

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDE KÜF MANTARLARININ
KLASİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI VE ANTİFUNGAL
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

Şahin DİREKEL

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE TM (ŞD) 2008-10 DR nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 13


MERSİN - 2010

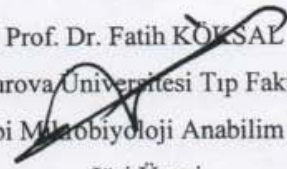
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü


Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
“Klinik örneklerde küf mantarlarının klasik ve moleküler yöntemlerle
araştırılması ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi” başlıklı çalışma, aşağıdaki
jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

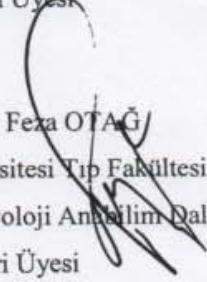
Tez Savunma Tarihi


26/08/2010


Prof. Dr. Ferit EMEKDAŞ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı/Danışman


Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi


Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi


Doç. Dr. Feza OTAĞI
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi


Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN
Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 02.08.2010 tarih ve 2010/236 sayılı kararı ile
kabul edilmiştir.


Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Şükri ÇOMBEKÖĞLU



TEŞEKKÜR

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda göreve başladığım tarihten itibaren her konuda desteğini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ başta olmak üzere doktora tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Feza OTAĞ'a, ve ayrıca hocalarım Sayın Prof. Dr. Gönül ASLAN, Sayın Prof. Dr. Candan ÖZTÜRK, Sayın Doç. Dr. Nuran DELİALİOĞLU ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Seda TEZCAN'a, Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Mehmet Sami SERİN'e, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi İler HELVACI'ya, tecrübelerini ve görüşlerini benimle paylaşan ve laboratuvar olanaklarından yararlanmamı sağlayan, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR ve Sayın Doç. Dr. Ayşe KALKANCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Tez çalışmam boyunca laboratuvar ortamında sonsuz desteklerini gördüğüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda görev yapan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni destekleyen ve sabır gösteren aileme, eşim Gülsüm, oğlum Burak ve kızlarım Şeyda ve Melike'ye sonsuz teşekkür ederim.

Şahin DİREKEL

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1. Tanım ve Tarihçe	4
2.2. Mantarların Sınıflandırılması	4
2.3. Mantarların Genel Özellikleri	5
2.3.1. Mayalar	6
2.3.2. Filamentöz (Küf) Mantarlar	7
2.4. En Sık İnfeksiyona Neden Olan Filamentöz Mantarlar	11
2.4.1. <i>Aspergillus</i> spp.	11
2.4.1.1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	14
2.4.1.2. <i>Aspergillus flavus</i>	15
2.4.1.3. <i>Aspergillus niger</i>	16
2.4.1.4. <i>Aspergillus terreus</i>	17
2.4.2. <i>Fusarium</i> spp.	18
2.4.3. <i>Mucor</i> spp. ve <i>Rhizopus</i> spp.	21
2.4.4. <i>Scedosporium</i> spp.	23
2.4.5. <i>Bipolaris</i> spp.	24
2.4.6. <i>Aureobasidium</i> spp.	26
2.4.7. <i>Lecythophora</i> spp.	27
2.4.8. <i>Acremonium</i> spp.	28

2.5. Mantarların Laboratuvar Tanısı	29
2.5.1. Klasik (Konvansiyonel) Yöntemler	29
2.5.1.1. Doğrudan Mikroskopik İnceleme	30
2.5.1.1.1. %10'luk KOH veya NaOH ile İnceleme	30
2.5.1.2. Boyalı Mikroskopik İnceleme	31
2.5.1.2.1. Gram Boyama Yöntemi	31
2.5.1.2.2. Giemsa ve Wright Boyama Yöntemleri	31
2.5.1.2.3. Kalkoflor Beyazı Boyama Yöntemi	32
2.5.1.2.4. Periyodik Asit-Schiff (PAS) Boyama Yöntemi	32
2.5.1.2.5. Laktofenol Pamuk Mavisi Boyama Yöntemi	32
2.5.1.3. Kültür Yöntemleri	33
2.5.1.3.1. Kültürlerin İncelenmesi	34
2.5.1.3.2. Makroskopik İnceleme	35
2.5.1.3.3. Mikroskopik İnceleme	35
2.5.2. Serolojik Tanı Yöntemleri	36
2.5.3. Moleküler Tanı Yöntemleri	38
2.5.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	39
2.5.3.1.1. PZR'nun Temel Bileşenleri	39
2.5.3.1.2. PZR Yöntemi	40
2.5.3.2. DNA Dizi Analizi	42
2.6. Antifungaller	43
2.7. Antifungal Duyarlılık Testleri	45
2.7.1. Sıvı Makrodilüsyon Testi	46
2.7.2. Sıvı Mikrodilüsyon Testi	47
2.7.3. Kolorimetrik Mikrodilüsyon Testi	47
2.7.4. Agar Dilüsyon Testi	48
2.7.5. Agar Difüzyon Testi	48
2.7.5.1. Disk Difüzyon Testi	48
2.7.5.2. E-Test	49
2.7.6. Flowsitometri Testi	50
3. GEREÇ VE YÖNTEM	51
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	51

3.1.1. Kullanılan Cihazlar	51
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	52
3.1.3. Kullanılan Besiyerleri ve Boyalar	53
3.1.4. Kullanılan Antifungal Strip ve Diskler	54
3.1.5. Kullanılan Standart Suşlar	54
3.1.6. Kullanılan Bilgisayar Programları	54
3.2. Yöntemler	54
3.2.1. Besiyerleri ve Boyaların Hazırlanması ve Kalite Kontrolllerinin Yapılması	54
3.2.1.1. Sabouraud Dekstroz Agar'ın (SDA) Hazırlanması	54
3.2.1.2. Patates Dekstroz Agar'ın (PDA) Hazırlanması	55
3.2.1.3. Mueller Hinton Agar'ın Hazırlanması (GM-MHA) (%2 glikoz ve 0.5 µg/ml metilen mavisi eklenmiş)	56
3.2.1.4. Sabouraud Dekstroz Broth'un (SDB) Hazırlanması	57
3.2.1.5. Besiyerlerinin Kalite Kontrolü	57
3.2.1.6. Laktofenol Pamuk Mavisi'nin (LFPM) Hazırlanması	58
3.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	58
3.2.2.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar	58
3.2.2.1.1. Parçalama Tamponu (Lizis tamponu)	58
3.2.2.1.2. Proteinaz-K (100 mg/mL)	59
3.2.2.1.3. Fenol-Kloroform-İzoamil alkol (25:24:1)	59
3.2.2.1.4. Kloroform-İzoamil Alkol (24:1)	59
3.2.2.1.5. %70'lik Etil Alkol	60
3.2.2.2. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar	60
3.2.2.2.1. 10X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Tamponu Stok Solüsyonu	60
3.2.2.2.2. Elektroforez Yürütme Tamponu (1XTBE)	60
3.2.2.2.3. Yükleme Tamponu (Loading Buffer)	60
3.2.2.2.4. Etidyum Bromid	61
3.2.2.2.5. %1.5 Agaroz Jel Solüsyonu	61
3.2.3. Hasta Örneklerinin Toplanması	61
3.2.4. Klinik Örneklerin Gram Boyama ile İncelenmesi	63

3.2.5. Hasta Örneklerinin Kültürünün Yapılması	63
3.2.6. Kültür Sonuçlarının Değerlendirilmesi	63
3.2.6.1. Makroskobik Değerlendirme	64
3.2.6.2. Mikroskobik Değerlendirme	64
3.2.7. Hasta İzolatlarının Saklanması	65
3.2.7.1. Serum Fizyolojik İçerisinde Saklama	65
3.2.7.2. Kum İçerisinde Saklama	65
3.2.8. Moleküler Yöntemle İzolatların Tiplendirilmesi	66
3.2.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	66
3.2.8.1.1. DNA İzolasyonu	66
3.2.8.1.2. DNA İzolasyonu İçin Yapılan Diğer Denemeler	67
3.2.8.1.2.1. Dondurma-Kaynatma Yöntemi	67
3.2.8.1.2.2. Sıvı Nitrojen Yöntemi	67
3.2.8.1.2.3. Mirhendi'nin Yöntemi	68
3.2.8.1.2.4. Fuji Film Hazır Kit Yöntemi	68
3.2.8.1.2.5. MagNa Pure Yöntemi	68
3.2.8.1.2.6. Qiagen Hazır Kit Yöntemi	68
3.2.8.1.2.7. Modifiye Yöntem	69
3.2.8.1.2.8. Beş Kez Dondurma-Kaynatma Yöntemi	69
3.2.8.1.2.9. Homojenizatör Kullanarak Yapılan Yöntem	69
3.2.8.1.3. PZR Reaksiyon Karışımı	69
3.2.8.1.4. Amplifikasyon Şartları	70
3.2.8.1.5. Agaroz Jel Elektroforezi	70
3.2.8.1.6. Elektroforez Sonuçlarının Gözlenmesi	71
3.2.8.2. DNA Dizi Analizi	71
3.2.9. İzolatların Antifungal Duyarlılık Testleri	72
3.2.9.1. Disk Difüzyon ve E-test Yöntemi	72
4. BULGULAR	74
4.1. Klinik Örneklerden Küflerin İzolasyonu	74
4.2. Küf Mantarı İzole Edilen Hastalar	74
4.3. Kültürde Üretilen Suşlardan Elde Edilen DNA'ların Ölçüm Sonuçları	83
4.4. PZR Sonuçları	86

4.5. DNA İzolasyonu İçin Yapılan Diğer Denemelerin Sonuçları	87
4.6. DNA Dizi Analizi Sonuçları	93
4.7. Disk Difüzyon Test Sonuçları	95
4.8. E-test Sonuçları	97
4.9. İstatistiksel Analiz	98
5. TARTIŞMA	99
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	112
7. KAYNAKLAR	114
ÖZGEÇMİŞ	128

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bir maya hücresinin yapısı	7
Şekil 2.2. Bir filamentöz mantarın yapısı	8
Şekil 2.3. <i>A. fumigatus</i> 'un SDA'daki koloni görüntüsü	14
Şekil 2.4. <i>A. fumigatus</i> 'un mikroskopik görüntüsü	15
Şekil 2.5. <i>A. flavus</i> 'un SDA'daki koloni görüntüsü	15
Şekil 2.6. <i>A. flavus</i> 'un mikroskopik görüntüsü	16
Şekil 2.7. <i>A. niger</i> 'in SDA'daki koloni görüntüsü	16
Şekil 2.8. <i>A. niger</i> 'in mikroskopik görüntüsü	17
Şekil 2.9. <i>A. terreus</i> 'un SDA'daki koloni görüntüsü	17
Şekil 2.10. <i>A. terreus</i> 'un mikroskopik görüntüsü	18
Şekil 2.11. <i>Fusarium oxysporum</i> 'un SDA'daki koloni görüntüsü	19
Şekil 2.12. <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> ve <i>F. equiseti</i> 'nin mikroskopik görüntüsü	20
Şekil 2.13. <i>Cylindrocarpon lichenicola</i> 'nın mikroskopik görüntüsü	20
Şekil 2.14. <i>Rhizopus oryzae</i> 'nin SDA'daki koloni görüntüsü	22
Şekil 2.15. <i>Rhizopus oryzae</i> 'nin mikroskopik görüntüsü	22
Şekil 2.16. <i>Scedosporium apiospermum</i> 'un SDA'daki koloni görüntüsü	24
Şekil 2.17. <i>Scedosporium apiospermum</i> 'un mikroskopik görüntüsü	24
Şekil 2.18. <i>Bipolaris spicifera</i> 'nın SDA'daki koloni görüntüsü	25
Şekil 2.19. <i>Bipolaris spicifera</i> 'nın mikroskopik görüntüsü	25
Şekil 2.20. <i>Aureobasidium pullulans</i> 'ın SDA'daki koloni görüntüsü	26
Şekil 2.21. <i>Aureobasidium pullulans</i> 'ın mikroskopik görüntüsü	27
Şekil 2.22. <i>Lecythophora hoffmannii</i> 'nin SDA'daki koloni görüntüsü	28
Şekil 2.23. <i>Lecythophora hoffmannii</i> 'nin mikroskopik görüntüsü	28
Şekil 2.24. <i>Acremonium</i> spp. 'nin mikroskopik görüntüsü	29
Şekil 2.25. Gram ile boyanmış bir klinik örnekte hif yapıları	31
Şekil 2.26. PZR'nun aşamaları	41
Şekil 2.27. PZR sıcaklık-zaman grafiği	42
Şekil 3.1. Mantarlara özgü ITS bölgesi	53
Şekil 4.1. DNA dizi analiz sonuçlarına göre suşların dağılımı	83

Şekil 4.2. PZR öncesi ve sonrası bir suşa ait DNA konsantrasyonu ölçüm rapor örneği	84
Şekil 4.3. Suşların PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü	86
Şekil 4.4. Dondurma-kaynatma yöntemi ile agaroz jel elektroforez görüntüsü	87
Şekil 4.5. Sıvı nitrojen yöntemi ile agaroz jel elektroforez görüntüsü	88
Şekil 4.6. Mirhendi'nin yöntemi ile agaroz jel elektroforez görüntüsü	88
Şekil 4.7. Fuji Film DNA izolasyon kitle ile agaroz jel elektroforez görüntüsü	89
Şekil 4.8. MagNa Pure yöntemi ile agaroz jel elektroforez görüntüsü	90
Şekil 4.9. Qiagen DNA izolasyon kitiyle agaroz jel elektroforez görüntüsü	91
Şekil 4.10. Modifiye yöntemi ile agaroz jel elektroforez görüntüsü	92
Şekil 4.11. Beş kez dondurup-kaynatma yöntemi ile agaroz jel elektroforez görüntüsü	92
Şekil 4.12. Homojenizatör yöntemi ile agaroz jel elektroforez görüntüsü	93
Şekil 4.13. DNA dizi analizi sonrasında Finch TV programı ile bir suşa ait farklı renklerdeki nükleotid dizilerinin gösterilmesi	94
Şekil 4.14. Farklı hastaların disk difüzyon antifungal duyarlılık test görüntüleri	97
Şekil 4.15. Bir hastanın E-test antifungal duyarlılık görüntüleri	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Filamentöz mantarların sınıflandırılması	4
Çizelge 3.1. Klinik örneklerin örnek çeşidine göre dağılımı	62
Çizelge 3.2. Klinik örneklerin gönderildiği bölümlere göre dağılımı	62
Çizelge 3.3. PZR Reaksiyon Karışımı	70
Çizelge 3.4. PZR Amplifikasyon Şartları	70
Çizelge 3.5. Çalışmada izlenen akış şeması	73
Çizelge 4.1. Filamentöz mantar üreyen hastaların verileri	81
Çizelge 4.2. Filamentöz mantar üreyen hastaların altta yatan hastalıkları ve tedavi durumları	82
Çizelge 4.3. Suşların PZR öncesi ve sonrası DNA konsantrasyonu ölçüm sonuçları	85
Çizelge 4.4. Klasik identifikasyon ve DNA dizi analiz sonuçlarının karşılaştırılması	95
Çizelge 4.5. Suşların E-test ve Disk difüzyon yöntemi ile antifungal duyarlılık test sonuçları	96
Çizelge 5.1. Klinik örneklerden izole edilen filamentöz mantarlarla ilgili yapılan diğer çalışmalar	104
Çizelge 5.2. Ülkemizde farklı illerden bildirilen aspergilloz olguları	105
Çizelge 5.3. Farklı ülkelerden bildirilen <i>Fusarium</i> spp.'ye bağlı keratit salgınları	107
Çizelge 5.4. Farklı ülkelerden bildirilen <i>Fusarium</i> spp.'ye bağlı peritonit olguları	108

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABY	Akut Böbrek Yetmezliği
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
ALL	Akut Lenfoid Lösemi
AML	Akut Myeloid Lösemi
BAL	Bronkoalveoler Lavaj
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DM	Diabetes Mellitus
GM	Galaktomannan
HIV	Human Immunodeficiency Virus
İPA	İnvaziv Pulmoner Aspergilloz
KBY	Kronik Böbrek Yetmezliği
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LFPM	Lakto Fenol Pamuk Mavisi
MİK	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDA	Sabouraud Dekstroz Agar
TBC	Tüberküloz

ÖZET

Klinik Örneklerde Küf Mantarlarının Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması ve Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Küf mantarları doğada çok yaygın olarak bulunmaktadır. İnvaziv fungal infeksiyonlar özellikle nötropeni, kanser, kemoterapi, transplantasyon, AIDS gibi immün sistem zayıflığına yol açan risk faktörü bulunan hastalarda morbidite ve mortalitenin önemli nedenlerinden biridir. *Candida* türleri en sık izole edilen mantarlar olmasına karşın, küflerin yaygınlığı gittikçe artmaktadır. *Aspergillus* türleri başta olmak üzere *Fusarium* ve *Zygomycetes* türleri yüksek mortalite oranlarına sahiptir.

