ve cerrahi alan enfeksiyonu 1 (%1,9) olarak bildirilmiştir (yayımlanmamış rapor).

Çalışmamızı yürüttüğümüz dönemde hastane enfeksiyonu etkeni olarak tanımladığımız 57 türün enfeksiyon bölgelerine göre dağılımları HEKK raporuna benzer şekilde NKDE 26 (%45,6), NÜSE 24 (%42,1), kateter enfeksiyonu 4 (%7,0), deri ve yumuşak doku enfeksiyonu 2 (%3,5) ve pnömoni 1 (%1,8) olarak saptanmıştır.

Kandida türlerinin neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarının %95'inden fazlasından sorumlu olan beş tür; *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. krusei*'dir (113). Tüm dünyada kandidemilerden en sık izole edilen tür *C. albicans*'tır (113). Bazı çalışmalarda *C. parapsilosis* en sık görülen etken olarak raporlanmaktadır (30,73). *Candida glabrata* Kuzey Amerika'da, Fransa ve Norveç gibi Avrupa ülkelerinden bildirilen bazı yayınlarda KDE etkeni kandida türleri içinde ikinci sıraya yükselmiştir ve etkenler içinde % 20-24 oranlarında raporlanmaktadır (102,113). Nedeni çok iyi bilinmemekle beraber Güney Amerika ülkelerinde *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* 2. ve 3. sıralarda yer alırken *C. glabrata* daha

az sıklıkta görülmektedir (9,73). Çalışmamız süresince 26 nozokomiyal kandida nedeni KDE epizotu tespit edilmiş, sorumlu etkenler sıklık sırasına göre *C. parapsilosis* 10 (%38,5), *C. tropicalis* 8 (%30,8), *C. albicans* 7 (%26,9) olarak belirlenmiş ve bir tür (%3,8) inkomplet olarak tanımlanmıştır (*C. lusitaniae* veya *C. intermedia*). Araştırma süresi içinde *C. glabrata* ve *C. krusei* türlerinin etken olduğu NKDE saptayamamış olmamız, HEKK kararları gereği hastanemizde profilaktik flukonazol kullanımının çok kısıtlı tutulmasına bağlı olabilir.

Çalışma sonucunda kandida türlerinin neden olduğu hastane enfeksiyonu etkenleri arasında *C. albicans* ilk sırada olmasına karşın, NKDE söz konusu olduğunda *albicans*-dışı kandida türlerinin daha sık etken olduğu görülmüştür. Hastanemizde toplam 10 farklı serviste fungal NKDE tespit edilmiştir. NKDE'nin % 42,3 (11/26)'ü, yani yarısına yakını Genel Cerrahi YBÜ hastalarında saptanmıştır. Yine *C. parapsilosis* nedeni toplam 10 NKDE'nin %50'si Genel Cerrahi YBÜ'nde yatan hastalarda ortaya çıkmıştır. Söz konusu beş *C. parapsilosis* suşunun dördü aynı dönemde YBÜ'nde yatan hastalardan soyutlanmıştır. Bu türlerin klonal ilişkisini araştırmak için moleküler epidemiyolojik çalışmalara gereksinim vardır. Genel Cerrahi YBÜ'nde kandida enfeksiyonlarının yüksek oranlarda olması bu serviste mide, kolon, pankreas kanseri vb. patolojiler nedeni ile ameliyat edilen ileri yaş grubu hastaların oranının yüksek olması ile ilgili olabilir. Uzun süreli YBÜ tedavisi gereksinimi, çoğul invaziv girişimlere maruz kalmaları, yoğun antibiyotik kullanılması, TPN (total parenteral nütrisyon) uygulaması vb. faktörler bu hastalarda fungal NKDE'nin daha sık ortaya çıkmasının başlıca nedenleri olarak düşünülebilir.

Dünya genelinde olduğu gibi hastanemizde kandida türlerinin en sık neden olduğu enfeksiyon alanlarından biri de üriner sistemdir. Tüm NÜSE'nin %10-15'inde kandida türleri etken olarak soyutlanmaktadır (61). Üriner sistem örneklerinde *C. albicans* başta olmak üzere *C. glabrata*, *C. tropicalis* gibi kandida türlerinin sık olarak soyutlandığı *C. parapsilosis*'in ise seyrek olarak izole edildiği bildirilmektedir (23,26,28,36,50,61,68,82,86). Çalışmamızda kandidaların etken olduğu NÜSE, NKDE'nı takiben ikinci sırada yer almıştır.

NÜSE etkeni olarak en sık soyutlanan patojenler *C. albicans* 12 (%50,0), *C. glabrata* 7 (%29,2) ve *C. tropicalis* 4 (%16,7) olup üriner sistem izolatlarının yedisi CDC kriterlerine göre SÜSE etkeni olarak tanımlanmış, 17 izolat ise nozokomiyal kandidüri olarak değerlendirilmiştir. Hastanemizde ortaya çıkan NÜSE'nde tür dağılımı dünya genelindeki verilere benzerlik göstermektedir, kolonizasyonu olan riskli hastalarda invaziv enfeksiyon gelişme olasılığı yüksek olduğundan (3) bu hastaların takibi önem arz etmektedir.

Kandida türlerinin yatan hastalarda sıklıkla solunum yolu kolonizasyona neden olması nedeniyle nozokomiyal pnömoni (NPNEU)'lerin gerçek insidansının saptanması ancak postmortem dönemde otopsi çalışmaları ile mümkün olabilmektedir (59). *Candida albicans* tüm NPNEU olgularının %40-70'inde etkindir, bunu sırasıyla *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* izlemektedir (118). Hastanemizde HEKK 2007 yılı raporunda NPNEU'ler tüm HE arasında (%14,5) ve kandida türlerinin etken olduğu HE arasında (%7,7) 3. sık enfeksiyon tipi olarak belirtilmiştir. Aynı raporda tüm NPNEU'erin %6,6 (4/61)'sından kandida türleri sorumlu olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda yedi hastanın solunum yolları örneklerinden sekiz kandida türü izole edilmiştir. CDC kriterlerine göre altı *C. albicans* ve bir *C. glabrata* türü kolonizasyon, bir *C. tropicalis* türü ise NPNEU olarak değerlendirilmiştir.

Kandida enfeksiyonları sıklıkla endojen kaynaklıdır (62). Hastanede yatan düşkün hastalarda ortaya çıkan mukozal kolonizasyon ve/veya yüzeysel kandidozlar sistemik enfeksiyonlara kaynak oluşturabilirler. On günden fazla sürede hastanede yatan ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanan hastalarda %80 oranında mukoza kolonizasyonu görülebilmekte, bu oran sağlıklı kişilerde %2-37 arasında değişmektedir. Söz konusu bölgelerden kandida izolasyonu enfeksiyonu göstermemekte, ancak kandida türlerinin mukoza yüzeylerine aderensi ve kalıcılığı kandidoz gelişmesi için başlangıç evresini oluşturmaktadır. Kolonizasyon suşları ile kandidemi yapan suşların genomik düzeyde aynı olduğunu gösteren çalışmalar vardır (62). Pittet ve ark. (93) tarafından geliştirilen kolonizasyon indeksi (kandida üremesi olan anatomik bölge sayısı / kültür alınan anatomik bölge sayısı), kolonizasyon ile

enfeksiyonun ayırımında cerrahi girişim uygulanmış kritik hastalarda yararlı bulunmuştur.

Çalışmamızda 17 hastanın üriner sisteminde (ASK) ve 13 hastanın diğer vücut bölgelerinde (solunum yolları, vasküler kateter ve yara) kandida kolonizasyonu tanımlandı. İzole ettiğimiz toplam 77 suşun 33 (%42,9)'ü kolonizasyon olarak değerlendirildi. Çalışmamız sırasında takip ettiğimiz 60 hastanın 30 (%50,0)'unun bir veya birden fazla kandida türü ile kolonize olduğu saptandı. Bu hastaların büyük çoğunluğunda kolonizasyon oluşmasında en önemli risk faktörleri olarak bilinen YBÜ'nde bulunma %76,6 (23/30) invaziv girişim uygulanması ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı gibi predizpozisyon oluşturan risk faktörleri vardı.

İnvaziv kandida enfeksiyonlarının önlenmesi ve uygun tedavisi için laboratuvarın tür düzeyinde hızlı ve doğru tanımlamasına ihtiyaç vardır. Germ tüp testi bu amaçla hastanelerde mayaların identifikasyonunda en sık ve ilk basamakta kullanılmaktadır. Lo ve ark. (68) germ tüp testinin sensitivite ve spesifitesini sırasıyla %95 (230/242) ve %98,6 (411/417) olarak bulmuşlardır. *Candida albicans* suşlarında germ tüp pozitifliği % 95-97 olarak bildirilmektedir (67). Lee ve ark. (66) *C. albicans* suşlarının en iyi germ tüp oluşumunun serumda 37°C'de, serum içermeyen YEPD besiyerinde ise 39°C'de olduğunu, ısı ile germ tüp oluşumunun indüklendiği serumsuz besiyerinde sensitivite ve spesifitenin %100'e ulaştığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda test ettiğimiz 35 *C. albicans* suşunun tamamı germ tüp oluşturdu. Farklı hasta serumlarının randomize olarak kullanıldığı ilk testlerde beş (%14,3) *C. albicans* suşu germ tüp negatif olarak değerlendirildi. İlk değerlendirme sonucunda %85,7 olarak saptanan test duyarlılığı pozitif kontrol suşları kullanıldığında %100 olarak saptandı.