Bu çalışmanın amacı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen filamentöz mantarların tür dağılımını klasik ve PZR bazlı DNA dizi analizi teknikleri ile tanımlamak ve *in vitro* antifungal duyarlılık paternlerini belirlemektir. Bu amaçla 22 aylık dönemde 6742 klinik örnek taranarak klasik yöntemle tanımlanan altı *Aspergillus niger*, altı *A.flavus*, beş *A.fumigatus*, dört *A.terreus*, beş *Fusarium* spp., iki *Bipolaris* spp. ve birer *Acremonium* spp., *Aurebasidium* spp., *Mucor* spp. ve *Scedosporium* spp. olmak üzere toplam 32 filamentöz mantar izole edilmiştir.

Küf mantarı izole edilen hastaların %62,3'ünde risk faktörü bulunduğu saptanmıştır. DNA dizi analiz sonuçlarına göre sadece üç filamentöz mantarın tanısında değişiklik olmuştur. Klasik ve moleküler tekniklerle *Aspergillus* türlerinin tümü doğru olarak tanımlanırken tüm izolatlar arasındaki uyum %90 bulunmuştur.

Bütün suşların antifungal duyarlılıkları amfoterisin B, vorikonazol, flukonazol, kaspofungin ve posakonazol'e E-test ile, vorikonazol ve flukonazol'e disk difüzyon testi ile belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma klasik yöntemlerle, yaygın olarak klinik örneklerden izole edilen filamentöz mantarların mikoloji atlaslarından yararlanılarak kolayca tanımlanabileceğini göstermiştir. Özellikle immün sistemi baskılanmış hastaların klinik örneklerinin filamentöz mantar yönünden de değerlendirilmesi önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Filamentöz mantar, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Lecyhtophora*, DNA dizi analizi, Antifungal duyarlılık

ABSTRACT

Diagnosis of molds in clinical specimens by conventional and molecular methods and determination of their antifungal susceptibility.

Molds are widely distributed in nature. Invasive fungal infections are one of the important causes of morbidity and mortality particularly in patients with underlying risk factors such as immune suppression (e.g., neutropenia, cancer chemotherapy, transplantation, AIDS). Although *Candida* species remain a relevant cause of invasive fungal infections, molds have become increasingly prevalent. In particular, *Aspergillus* species are the leading cause of mould infections although other moulds including *Fusarium* species and *Zygomycetes* are increasing in frequency, and are associated with a high mortality rate.

The aim of this study is to identify the species distribution of filamentous fungi strains isolated from clinical specimens of the hospitalized patients in Mersin University Medical Faculty Hospital by conventional and PCR based molecular techniques and to detect in vitro antifungal susceptibility patterns. For this purpose, 6742 clinical specimens were investigated during 22 months period and, totally 32 filamentous fungi isolates were identified by conventional methods, respectively, six *Aspergillus niger*, six *A.flavus*, five *A.fumigatus*, four *A.terreus*, five *Fusarium* spp., two *Bipolaris* spp., one *Acremonium* spp., one *Aurebasidium* spp., one *Mucor* spp., and one *Scedosporium* spp.

Risk factors were detected in 62,3% of filamentous fungi isolated patients. Only three of the isolates were identified differently according to DNA sequencing results. For all of the *Aspergillus* isolates identification by conventional and PCR based DNA sequencing techniques was correct and 90% agreement was detected between all of the isolates.

In vitro susceptibility patterns of all isolates determined by E-test for amphotericin B, fluconazole, caspofungin, voriconazole and posaconazole and by disk diffusion test for fluconazole and voriconazole.

In conclusion, this study presents that common filamentous fungi isolates from clinical specimens could be easily identified by conventional methods and using a clinical mycology atlas. It is recommended that filamentous molds also should be considered in clinical specimens of patients especially have immunocompromission.

Key Words: Filamentous fungi, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Lecyhtophora*, DNA sequencing, Antifungal susceptibility.

1. GİRİŞ

Mantarlar ekosistemin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Dünya genelinde yaklaşık 150.000-200.000 civarında mantar türü olduğu tahmin edilmektedir (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). Doğada toz, toprak, hava, su, bitki, gübre, çürüyen atıklar gibi bir çok ortamda yaygın olarak bulunmakta ve değişik hava hareketleri ile geniş alanlara yayılabilmektedirler (9, 10, 11). Mantarlar enerji döngüsü için önemli canlılardır ve karbon döngüsünü devam ettirerek, tarımdan gıdaya, alkol üretiminden antibiyotiklerin üretilmesine kadar birçok alanda insanoğluna yarar sağlamaktadırlar (8, 12).

İnsan yaşamında önemli birçok faydalarının yanı sıra mantarların bir kısmı bitkilerde, hayvanlarda ve insanlarda hastalıklara yol açmaktadır (8, 13). Yıllarca mantarların klinik olarak önemli olmadığına inanılmıştır, ancak son yirmi yıldır invaziv fungal infeksiyonların insidansında bir artış görülmüştür. İnfekte olan hastalar arasındaki ölüm oranları yükselmiştir (10).

İnsan vücudu normal koşullarda mantar infeksiyonlarına karşı dirençli bir konuma sahiptir. Bu yüzden bilinen birçok mantar türünden ancak çok az bir kısmı (yaklaşık 150-200 kadarı) insan ve hayvanlarda primer infeksiyon oluşturabilmektedir (1, 7).

İmmün sistemi sağlam konaklarda hastalık oluşturmayıp saprofit olarak bulunan bazı mantarlar, immün sistemi baskılanmış hastalarda fırsatçı patojen olarak tanımlanan mantar infeksiyonlarına sıklıkla neden olmaktadır (6, 12). Uzun süreli nötropeni, medikal invaziv uygulamalardaki gelişmeler (santral venöz kateterler, diyaliz, aspirasyon, skopi uygulamaları, yapay protezler), metabolizma düzenini zayıflatan çeşitli etkilere maruz kalanlar (sistemik lupus erythematosus ve diğer kollagen vasküler hastalıklar, Diabetes mellitus (DM) ile alkol ve diğer damar içi ilaç kullanıcıları); radyasyon, transplantasyon, yaşlılık, bazı kronik hastalıklar, lösemi, lenfoma gibi hematolojik maligniteler kanser, Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu (Acquired Immuno Deficiency Syndrome-AIDS), steroid ve yaygın geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, kemoterapi, bazı viral infeksiyonlar, ciddi yanıklar ve travmalar, parenteral beslenmenin geniş çapta uygulanması, çeşitli destek tedavileri alan yoğun bakım hastaları gibi immün sistemi baskılayan durumlardaki artış büyük ölçüde

mantar infeksiyonuna yakalanma riski taşımaktadır (2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

Primer patojen mantar kavramının bugün artık kapsamının genişlediği ve önceden saprofit olarak düşünülen non-*albicans* kandidaların, diğer mayalar ve diğer filamentöz (küf) mantarlarının artık patojen grup içerisinde değerlendirilmeye başlandığı dikkati çekmektedir (4). Birçok merkezde son zamanlarda filamentöz mantarların neden olduğu infeksiyonların sayısında yaygın bir artış olduğu bildirilmiştir (21). *Mucorales*, *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Scedosporium* gibi küf mantarları, immün sistemi baskılanmış hastalarda çok ciddi ve hızlı ölüme neden olabilen temel filamentöz mantarlardır (22). İnsanlardaki *Aspergillus* infeksiyonlarının %90'ından fazlasında *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) sorumlu iken, invaziv hastalıkların %10'undan *Aspergillus flavus* (*A. flavus*), %2 kadarından da *Aspergillus niger* (*A. niger*) ve *Aspergillus terreus* (*A. terreus*) sorumlu tutulmaktadır (9, 10, 23, 24, 25, 26). İnvaziv pulmoner aspergilloz'da (İPA) tedavi edilmeyen olgularda pnömونيye bağlı ölümler görülmektedir (%70–90) ve mortaliteyi konağın direnci belirlemektedir (25). Dissemine aspergilloz ile ilgili en yaygın patojen *A. fumigatus*'tur (16, 17, 25, 27). Karaciğer transplantasyonu yapılan hastalarda sistemik fungal infeksiyonların sıklığının %10 ile %40 arasında olduğu bildirilmiştir (28).

Hava, su ve hastane yüzeylerinde bulunan *Aspergillus* ve *Fusarium*'ların içinde bulunduğu fırsatçı filamentöz mantarlar ile kanserli hastalardan izole edilen suşlar arasındaki klonal ilişki moleküler çalışmalarda doğrulanmıştır (29).

İlimizin coğrafik özellikleri, yoğun tarımsal faaliyetlerin yapılması (sebze ve meyva yetiştiriciliği, seracılık), nemin ve sıcaklığın yüksek olması, organik materyal zenginliği gibi faktörler filamentöz mantar çeşitliliğini ve yoğunluğunu arttırmaktadır. Daha önce bölgemizde yapılan çalışmalarda bitki patojeni olarak bilinen bazı filamentöz mantarların hastalarda infeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir (30, 31, 32).

Bu tez çalışmasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde özellikle kritik ünitelerde (Yoğun Bakım Üniteleri, Reanimasyon, Diyaliz Üniteleri, Transplantasyon, Onkoloji) ve hastanenin diğer servislerinde (Göğüs Hastalıkları, Nefroloji, Hematoloji, Pediatri, Enfeksiyon Hastalıkları, Kardiyoloji, Dermatoloji ve tüm cerrahi servisler) yatan, uzun süreli tedavi gören ve invaziv girişim uygulanan hastaların klinik örneklerinden izole edilen küf

mantarlarının klasik ve moleküler yöntemlerle tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ülkemizde klinik örneklerde prospektif olarak filamentöz mantarların araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma vardır ve bu çalışmalar daha çok olgu sunumu şeklinde yapılmıştır. Mersin’de ilk defa yapılmış olan bu çalışmanın bölgemiz ve ülkemizdeki klinik örneklerden izole edilen filamentöz mantarların epidemiyolojik durumunun ve prevalansının belirlenmesine ışık tutucu olacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Tanım ve Tarihçe

Mikoloji kelimesi Yunanca mykes (mantar) ve logos (bilim) kelimelerinin birleşmesi sonucunda oluşmuştur. Mantar infeksiyonları mikoz olarak adlandırılmaktadır (1, 6, 33).

Mantar infeksiyonlarına ait bilinen en eski bilgi Hindu kutsal yazıtında (Samhita, M.Ö. 2000-1000) bulunmaktadır. Mantarlarla ilgili gerçek anlamda ilk sistematik çalışmalar ise mikroskobun keşfi ile gerçekleşmiştir. Mikolojinin kurucusu olarak kabul edilen İtalyan botanikçi Micheli 1729'da mantarlar ile ilgili değerli araştırmalarını yayınlamıştır. Mantarların insanlarda hastalığa yol açtığına dair ilk bilgiler ise 1839'da bildirilmiştir (33).

2.2. Mantarların sınıflandırılması

Filamentöz mantarlar Andreoni ve ark. (34) 2003 yılında yapmış oldukları sınıflandırmaya göre altı farklı grupta toplanmaktadır. (Çizelge 2.1)

Çizelge 2.1. Filamentöz mantarların sınıflandırılması (34).

Filamentöz mantar grupları	Cins ve türler
Hyalin Hifomiçetler (Renksiz, pigment oluşturmayan)	<i>Acremonium, Beauveria, Chrysosporium, Fusarium, Geotrichum, Gliocladium, Paecilomyces</i> türleri, <i>Penicillum, Scopulariopsis, Sepedonium, Sporotrichum, Trichoderma, Tricothecium, Verticillium</i>
<i>Aspergillus</i> 'lar	<i>A. candidus, A. clavatus, A. flavus, A. fumigatus, A. glaucus, A. nidulans, A. niger, A. ochraceus, A. oryzae, A. parasiticus, A. penicilloides, A. tamari, A. terreus, A. ustus, A. versicolor, A. wenti</i>
Zygomіçetler	<i>Absidia, Mucor, Rhizomucor, Rhizopus</i>
Dermatofitler	<i>Epidermophyton, Microsporium, Trichophyton</i>

Çizelge 2.1.devamı Filamentöz mantarların sınıflandırılması (34).