Yücesoy ve ark. (122) insan serumu kullandıkları çalışmalarında 111 *C. albicans* suşundan sadece 88 (%79,3)'ünde germ tüp testinin pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar saptadıkları düşük duyarlılık oranının çalışmada insan serumu kullanmalarına veya izolatların çoğunun immün baskılanmış ya da antifungal tedavi altındaki hastalardan soyutlanmış olmasına bağlı olabileceğini bildirmişlerdir. Germ tüp oluşumunu üzerine çok

çeşitli faktörlerin etkili olabildiği dikkate alındığında, özellikle de insan serumu kullanıldığı durumlarda testte kullanılan serumların pozitif kontrol suşları ile birlikte işleme tabi tutulmasının, ayrıca değerlendirilmesi kolay duyarlılık ve seçiciliği yüksek olan CAC besiyeri kullanılarak, kolonilerin renk değişimi ve görünümüne göre, test sonuçlarının doğrulanmasının yanlış negatif sonuçların en aza indirgenmesine yardımcı olacağı kanısındayız.

Candida dubliniensis germ tüp testi pozitif olan diğer bir kandida türüdür. Leigh ve ark. (27) *C. dubliniensis* suşlarında tavşan serumunda germ tüp oluşturma oranını %98 (40/41) olarak bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *C. albicans* türlerinin tanımlanmasında kullanılmak üzere tasarlanmış "Germ Tube Solution" (GTS; Remel, Lenexa, KS)'un *C. albicans* suşlarında tavşan serumu ile benzer sonuçları verdiği halde, 41 *C. dubliniensis* suşunun hiçbirisinin 3. saat sonunda GTS solüsyonunda germ tüp oluşturmadığı, süre üç saatten daha fazla uzatıldığında ise sadece üç izolatta kısa ve az sayıda germ tüp oluştuğu gözlenmiş ve sonuçta *C. dubliniensis* suşlarının germ tüp oluşturma özelliğinin GTS ile test edilemeyeceği sonucuna varmışlardır.

C. tropicalis türleri germ tüp benzeri psödohipler oluşturabilir, fakat bu borucuğun maya hücresinden çıktığı yerde *C. albicans* germ tüpünde görülmeyen bir daralma görülür (120). Bu yüzden *C. tropicalis* suşlarında germ tüp testi yalancı pozitif olarak değerlendirilebilmektedir (68).

Candida albicans ve *C. dubliniensis*'i hızlı tanımlamak için kullanılan diğer bir yöntem de değişik besiyerlerinde klamidospore oluşumunun araştırılmasıdır (8,107,112).

Tintelnot ve ark. (107) Tween 80 içeren agar kullanarak toplam 170 *C. dubliniensis* ve *C. albicans* suşunda klamidospore oluşumunu araştırmışlardır. Çalışmada *C. albicans* suşlarından % 2,6 (3/117)'sının klamidospore oluşturmadığı, buna karşılık *C. albicans* suşlarının % 24,8 (29/117)'i ile *C. dubliniensis* suşlarının %86,8 (46/53)'inin bol miktarda, ikili veya üçlü kümeler şeklinde klamidospore yaparken, *C. albicans* suşlarının %72,6 (85/117)'sının ve *C. dubliniensis* suşlarının ise %13,2 (7/53)'sinin uzun hiflerin ucunda tekli klamidospore oluşturduğunu bildirmişlerdir. Sonuçta kümeler halinde ikili veya üçlü klamidospore oluşturma özelliğinin

C. dubliniensis'te daha sık görüldüğü ancak türe özgü olmadığı, dolayısıyla bu yöntemle *C. albicans* ile *C. dubliniensis*'in ayrımının mümkün olmayacağı kanısına varmışlardır.

Lee ve ark. (66) *C. albicans* suşlarının klamidospore oluşturma testinin duyarlılık ve seçiciliğini sırasıyla %96,2 ve %99,0 olarak bildirmişlerdir. Alves ve ark. tarafından (8) *C. dubliniensis* ve *C. albicans* ayrımında farklı besiyerlerinde klamidospore oluşturma özellikleri araştırılmıştır. Bu araştırmacılar tomato juice agar (V8 agar)'da 26 *C. dubliniensis* izolatının tamamının klamidospore oluşturduğunu, buna karşılık 93 *C. albicans* suşunun %92,5'inin klamidospore oluşturmadığını bildirmişlerdir. Khan ve ark. (55) Sunflower seed husk agar'da 40 *C. dubliniensis* izolatının tamamının klamidospore oluşturduğunu, ancak *C. albicans* suşlarının %96,2'sinin klamidospore oluşturmadığını rapor ettiler. Aynı amaçla tobacco agar, casein agar, staib agar ve caffeic acid-ferric citrate agar gibi besiyerlerinin kullanıldığı çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır (6,7,56,112)

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz *C. albicans* ve *C. dubliniensis* suşlarının tümünün klamidospore oluşturduğu gözlemlendi. *Candida dubliniensis* standart suşu ve *C. albicans* suşlarının bazıları bol ve ikili klamidospore oluşturdu. Bu nedenle literatürde bildirildiği gibi (107) bu özelliğin tür identifikasyonu için yeterli olmadığı belirlendi. Klamidospore oluşumunun değerlendirilmesinin zaman alıcı olmasının yanı sıra negatiflik saptanan durumlarda yapılan tekrarlı değerlendirmelerde klamidospore oluşumunun gözlemlenmesi gibi paradoks bir durum da ortaya çıkabilmektedir. Çalışmamızda MU-Tw80 agarda üreme özelliklerinin değerlendirilmesi yolu ile inkomplet olarak tanımlanan kandida suşu dışındaki dört türü birbirinden ayırt edebilmemiz mümkün oldu. Ancak nadir görülen türlerle karşılaşıldığında veya daha geniş tür çeşitliliği olduğunda türlerin birbirinden ayırt edilmesinde sorunlarla karşılaşılabilineceğini düşünüyoruz.

Candida dubliniensis'in *C. albicans*'tan ayırt edilmesinde tanımlanan diğer yöntemler arasında 42°C ve 45°C'lerde üreme, metil blue SDA'da üreme özellikleri, Staib agarda koloni morfolojisi, intrasellüler b-D-glukozidaz aktivitesi, biyokimyasal özelliklerin araştırıldığı çeşitli testler ve çeşitli

moleküler yöntemler bulunmaktadır. *C. dubliniensis* suşlarının 42°C'de zayıf da olsa üreyebildiği bilinmektedir. Pinjon ve ark. (92) 120 *C. dubliniensis* ve 98 *C. albicans* suşu ile yaptıkları çalışmada 10 *C. dubliniensis* suşunun (%8,3) 42°C'de ürediğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada *C. dubliniensis* ve *C. albicans* türlerinin ayırımında en uygun ısının 45°C olduğunu bildirilmiştir. Esen ve ark. ise (33) "Metil Blue SDA" besiyerinin 45°C'de üreme testine göre daha iyi sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız 35 *C. albicans* suşunun tamamı 45°C'de üremiş ve pozitif kontrol amaçlı kullandığımız *C. dubliniensis* suşu ürememiştir.

Pincus ve ark. (91) *C. dubliniensis* ve *C. albicans* türlerinin ayırımında karşılaştırdıkları ticari sistemlerden API 20C AUX ve ID 32C sistemlerinde veritabanı değişikliği ile daha güvenilir sonuçlar verilebileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda ID 32C ile test ettiğimiz *C. dubliniensis* suşu 24. ve 72. saatlerde *C. albicans*, 48. saatte ise *C. dubliniensis* olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle biyokimyasal özellikleri birbirine benzeyen bu iki türün birbirinden ayrılmasında ticari kitlerin yetersiz kalabileceğinin hatırdta tutulması uygun olacaktır.

Tintelnot ve ark. (107) ID 32C asimilasyon testlerinin, CAC besiyerinde koyu yeşil pigment yapımının, klamidospore oluşturma ve beta-D glukozidaz aktivitesinin araştırılmasının *C. dubliniensis* suşlarının *C. albicans* suşlarından ayrılmasında bazı durumlarda yetersiz kalabileceğini bildirmektedirler. Tüm bu bilgiler ışığında *C. albicans*'a göre azol dirençli olma olasılığı daha yüksek olan *C. dubliniensis* suşlarının identifikasyonunda en güvenilir sonuçların altın standart yöntem olarak kabul edilen moleküler çalışmalar ile elde edildiği söylenebilir (76).

CHROMagar *Candida* (CAC) hazır besiyeri öncelikle *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* türlerinin diğer türlerden ayırt edilmesi için tasarlanmıştır. Birçok araştırmada bu üç türün tanımlanmasında duyarlılığı %94-100, özgüllüğü ise %99-100 arasında bulunmuştur (79,110). İzole ettiğimiz 35 *C. albicans* suşunun tümü CAC besiyerinde 24-48 saatte parlak yeşil koloniler oluşturdular. Bu görünüme diğer hiçbir türde rastlanmadı ve

14 *C. tropicalis* suşunun hepsi CAC besiyerinde parlak çelik mavi koloniler oluşturdular. Bu görünüm de diğer hiçbir türde gözlenmedi.

Nadir görülen *albicans*-dışı kandida suşlarının hasta örneklerinde daha sık karşımıza çıkmaya başlaması *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* suşlarının etken olduğu kandidemilerin artması, söz konusu suşların tanımlanmasında CAC besiyerinin performansının sorgulanmasına neden olmuş ve bazı araştırmacılar söz konusu besiyerinin etkinliğinin ortaya konmasına yönelik çeşitli çalışmalar yapmışlardır (46,81). Pfaller ve ark. (89) CAC besiyeri ile *C. glabrata*'yı tanımlamada güvenilir sonuçlar elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bununla birlikte bazı araştırmacılar, daha az soyutlanan bazı türlerin ayırımında güçlükler yaşandığı konusunda bildirimde bulunmuşlardır (110).