Dematiasöz Hifomiçetler (Esmer mantarlar)	<i>Alternaria, Aureobasidium, Bipolaris, Botrytis, Cladophialophora, Cladosporium, Curvularia, Epicoccum, Exophiala, Exserohilum, Fonsecaea, Graphium, Lecythophora, Myceliophthora, Nigrospora, Phaeoannellomyces, Pithomyces, Scedosporium, Stachybotrys, Stemphylium, Ulocladium, Wangiella</i>
Dimorfik Mantarlar	<i>Blastomyces dermatitidis, Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, Paracoccidioides brasiliensis, Penicillium marneffeii, Sporothrix schenckii</i>

2.3. Mantarların Genel Özellikleri

Mantarlar ökaryotik mikroorganizmalar olup canlıların beşinci alemini oluşturmaktadırlar. Mantarların sitoplazma zarı yapısal olarak insan sitoplazma zarına benzemekte olup sporları ile çevreye yayılmaktadırlar. Klorofil içermemeleri ile yüksek bitkilerden ayrılmaktadırlar. Mantarlarda mitoz ile gerçekleşen eşeysiz veya mayoz ile gerçekleşen eşeyli üreme görülmektedir. Üremeleri esnasında ve vejetatif gelişmenin yanı sıra dış ortama dayanıklı eşeysiz ve eşeyli sporları aynı anda oluşturabilmektedirler. Küf mantarları filamantöz yapı oluştururken, mayaların çoğu filamantöz yapı oluşturmazlar. Mantarlar, hücre duvar yapıları ile hayvan hücrelerinden, hücre duvar yapısında bulunan kitin ile de bakteri ve yüksek bitkilerden ayrılmaktadırlar (1, 6, 35).

Mantar hücreleri boyut olarak bakterilerden daha büyüktür. Nükleusları bir zarla çevrili olup birden fazla kromozoma ve nükleolusa sahiptirler. Sitoplazma zarlarında sterol bulunmakta olup sitoplazmalarında mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve 80S'lik ribozomlara sahiptirler. Mantarların hücre duvarları glukan, mannan, kitin ve kitozan açısından zengindir. Heterotrofturlar, aerop ve fakültatif anaerop mikroorganizmalardır (6).

Hidrolitik ekzoenzimleri sayesinde (amilaz, lipaz, proteinaz) hücre dışındaki maddeleri sindirerek hücre duvarından emerek içeri alırlar. Organik bileşikleri karbon, elektron ve enerji kaynağı olarak kullanırlar.

Mantarların *in vivo/in vitro* üreme hızını etkileyen başlıca etmenler oksijen, ısı, pH, besiyeri bileşimi gibi faktörlerdir. Mantarların çoğu asidik pH'da iyi üreyebilirken optimum üreme pH aralığı 6,8-7 dir (6).

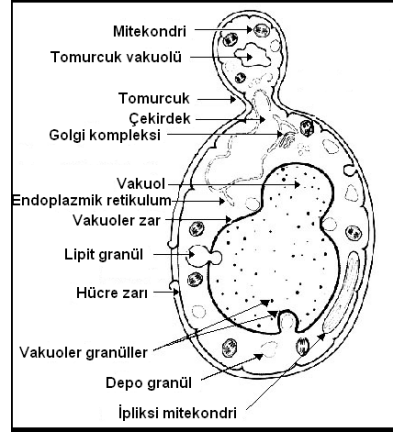
Mantarların çoğu karanlık ve %95–100 nemli ortamda daha iyi ürerler. Besin emilimi için ortamda suya gereksinimleri vardır. Ancak kuru ortamda konidiosporları canlı kalabilmektedir. Besiyerindeki nemliliğin azalması mantar sporlarının gelişimine yol açmaktadır. Patojen mantarların sporları kuruluğa çok dirençli olup, yıllarca bu şekilde yaşamsal işlevlerini sürdürebilmektedir. Bu özelliklerin sürdürülmesini sağlayan diğer önemli bir faktör ısıdır. Mantarların çoğu mezofilik olup 10-40°C'de ürerken optimal olarak 25-35°C'de iyi üreyebilmekle birlikte bazı mantarlar termotolerandır ve geniş bir ısı yelpazesinde çoğalabilme yeteneğine sahiptir. Mantarların çoğu düşük ısılara dirençlidir ve psikrofil, asidofil ve halofilik özelliklere sahiptirler (6, 36).

Mantarlar üreme özellikleri ve morfolojik yapılarına göre maya ve küf mantarı olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. Bazı mantarlar ise doğal ortamlarda (25-26°C) küf, insan vücut ısısında (37°C) maya şeklinde görülürler. Isıya bağlı yapı değişikliği gösteren mantarlara dimorfik (difazik) mantarlar denir (1, 6, 37). Maya mantarları, besiyerinde 24 saatte gözle görünür hale gelirken küf mantarları maya mantarlarına göre yavaş üreyerek türe bağlı olarak 4-21 günde kolonileri gelişmektedir (6).

2.3.1. Mayalar

Maya hücreleri, yuvarlak, oval veya silindir biçiminde bir görünüme sahip olup tek hücrelidir ve Gram pozitif boyanırlar. Boyutları, türlere ve kültür koşullarına bağlı olarak, 2-10x3–16 µm arasında değişmektedir. Tomurcuklanma veya ortadan ikiye bölünme ile çoğalmaktadırlar. Bir maya hücresi, bir veya birkaç farklı noktadan tomurcuklanmaktadır. Olgunlaşan yapı ana hücreden koparak blastokonidium adı verilen ana hücrenin aynısı olan yavru hücreyi oluşturmaktadır. Bazen bölünen hücreler birbirinden ayrılmayarak zincir şeklinde yalancı hif (psödohif) ya da yalancı miçelyum (psödomiçelyum) olarak adlandırılan yapıları oluşturur. Mayalar hücre duvarlarında glikoz, mannoz, az miktarda protein, lipid ve kitin; sitoplazmalarında ise hücre

çekirdeğinin yanı sıra yağ, protein, karbonhidrat tanecikleri ve olgunlaşmış hücrelerde vakuol içerirler (1, 6, 38).



Şekil 2.1. Bir maya hücresinin yapısı (39)

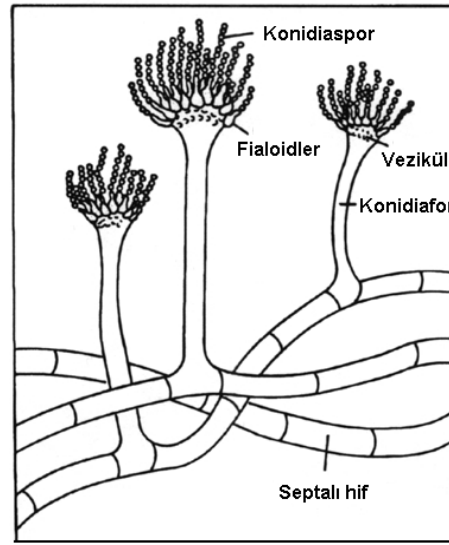
2.3.2. Filamentöz (Küf) Mantarlar

Filamentöz mantarlar, uzun dallanan 2-10 µm çapında iplikli yapılar içermektedir. Küf şeklindeki mantarların hücre duvarları birbirine paralel tübüler şeklindeki esas yapı birimi hif olarak adlandırılan çok hücreli filamentöz kolonilerdir. Hiflerin bir araya gelerek oluşturdukları topluluğa miçel adı verilir. Miçelin besiyerindeki görünümüne koloni denir. Bazı küflerde hifler enine septum adı verilen bölmelerle bölünmüştür. Septumlara sahip olan küfler septumlu (bölmeli), olmayanlar ise septumsuz (bölmesiz) hifli olarak adlandırılır. Bölmesiz hiflerin çapı 10–15 µm iken, daha kısa olan bölmeli hiflerin çapı 2–5 µm'dir. Küf mantarlarının tanımlanmasında hiflerin çapı, uzunluğu ve septumu önemlidir. Septada tek veya çok sayıda "por" adı verilen delikler bulunur. Porlar sitoplazma akışını sağlar. Septasız hiflere, sitoplazmik sürekliliğin bulunması nedeniyle sönositik hif denir (6, 8, 35).

Hifler fonksiyonlarına göre üçe ayrılır: Besiyerinin içinde veya üzerinde gelişen ve besinin emilimini sağlayan hiflere *vegetatif hif*, çoğunlukla üreme elemanlarını (eşeyli spor, eşeysiz konidya) taşıyan çoğalmada rol oynayan yapılara (reproduktif) *çoğalma hifi* ve besiyeri yüzeyinde gelişerek koloninin görünen kısmını oluşturan

hiflere ise *aerial* (havasal) *hif* denir. Bu üç tip hif tek bir kolonide bulunmaktadır. Miçel dokusunun artmasıyla “kadifemsi”, “tüyümsü” küf kolonileri gelişmektedir. Raket, nodüler, taraksı, spiral, favus şamdani ve köksü (rizoid) yapıdaki hifler mantar türlerine göre değişiklik göstermektedir ve mikroskopik incelemede tanıya yardımcı olmaktadır (6, 8, 35).

Küf mantarının parlak renkli ve tüyümsü yumuşak yapıda görülmelerinin nedeni aerial hifleri ve spordur (6, 8).



Şekil 2.2. Bir filamentöz mantarın yapısı (40)

Filamentöz mantarlar spor oluşturarak değişik hava hareketleriyle geniş alanlara yayılabilmektedir. Havanın kimyasal ve fiziksel kirlenmesiyle birlikte mantar sporları da artmaktadır (41). Normalde açık havada 10^5 mantar sporu/ m^3 bulunurken kapalı ortamlarda bu sayı $10^9/m^3$ 'e kadar çıkabilmektedir. Gerek iç gerekse dış ortam atmosferine ait solunan havanın $1 m^3$ 'ünde asılı bulunan konidial mantar sporu sayısı 10^6 'ya ulaştığında doğrudan sağlığı tehdit eder hale gelmektedir (8, 42). Havada bulunan bu mantar sporlarının sayısı mevsime, iklim koşullarına, coğrafik yerleşim bölgesine ve günün belli saatlerine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Sporların büyüklükleri, renkleri, şekilleri ve sayıları mantar türlerinin tanımlanması ve ayırımında

kullanılmaktadır. Genellikle küçük ve hafif olan mantar sporları, havada uzun süre asılı kalabilmektedirler (43).

Doğada serbest yaşayan mantarların havadaki sporları insanlar ve hayvanlar tarafından solunum yoluyla veya inokülasyon ile kolaylıkla alınarak infeksiyonlara yol açabilmektedirler. Bu sporlar ve diğer mantar yapıları insanlar için kuvvetli alerjen olabilmektedir ve kişide aşırı duyarlılık reaksiyonları oluşturabilmektedir. Bu alerjenler vücutta depolandığı bölgeye göre en çok rinit, konjunktivit, bronşiyal astım, alveolit veya genelleşmiş pnömoniye yol açmaktadırlar, bazen de ürtiker ve sistemik anaflaksiye neden olabilmektedirler (8, 41, 42, 44, 45).

Sporları doğada yaygın olarak bulunan *Hyalohyphomycetes* türleri (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*), *Zygomycetes* türleri (*Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*), *Fusarium* türleri ve diğer (*Pseudallescheria*, *Alternaria*, *Cladosporium*) küfler en sık hastalık etkeni olan türlerdir. Yeterli nem, ısı ve besin maddelerini bulduklarında çok hızlı gelişip ortamı istila edebilir ve çevre kirliliğine neden olabilirler (42).

Mantarlar vücuda sıklıkla derideki yarıklar (kateter), mukozal membranlar (gastrointestinal yol) ve sinopulmoner invazyon yoluyla girerler. Sağlıklı konak infeksiyondan doğuştan ve sonradan kazanılan immünitinin çeşitli mekanizmaları ile korunmaktadır. Deri ve mukozal membranlar mantarlara karşı primer savunmayı oluşturmakta olup anatomik bariyer olarak görev yapmaktadırlar. Hem gastrointestinal yolda hem de solunum yolunda bulunan epitel hücreleri mantarlara karşı antimikrobiyal efektörler salgılayarak primer savunma yapabilmektedirler. Ancak bazı mantarlar konak savunmasından korunmanın bir yolunu bularak etken hale geçebilmektedir (2, 21).

Küflerin neden olduğu hastalıkların patogenezi infeksiyon, alerji ve toksisite olmak üzere üç mekanizma ile açıklanmaktadır. İnsandaki mantar infeksiyonları sıklıkla deri veya akciğerlerde lokalize olmasına karşın sistemik olarak da lokalize olabilmektedir. Merkezi sinir sistemi (MSS), kemikler, eklemler veya lenf nodlarını tutan infeksiyonlar daha az yaygındır ve immün sistemi baskılanmış konaklarda herhangi bir organda veya yüzeyinde doku apsesi ya da dissemine hastalık şeklinde fırsatçı infeksiyonlar oluşturmaktadır (36).

Alerji; uzmanlar tarafından alerjik mekanizmalarca küf sporlarının inhalasyonu ile oluşan solunum hastalığı olarak tanımlanmıştır. Atopik astım,

hipersensitif pnömoni, alerjik bronkopulmoner aspergilloz ve alerjik fungal sinüzit olmak üzere dört bilinen hastalık vardır (36).

Toksisite ise; bazı filamentöz mantarların besinler üzerinde üreyerek oluşturduğu mikotoksinleri (aflatoksin, okratoksin A, patulin, sitrinin) insanların almasıyla oluşmaktadır. Mikotoksin içeren çeşitli yiyecekler belirli bir dozun üzerinde alınıp sindirildiğinde klinik mikotoksikozis'e (ergotizm, aflatoksikozis) neden olmaktadır (36).

Bu mikotoksinler böbrek fonksiyonlarının bozulmasına, deri duyarlılığına, nekroza ve bağışıklık yetmezliğine de neden olmaktadır. Bazı mikotoksinler nörotoksik etki göstermektedir. Pekçok mikotoksinin düşük doz ve uzun süreli etkisi, özellikle karaciğerde, kanser oluşumunda önemli role sahiptir. Karsinojen özellikte olan ve en iyi bilinen toksin "aflatoksin" dir. Mantarlarda toksin yapımını ortamdaki besin, ısı, nem, pH, oksijen varlığı, tahıl ürünlerinin depolanma süresi etkilemektedir (8).

İnsan ve hayvanlarda mikoza yol açan mantarlar; vücuda girdiğinde konağın yüksek ısısından etkilenmeyen, doku içindeki azalmış oksidasyon-redüksiyon potansiyeli ve savunma mekanizmalarına rağmen hayatta kalan, buldukları yerlerdeki maddeleri parçalayacak enzimleri taşıyan mikroorganizmalardır. Mantarların hastalık yapabilmelerinin temel dayanağının veya bir başka anlatımla mantar patojenitesi ile ilgili temel mekanizmanın, mantarların dokudaki ısıya ve diğer şartlara uyum gösterebilme ve konağın savunmasına karşı direnç mekanizmalarında saklı olduğu belirlenmiştir (33).

Fırsatçı mantarların dokuya yerleşebilmeleri için vücut direncinin ve normal savunma mekanizmasının önemli derecede hasar görmüş olması gerekmektedir. Mantarlar içerisinde düşük virülanslı, nadir görülen fakat hayatı tehdit eden etken sayısı ve çeşitliliği giderek artmaktadır (33).

Mantar infeksiyonları nozokomiyal ve toplum ilişkili olmak üzere iki kategoride toplanmaktadır. Nozokomiyal fungal infeksiyonlar, bir sağlık kurumunda kazanılmış olarak tanımlanmakta ve hemen hemen hepsi fırsatçı mikozlardır. Aksine toplum ilişkili fungal infeksiyonlar sadece fırsatçı mikozları değil endemik mikozları da içermektedir. Son 25 yıldır hem nozokomiyal hem de toplum ilişkili fungal infeksiyonlar dramatik olarak artmıştır. Fungal infeksiyonlarda artışa katkıda bulunan bir çok faktör vardır (46).

İnvaziv fungal infeksiyonların oranı altta yatan risk faktörleri ve lokal faktörlere bağlı olarak hastane ve bölgelerde değişiklik göstermektedir. En yaygın nozokomiyal fungal patojenler arasında *Candida* (yılda milyonda 73 vaka), *Aspergillus* (yılda milyonda 12 vaka) ve *Zygomycetes* (yılda milyonda ~2 vaka) ilk üç sırayı almaktadır. Fungal infeksiyonlarda görülen artış oranları aynı zamanda ölüm oranlarındaki önemli artışı da beraberinde getirmektedir (46).

Hastaların yattığı odalarda veya yakın ünitelerde yapılan inşaat çalışmaları veya tadilatlarla bağlı havalandırma sistemlerinin kontamine olmasıyla filamentöz mantarların neden olduğu nozokomiyal salgınlar ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca kontaminasyon kaynağı ilaç ve ekipmanların hazırlandığı veya saklandığı odalar olabilmektedir (10).

Hastane ve kritik ünitelerinde, havada bulunan küflerin yoğunluğunun belirli düzeylerde olması gerektiği ve fırsatçı infeksiyonlarda havada bulunan küflerin etkili olabildiği bildirilmiştir (18, 32, 47).

2.4. En Sık İnfeksiyona Neden Olan Filamentöz Mantarlar

2.4.1. *Aspergillus* spp.

Aspergillus terimini ilk olarak 1729 yılında Micheli kullanmıştır. Virchow 1856'da, ayrıntılı mikroskopik gözlemleri ile *Aspergillus*'un insanlar için patojen olabileceğini bildirmiştir. Cramer, 1859'da bir kulak infeksiyonundan *A. niger*'i tanımlamıştır. Deve, 1938'de mantar topunu (pulmoner aspergilloma) tarif etmiştir. Günümüzde 18 grup ve 200'ün üstünde tür bildirilmektedir. *Aspergillus* türleri çoğunlukla anamorfik (eşaysız) olarak üremektedirler (48).

Aspergillus cinsinden mantarlar çeşitli besiyerlerinde geniş bir ısı aralığında kolayca ve bir kaç gün içinde üreyebilirler. Patojen olabilen türler 37°C'de üreyebilme özellikleri ile patojen olmayan türlerden ayrılır. *Aspergillus*'ların tür ayrımı, konidiafor uzunluğu, vezikül biçimi, tek veya çift sıralı fialoid (sterigma) oluşumu, fialoidlerin vezikülde kapladığı alana göre yapılmaktadır (24).

Aspergillus cinsi mantarların, "Y" şeklinde dallanmalar gösteren, 3-4 µm enindeki bölmeli hifleri tipiktir. Dik ve bölmeli konidiaforların son kısmının

yuvarlaklaşması sonucunda oluşan 10-30 µm çapındaki vezikül; tamamen veya kısmen 4-6 µm çapında fialoidler ile kaplanmıştır. Tek veya çift sıralı fialoidler üzerinde yuvarlak, nadiren oval 2,5-3 µm çapındaki konidium zincirleri bulunur. *Aspergillus*'ların hücre duvarının kimyasal bileşimi; %40-60 glukan, %10-20 oranında kitin içerir ve diğer küfler ile benzerlik gösterir.

Toprakta, suda ve çürüyen bitkilerle eşyada çok fazla sayıda bulunan *Aspergillus*'lar için hastane ortamlarının rezervuar oluşturduğu, bu mantarın hastanelerin iç ortam havasından, yer döşemelerinden, havalandırma ve su sistemlerinden, yemeklerden, süs bitkilerinden alınan örneklerde saptanabildiği bildirilmiştir (13, 49).

Aspergillus'ların, hayvanlarda ve insanlarda birçok hastalığın etkeni olarak izole edilmeye başlanmasından sonra önemi gittikçe artmıştır (48). Akciğerler ve santral sinir sistemi, hastalığın en sık görüldüğü bölgeler olup (50) dış kulak yolu, paranasal sinüsler, bronşektazi ve tüberküloz (TBC) sonrası oluşan kavitelerde de kolonize olabilmektedir (25).

Aspergillus'ların oluşturdukları hastalıklara genel olarak aspergilloz adı verilmektedir. Bu hastalıklar saprofitik kolonizasyon, saprofitik bronkopulmoner aspergilloz, solunum yolu ile alınan sporlarının antijenik uyarımı sonucunda oluşan alerjik hastalıklar; (alerjik astım, alerjik rinit, alerjik sinüzit, hipersensitif pnömonit, alerjik bronkopulmoner aspergilloz, toksik aspergilloz) önceden var olan kaviteleri miçellerinin doldurması ile gelişen aspergillom (mantar topu), sinüzit, akciğer nodülleri, osteomyelit, trakeobronşit, endokardit, deri lezyonları, dokulara yayılarak invaziv sistemik infeksiyonlara (İPA) ve fungemilere neden olmaktadır (10, 25, 51, 52, 53, 54, 55). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda *A. flavus*'un oluşturduğu aflotoksin B1'in karaciğer kanserine neden olduğu ileri sürülmüştür (56).

Aspergillus'lar *Candida albicans*'tan sonra insanda fırsatçı mantar infeksiyonlarının ikinci en yaygın nedeni iken (19) son 10-15 yıldır invaziv küf infeksiyonlarının en önemli etkenidir ve yüksek mortalite oranlarına sahiptir (17, 20, 57). Bu mortalite oranları erken tanı ile etkili tedavinin zamanında uygulanmasına ve konak faktörlerine bağlı olarak değişmektedir (49).

Hava, *Aspergillus*'ların çevreye yayılmasında ve hastalara geçişinde çok önemli bir rol oynamaktadır. *Aspergillus* infeksiyonlarının primer bulaş yolu konidiaların

inhalasyonu ile olmaktadır (49). Solunum yoluyla alınan konidialar burada yaygın bir şekilde kolonize olur (51). Hastalığın klinik seyri ve şiddeti hastanın altta yatan risk faktörleri ile ilişkili olup, immünolojik durumuna bağlıdır. *Aspergillus*'lar için risk faktörleri; kemik iliği transplantasyonu, organ transplantasyonu (kalp, akciğer, karaciğer), ciddi ve uzun süre devam eden inatçı nötropeni (en önemli risk faktörü), AIDS, steroid kullanımı ve kronik granülomatöz hastalıklar sayılabilir. *Aspergillus* spp. TBC, sarkoid, diğer mikozlar, kanser ve bronşektazili hastalarda sıklıkla ikincil fırsatçı patojendir. Ancak sağlıklı kişilerde de görülebilmektedir (25, 51).

Bir çok nozokomiyal invaziv aspergilloz salgını bildirilirken (49), invaziv aspergilloz, hastaların 1/3'ünde asemptomatik seyretmekte ve semptom ve belirtilerin eksikliğine bağlı olarak ve *Aspergillus* antijenlerini serolojik yöntemlerle tespit eden ticari testler çok yaygın olmadığı için tanısız zorluklar yaşanmaktadır (20, 53).

İnvaziv aspergillozun transplant hastalarında insidansı transplante edilen organa bağlı olarak %0,7 ile %10 arasında değişmektedir. Akciğer ve kemik iliği alıcılarında invaziv aspergilloz gelişme riski yüksek iken pankreas ve böbrek alıcılarında risk düşüktür. İnvaziv aspergilloz insidansının akut lösemili hastalarda %5-24 (29), kronik granülomatöz hastalığında %25-40, karaciğer alıcılarında %1,5-10, hematopoetik kök hücre alıcılarında %10-15 ve AIDS'li hastalarda %0-12 arasında değiştiği bildirilmiştir (28, 49, 58, 59). *Aspergillus*'lara bağlı invaziv mantar infeksiyonları, tüm invaziv mantar infeksiyonlarının %4-5'inden sorumlu tutulmaktadır (60).

Son yıllardaki tanı ve tedavideki ilerlemelere rağmen immün baskılanmış kişilerde mortalite ve morbiditenin en önemli nedenlerinden biri *Aspergillus*'ların neden olduğu invaziv fungal infeksiyonlardır. İnvaziv aspergilloz tedavi edilmezse %50-100 fatal sonuçlanmaktadır (49, 55). Hematolojik malignensitesi olan ve kemik iliği nakli yapılan çocuklarda invaziv aspergillozun mortalite oranının %40-94 olduğu bildirilmiştir (61, 62).

A. niger ve *A. terreus*, dış kulak yolunun bakteriyel infeksiyonlarında ikincil infeksiyon etkeni olarak izole edilmektedir (25, 63).

Aspergillus'lar en önemli iç ortam küfü olarak değerlendirilmektedir (45). Hava örneklerinin toplandığı çalışmalarda hem iç ortam hem de dış ortam havasında *A. fumigatus*'un spor konsantrasyonunun diğer *Aspergillus* türlerinden oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (49).

Çalışmalarda invaziv aspergillozun patogenezi ve epidemiyolojisinde hastane çevresinin rolü olduğu bildirilmiştir. Kritik ünitelerde yatan hastaların havalandırma sistemlerine High-Efficiency Particulate Air filtration (HEPA) filtreler takıldığında ortam havasındaki konidia konsantrasyonunun düştüğü ve buna paralel olarak invaziv aspergilloz sıklığının azaldığı bildirilmiştir (49).

2.4.1.1. *Aspergillus fumigatus*

Dissemine invaziv aspergillozun en sık nedenidir. Sinüslerden en sık izole edilen ajanlardandır. *A. fumigatus* kolonileri; kadifemsi, pudramsı yapıda olup, ilk ürettiğinde beyaz renkli olan koloniler, eskidikçe koyu gri, yeşilimsi renge döner. Ters tarafı beyazdan ten rengine kadar değişebilir (Şekil 2.3). Kolonilerden hazırlanan preparasyonda, bölmeli hifler, düzgün yüzeyle, renksiz, kısa konidiaforlar görülür. Fialoidler tek sıralı olup, vezikülün 2/3 üst yarısından başlamıştır ve konidiaforun eksenine paralel dizilim gösterirler. Konidiumlar 2-3,5 µm çapında ve genelde düzgündür (Şekil 2.4) (25, 64).



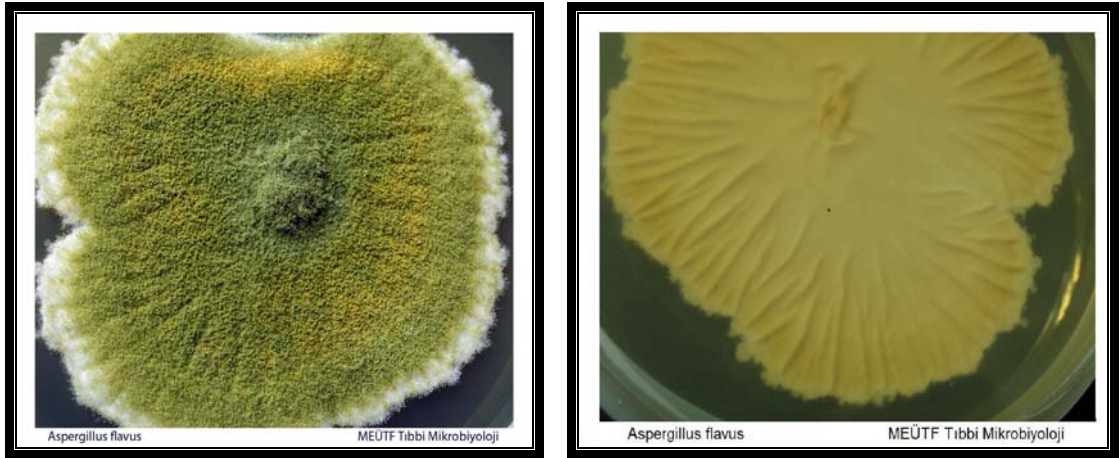
Şekil 2.3. *A. fumigatus*'un SDA'daki koloni görüntüsü
(Hasta 8'den izole edilen suş, *A. fumigatus* BLAST:GU594752.1)



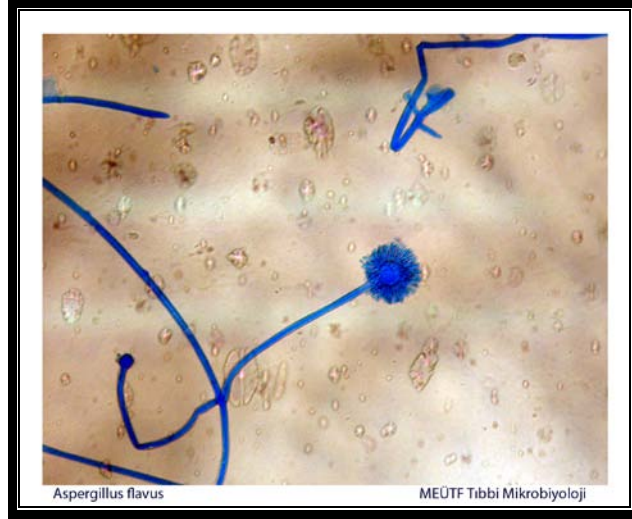
Şekil 2.4. *A. fumigatus*'un mikroskopik görüntüsü (LFPM ile boyanmış)

2.4.1.2. *Aspergillus flavus*

İkinci sıklıkta aspergilloz etkenidir. Pulmoner, sistemik infeksiyonlar, sinüzit, kulak ve diğer infeksiyonlara neden olurlar. Aflatoksin üretirler. Kolonileri kadifemsi, sarıdan yeşile değişen veya kahverengi olabilir. Koloninin ters tarafı sarıdan, kırmızı veya kahverengiye kadar değişebilir (Şekil 2.5). Konidiaforlarında değişken uzunlukta, pürtüklü, çukurlu, dikensi çıkıntılar vardır, fialoidleri tek veya çift sıralıdır, vezikülün her tarafını kaplar ve bütün yönlere doğru uzanır (Şekil 2.6) (25, 64).