Hospenthal ve ark. (46) 180 *albicans*-dışı kandida türünü (*C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. firmetaria*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefir*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. parapsilosis* ve *C. rugosa*) tanımlamada CAC besiyerinin etkinliğini araştırmışlardır. Bu çalışmada *C. dubliniensis* izolatlarının *C. albicans* türlerinden tam olarak ayırt edememişler ve bunu stoklardan canlandırılan suşların kullanılması ile stoklama koşullarının pigment oluşumu üzerine olan olası olumsuz etkilerine bağlamışlar. Diğer taraftan aynı çalışmada *C. dubliniensis* ve *C. albicans* izolatlarının direkt klinik örneklerden ve stok suşlardan CAC besiyerlerine yapılan pasajlardan identifikasyonunun farklı araştırmacılar tarafından yapılabildiği de bildirilmektedir (46). Bu iki tür için en iyi ayırım inkübasyon süresi 72 saate uzatıldığında mümkün olmakta, bu durum ise tanıda gecikmelere neden olabilmektedir. Yukarıda da bahsedildiği gibi çeşitli koşullar pigment oluşumunu etkileyebildiğinden şüpheli kolonilerin görüldüğü durumlarda tanı diğer yöntemler ile konfirme edilmelidir. Çalışmamız süresince takip ettiğimiz hastalara ait örneklerde *C. dubliniensis* suşuna rastlanmamıştır.

Pfaller ve ark. (89) *C. norvegensis* suşlarının *C. krusei* suşlarından tam olarak ayırt edilemeyebileceğini, Hospenthal ve ark. ise (46) birer *C. lipolytica*, *C. norvegensis* izolatları ile *C. firmetaria* kolonilerinin çoğu ve *C. inconspicua* kolonilerinin tamamının *C. krusei*'den makroskopik olarak

ayırt edilemeyen koloniler oluşturduklarını rapor ettiler. Çalışmamız süresince hastanemiz izolatları arasında *C. krusei* türüne rastlanmamıştır. Ancak nadir de olsa hastanemizde bu türün neden olduğu enfeksiyonlar ortaya çıkmaktadır. Deneyimlerimize ve her iki araştırma sonuçlarına bakıldığında *C. krusei* suşları ile karıştırılabilen diğer türlerin daha az sıklıkta görülmeleri nedeni ile CAC besiyerinden soyutlanan bu tip koloniler öncelikle *C. krusei* olarak değerlendirilmeli ve tedavi ona göre düzenlenmelidir. Laboratuvarlar tanıyı diğer yöntemlerle doğrulamalıdır.

Hospenthal ve ark. (46) zamanla koyu menekşe rengine (dark violet) dönüşen pembe mor koloniler oluşturan tüm *C. glabrata* suşlarının diğer türlerden kolaylıkla ayırt edilebildiğini ve amfoterisin B'ye azalmış duyarlılık gösterebilen 15 *C. rugosa* izolatının 12'sinin koloni görünümününün *C. krusei* gibi olduğunu, ancak açık mavi-yeşilimsi özgün renk farklılığı ile diğer türlerden ve *C. krusei*'den kolaylıkla ayırt edilebildiğini bildirdiler.

Sürveyans çalışması yapılan dönem içinde yedi adedi idrar, birer adedi de aspirasyon kateter ucu, apse ve yara kültüründen soyutlanan toplam 10 (%13,0) *C. glabrata* suşunun tamamı CAC besiyeri ile doğru olarak tanımlanmış ve sonuçlar gerek ticari kitlerle (API) gerekse moleküler yöntemlerle doğrulanmıştır. Sekiz tür saf olarak izole edilirken, yara kültüründen izole edilen suş *C. albicans* ve *C. parapsilosis* ile beraber, aspirasyon kateter ucu kültüründen izole edilen suş ise *C. albicans* ile birlikte polimikrobiyal üreme gösteriyordu. Bu bulgu CAC besiyerinin *C. glabrata* suşlarını gerek saf gerekse çoklu üremelerin bir parçası olduğunda tanımlayabildiğini ortaya koyması bakımından önemlidir.

Nadir izole edilen diğer kandida türlerinin çoğu ve *C. parapsilosis* türleri CAC besiyerinde konveks, krem gibi, pembenin çeşitli tonlarından, açık mora ve fildişi rengine değişebilen renklerde birbirinden ayırt edilemeyen koloniler oluşturmaktadırlar. Aynı türün tekrarlanan pasajlarında dahi birbirinden farklı görünümeler ortaya çıkabilmektedir. Bazı çalışmalarda CAC besiyerinin *C. parapsilosis* türlerinin identifikasyonunda kullanılabileceği bildirilse de bu türlerin olası etken olduğunun düşünüldüğü durumlarda sonuçların mutlaka diğer konvansiyonel yöntemler, hazır ticari identifikasyon

kitleri ve gerekirse moleküler yöntemlerle doğrulanması gerekmektedir (46).

Tüm izolatlarımızın %76,6 (59/77)'sını oluşturan *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* suşlarının tamamı CAC besiyeri kullanılarak tanımlandı. Diğer suşların koloni ve renk görünüşleri *C. krusei* ile uyumlu bulunmadı. En sık enfeksiyon etkeni olan diğer dört tür ekarte edildiğinde geriye kalan pembe-beyaz koloniler oluşturan %23,4 (18/77)'lük kısmı çok büyük olasılıkla *C. parapsilosis* olarak değerlendirilebilir. Ancak diğer nadir görülen türlerden tam olarak ayırımını yapamadığımızdan sonuçlarımızı ileri tanı yöntemleriyle konfirme ettik. Nitekim API ve moleküler yöntemler kullanılarak CAC besiyerinde fildişi renginde ve nispeten daha küçük koloniler oluşturan bir suş *C. intermedia* veya *C. lusitaniae* şeklinde inkomplet olarak tanımlanırken diğer 17 tür ise *C. parapsilosis* olarak doğrulanmıştır.

Çoklu etkene bağlı kandidemi sıklığı bir çalışmada %3,3 (14/427) olarak bildirilmiştir (78). Yapılan birçok retrospektif çalışma sonucuna göre kandida enfeksiyonlarının yaklaşık %4-10'unda birden fazla maya türünün enfeksiyona eşlik ettiği görülmüştür ve prospektif çalışmalarla bu oranın daha da artabileceği öne sürülmektedir (89,99,110). Karışık enfeksiyonlarda uygulanan antifungal tedavinin etken maya türlerine etkili olması hayati önem taşımaktadır. Çalışmadan elde ettiğimiz deneyimlere göre klinik örneklerin direkt mikroskopik incelemesinde veya üreme olan kan kültürü şişelerinden yapılan gram boyamalarda maya hücreleri görülmesi durumunda kanlı agar, Eozin metilen-blue agar ve diğer besiyerleri yanında SDA ve CAC besiyerlerine de ekimler yapılması, 24 saat veya 48 saatlik inkübasyonun sonunda kültürlerin değerlendirilerek karışık enfeksiyon varlığı ya da flukonazole daha az duyarlı kandida türlerinin varlığının belirlenmesine çalışılması en rasyonel davranıştır. CAC besiyerinin bu amaçla tarama testi şeklinde kullanımı kabul görmüştür (110).

Çalışmamızda üç klinik örnekte polimikrobiyal üreme olmuş, tümü CAC besiyeri ile tanımlanmıştır. Sabouraud-dextrose agar ve diğer besiyerlerinde koloni morfolojileri birbirine benzediği için ayırt edilemeyen *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis*'in etken olduğu örneklerin üçünde de *C. albicans* polimikrobiyal üremenin bir elemanı olarak

soyutlanmıştır. Bu nedenle her üç kültürdeki üremelerin değerlendirilmesi sadece germ tüp testi ile yapılması durumunda *C. albicans* suşunun tüm çoklu enfeksiyon örneklerinde yer almasından dolayı germ tüp testinin pozitif olarak değerlendirilebileceği ve *albicans*-dışı diğer türlerin tespit edilmesinin mümkün olamayacağı hatırdta tutulmalıdır.

Bindokuzyüzaltmışlı yıllarda yalnızca beş kandida türü olduğu düşünülürken, günümüzde patojen olduğu bilinen en az 17 kandida türünün varlığı ortaya konmuştur (42,52,116). Kandida türlerinin tanımlanmasında mikroskopik morfolojik özelliklerin incelenmesi ve substrat asimilasyonunun değerlendirilmesine dayanan metotlar zaman gerektiren ve iş yükünü arttıran yöntemlerdir. Bu nedenle 4-72 saat içinde sonuç veren, uygulaması daha kolay olan çeşitli ticari sistemler geliştirilmiştir (52). ID 32C API sistemi 63 maya türünü güvenilir bir şekilde tanımlayabildiği için çoğu araştırmacı bu sistemi standart sistem olarak kullanmışlardır. Bununla beraber bu yöntemlerin tanıda yetersiz kaldığı durumlar olabilmektedir (52).

Fujita ve ark. (37) API 20C kitinin inkomplet identifikasyon oranını %6,8 olarak bulmuşlar ve diğer araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda *C. albicans*, *C. tropicalis*, ve *C. glabrata* kökenlerinde olmak üzere inkomplet identifikasyon oranının %5-10 olarak raporlandığını bildirmişlerdir. Thanos ve ark. (106) ise bazı *C. albicans*, *C. guilliermondii*, ve *C. parapsilosis* izolatlarını ID 32C sistemi ile doğru olarak identifiye edemediklerini, bunun ancak DNA fingerprinting yöntemiyle mümkün olduğunu raporladılar. Lo ve ark. (68) kandida suşlarının tanımlanmasında kullanılan biyokimyasal testlerden VITEK Yeast Biochemical Card ve ID 32C API testlerinin duyarlılıklarını sırasıyla % 92,6 (412/445) ve % 98,3 (59/60) olarak açıkladılar. Buna karşılık Verweij ve ark. (111) yedi ayrı ticari sistemi karşılaştırdıkları çalışmalarında yöntemler arasında %7,7-40,4 arası değişen oranlarda farklı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Kaçmaz ve ark. (52) ID 32C API ile Rapid Yeast Plus (RYP) sistemini karşılaştırdıkları çalışmalarında her iki sistem ile 100 suştan 92'sini doğru ve aynı tür olarak tiplendirmişlerdir. Bu araştırmacılar ID 32C'nin inkübasyondan 24-48 saat, RYP sisteminin ise inkübasyondan 4-5 saat sonra sonuç

vermesinden dolayı aynı gün içerisinde dört saat gibi kısa sürede tanımlama yapabilen RYP sisteminin hızlı tanıma kullanılabileceğini bildirilmişlerdir. Kandida türlerinin ileri derecede fenotipik varyasyon göstermeleri nedeniyle ticari sistemlerle eksik tanımlanan veya hiç tanımlanamayan suşlar için ek tanımlama yöntemlerine başvurulması önerilmektedir (52).