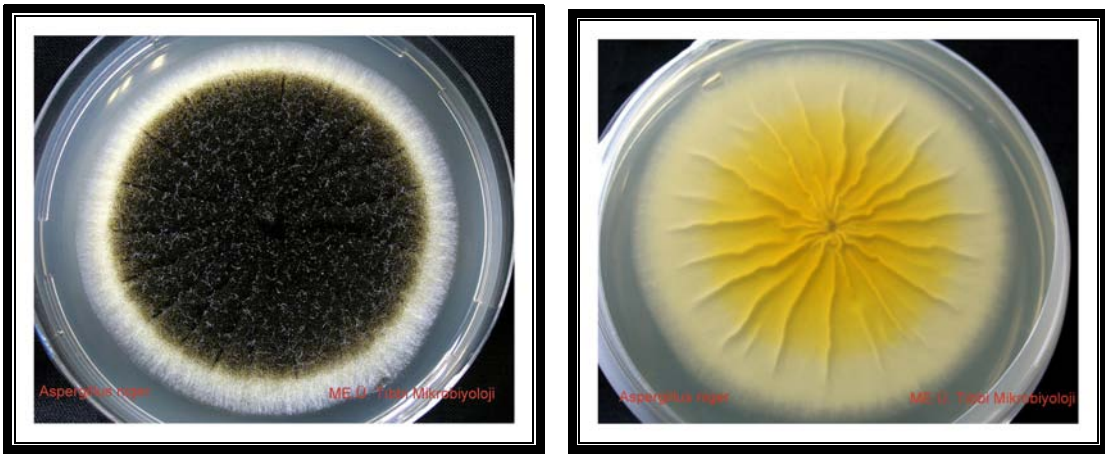
Şekil 2.5. *A. flavus*'un SDA'daki koloni görüntüsü
(Hasta 9'dan izole edilen suş, *A. flavus* BLAST:GU594738.1)



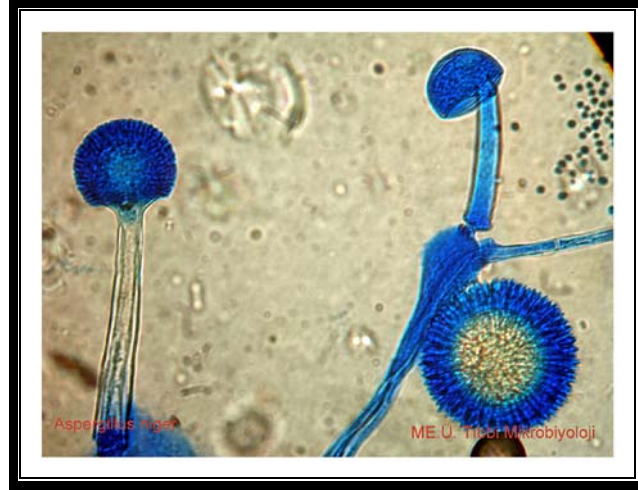
Şekil 2.6. *A. flavus*'un mikroskobik görüntüsü (LFPM ile boyanmış)

2.4.1.3. *Aspergillus niger*

Yaygın olarak kulak infeksiyonlarında görülür. Sıklıkla aspergillom oluştururken nadir olarak dissemine infeksiyon yapar. Genellikle laboratuvar bulaşına neden olur. Makroskobik görünümü çok tüylü, genç kolonileri başlangıçta beyaz veya yeşil renkte görülürken sonradan siyaha döner. Besiyerinin arka tarafından bakıldığında koloni sarı renkte görülür (Şekil 2.7). Konidiaforları uzun ve düzdür. Fialoidler çift sıralı, vezikülün tüm yüzeyini kaplar ve ışnsal bir dizilim gösterirler (Şekil 2.8)(25, 64).



Şekil 2.7. *A. niger*'in SDA'daki koloni görüntüsü
(Hasta 7'den izole edilen suş, *A. niger* BLAST:EF625687.1)



Şekil 2.8. *A. niger*'in mikroskobik görüntüsü (LFPM ile boyanmış)

2.4.1.4. *Aspergillus terreus*

Tırnak, deri, göz ve kulak infeksiyonlarının yanı sıra sistemik infeksiyonlar da yapmaktadır. Genellikle kadifemsi, tarçın kahverengisine benzer renkte koloniler oluşturmaktadır. Koloninin ters tarafı beyaz veya kahverengidir. (Şekil 2.9) Konidiaforları kısa ve düzdür. Fialoidler çift sıralı, agara batmış miçelyumda oluşan hyalin hücreler ard arda sıralanmıştır (Şekil 2.10) (25, 64).



Şekil 2.9. *A. terreus*'un SDA'daki koloni görüntüsü
(Hasta 11'den izole edilen suş, *A. terreus* BLAST:FN811183.1)



Şekil 2.10. *A. terreus*'un mikroskopik görüntüsü (LFPM ile boyanmış)

2.4.2. *Fusarium* spp.

Hyalin hifomiçetes sınıfı içerisinde yer alan *Fusarium* türleri dünya genelinde yaygın olarak bulunan toprak saprofitleri ve iyi bilinen bir bitki patojenidir. Yaklaşık olarak 1000'den fazla *Fusarium* türü patojen özellik göstermektedir (65, 66).

Fusarium'lardan üretilen bazı metabolitler, bitkiler ve hayvanlarda büyümeyi arttırıcı madde olarak kullanılırken, bazı iddalara göre bu mantarlardan elde edilen mikotoksinlerin biyolojik silah olarak kullanıldığı ileri sürülmektedir (66).

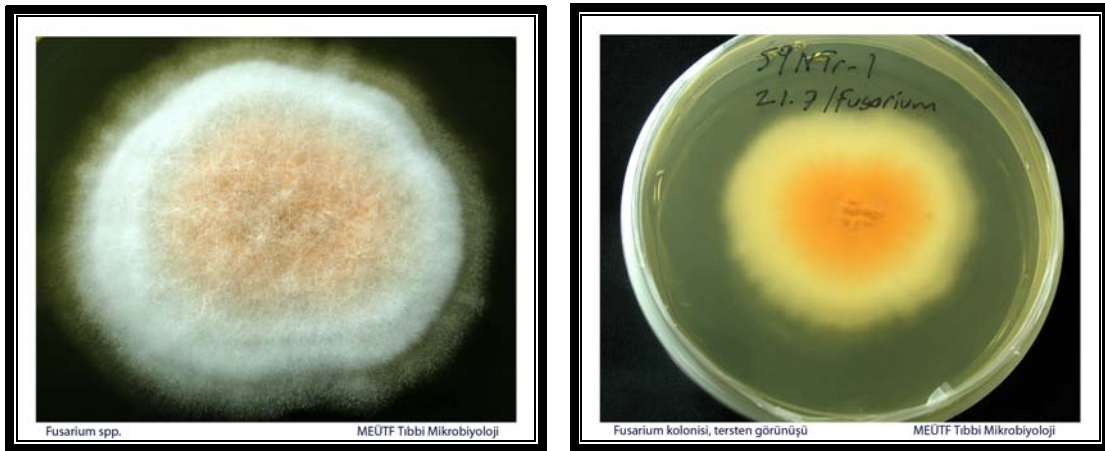
Nadir olarak insan ve hayvanlarda toksikozlara ve lokalize ya da hematojen yayılımla çeşitli sistemik infeksiyonlara neden olmaktadır (67). En fazla izole edilen türler *F. solani*, *F. oxysporum* ve *F. moniliforme*'dir. Keratomikoz, endoftalmit, peritonit, invaziv nazal infeksiyonlar, sinüzit, rinoserebral infeksiyon, pulmoner infiltratlar, piyomiyozit, onikomikoz, kemik, eklem ve derinin postoperatif ya da travmatik lezyonları, miçetom, yanık yaraları gibi lokal infeksiyonlar ve dissemine infeksiyonlar sağlıklı kişilerde ve immünsüprese hastalarda gelişebilmektedir. Bildirilen sistemik fusariyoz olgularının büyük bir çoğunluğu hematolojik maligniteli hastaların nötropenik periyodunda gelişmektedir. *Fusarium*'ların giriş yolu; konidiaların solunmasıyla akciğerler, paranasal sinüsler ve bütünlüğü bozulan deri olarak belirtilirken, kan kültürlerinde aspergilloz olgularına göre daha yüksek oranda (%59-60)

izole edilmeleri derinin en önemli bulaş yolu olduğunu göstermektedir (13, 29 52, 55 64, 65, 68). Hastane havalandırma ve su sistemlerinde kontaminant olarak bulunduğu bildirilmiştir (66). *Fusarium*'ların neden olduğu nozokomiyal salgınlar tanımlanmıştır (61). Sistemik *Fusarium* enfeksiyonu bulunan hastalarda ölüm oranının %70'den fazla olduğu bildirilmiştir (66).

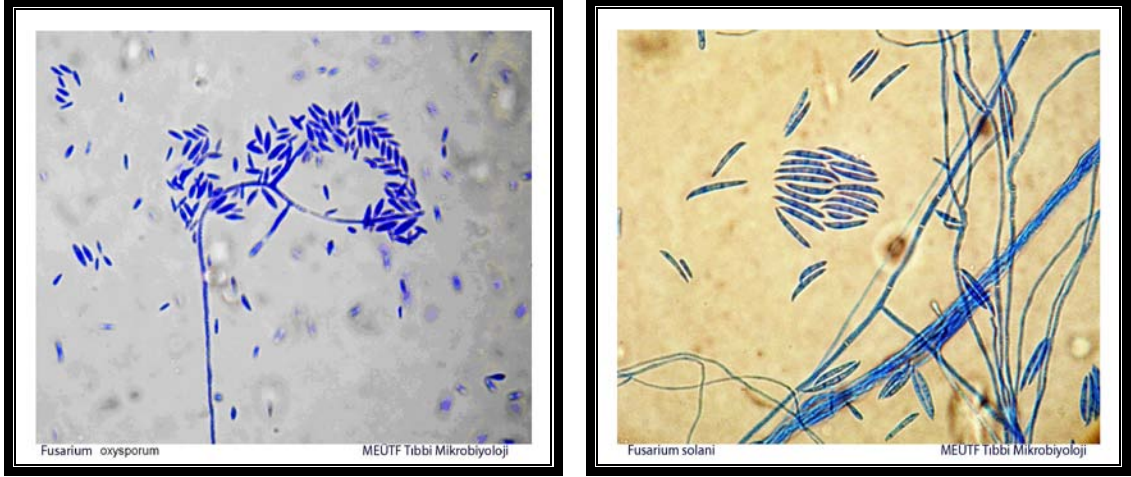
Dissemine *Fusarium* enfeksiyonlarının tanısında kan kültüründen küf mantarı izolasyonunun yanısıra ayak başparmağı ve parmaklarda eşlik eden selülit ve yaygın deri lezyonlarının bulunmasının önemli olduğu bildirilmiştir. Deri lezyonları ektima benzeri ya da çok sayıda subkutan nodül şeklinde olabilmekte ve aspergillozdan daha yüksek sıklıkta meydana gelmektedir (52, 55).

İnvaziv fusarioz immün baskılanmış hastalarda aspergillozdan sonra en yaygın invaziv küf enfeksiyonları arasında ikinci sırayı almaktadır (17, 29, 61, 65).

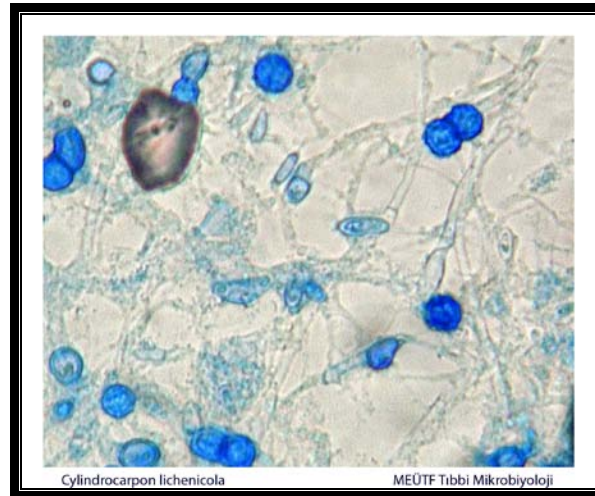
Fusarium kolonileri 4-5 günde hızlı şekilde ürerken, ilk başta beyaz fakat merkezde pembe veya mor, çevre kısmında daha açık olan bir renge hızla değişir. Bazı türleri beyaz kalırken, bazıları ten rengi veya turuncuya dönüşür. Kolonilerin ters tarafı genellikle beyazdır ancak bazen renklenebilir (Şekil 2.11). Hiflerinde septaları vardır, orak veya kano şeklinde makrokonidia (3-5 septalı) ve mikrokonidia (1-2 septalı) olmak üzere iki tip konidiaya sahiptir. Dallanmış veya dallanmamış konidiaforlara sahiptir (Şekil 2.12). Bazı türleri mikroskopik görüntüleri ile *Acremonium*'lara benzemektedir (64).



Şekil 2.11. *Fusarium oxysporum*'un SDA'daki koloni görüntüsü (Hasta 1'den izole edilen suş, *Fusarium oxysporum* BLAST:GQ376117.1)



Şekil 2.12. *F. oxysporum*, *F. solani* ve *F. equiseti*'nin mikroskobik görüntüleri (LFPM ile boyanmış)



Şekil 2.13. *Cyindrocarpon lichenicola*'nın mikroskobik görüntüsü (LFPM ile boyanmış)

2.4.3. *Mucor* spp. ve *Rhizopus* spp.

Mucoraceae ailesinde yaygın olarak *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor* ve *Absidia* enfeksiyonlara neden olmaktadır (69).

Mucorales grubunda risk faktörü olarak nötrojeni, diabetik ketoasidoz, aşırı demir yükü, yanıklar, çocuklarda kötü beslenme, yanlış ilaç kullanımı ve transplant alıcıları sayılabilir. Oluşturduğu hastalıklar arasında sinüzit, beyin apseleri, deri lezyonları, pnömoni, dissemine hastalıklar, gastrointestinal lezyonlar, endoftalmit, kemik ve yumşak doku hastalıkları bulunmaktadır (10).

Zigomikoz etkenleri; toprakta, havada ve besinlerde yaygın olarak bulunan saprofit küf mantarlarıdır. *Zygomycetes* sınıfında yer alan fırsatçı küf mantarlarının neden olduğu zigomikoz, sağlıklı kişilerde de görülmekle birlikte, özellikle immünsüpre ve asidozlu hastalarda çeşitli klinik şekillerde görülen bir enfeksiyondur. Zigomikoz hızlı ilerleyen ölümcül bir hastalıktır. Bütün tedavi girişimlerine rağmen hastaların çoğu (%70-80) kaybedilmektedir (70).

Zigomikozda mikolojik incelemede damak ve nazofarinkste görülen siyah renkli nekrotik lezyondan ve akciğer, rinoserebral ve deri lezyonlarından alınan biyopsi örnekleri incelenmektedir (70).

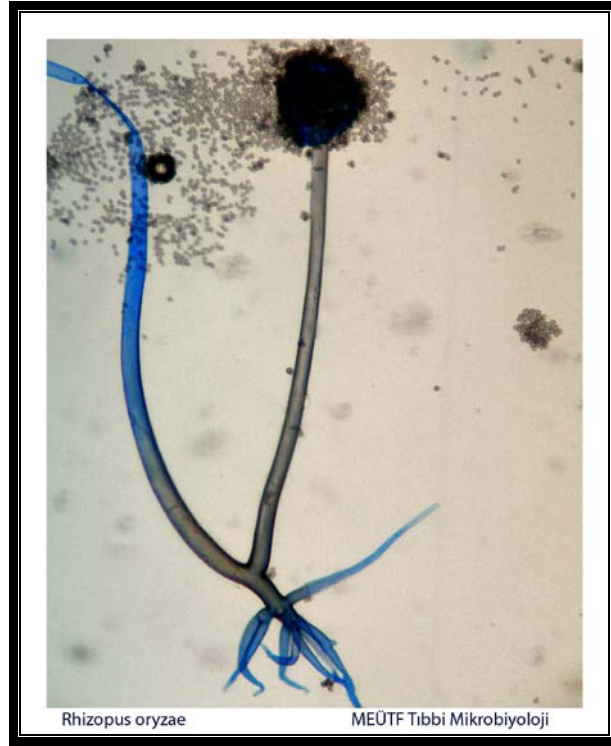
Mucor, mukormikoz etkenlerinden olup, predispoze kişilerde sistemik enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Rinoserebral zigomikozda, paranazal sinüslerden başlayan enfeksiyon komşuluk yolu ile yüz, damak ve/veya beyine yayılması en sık görülen klinik şeklidir. Daha sık olarak DM ve ketoasidozlu kişilerde ve organ transplantasyonu yapılanlarda görülmektedir (70).

Rhizopus oryzae birçok ülkede rapor edilmiş en yaygın *Rhizopus* türüdür (71). Mukormikoz'un en yaygın ajanıdır (72). Sinonazal bölgeden alınan kemik ve yumşak doku örneklerinden *R. oryzae* izole edilmiştir (73).

Rizopus kolonisi sık örgülü, pamuğumsu görünümündedir. Tüm besiyeri yüzeyini kaplayan beyaz renkli koloni bir süre sonra gri veya sarı renge dönüşür. Koloni tabanı beyazdır (Şekil 2.14) Bölmesiz geniş hifler ve uzun sporangiyofor kümelerini birbirine bağlayan stolonlar bulunur. Stolon ile sporangiyofor çoğu kez dallanma göstermez. İkisinin birleştiği noktalarda rizoit adı verilen kökümsü hifler bulunur. Sporangiyum yuvarlak ve koyu renkli olup çok sayıda spor içerirler (Şekil 2.15) (70).



Şekil 2.14. *Rhizopus oryzae*'nın SDA'daki koloni görüntüsü
(Hasta 23'den izole edilen suş, *Rhizopus oryzae*, BLAST:GU594768.1)



Şekil 2.15. *Rhizopus oryzae*'nın mikroskopik görüntüsü (LFBP ile boyanmış)
(Hasta 23'ten izole edilen suş, *Rhizopus oryzae*, BLAST:GU594768.1)

2.4.4. *Scedosporium* spp.

Dematiasöz hifomiçetes grubunda bulunan *Scedosporium* cinsi küf mantarları toprak, gübre, durgun su ve çürüyen bitkiler gibi geniş bir alanda bulunmaktadır. İnsanlarda en sık eller ve ayaklarda olmak üzere çeşitli anatomik bölgelerde kolonizasyondan invaziv infeksiyonlara kadar çok değişik infeksiyonlar oluşturmaktadır. Eklem, kemik, kornea, beyin, akciğer, sinüsler, meningesler, deri ve deri altı dokularındaki lokalize infeksiyonlar etkenin post-travmatik veya implantasyonu ile oluşmaktadır. Kortikosteroid ve immünsüpresif ilaç alan kişilerde hematojen yayılımla sistemik infeksiyonlar gelişebilmektedir (4, 64, 68, 72, 74).

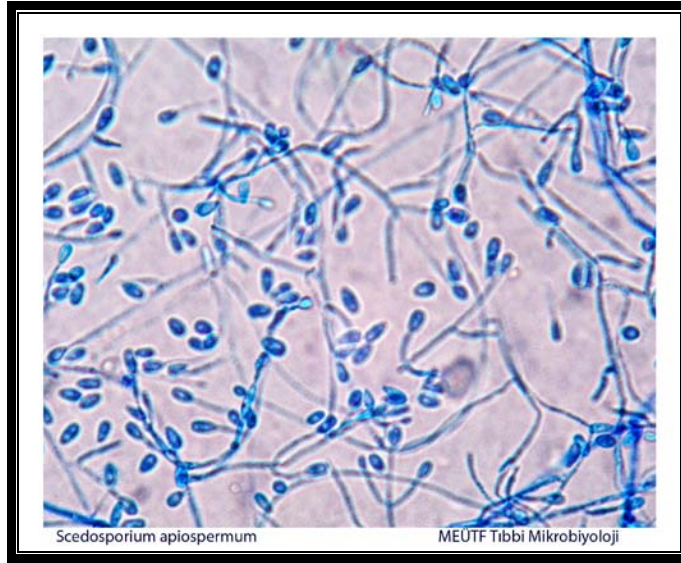
Aspergilloza benzer hastalığa neden olan *Scedosporium* cinsi filamentöz mantarlardan en yaygın olarak *Scedosporium apiospermum* türünün oluşturduğu infeksiyonlar görülmektedir. *S. apiospermum*, *Pseudallescheria boydii*'nin aseksüel telemorf formudur. Oldukça virülan olan bu küf mantarının mortalite ve morbititesi oldukça yüksektir. Tedaviye oldukça dirençlidir. Bağışıklığı sağlam kişilerde bile ölümcül mikoz oluştururken bağışıklığı baskılanmış kişilerde hızla dissemine infeksiyon oluşturmaktadır. Özellikle MSS infeksiyonlarında mortalite oranı %82 olarak bildirilmiştir (29, 74, 75).

Ülkemizde *Scedosporium* cinsi küf mantarlarının neden olduğu çeşitli olgular bildirilmiştir (74, 75, 76).

Yaklaşık yedi günde kolonileri ürer. Seksüel dönemi olan *P. boydii* sikloheksimid tarafından inhibe olurken *S. apiospermum* inhibe olmaz. Yüzeğe yayılan önce beyaz sonradan gri veya kahverengiye dönen pamuksu aeral miçelyumlara sahiptir. Kolonilerin ters tarafı önce beyazken sonradan gri veya siyaha döner (Şekil 2.16). Septalı hiplere sahip olup. kısa ve uzun konidiaforlardan çıkan konidialar tekli veya küçük gruplar halinde olabilir. Konidialar tek hücreli, oval, uca doğru genişler ve yaşlandıkça koyu renk alır (Şekil 2.17). Seksüel aşamada büyük, kahverengi ve koloninin merkezinde kleistoteka oluşur ve koptuğu zaman eliptik askosporlar serbest kalır (64).



Şekil 2.16. *Scedosporium apiospermum*'un SDA'daki koloni görüntüsü (Hasta 5'ten izole edilen suş, *Scedosporium apiospermum* BLAST:FJ345358.1)

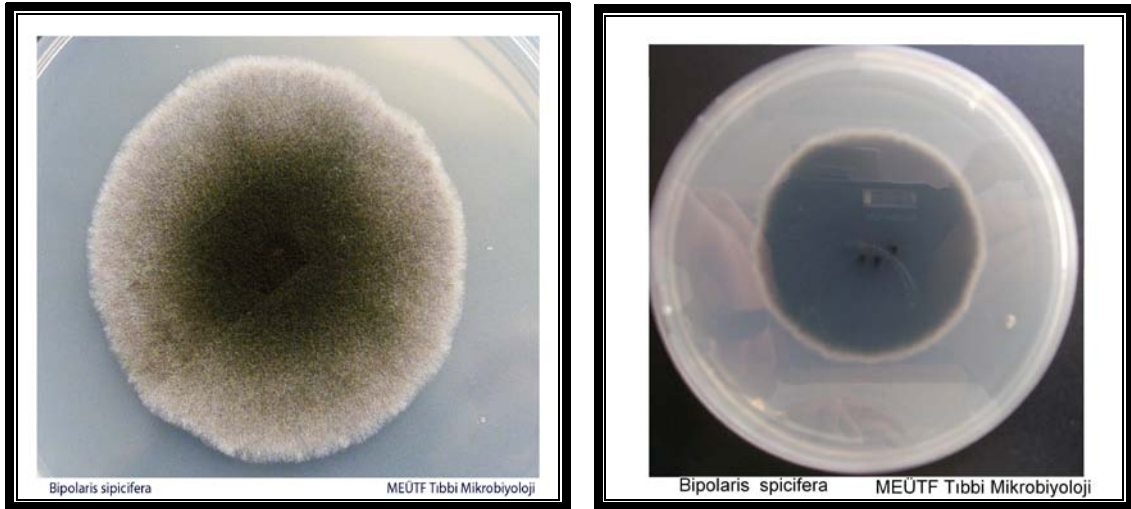


Şekil 2.17. *Scedosporium apiospermum*'un mikroskopik görüntüsü (LFPM ile boyanmış)

2.4.5. *Bipolaris* spp.

İnsanlarda yaygın olarak alerjik sinüzit yaparken, immün baskılanmış hastalarda kemikleri tutabilmekte ve beyinde lezyonlara neden olabilmektedir. Nadir olarak subkutanöz, göz, deri, aort, akciğer gibi diğer bölgelerde infeksiyonlara neden olabilir. Aynı zamanda kontaminant olarak da değerlendirilmektedir (72). Dematiasöz

hifomiçetes grubunda bulunan *Bipolaris* spp. hızlı bir şekilde beş gün içerisinde üreyebilir. Koloni yüzeyi ilk olarak gri kahverengi, merkez siyahlaşarak kenarlara doğru gri bir renk alır. Koloninin ters tarafı kahverengi veya siyahtır (Şekil 2.18). Koyu septalı hiflere sahiptir. Konidiaforlar uzar ve her konidiumun geldiği noktada eğilirler. Zigzag şeklinde bir görünüm alır. Konidialar kahverengi, dikdörtgen-silindirik, kalın duvarlı görülür, 3-5 septuma sahiptir ve hafifçe çıkık bir hilumu vardır (Şekil 2.19) (64).



Şekil 2.18. *Bipolaris spicifera*'nın SDA'daki koloni görüntüsü (Hasta 6'dan izole edilen suş, *Bipolaris spicifera* BLAST:GU596488.1)

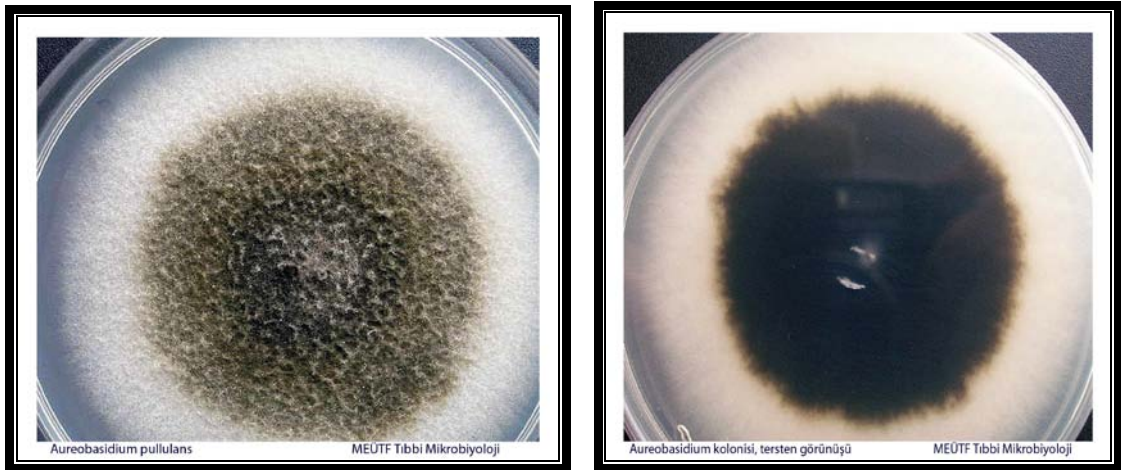


Şekil 2.19. *Bipolaris spicifera*'nın mikroskopik görüntüsü (LFPM ile boyanmış)

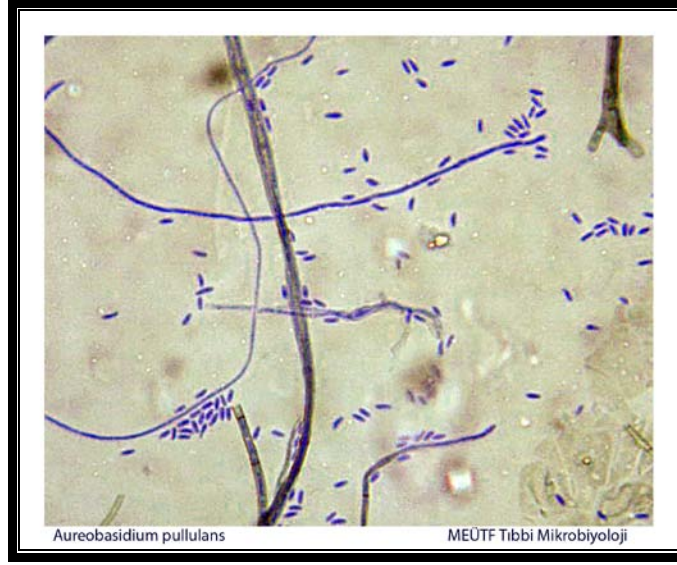
2.4.6. *Aureobasidium* spp.

İnsan ve hayvanlarda nadiren phaeohyphomycosis'in bir etkeni olarak *Aureobasidium pullulans* bildirilmiştir. Dematiasöz hifomiçetes grubunda yer almaktadırlar. Korneal, peritoneal, pulmoner, deri, tırnak, subkutanöz ve derin dokulardan izole edildiği rapor edilmiştir. Klinik örneklerde bir kontaminant olarak karşılaşılmaktadır (64, 72).

Kolonileri iki üç günde hızlı ürer. Fakat pigment üretimi ve karakteristik morfolojisi için daha uzun süre gereklidir. Kolonileri ilk başta beyaz, açık pembe veya ıslak krem renginde görülebilir. Artrokonidia geliştiği zaman kahverengi veya siyah alanlar gelişir ve parlar. Koloni kenarları beyazdan kahverengiye dönüşür. Koloninin ters tarafı olgunlaştığı zaman koyu bir renk alır (Şekil 2.20). Mikroskopik olarak genç koloniler tek hücrelidir ve maya hücresi gibi tomurcuklanır. İki tip hif gelişir; birincisi hyalin, narin ve ince duvarlı, belirli fertil noktalarda duvardan doğrudan blastokonidia üretirken ikincisi; kalın duvarlı, koyu, artrokonidia olan sık septalı segmentlerden oluşur (Şekil 2.21). Erken maya benzeri formları *Candida*'lara benzer. Sıklıkla *Hormonema dematioides* ile karıştırılmaktadır (64).