Çalışmamızda 45 kandida türü ID 32C API test kiti ile tanımlanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçları moleküler test sonuçları ile karşılaştırdığımızda API ID 32C'nin duyarlılığını 24. saatte %72,9 (35/48), 48. saatte %95,8 (46/48) ve 72. saatte % 87,5 (42/48) olarak bulunmuştur. Bir *C. tropicalis* suşunun doğru tanımlamasını 48. saatte ikinci seçenek olarak vermesi, bir türü inkomplet olarak (*C. lusitaniae* veya *C. intermedia*) tanımlaması, *C. dubliniensis* standart suşunu ise 48. saatte doğru tanımlarken 24. ve 72. saatlerde *C. albicans* olarak tanımlaması sistemin eksik yönlerine örnek olarak gösterilebilir. *Candida tropicalis* suşlarının çoğunda ilk seçenek olarak tanımlama yapmasına rağmen düşük düzeyli tanımlamalara da (low discrimination, acceptable identification, identification of the genus vb.) rastlanabilmektedir. Çalışma sonuçlarımıza göre *C. tropicalis* suşlarının tanımlanmasında CAC besiyerinin duyarlılığı ID 32C API testinden yüksek bulunmuştur. Ayrıca *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* suşlarının tamamı ve randomize olarak seçilen *C. albicans* suşları ID 32C API ile yüksek tanımlama dereceleri ile doğru olarak tanımlanmıştır.

Virülans kandida izolatlarında türlere göre farklılıklar göstermektedir. En fazla virülan tür olan *C. albicans*'ı *C. tropicalis* izlemektedir. Kandida türlerinin etken olduğu enfeksiyonlarda mortalite oranlarının yüksek olması ve flukonazole yapısal olarak dirençli *albicans*-dışı kandida türlerinin neden olduğu kandidemilerin artışı maya türlerinin hızlı ve doğru tanımlanmasının önemini daha da arttırmıştır (37). Söz konusu patojenlerin 4 ile 72 saat içinde identifikasyonuna olanak sağlayan değişik ticari sistemler geliştirilmiştir. Ancak söz konusu yöntemlerin özellikle yeni ve yeniden önem kazanan maya türlerinin test edilmesinde yetersiz kaldığı ya da hatalı identifikasyonlara neden olduğu bildirilmektedir. Diğer taraftan klinik materyallerden kandida türlerinin kültür bazlı yöntemlerle fenotipik olarak identifikasyonu için saf

kültürlerin elde edilmesi gerekmekte ve bunun için ise en az bir günlük süreye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle kandida türlerinin hızlı tanı ve identifikasyonuna yönelik olarak PCR bazlı metotlar tanımlanmıştır. Bunlar arasında yaygın uygulama alanı bulan RFLP, PCR-RFLP, türe spesifik problemlerle PCR ve RAPD analizleri sayılabilir (37).

Turenne ve ark. (108) klinik olarak önem arzeden mantarların hızlı identifikasyonunda fungusların ITS2 bölgelerinin büyüklük farklılıklarının ortaya konmasının yararlı olabileceğini bildirdiler. Ancak sık karşılaşılan ve antifungal tedavi seçenekleri farklı olan *C. albicans* ve *C. krusei* ITS2 amplicon uzunluklarının arasında sadece 3 bp.'lik fark vardı. Fujita ve ark. ise (37) toplam 120 fungal türün hem ITS1 hem de ITS2 bölgelerini multipleks PCR ile çoğaltarak 30 maya türüne ait 29 farklı jel paterni tanımladılar. Bununla birlikte bu yöntem *Trichosporon* cinsine ait iki farklı tür ile *C. albicans* ve *C. dubliniensis* türlerini birbirinden ayırt edememektedir.

Fujita ve ark. (37) hem kültürdeki kolonilerden (40 dakika), hem de maya pozitif kan kültür şişelerinden DNA izolasyonu (1 saat) ile multipleks PCR'ın başarılı bir şekilde uygulanabildiğini açıkladılar. Aynı çalışmada karışık florası olan klinik örneklerden fungusların direkt tanısında sorunlar yaşanması nedeni ile söz konusu yöntemin kullanım alanının agar plakları üzerindeki kültür kolonileriyle sınırlı kalabileceği bildirilmiştir.

Çalışmamızda Fujita ve ark. (37) kullandıkları yöntemi örnek olarak, klasik yöntemlerle yaptığımız fenotipik tür tanımlamalarını moleküler yöntemlerle doğrulamayı amaçladık. Farklı olarak klinik örneklerden doğrudan tür tanımlaması yapmadan kültürlerdeki saf kolonilerden çalıştık ve amplifikasyon ürünlerini PCR-ME (mikroçip elektroforez) tekniğini kullanmadan sadece PCR-AGE (agaroz jel elektroforezi) ile görüntüledik. Sonuç olarak Fujita ve ark. (37) her ne kadar 29 türü net olarak ayırt ettiklerini bildirseler de beklenen bant uzunluklarını incelediğimizde bazı türlere ait uzunlukların birbirine yakın olduğunu ve jel üzerinde de birbirine benzer görüntüler oluştuğunu gözlemledik. Fenotipik olarak tanımladığımız türlerin 66 (%85,7)'sını oluşturan *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* türlerinin tek olarak yürütüldüklerinde AGE görüntüleri ile birbirinden net

olarak ayırt edilemeyebileceği sonucuna vardık. Fujita ve ark. (37) bu yöntemin bant uzunlukları arasındaki fark 10 bp. olduğunda ayırım yapabildiğini bildirmiş olmakla birlikte, *C. albicans* ve *C. tropicalis* türlerine ait bant uzunluklarının ortalamaları baz alınmayıp en düşük ve en yüksek değerlerin birlikte değerlendirilmesi durumunda uzunluk farklılığının 4-5 bp.'e düştüğü görülmektedir. *Candida parapsilosis* bant uzunluklarının diğer türlerden uzunluk farklılığı 10 bp.'den büyük olmasına rağmen beklenen uzunluk değerleri *C. tropicalis* ve *C. krusei*'ye yakındı. Bant uzunluklarının birbirine yakın olduğu türlerde agaroz konsantrasyonunun ayarlanmasındaki küçük hataların, jelin homojenizasyonu ve kalınlığının sonuçları etkileyebileceği düşünüldüğünde bu yöntemin sık karşılaşılan bu dört türü birbirinden ayırmada yetersiz olduğunu değerlendirdik. Söz konusu yöntemin 29 farklı fungus türü için farklı jel paternlerini tanımlaması, tanımlamada yetersiz kalınan durumlarda PCR-RFLP gibi daha ileri tanı basamaklarına geçiş olanağı sağlaması nedeni ile moleküler tür tiplendirmesinde ilk basamak olarak kullanılabilmesi kanısına vardık. On *C. glabrata* suşu bu yöntemle tam olarak tanımlanmıştır. Fujita ve ark. (37) test ettiği maya türleri arasında uzun ürün bant uzunluğu en büyük olan tür *C. glabrata* olarak bildirildi ve yalnızca uzun ürünün çoğaltılması tüm *C. glabrata* suşlarının tanımlanması için yeterli kabul edildi. Aynı yöntemle türlerden biri uzun ve kısa amplifikasyon ürünlerinin uzunluklarına göre *C. lusitaniae* veya *C. intermedia* şeklinde inkomplet olarak tanımlanmıştır. Bu iki tür diğer 31 türden ayırt edilirken birbirinden tam olarak ayırt edilememiş, sonuç olarak bu yöntemle çalışmaya dahil edilen suşların % 87,0 (67/77)'si tam olarak tanımlanamamıştır.

Biz laboratuvarımızda daha iyi tanımlamalar yapabilmek için elde ettiğimiz amplifikasyon ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesine dayalı tanımlama yöntemlerini uygulamaya karar verdik. Mirhendi ve ark. (75) uzun PCR ürünlerini *Msp I* restriksiyon enzimi ile keserek tıbbi öneme sahip altı kandida türünü ayırt edilebildiklerini bildirmişlerdir. Biz de aynı yöntemi kullanarak 77 suşun 76 (%98,7)'sini tam olarak tanımlamayı başardık. Yöntemin *C. albicans* ve *C. dubliniensis* suşlarının birbirinden ayrılmasında

yardımcı olmaması üzerine iki türün birbirinden ayrılması için Mirhendi ve arkadaşlarının (76) tanımladıkları yöntemi bazı şüpheli *C. albicans* suşlarına uyguladık. Klinik izolatlarımız arasında *C. dubliniensis* suşu olmadığını tespit ettik.