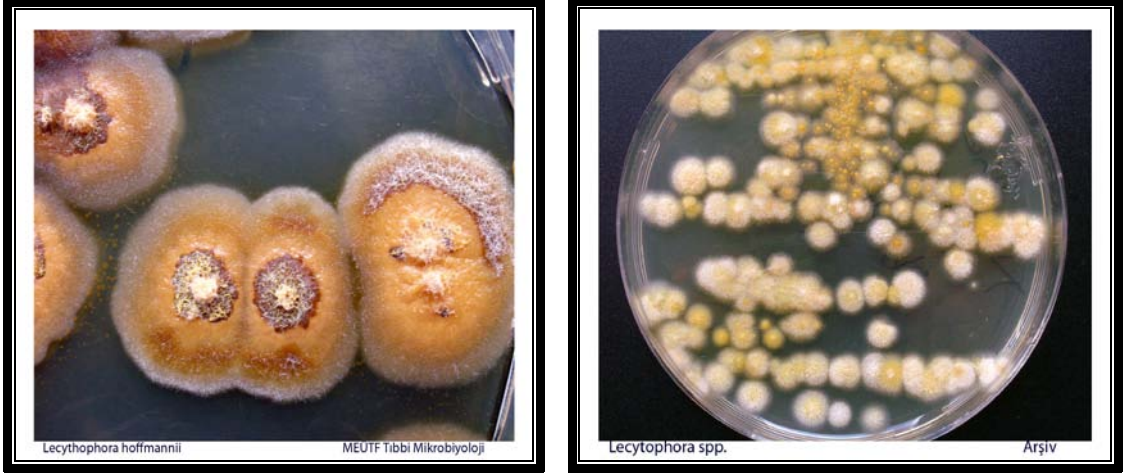
Şekil 2.20. *Aureobasidium pullulans*'ın SDA'daki koloni görüntüsü
(Hasta 26'dan izole edilen suş, *Aureobasidium pullulans* BLAST: AF121283.1)



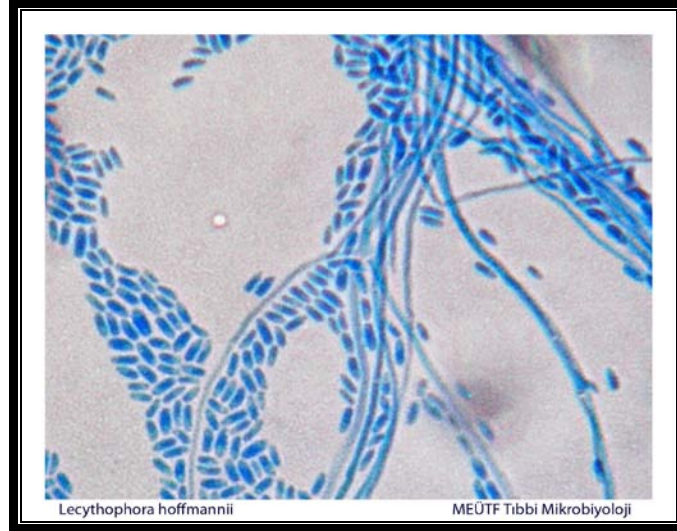
Şekil 2.21. *Aureobasidium pullulans*'ın mikroskobik görüntüsü (LFPM ile boyanmış)

2.4.7. *Lecythophora* spp.

Dematiasöz hifomiçetes olan *Lecythophora* cinsi filamentöz mantarların etken olduğu korneal infeksiyonlar, endoftalmit, peritonit, sinüzit, endokardit ve subkutanöz apse şeklinde olgular rapor edilmiştir (64, 72). Kolonileri yedi günde büyürken, ilk günde düzgün, nemli-yapışkan, bazen mayaya benzeyen, pembeden somon rengi veya turuncuya kadar değişen koloni oluşturur. Dikleşmiş hif tüyleri kümesi oluşturabilir. Eğer suş klamidospor üretirse koloninin merkezi kahverengi siyah olacaktır. Koloninin ters tarafı pembe veya ten rengindedir (Şekil 2.22). Mikroskobik görünümünde, hifler septalı, hyalin veya çok hafif pigmentlidir. Fialoidlerin genellikle septumu yoktur. Kısa volkan şeklinde veya uzun cam şişe şeklinde ya da silindiriktir. Konidialar çoğunlukla hyalin tek hücreli, oval veya silindirik bazen hafif kavislidir. Bazen kahverengi, kalın duvarlı, geniş labut şeklinde klamidokonidialar görülebilir (Şekil 2.23) (64).



Şekil 2.22. *Lecythophora hoffmannii*'nin SDA'daki koloni görüntüsü (Hasta 12'den izole edilen suş, *Lecythophora hoffmannii* BLAST: AB231012.1)

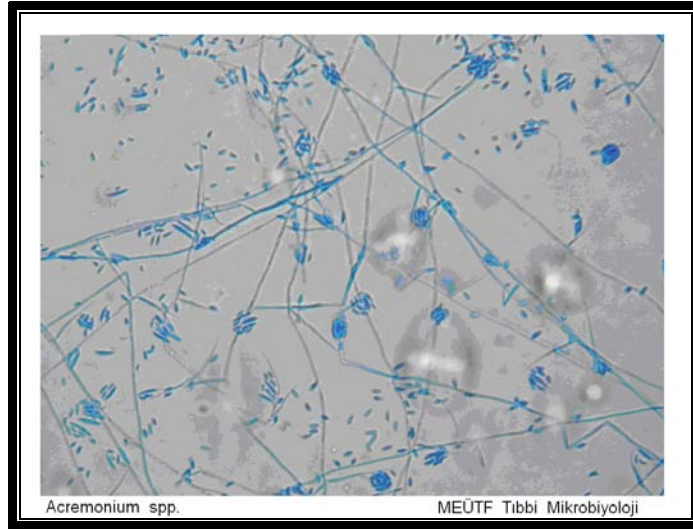


Şekil 2.23. *Lecythophora hoffmannii*'nin mikroskopik görüntüsü (LFCB ile boyanmış)

2.4.8. *Acremonium* spp.

Hyalin hifomiçetes grubu üyesi olan *Acremonium* beyaz tahıl miçetomunun etyolojik ajanı olarak bilinmesine karşın tırnak infeksiyonu gibi lokalize hastalıklar ve korneal veya endoftalmik infeksiyonlar yapmaktadır. Kolonileri beş-yedi günde ürerken, ilk başta yoğun ve tüysüz, sonra pudramsı, veya pamuksu olabilir. Beyaz, sarımsı, açık gri veya açık gül rengine görülebilir. Ters tarafı renksiz veya pembemsi

olabilir. Mikroskopik morfolojisi; oldukça kırılıgandır. Hifleri septalı, fialoidler dikleşmiş, dallanmamış ve incelmıştır (Şekil 2.24) .



Şekil 2.24. *Acremonium* spp. 'nin mikroskopik görüntüsü (LFPM ile boyanmış)

2.5. Mantarların Laboratuvar Tanısı

Tam ve doğru bir laboratuvar tanı için, klinik tanı ile uyumlu örneklerin uygun zamanda ve uygun yerden alınarak uygun koşullarda laboratuvara hemen ulaştırılması gerekir (7, 77).

İnvaziv mantar infeksiyonlarında erken tanı ile uygun tedavinin bir an önce başlanması için hayati öneme sahiptir. Tanı için radyolojik, histopatolojik teknikler, geleneksel mikrobiyolojik yöntemler ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır (78).

2.5.1. Klasik (Konvansiyonel) Yöntemler

Sistemik ve fırsatçı küf infeksiyonlarında, etkenin yerleşim bölgesine göre çeşitli klinik örnekler (balgam, beyin omurilik sıvısı [BOS], doku, kemik iliği, kan)

alınarak steril şartlarda incelenmelidir. Eğer örneklerin incelenmesi gecikecekse, kültür için 4°C’de bekletilmelidir (79).

2.5.1.1. Doğrudan Mikroskopik İnceleme

İnvaziv küf infeksiyonu olan hastalardan alınan numunelerden hazırlanan preparatlarda doğrudan mikroskopi ile küflerin tür tayini yapılması ve birbirinden ayrılması mümkün değildir. Ancak küf elemanlarının görülmesi infeksiyon etkeni olabileceğini akla getirmektedir.

2.5.1.1.1. %10’luk KOH veya NaOH ile İnceleme

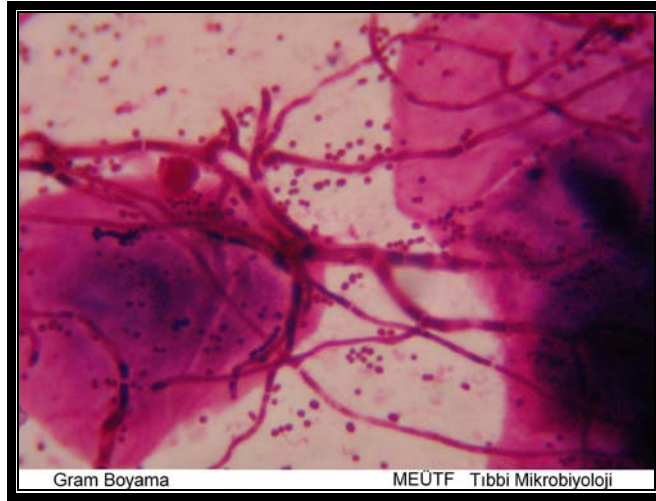
Küf mantarı şüphesi ile laboratuvara gönderilen klinik örnek, temiz bir lam üzerine 1 damla %10-15 KOH (10 g KOH + 10 g Gliserol + 80 ml distile su) veya NaOH damlatılmış solüsyon içerisine bir miktar alınarak iyice karıştırılmaktadır. Üzerine bir lamel kapatılarak hafifçe bastırılıp 15-20 dakika kadar oda ısısında içerisinde nemli gazlı bez bulunan petri kutusu içerisinde bekletildikten sonra mikroskopta incelenmektedir. Örnek hemen incelenecekse lam altından hafifçe ısıtılarak da inceleme yapılabilir. Bu yöntem daha çok yüzeysel küf infeksiyonlarında kullanılırken, kullanılan %10-15 KOH veya NaOH solüsyonları hem mantarların içinde bulunduğu dokuyu eriterek mantar yapılarının serbest kalmasını hem de mantara benzeyen yapıların eriyerek kaybolmasını sağlamaktadır. Hazırlanan preparatlar önce küçük büyütmeli 10X objektifte sonra büyük büyütmeli 40X objektifte ışık mikroskopunun diyaframı kısılarak incelenmektedir. Preparatta dallanmış hif yapıları, septum ve sporlarının varlığı araştırılmaktadır. Bazı mantar elemanlarının görülmesi ile (*Aspergillus*, mukormikoz vb.) ön tanı konulabilmektedir. Ancak kesin tanı için kültür ile doğrulama yapılması gerekmektedir (79, 80).

2.5.1.2. Boyalı Mikroskobik İnceleme

Hastadan alınan klinik örnek temiz bir lam üzerine yayılarak preparat hazırlanmakta ve havada kurutulmaktadır. Preparat değişik boyama yöntemleri kullanılarak boyanmakta ve mikroskopta incelenmektedir (79, 80).

2.5.1.2.1. Gram Boyama Yöntemi

Hazırlanan preparat alevde tespit edildikten sonra Gram boyama yöntemi ile boyanmaktadır. Preparat ışık mikroskobunun 100X immersiyon objektifi kullanılarak incelenmektedir. Gram pozitif boyanmış hif yapıları ve septum varlığı araştırılmaktadır (79).



Şekil 2.25. Gram ile boyanmış bir klinik örnekte hif yapıları

2.5.1.2.2. Giemsa ve Wright Boyama Yöntemleri

Daha çok kemik iliği, kan ve çeşitli doku örneklerinde mantar elemanlarını görmek için yapılan bir boyama yöntemidir. Kan yaymaları, sitratlı kan santrifüj edildikten sonra buffy coat kısmından yapılırsa daha iyi sonuç alınmaktadır (79, 80).

2.5.1.2.3. Kalkoflor Beyazı Boyama Yöntemi

Boya β 1-3, β 1-4 polisakkaritlere (selüloz ve kitin gibi) bağlandığı için klinik örneklerdeki mantar hücrelerinin gösterilmesinde yararlı olmaktadır. Boya kısa dalga boylu ultraviyole ışık etkisiyle floresans vermektedir. Temiz bir lam üzerine 1 damla %10 KOH ve 1 damla %0,1'lik kalkoflor boyası solüsyonundan damlatılarak karıştırılmaktadır. Örnekten bir miktar konup üzerine lamel kapatılmaktadır. Lam hafifçe altından ısıtılarak floresans mikroskopunda küçük büyütmede incelenmektedir. Kullanılan filtreye bağlı olarak hif yapıları tebeşir beyazı veya elma yeşili renğinde floresans vermektedir (1, 79, 80).

2.5.1.2.4. Periyodik Asit-Schiff (PAS) Boyama Yöntemi

Mantarların histopatolojisinin incelenmesinde en yaygın kullanılan boyama yöntemlerinden biridir. Klinik örneklerin doğrudan incelenmesinde ve mantar şüphesi olan KOH preparatlarında gözlemlenemediği durumunda kullanılmaktadır. Bu boyama yönteminde mantar hücre duvarlarında bulunan bazı polisakkaritler boyanmaktadır. Mantarlar koyu morumsu-kırmızı renkte görülürken, zemin açık yeşil renkte görülmektedir (79, 80).

2.5.1.2.5. Laktofenol Pamuk Mavisi Boyama Yöntemi (LFPM)

Laktofenol pamuk mavisi (LFPM) hem bir kaplama solüsyonu hem de bir boyadır. Özellikle küf mantarlarındaki hif ve sporların incelenmesi amacıyla kullanılan bir boyama yöntemidir. Laktik asit temizleyici ajan olarak görev yapar ve küf yapılarını koruyarak tespit eder. Fenol öldürücü etki göstermektedir. Gliserol kurumayı önler ve pamuk mavisi küf yapılarının boyanarak daha iyi görülmesini sağlamaktadır. Mantar yapıları mavinin farklı tonlarında boyanarak görülmektedir. Örnekler doğrudan lam-lamel arası incelenebildiği gibi selofan bant yöntemi ile de incelenebilmektedir (79, 80).

Pratik olarak temiz bir lam üzerine bir damla LFPM eriyiğinden konulmaktadır. Selofan bandın yapışkan tarafı petri kutusunda üretilmiş olan mantar kolonisi üzerine temas ettirildikten sonra lamın üzerindeki LFPM alanı üzerine gelecek şekilde hafifçe bastırılarak lamın yüzeyine yapışması sağlanmaktadır. Sonra 1-2 dakika bekletilerek hiflerin boyayı iyice alması sağlanır ve mikroskopta 10X ve 40X objektiflerle incelenmektedir. İncelemede küf kolonilerine ait hif ve spor yapıları bozulmadan görülebilmektedir (79, 80).