Aktif sörveyans yöntemi ile takip ettiğimiz hastalardan Genel Cerrahi YBÜ'nde dört *C. parapsilosis* türü, İç Hastalıkları YBÜ'nde yedi *C. albicans* (3 tür birbiri ile ve diğer 4 tür birbiri ile aynı dönemde) ve iki *C. tropicalis* suşu aynı dönemde yatan hastalardan soyutlanmıştır. Bu suşların klonal ilişkilerinin tespit edilmesi için karyotiplendirme, RFLP, prob hibridizasyon ve RAPD gibi moleküler epidemiyolojik çalışmaların yapılmasına gereksinim duyulmaktadır. López ve ark. (70) *C. albicans* suşları üzerinde PFGE, RAPD ve RFLP tekniklerini karşılaştırdıkları çalışmalarında söz konusu yöntemlerin üstün ve zayıf yönlerini tanımlayıp kandida epidemiyolojisi çalışmasında bu tekniklerin herbirinin yararlı olduğunu ve epidemiyolojik tiplendirme tekniklerinin kombinasyonu ile daha doğru ve kolay değerlendirilebilen sonuçlar ortaya konabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamız sırasında topladığımız epidemiyolojik sörveyans verilerinin anlam kazanabilmesinin, laboratuvarımızın moleküler epidemiyolojik araştırmaları yapılabilecek şekilde modern sistemler kurularak geliştirilmesine bağlı olduğu kanısındayız.

VI- SONUÇ ve ÖNERİLER

Candida cinsine ait türlerin neden olduğu enfeksiyonlar hastanemiz YBÜ'lerinde ortaya çıkan tüm HE (%12,4) ve NKDE'leri arasında (%14,0) üçüncü, NÜSE arasında ise (%22,4) ikinci sırada yer almaktadır (HEKK yayımlanmamış rapor). Klinik ve YBÜ ayırımı yapmadığımız çalışmamızda ve HEKK'nin 2007 raporunda saptandığı üzere kandida türlerinin etken olarak en sık izole edildiği enfeksiyon bölgeleri NKDE ve NÜSE'leridir, diğer enfeksiyonlar ise daha nadir olarak görülmektedir.

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de kandida türlerinin neden olduğu HE'nin insidansı artmaktadır ve soyutlanan türler coğrafi, bölgesel, hatta kurumsal farklılıklar gösterebilmektedir. Çalışmamızda 35 *C. albicans* (%45,5), 17 *C. parapsilosis* (%22,1), 14 *C. tropicalis* (%18,2), 10 *C. glabrata* (%13,0) ve inkomplet olarak tanımlanan bir tür (*C. lusitaniae* veya *C. intermedia*) (%1,3) olmak üzere toplam 77 kandida suşu tanımlanmıştır. Aktif sürveyans sonucunda hastane enfeksiyonu etkeni olarak değerlendirilen 57 suşun (%74,0) sayısal ve oransal dağılımları 22 *C. albicans* (%38,6), 14 *C. tropicalis* (%24,6), 13 *C. parapsilosis* (%22,8), 7 *C. glabrata* (%12,3), inkomplet olarak tanımlanan bir tür (*C. lusitaniae* veya *C. intermedia*) (%1,8) olarak saptanmıştır. *C. parapsilosis* (%38,5) ve *C. tropicalis* (%30,8) NKDE'nin, *C. albicans* (%50,0) ile *C. glabrata* (%29,2) NÜSE'nin en sık etkenleri olarak saptanmıştır. *Candida glabrata* ve *C. krusei* türlerinin etken olduğu KDE saptanmamıştır. Bu bağlamda kandidemilerin tedavisinde ilk seçenek olarak bildirilen flukonazolün (54) hastanemiz için iyi bir ampirik antifungal tedavi seçeneği oluşturabileceği kanısını edindik. Bununla birlikte çalışmamızda flukonazole karşı %5-10 oranında direnç bildirilen *C. glabrata*'nın (113) kandida nedenli NÜSE etkenleri arasında ikinci sıklıkla soyutlanmış olmasının antifungal tedavinin planlanmasında dikkate alınması gereken önemli bir bulgu olduğunu düşünüyoruz.

NKDE etkeni olarak en sık tanımladığımız tür olan *C. parapsilosis* sıklıkla sağlık çalışanlarının ellerinde kolonize olabilmekte, dolayısıyla hastane ortamında kolayca yayılabilme olanağı bulmaktadır. Bu nedenle hastanelerde bir biriminde, özellikle YBÜ'lerinde, hastane enfeksiyonu etkeni

olarak soyutlanan *C.parapsilosis* türleri sık olarak saptanıyorsa, el yıkama başta olmak üzere hastanede yürütülen enfeksiyon kontrol önlemlerine ilişkin uygulamaların etkinliğinin özenle sorgulanmasının gerekli olduğu kanısındayız.

Hastane enfeksiyonlarına neden olan türlerin dağılımında hastaların yattıkları kliniklere göre değişiklikler görülebildiği bilinmektedir. Bizim çalışmamızda da Genel Cerrahi kliniği ve YBÜ'nde *C. parapsilosis* diğer kliniklere göre daha yüksek oranda soyutlanmıştır.

Genel Cerrahi ve İç Hastalıkları YBÜ'nde aynı dönemde aynı türlerin etken olarak izole edildiği HE'nda klonal ilişkinin gösterilebilmesi ancak moleküler epidemiyolojik çalışmalarla mümkün olabilecektir. Daha önceki dönemlerde hastanemizde benzer kandida üremeleri olmuş ve izole edilen kandida türleri arasındaki genomik benzerliğin ortaya konması ancak başka bir merkezde PFGE yöntemi uygulanarak mümkün olabilmıştır. Diğer taraftan YBÜ'leri, yanık ve onkoloji servisleri gibi immün sistemi baskılanmış hastaların uzun süreli tedavi gördüğü birimleri barındıran büyük merkezler ve eğitim hastaneleri için uygulanabilir ve standardize edilmiş epidemiyolojik moleküler tanı yöntemlerinin hastane enfeksiyonu sürveyans uygulamalarının bir unsuru olarak düşünülmesinin (81) abartılı olmayacağı kanısındayız.

Hasta örneklerinden soyutladığımız toplam 77 suşun, asemptomatik kandidüriler dahil olmak üzere, 33 (%42,9)'ü kolonizasyon etkeni olarak değerlendirildi. Kolonizasyon kandida türlerinin konak mukoza yüzeylerine aderensi ve çoğalmaları olup, invazyonun başlangıç evresini oluşturmaktadır. Bu nedenle özellikle de çoğul kolonizasyonu olan kritik hastalar invaziv enfeksiyon varlığı yönünden düzenli aktif sürveyans ile izlenmeli, gerektiğinde proflaktik antifungal tedaviye başlanmalıdır. Diğer taraftan hastalarda kolonizasyon ile invaziv enfeksiyona neden olabilen suşların farklı olabileceği de unutulmamalıdır. Özellikle de invaziv kandida enfeksiyonları için risk grubunu oluşturan hastalardan tek bir enfeksiyon alanından, ya da farklı klinik örneklerden soyutlanan kandida suşlarının tür düzeyinde tanımlanmalarının tedavi ve HE kontrol önlemlerinin zamanında alınabilmesine önemli katkı sağlayacağı unutulmamalıdır.

Yukarıda vurgulandığı gibi invaziv kandida enfeksiyonlarının tanısı, sağaltımı ve etkenin hastane ortamında yayılmasının önlenmesinde mikrobiyoloji laboratuvarlarının hızlı ve doğru tanımlama yapması koşuldur. Kandida türü mayaların identifikasyonunun ilk basamağını oluşturan germ tüp testinin duyarlılığı %95-97 olarak bildirilmektedir (67,68). Deneyimlerimiz insan serumu kullanılarak yapılan germ tüp testinde yanlış negatif sonuçların en aza indirilebilmesi için test serumlarının pozitif kontrol suşları ile beraber değerlendirilmesi yönündedir.

Kandida suşlarının, MU-Tw80 agardaki üremeler değerlendirilerek tiplendirilmesi gerek işlemin yoğun emek gerektirmesi ve zaman alıcı olması gerekse duyarlılık bakımından CAC ya da ID 32C API yöntemlerine göre üstünlüğünün bulunmaması vb. dezavantajları göz önüne alındığında rutin uygulama için öncelikli bir yöntem olmadığı kanısını edindik. Bu bağlamda *C. dubliniensis* suşlarında daha sık gözlenen küme şeklinde ya da ikili veya üçlü klamidospor yapma özelliğinin türe özgül olmadığı ve tüm *C. dubliniensis* suşlarının da ikili ya da üçlü klamidospor oluşturmadıkları bildirilmiştir (107). Çalışmamızda bazı *C. albicans* suşlarının ikili klamidospor oluşturduğunu saptadık, bu nedenle *C. albicans* ile *C. dubliniensis*'in ayrımı için MU-Tw80 agarda üretme yönteminin tek başına yeterli olmadığı düşünüyoruz. Bu amaç için kolay, ucuz ve tekrarlanabilir yöntemler olan 45°C'de üreme ile CAC besiyeri kullanılmasının daha uygun olacağı sonucuna vardık.

Kandidemi tanısında genel olarak rutin laboratuvar iş akışı; germ tüp testi, MU-Tw80 agarda üretme ve API sisteminde identifikasyon sırası izlenmektedir. Bu durumda pozitif sinyal veren, ve gram boyama sonucunda maya hücresi saptanan hemokültür şişesinden SDA'ya yapılan pasajlardaki üremenin saf kültür olduğu varsayılsa bile, bir *C. albicans* suşunun tanımlanması için gereken asgari süre 48 (24+24) saati bulmaktadır, *albicans*-dışı türler söz konusu olduğunda ise tür düzeyinde tanımlama yalnızca konvansiyonel yöntemlerle yapılabilmekte, en erken 48-72 saat sonunda sonuca ulaşılabilir. Konfirmasyon için API yöntemine başvurulması durumunda ise tanımlama süresi asgari 24 saat daha

uzayabilmektedir. Bizim çalışmamızda uyguladığımız gibi üreme saptanan hemokültür şişesinden doğrudan CAC besiyerine ekim yapılması durumunda, ise SDA besiyerinde maya kolonilerin belirgin hale gelmesi için gereken süre olan 24 saat sonrasında, sıklıkla tür düzeyinde tanımlama da mümkün olabilmektedir. Yöntemin polimikrobiyal üremenin erken dönemde saptanmasına olanak sağlamak gibi bir üstünlüğü de bulunmaktadır (81). Diğer taraftan CAC besiyerinin kandidemilerin erken dönemde tanısına yönelik laboratuvar iş akışı kapsamına dahil edilmesinin API yöntemi ile identifikasyon gereksinimini azaltacağını, dolayısıyla maliyetin düşürülmesine yardımcı olacağını düşünüyoruz. CAC besiyerinin kullanılmasının antifungal seçiminin hızla yapılmasına olanak sağlaması, dolayısıyla mortalite ve morbiditenin azaltılmasına katkı sağlaması gibi çok önemli bir avantajı daha bulunmaktadır (45).

Deneyimlerimiz CAC besiyeri ile tür tayinlerinin *C. albicans* için germ tüp testinden, *C. tropicalis* için ise ID 32C API testinden daha duyarlı bir şekilde yapılabildiği yönündedir. Bu yöntemle *C. glabrata* ve *C. krusei* identifikasyonu da kolaylıkla yapılabilmektedir. Diğer taraftan CAC besiyerinde koloni renk ve morfolojik görünümüne göre tanımlanması tam olarak yapılamayan *C. parapsilosis* ile diğer kandida türlerinin identifikasyonunda ise 63 maya türünü güvenilir bir şekilde tanımladığı bildirilen (52) ID 32C API sisteminden yararlanılabileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda kandida suşlarının tür düzeyinde tanımlanmasında klasik yöntemler ile moleküler yöntemler retrospektif olarak karşılaştırılmış sonuçta; CAC besiyeri ve ID 32C API yöntemlerinin beraber kullanılması ile elde edilen sonuçların moleküler test sonuçları ile % 100 uyumlu olduğu saptanmıştır.

İnvaziv kandida enfeksiyonlarının tanısında kan kültürü yönteminin duyarlılığı %50-70 olarak bildirilmektedir (43,96). Bu nedenle genomik yükün düşük olduğu, kültür ve serolojik yöntemlerin tanıya yeterince yardımcı olmadığı enfeksiyonun erken dönemlerinde PCR temelli moleküler ve genetik tanı yöntemlerine başvurulması gerekebilmektedir. Bu durum nötropenik hastaların kan kültürü örneklerinden yapılan tanımlamalarda daha da önem

kazanmaktadır (98).

Son olarak günümüzde fungal (kandida) enfeksiyonların tanısına yönelik olarak geliştirilen moleküler ve genetik ticari sistemlerin halen araştırma aşamasında ve henüz tam anlamı ile standardize edilmemiş olduklarının göz önünde bulundurulması gerekmektedir (98). Hastanelerin, moleküler tanısal yöntemleri; olası salgınların erken tespiti ve önlenmesine, hastanede kalış süresi ve tedavi maliyetlerinin azaltılmasına olan katkılarını, özetle maliyet-etkinlik durumlarını değerlendirerek bu testlerin kullanılabilir olup olmadığına karar vermeleri gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Abelson, J.A., Moore, T., Bruckner, D., Deville, J., Nielsen, K., Frequency of fungemia in hospitalized pediatric inpatients over 11 years at a tertiary care institution, *Pediatrics*, 116(1), 61-67, 2005.
2. Akalın, H., Nozokomiyal *Candida* İnfeksiyonları, Klinikte *Candida* İnfeksiyonları Eğitim Toplantısı Kitabında (24-25 Mart, İstanbul), Ed.: Özsüt, H., 67-69, 2007.
3. Akalın, H., Kandidemilerde Risk faktörleri ve Risk Değerlendirmesi, *ANKEM Derg.*, 22(Ek 2), 270-274, 2008.
4. Akova, F., İlçe, Z., Köksal, F., Celayir, S., Cerrahi Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesinde Sepsis Olgularının Değerlendirilmesi, *Cerrahpaşa J. Med.*, 32(4), 214-220, 2001.
5. Akova, M., Kandidemi, *Candida* Kateter İnfeksiyonları, Klinikte *Candida* İnfeksiyonları Eğitim Toplantısı Kitabında (24-25 Mart, İstanbul), Ed.: Özsüt, H., 33, 2007.
6. Al Mosaid, A., Sullivan, D., Salkin, I.F., Shanley, D., Coleman, D.C., Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on staib agar and caffeic acid-ferric citrate agar, *J. Clin. Microbiol.*, 39(1), 323-327, 2001.
7. Alves, S.H., de Loreto, E.S., Linares, C.E., Silveira, C.P., Scheid, L.A., Pereira, D.I., Santuario, J.M., Comparison among tomato juice agar with other three media for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*, *Rev. Inst. Med. Trop.*, 48(3), 119-121, 2006.
8. Alves, S.H., Linares, C.E., Loreto, E.S., Rodrigues, M., Thomazi, D.I., Souza, F., Santurio, J.M., Utilization of tomato juice agar (V8 agar) in the presumptive identification of *Candida dubliniensis*, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 39(1), 92-93, 2006.
9. Aquino, V.R., Lunardi, L.W., Goldani, L.Z., Barth, A.L., Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil, *Braz. J. Infect. Dis.*, 9(5), 411-8, 2005.

10. Arıkan, S., Antifungal Duyarlılık Testleri: Neredeyiz?, Turkish Journal of Infection, 21(2), 69-70, 2007.
11. Arısoy, A., İdrar Yolu Kandidozları: Tanı Sorunları, Turkish Journal of Infection, 21(2), 123-125, 2007.
12. Arjuna, N.B., Morrison, E.J., Morrison, C.J., Laboratory Diagnosis of Invasive Candidiasis, The Journal of Microbiology, 43, 65-84, 2005.
13. Aygün, G., Yoğun Bakım Ünitelerinde (YBÜ) *Candida* İnfeksiyonları, Klinikte *Candida* İnfeksiyonları Eğitim Toplantısı Kitabında (24-25 Mart, İstanbul), Ed.: Özsüt, H., 30-32, 2007.
14. Azap, A., Orofarengeal *Candida* İnfeksiyonları, *Candida* Özofajiti, Alt Gastrointestinal Sistem *Candida* İnfeksiyonları, Klinikte *Candida* İnfeksiyonları Eğitim Toplantısı Kitabında (24-25 Mart, İstanbul), Ed.: Özsüt, H., 59-61, 2007.
15. Baron, E.J., Laboratory Methods in Basic Mycology, in: Diagnostic Microbiology, Eds.: Baron, E.J., Peterson, L.R., Tenover, S.M., 689-775, 1994.
16. Bassetti, M., Righi, E., Costa, A., Fasce, R., Molinari, M.P., Rosso, R., Pallavicini, F.B., Viscoli, C., Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care, BMC Infect. Dis., 6:21, 2006.
17. Bayram, A., Balcı, I., Patterns of antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit of a university hospital in Turkey, BMC Infect. Dis., 6:155, 2006.
18. Beck-Sagué, C.M., Jarvis W.R., Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990, J. Infect. Dis., 167, 1247-1251, 1993.
19. Biswas, S.K., Yokoyama, K., Wang, L., et al., Identification of *Candida dubliniensis* based on the specific amplification of mitochondrial cytochrome b gene, Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi, 42(2), 95-98, 2001.

20. Bougnoux, M., Dupont, C., Mateo, J., et al., Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR, *J. Clin. Microbiol.*, 37(4), 925-930, 1999.
21. Chen, Y.C., Chang, S.C., Luh, K.T., Hsieh, W.C., Stable susceptibility of *Candida* blood isolates to fluconazole despite increasing use during the past 10 years, *J. Antimicrob. Chemother.*, 52(1), 71-77, 2003.
22. Clark, T.A., Slavinski, S.A., Morgan, J., Lott, T., Arthington-Skaggs, B.A., Brandt, M.E., Webb, R.M., Currier, M., Flowers, R.H., Fridkin, S.K., Hajjeh, R.A., Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital, *J. Clin. Microbiol.*, 42(10), 4668-4672, 2004.
23. Colombo, A.L., Guimarães, T., Candiduria: a clinical and therapeutic approach, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 40(3), 332-337, 2007.
24. Çerikcioğlu, N., *Candida*'ların İnce Yapısı, *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Kitabında (Eskişehir, 21-22 Haziran 2002), Eds.: Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., TMC Yayını No: 43, 47-54, 2002.
25. Çetinkaya-Şardan, Y., Ünal, S., İnfeksiyon Kontrolünde Organizasyon ve İnfeksiyon Kontrol Programlarının Geliştirilmesi, Hastane İnfeksiyonları kitabında, Eds.: Doğanay, M., Ünal, S., Hastane İnfeksiyonları Derneği Yayını No: 1, 59-67, 2003.
26. Da Silva, E.H., Ruiz, L.S., Matsumoto, F.E., Auler, M.E., Giudice, M.C., Moreira, D., Szeszs, W., Paula, C.R., Candiduria in a public hospital of São Paulo (1999-2004): characteristics of the yeast isolates, *Rev. Inst. Med. Trop.*, 49(6), 349-353, 2007.
27. Davis, L.E., Shields, C.E., Merz, W.G., Use of a commercial reagent leads to reduced germ tube production by *Candida dubliniensis*, *J. Clin. Microbiol.*, 43(5), 2465-2466, 2005.
28. De Oliveira, R.D., Maffei, C.M., Martinez, R., Nosocomial urinary tract infections by *Candida* species, *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 47(3), 231-5, 2001.

29. Dóczy, I., Dósa, E., Hajdú, E., Nagy, E., Aetiology and antifungal susceptibility of yeast bloodstream infections in a Hungarian university hospital between 1996 and 2000, *J. Med. Microbiol.*, 51(8), 677-681, 2002.
30. Durán, M.T., Velasco, D., Canle, D., Moure, R., Villanueva, R., Antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolates from blood cultures in a five-year period (1997-2001), *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 21(9), 488-492, 2003.
31. Ener, B., *Candida* İnfeksiyonlarının Patogenezi: Etkenin Rolü, *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Kitabında (Eskişehir, 21-22 Haziran 2002), Eds.: Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., TMC Yayını No: 43, 65-70, 2002.
32. Erturan, Z., *Candida*'ların Bugünü, *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Kitabında (Eskişehir, 21-22 Haziran 2002), Eds.: Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., TMC Yayını No: 43, 29-36, 2002.
33. Esen, N., Şengönül, A., Yuluğ, N., Rutin Laboratuvarda *Candida albicans* Tanısı Almış İzolatlarda Üç Farklı Yöntemle *Candida dubliniensis* Araştırılması, *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 34, 46-50, 2004.
34. Espinel-Ingroff, A., Barchiesi, F., Cuenca-Estrella, M., Pfaller, M.A., Rinaldi, M., Rodriguez-Tudela, J.L., Verweij, P.E., International and Multicenter Comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 Broth Microdilution Methods for Testing Susceptibilities of *Candida* spp. to Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole, *J. Clin. Microbiol.*, 43(8), 3884-3889, 2005.
35. Evertsson, U., Monstein, H.J., Johansson, A.G., Detection and identification of fungi in blood using broad-range 28S rDNA PCR amplification and species-specific hybridisation, *APMIS*, 108(5), 385-392, 2000.
36. Fındık, D., Tuncer, İ., Nosocomial Fungal Infections in a Teaching Hospital in Turkey: Identification of the Pathogens and Their Antifungal Susceptibility Patterns, *Turk J. Med. Sci.*, 32, 35-38, 2002.

37. Fujita, S.I., Senda, Y., Nakaguchi, S., Hashimoto, T., Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains, *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3617-3622, 2001.
38. Ganz, N.M., Brown, R.B., Berk, S.L., Esposito, A.L., Gieckman, R.A., *Manual of Clinical Problems in Infectious Diseases*, 4th ed., Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 119, 1999.
39. Gómez, J., Baños, V., Simarro, E., Ruiz, J., Requena, L., Pérez, J., Canteras, M., Valdés, M., Nosocomial fungemias in a general hospital. Epidemiology and prognostic factors. Prospective study 1993-1998, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 19(7), 304-307, 2001.
40. Goodway, G.W., Cell Membrane, In: *The Growing Fungus*, Eds.: Gow, N.A.R., Gaodd, G.M., 63-74, 1995.
41. Gow, N.A.R., Biochemical and Biophysical aspects of dimorphism in *Candida albicans*, in : *Proceedings, 10th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology*, Eds.: Torres-Rodriguez J.M., 73-77, 1988.
42. Hazen, K.C., New and emerging yeast pathogens, *Clin. Microbiol. Rev.*, 8(4), 462-478, 1995.
43. Hilmioğlu, S., *Candida* İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı: Klasik Tanıda İzlenecek Yol Ne Olmalı?, *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Kitabında* (Eskişehir, 21-22 Haziran 2002), Eds.: Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., TMC Yayını No: 43, 125-131, 2002.
44. Horan, T.C., Gaynes, R.P., Surveillance of nosocomial infections, In: *Hospital Epidemiology and Infection Control*, Ed.: Mayhall CG, 3rd ed., 1659-1702, 2004.
45. Horvath, L.L., Hospenthal, D.R., Murray, C.K., Dooley, D.P., Direct isolation of *Candida* spp. from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar *Candida*, *J. Clin. Microbiol.*, 41, 2629-2632, 2003.

46. Hospenthal, D.R., Beckius, M.L., Floyd, K.L., Horvath, L.L., Murray C.K., Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis* with the chromogenic medium CHROMagar *Candida*, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 5:1, 2006.
47. Hui, M., Ip, M., Chan, P.K., et al., Rapid identification of medically important *Candida* to species level by polymerase chain reaction and single-strand conformational polymorphism, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 38(2), 95-99, 2000.
48. İnci, R., *Candida* İnfeksiyonlarının Patogenezinde Konağın Rolü, *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Kitabında (Eskişehir, 21-22 Haziran 2002), Eds.: Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., TMC Yayını No: 43, 71-84, 2002.
49. İnci, R., Dermatomikozlarda Etkenler ve Epidemiyoloji, 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kitabında (4-6 Mayıs 1999, İzmir), Eds.: Tümbay, E., İnci, R., Hilmioğlu, S., Aydemir, Ş., TMC Yayını No: 36, 87-95, 1999.
50. Jain, N., Kohli, R., Cook, E., Gialanella, P., Chang, T., Fries, B.C., Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(6), 1697-703, 2007.
51. Jones, J.M., Laboratory Diagnosis of Invasive Candidiasis, *Clinical Microbiology Reviews*, 3(1), 32-45, 1990.
52. Kaçmaz, B., Sipahi, A.B., Aksoy, A., *Candida* Türlerinin Tanımlanmasında "API ID 32C" Ve "Rapid Yeast Plus" Sistemlerinin Karşılaştırılması, *ANKEM Derg.*, 20(4), 214-216, 2006.
53. Kalkancı, A., Mikoizların Serolojik Tanısında Yenilikler, 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kitabında (3-6 Mayıs 2005, Konya), Eds.: Tuncer, İ., Fındık, D., Arslan, U., TMC Yayını No: 49, 61-74, 2005.
54. Kauffman, A.C., Fungal Infections, *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 3, 35-40, 2006.

55. Khan, Z.U., Ahmad, S., Mokaddas, E., Al-Sweih, N., Chandy, R., Sunflower seed husk agar: a new medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*, Indian J. Med. Microbiol., 23(3), 182-185, 2005.
56. Khan, Z.U., Ahmad, S., Mokaddas, E., Chandy, R., Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*, J. Clin. Microbiol., 42(10), 4796-4798, 2004.
57. Koç, A.N., Tıbbi Bakımdan Önemi Olan *Candida* Türlerinin Mikolojik Özellikleri. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Kitabında (Eskişehir, 21-22 Haziran 2002), Eds.: Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., TMC Yayını No:43, 37-45, 2002.
58. Kontoyiannis, D.P., Vaziri, I., Hanna, H.A., Boktour, M., Thornby, J., Hachem, R., Bodey G.P., Raad, I.I., Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer, Clin. Infect. Dis., 33, 1676-1681, 2001.
59. Kontoyiannis, D.P., Reddy, T., Torres, H.A., Luna, M., Lewis, R.E., Tarrand, J., Bodey, G.P., Read, I., Pulmonary candidiasis in patients with cancer in autopsy study, Clin. Infect. Dis., 34, 400-403, 2002.
60. Krcmery, V., Spanik, S., Kunova, A., Dacok, Z., Miaz, M., Krizan, S., et al. Nosocomial non-*albicans* *Candida* spp. fungemias in cancer patients: risk factors, aetiology and outcome in 32 episodes, J. Hosp. Infect., 40(suppl.A.), 37-40, 1998.
61. Kuloğlu, F., *Candida*'lar ve Üriner Sistem, Klinikte *Candida* İnfeksiyonları Eğitim Toplantısı Kitabında(24-25 Mart, İstanbul), Ed.:Özsüt, H., 27-29, 2007.
62. Kuştimur, S., Hastane infeksiyonuna neden olan mantarların Dünya'da ve Türkiye'de dağılımı, 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kitabında (27-30 Mayıs 2003, Bodrum), Eds.: Yeğenoğlu, Y., Erturan, Z., TMC Yayını No: 46, 47-58, 2003.
63. Kuştimur, S., Mantarların tanı ve araştırmasında kullanılan moleküler yöntemler, Mikrobiyol. Bült., 34, 189-192, 2001.

64. Kuştimur, S., Kalkancı, A., Moleküler Mikoloji Laboratuvarının Tasarımı, Kurulması, Yönetimi ve Beklentiler, Moleküler Tanı Dergisi, Ed.: Bozdayı, A.M., 3(1), 101-106, 2007.
65. Kwon-Chung, K.J., Bennet, J.E., Medical Mycology, Philadelphia: Lea and Febiger, 44-71, 1992.
66. Kyoung, H.L., The presumptive identification of *Candida albicans* with germ tube induced by high temperature, Yonsei Med. J., 40(5), 420-424, 1999.
67. Larone, D.H., Yeast and yeastlike organisms, in: Medical Important Fungi, 3rd ed., ASM Press, 61-90, 1995.
68. Lo, H.J., Ho, Y.A., Ho, M., Factors accounting for misidentification of *Candida* species, J. Microbiol. Immunol. Infect., 34(3), 171-177, 2001.
69. López-Ribot, J.L., Casanova, M., Murgui, A., Martinez, J.P., Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 41, 187-196, 2004.
70. López-Ribot, J.L., McAtee, R.K., Kirkpatrick, W.R., Perea, S., Patterson T.F., Comparison of DNA-based typing methods to assess genetic diversity and relatedness among *Candida albicans* clinical isolates, Rev. Iberoam. Micol., 17, 49-54, 2000.
71. Makhoul, I.R., Kassis, I., Smolkin, T., Tamir, A., Sujov, P., Review of 49 neonates with acquired fungal sepsis: further characterization, Pediatrics, 107(1), 61-66, 2001.
72. McCourtie, J., Douglas, J.L., Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and adherence to acrylic after growth on different carbon sources, Infect. Immun., 32, 1234-1239, 1981.
73. Medrano, D.J., Brilhante, R.S., Cordeiro Rde, A., Rocha, M.F., Rabenhorst, S.H., Sidrim, J.J., Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*, Rev. Inst. Med. Trop., 48(1), 17-20, 2006.

74. Meyer, W., Latouche, G.N., Daniel, H.M., et al. Identification of pathogenic yeasts of the imperfect genus *Candida* by polymerase chain reaction fingerprinting, *Electrophoresis*, 18(9), 1548-1559, 1997.
75. Mirhendi, H., Makimura, K., Khoramizadeh, M., Yamaguchi, H., A One-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of Six Medically Important *Candida* Species, *Jpn.J. Med. Mycol.*, 47, 225-229, 2006.
76. Mirhendi, H., Makimura K., Zomorodian, K., Maeda, N., Ohshima, T., Yamaguchi, H., Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* Using a Single-Enzyme PCR-RFLP Method, *Jpn. J. Infect. Dis.*, 58, 235-237, 2005.
77. Mokaddas, E.M., Al-Sweih N.A., Khan Z.U., Species distribution and antifungalsusceptibility of *Candida* bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year study, *J. Med. Microbiol.*, 56(Pt 2), 255-259, 2007.
78. Nguyen, M.H., Peacock, J.E., Morris, A.J., Tanner, D.C., Nguyen, M.L., Snyderman, D.R., Wabener, M.M., Rinaldi, M.G., Yu, V.L., The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance, *Am. J. Med.*, 100, 617-623, 1996.
79. Odds, F.C., Bernaerts, R., CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species, *J. Clin. Microbiol.*, 32(8), 1923-1929, 1994.
80. Okhravi, N., Adamson, P., Mant, R., et al., Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism mediated detection and speciation of *Candida* spp. causing intraocular infection, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39(6), 859-866, 1998.
81. Otağ, F., Aslan, G., Şen, S., Emekdaş, G., Fungemi etkeni *Candida* türlerinin hızlı tanısında CHROMagar *Candida* besiyerininin kullanımı, *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*, 36(4), 200-204, 2006.
82. Otağ, F., Aslan, G., Şen, S., Özturhan, H., Emekdaş, G., 2003-2005 Süresinde Klinik Örneklerden İzole Edilen Maya Türlerinin Değerlendirilmesi, *Turkish Journal of Infection*, 19(4), 435-443, 2005.

83. Öğünç, D., Mantarlarda Virulans Faktörleri. 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kitabında (3-6 Mayıs 2005, Konya), Eds.: Tuncer, İ., Fındık, D., Arslan, U., TMC Yayını No: 49, 46-49, 2005.
84. Özsüt, H., *Candida* İnfeksiyonlarına Genel Bakış (Epidemiyoloji, Risk Faktörleri, Hastalık Spektrumu), Klinikte *Candida* İnfeksiyonları Eğitim Toplantısı Kitabında (24-25 Mart, İstanbul), Ed.: Özsüt, H., 13-14, 2007.
85. Pappas, P.G., Rex, J.H., Sobel, J.D., Filler, S.G., Dismukes, W.E., Walsh, T.J., Edwards, J.E., Guidelines for Treatment of Candidiasis, *Clinical Infectious Diseases*, 38, 161-189, 2004.
86. Passos, X.S., Sales, W.S., Maciel, P.J., Costa, C.R., Miranda, K.C., Lemos, J.A., Batista, M.A., Silva, M.R., *Candida* colonization in intensive care unit patients urine, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 100(8), 925-928, 2005.
87. Pfaller, M., Cabezudo, I., Koontz, F., Bale, M., Gingrich, R., Predictive value of surveillance cultures for systemic infection due to *Candida* species, *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 6, 628-633, 1987.
88. Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem, *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 133-163, 2007.
89. Pfaller, M.A., Houston, A., Coffmann, S., Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*, *J. Clin. Microbiol.*, 34(1), 58-61, 1996.
90. Pfaller, M.A., Jones, R.N., Doern, G.V., Sader, H.S., Hollis, R.J., Messer, S.A., International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: Frequency of Occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada and South America for the SENTRY program, *J. Clin. Microbiol.*, 36, 1886-1889, 1998.
91. Pincus, D.H., Coleman, D.C., Pruitt, W.R., et al., Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification system, *J. Clin. Microbiol.*, 37(11), 3533-3539, 1999.

92. Pinjon, E., Sullivan, D., Salkin, I., Shanley, D., Coleman, D., Simple, Inexpensive, Reliable Method for Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*, J. Clin. Microbiol., 36(7), 2093-2095, 1998.
93. Pittet, D., Monod, M., Suter, P.M., Frenk, E., Auckenthaler, R., *Candida* Colonization and Subsequent Infections in Critically Ill Surgical Patients, Annals of Surgery, 220(6), 751-758, 1994.
94. Pugliese, G., Lamberto, B., Kroc, K.A., Development and implementation of infection control policies and procedures, in: Hospital Epidemiology and Infection Control, Philadelphia: Lipincott Williams Wilkins, Ed.: Mayhall C.G., 1357-1371, 2000.
95. Rennert, G., Rennert, H.S., Pitlik, S., Finkelstein, R., Kitzes, R., Epidemiology of candidemia a nationwide survey in Israel, Infection, 28, 26-29, 2000.
96. Richardson, M.D., Carlson, P., Culture and Non-Culture Based Diagnostics for *Candida* Species, in: *Candida* and Candidiasis, Ed.:Calderone, R.A., Washington Dc. ASM Press, 387-394, 2002.
97. Sandford, G.R., Merz, W.G., Wingard, J.R., Charache, P., Saral, R., The value of fungal surveillance cultures as predictors of systemic fungal infections, J. Infect. Dis., 142, 503-509, 1980.
98. Saraçlı, M.A., *Candida* İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısında Moleküler ve Genetik Tanı Yöntemleri, *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Kitabında (Eskişehir, 21-22 Haziran 2002), Eds.: Kiraz, N., Kiremitçi, A., Akgün, Y., TMC Yayını No: 43, 133-144, 2002.
99. Sendid, B., François, N., Standaert, A., Dehecq, E., Zerimech, F., Camus, D., Poulain, D., Prospective evaluation of the new chromogenic medium CandiSelect 4 for differentiation and presumptive identification of the major pathogenic *Candida*, J. Med. Microbiol., 56(Pt 4), 495-499, 2007.

100. Sesli-Çetin, E., Kaya, S., Pakbaş, İ., Demirci, M., Yoğun Bakım Ünitelerinde Yatan Hastalardan İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Duyarlılıkları, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 14(2), 69-73, 2007.
101. Snyderman, D.R., Shifting Patterns in the Epidemiology of Nosocomial *Candida* Infections, Chest, 123(5), 500-503, 2003.
102. St-Germain, G., Laverdière, M., Pelletier, R., Bourgault, A.M., Libman, M., Lemieux, C., Noël, G., Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) multicenter surveillance study in Quebec, Canada, J. Clin. Microbiol., 39(3), 949-953, 2001.
103. Sullivan, D.J., Westerneng, T.J., Haynes, K.A., Bennett, D.E., Coleman, D.C., *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals, Microbiology, 141, 1507-1521, 1995.
104. Tabak, F., Postoperatif Abdominal *Candida* İnfeksiyonları, Klinikte *Candida* İnfeksiyonları Eğitim Toplantısı Kitabında (24-25 Mart, İstanbul), Ed.: Özsüt, H., 62-63, 2007.
105. Tatman-Otkun, M., Sürveyans Çalışmalarında Mikrobiyoloji Laboratuvarına Düşen Görevler Nelerdir? Akış Şeması ve Kriterleri Nelerdir? Salgın Halinde Görevleri Nelerdir?, 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi Kitabında (20-24 Nisan 2005, Samsun), Eds.: Günaydın, M., Saniç, A., Gürler, B., 546-557, 2005.
106. Thanos, M., Schönian, G., Meyer, W., Schweynoch, C., Graser, Y., Mitchell, T.G., Presber, W., Tietz, H.J., Rapid identification of *Candida* species by DNA fingerprinting with PCR, J. Clin. Microbiol., 34, 615-621, 1996.
107. Tintelnot, K., Haase, G., Seibold, M., Bergmann, F., Staemmler, M., Franz, T., Naumann, D., Evaluation of Phenotypic Markers for Selection and Identification of *Candida dubliniensis*, J. Clin. Microbiol., 38(4), 1599-1608, 2000.

117. Yamamura, D.L., Rotstein, C., Nicolle, L.E., Ioannou, S., Candidemia at selected Canadian sites: results from the Fungal Disease Registry, 1992-1994. Fungal Disease Registry of the Canadian Infectious Disease Society, CMAJ., 160(4), 493-499, 1999.
118. Yamazhan, T., *Candida* Pnömonisi, Endokarditi, Perikarditi, Klinikte *Candida* İnfeksiyonları Eğitim Toplantısı Kitabında (24-25 Mart, İstanbul), Ed.: Özsüt, H., 37-38, 2007.
119. Yapar, N., Uysal, Ü., Yücesoy, M., Çakır, N., Yüce, A., Nosocomial bloodstream infections associated with *Candida* species in a Turkish University Hospital, Mycoses, 49, 134-138, 2006.
120. Yücel, A., Kantarcioğlu, A.S., Some important changes in taxonomy of *Candida albicans*, Cerrahpaşa J. Med., 30(3), 236-246, 1999.
121. Yücel, A., Kantarcioğlu, A.S., Hastane Kaynaklı (Nozokomiyal) Mantar İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi, Cerrahpaşa J. Med., 32(4), 259-269, 2001.
122. Yücesoy, M., Esen, N., Yuluğ, N., Use of Chromogenic Tube and Methyl Blue-Sabouraud Agar for the Identification of *Candida albicans* Strains, Kobe J. Med. Sci., 47, 161-167, 2001.