2.5.1.3. Kültür Yöntemleri

Doğrudan mikroskopik inceleme ile her zaman etkeni görmek mümkün olmamaktadır. Hem kesin tanı, hem de etkenin türünün belirlenebilmesi için kültür yapılması gerekmektedir. Küflerin izolasyonu ve identifikasyonu için çok sayıda besiyeri kullanılmaktadır. Alınan klinik örnekler küf mantarlarının kolay üreyebileceği genel besiyerlerine ekilmelidir. Bu amaçla genellikle Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besiyeri kullanılmaktadır. Bunun yanında Sabouraud Dekstroz Broth (SDB), Patates Dekstroz Agar (PDA), Selektif (sikloheksimit + kloramfenikol) SDA, Beyin Kalp İnfüzyon Agar (Brain Heart Infusion Agar -BHIA), Mycosel Agar (MA), Yeast Extract Phosphate Agar (YEPA) gibi besiyerleri de kullanılmaktadır. Kullanılan selektif besiyerlerine bakterilerin üremesini engellemek için kloramfenikol, gentamisin, penisilin veya streptomisin gibi bir antibiyotik ve saprofit mantarların üremesini engellemek için sikloheksimit gibi bir antimikotik katılması gerekmektedir. Kloramfenikol+gentamisin kombinasyonu hem geniş bir antibakteriyel etki spektrumu olduğu için hem de güvenli şekilde otoklavlanabildiği için daha çok tercih edilmektedir (79, 80).

Saprofit mantarlar antimikotik katılmayan besiyerlerinde hızlı bir şekilde üreyip etken olan mantarın üzerini kapatarak üremelerini engellemektedir. Ancak fırsatçı patojen olan bazı küflerin de üremesi engellendiği için klinik örnekler hem sikloheksimitli hem de sikloheksimit içermeyen besiyerlerine ekilmelidir. Klinik örnekler kültür için uygun şekilde işleme alındıktan sonra tüplerde veya plaklarda hazırlanmış besiyerlerine ekim yapılmaktadır. Ekim işlemi ucu "L" şeklinde olan sert

telli iğne özelerle yapılmalıdır. Klinik örnekler L öze ile besiyerinin içine iyice gömülmelidir. Ayrı koloniler izole etmek isteniyorsa daha geniş bir yüzey alanı bulunan plaklara ekim yapılması daha uygundur. Ancak plaklar kontaminasyona daha açıktır. Bu nedenle ekim işleminden sonra plakların kenarı hava almayacak şekilde parafilm ile kapatılmalıdır (79, 80).

Kültürlerin ilk ekimlerinde uzun süre inkübasyona bırakıldıklarından kurumaması için vida kapaklı tüplere eğik olarak hazırlanmış besiyerleri tercih edilmektedir. Tüplere ekim yapılmışsa yeterli oksijen desteği için kapakları gevşek bırakılmalıdır. Ekilen kültürlerin inkübasyonu için farklı laboratuvarlar farklı protokoller uygulamaktadır. Bazı laboratuvarlar her türlü ekimi iki ayrı besiyerine yapıp, birisini 37°C'de inkübe ederken diğerinin oda ısısında (22-25°C) inkübe edilmesini uygun bulmaktadır. Bazı laboratuvarlar ise örnekleri sadece oda ısısında inkübasyona bırakmaktadır. Ancak gece-gündüz arasında ısı farkı olduğu için bazı patojen mantarların üreme süreleri uzun olduğundan bu yöntem önerilmemektedir. Kültürler sadece 37°C'de inkübe edildiğinde, birçok klinik örnek bakterilerle yoğun şekilde kontamine olduğundan ve bakteriler bu ısıda hızla üreyerek mantarların üremesini baskıladığı için ve bu ısıda bazı patojen mantarların zayıf üreme gösterdikleri veya üreyemedikleri için önerilmemektedir. İnkübasyona bırakılan örnekler etüvde en az dört altı hafta bekletilmelidir. Besiyerinin kurummasını önlemek için etüvün içerisine bir miktar su konulmalıdır. Ekim yapılan besiyerleri iki üç günde bir incelenmelidir. Üreme görülen kültürler çıkartılarak incelemeye alınmalıdır. Mantarların üreme hızı büyük ölçüde inokulum miktarına bağlıdır. İnokulum miktarı az ise kültürde üç dört haftada üreme gözlenirken, inokulum miktarı fazla ise iki üç günde üreme gözlenebilmektedir (79, 80).

2.5.1.3.1. Kültürlerin İncelenmesi

Klinik örneklerin ekimi yapıldıktan sonra inkübasyon süresince her gün ya da haftada en az üç defa küf üremesi yönünden belirli aralıklarla takip edilmesi gerekmektedir. Üreme gözlenen besiyerleri gerek makroskopik gerekse mikroskopik olarak değerlendirilip üreyen küf mantarının tanısı konulmaya çalışılmaktadır. Ayrıca

bazı filamentöz mantarların tanısı için gerektiğinde biyokimyasal testlere başvurulmaktadır (80).

2.5.1.3.2. Makroskobik İnceleme

Koloni üreme hızı: Genellikle yavaş üreyen mantarlar küçük, hızlı üreyen mantarlar ise büyük koloni oluşturmaktadır. Küfler ortalama 2-15 gün içerisinde üreme göstermektedir (80).

Koloninin yüzeysel görünümü: Genellikle küf kolonileri etüvde 25°C'de 7-10 günlük bir süre içerisinde tanımlama için uygun üremeyi göstermektedir. Küf kolonisinin rengi besiyerinin yüzeyinde, pigmenti ise besiyerinin arka kısmında oluşmaktadır. Küf kolonileri öncelikle çıplak gözle, daha sonra stereo mikroskop altında incelenir. Bu incelemede, kolonin şekli (düzgün kenarlı, girintili çıkıntılı kenarlı, dağınık, düğmemsi, kubbemsi), koloninin büyüklüğü, yüzey görünümü (çıplak, tüylü, pamuksu, tozlu, tanecikli, kadifemsi, buruşuk), besiyeri üzerindeki kısmın renk özellikleri (açık, koyu, dalgalı, hareli), pigment oluşturma, pigment rengi, belirgin bir koku oluşturma ve su damlacıkları oluşturup oluşturumama gibi özellikleri değerlendirilmelidir (80).

2.5.1.3.3. Mikroskobik İnceleme

Kültürde üremiş olan küf kolonisinden bir parça alınarak boyanıp tanı için mikroskop altında incelenmelidir.

Koloniden parça alınarak inceleme: Temiz bir lam üzerine bir damla LFPM damlatılır. Küf kolonisinden L şeklindeki iğne öze ile bir parça alınarak, LFPM içerisinde iyice karıştırılarak miçellerin birbirinden ayrılması sağlanır. Lam üzerine bir lamel kapatılarak önce küçük büyütmede (10X objektif), sonra büyük büyütmede (40X objektif) mikroskopta incelenir. Bu yöntemde hızlı sonuç alınmasına karşın spor ve hiflerin özgül yapıları ve dizilimleri bozulduğu için kesin tanı koymak oldukça zordur (80).

Selofan bant yöntemi: Besiyerinde üremiş olan koloni üzerine U şeklinde yapışkanlı kısmı dış tarafa gelecek şekilde bir çubuğun etrafına sarılmış olan selofan bant koloninin farklı yerlerine (kenar, orta) yapıştırılıp çekilmektedir. Üzerine LFPM damlatılmış lam üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde yapıştırılmaktadır. Mantar yapılarının boyayı alması için 1-2 dakika beklendikten sonra 10X ve 40X objektiflerde incelenerek cins veya tür düzeyinde tanımlanmaya çalışılmaktadır. Bu yöntemle hif ve spor yapıları bozulmadan incelenebilmektedir.

LFPM yöntemiyle hiflerin dallanıp dallanmadığı, şekilleri, kalınlıkları, septalı veya septasız oluşları, saydamlıkları, rengi, konidiumların büyüklükleri, şekilleri, renkleri, dizilişleri, vezikül yapılarının olup olmadığı ve sporlarının özellikleri incelenerek cins veya tür düzeyinde identifikasyonları yapılabilmektedir.

Lam kültür yöntemi: Bir petri kutusuna 3-4 mm kalınlığında besiyeri dökülür. Besiyeri steril bir bistüri yardımı ile 1x1 cm boyutlarında parçalara ayrılır. Bu parçalar steril bir pens yardımıyla steril bir lamın ortasına konur. Küf mantarı şüphelenilen klinik örnekten öze ile örnek alınarak besiyeri parçasının tam orta noktasına ekim yapılır. Üzerine steril bir lamel kapatılarak hafifçe bastırılır. İçerisinde nemli gazlı bez ve üzerinde baget bulunan petri kutusunun içerisine yerleştirilir. Petri kutusunun kapağı kapatılarak oda ısısında inkübe edilir. Ekim iki-üç günde bir gözlenerek üreme varlığı takip edilir. Üreme görüldüğünde lam alınarak mikroskopta 10X ve 40X objektiflerde incelenir. Lam kültür yöntemi küflerin doğal mikroskobik yapılarının en iyi gözlemlendiği yöntemdir. Mikroskopta hiflerin yapısı, saydamlıkları, konidiumların biçimleri, büyüklükleri, dizilişleri gibi özelliklerine göre tanımlama yapılmaktadır (1).

2.5.2. Serolojik Tanı Yöntemleri

Mantar infeksiyonlarının kesin tanısı, etken mikroorganizmanın klinik örnekten izole edilmesi ve tanımlanmasına bağlıdır. Fungal serolojik testler daha çok fikir verici veya kültür ve histolojik bulguları destekleyici niteliktedir. Bu testler daha çok ticari olarak hazırlanmış kitler şeklindedir. İnvaziv mantar infeksiyonlarında ayırt edici klinik olguların yetersiz olması ve mevcut mantar izolasyonunda zaman zaman etkenin izolasyonunun düşük olması serolojik tanı yöntemlerini gündeme getirmiştir. Son

zamanlarda immünbaskılanmış hastalarda antijen saptamaya yarayan tanı yöntemleri önem kazanmıştır. Özellikle aspergilloz tanısında serolojik testlerden yararlanılmaktadır. İmmünsistemi baskılanmış hastalarda invaziv aspergillozun tanısı ve tedavisi oldukça güçtür. Bu infeksiyonlarda erken tanının hemen konulması ve antifungal tedaviye biran önce başlanması ile mortalite oranları düşürecektir. Kültür yönteminin dört hafta gibi uzun bir süre alması ve kültürde üreyen küf kolonisinin etken olabileceği gibi kontaminasyona bağlı bir üreme olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Her ne kadar kültür yöntemleri altın standart testler olarak değerini korusa da hızlı tanı testlerine gereksinim vardır. Bu testlerin dezavantajlarından birisi, diğer mantar antijenleri ile çapraz reaksiyon vererek yalancı pozitif sonuçlara neden olmasıdır. Serolojik testlerin anlamlı olabilmesi için, araştırılan antijene karşı yüksek antikor titresi elde edilmesi ve iki-üç hafta sonra alınan örnekte titre artışının gösterilmesi gerekmektedir (79, 81, 82).

Galaktomannan (GM), dokuda mantar üremesi sırasında dolaşıma salınan *Aspergillus* türlerinin bir polisakkarit hücre duvar komponenti ve *Aspergillus*'un bir ekzoantijendir. Bu ekzoantijeni tespit etmeye yarayan testlerden, GM testi serum ve vücut sıvılarından antijen araştırılmasına yönelik bir testtir. Bu test için önceleri lateks testi kullanılırken daha sonra duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek Enzim Linked Immun Assay (ELISA) testleri geliştirilmiştir. Serumda antijenler çabuk kaybolurken, idrarda daha yüksek düzeyde kaldığı gözlenmiştir. GM ELISA testinin duyarlılığının %29-100, özgüllüğünün ise %79-92 arasında değiştiği bildirilmiştir (79, 83, 84, 85). *Aspergillus* antijenlerine karşı oluşmuş antikorların tespiti için geliştirilen serolojik testler sağlam kişilerde aspergillom veya alerjik bronkopulmoner aspergilloz tanısında yardımcı olabilmektedir (86).

Bilgisayarlı tomografi ve *Aspergillus* antijeni tespiti (GM), İPA'un erken tanısında umut verici gözükmemektedir (20).

Penicillium türleri arasında sistemik infeksiyonlara neden olan en önemli tür dimorfik bir mantar olan *Penicillium marneffeii*'dir. İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü (Human Immunodeficiency Virus-HIV) infeksiyonlu hastalarda giderek artan önemi nedeniyle kültürde belirlenmiş *P. marneffeii* infeksiyonlarının tanısında destekleyici olarak antijen ve antikor saptanmasına yönelik serolojik testler geliştirilmiştir. Küflerin tanısı için kullanılan serolojik testler kısıtlıdır, ancak gün geçtikçe artmaktadır (81).

2.5.3. Moleküler Tanı Yöntemleri

İnvaziv mantar infeksiyonu etkenlerinin tanımlanmasında, doğrudan mikroskopik inceleme ve kültür günümüzde halen altın standart yöntemler olarak değerini korumaktadır. Ancak gerek zaman alıcı olması, gerekse her zaman olumlu sonuç vermemeleri, bazı mantarlar açısından zor uygulanabilir ve yorumlanabilir olması nedeniyle, bu yöntemlerin yanı sıra; daha hızlı, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek yeni tanı yöntemleri geliştirilmektedir. Son yıllarda DNA çoğaltma yöntemlerinin gelişimi bu güçlüklerin çözümlenmesinde önemli bir adım olarak dikkatleri çekmektedir. Tanısal Mikrobiyoloji’de temel hedef, etkenin en kısa sürede saptanıp tanımlanması ve hastalığın hızlı tanısı etkin tedavinin temelini oluşturmaktadır (78, 87).

Mantarların gerek klinik örneklerden, gerekse kültürden tanımlanması için bir çok moleküler yöntem geliştirilmiştir. Moleküler tanı yöntemleri giderek popüler olmakla birlikte, her klinik mikoloji laboratuvarında rutin bir yöntem olarak uygulanması gerek ekonomik nedenlerden, gerekse tam bir standardizasyonunun sağlanamaması nedeni ile olası değildir. Ancak invaziv mikozlarda mortalitenin yüksekliğinden dolayı erken tanı çok önemli olduğu için ve bu yöntemlerle kısa sürede sonuca ulaşıldığından günümüzde birçok araştırma laboratuvarında klinik örneklerde mantar DNA’sının saptanması konusunda ümit verici çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Ayrıca, tür tayini, epidemiyolojik tiplendirme ve ilaç direnci ile ilgili araştırmalarda da oldukça yol alınmış olup, çalışmalar sürdürülmektedir. İnfeksiyon etkeni mantarların saptanması ve tanımlanmasında nükleik asit amplifikasyon ve hibridizasyon problemlerinin kullanıldığı sinyal amplifikasyon yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Nükleik asit amplifikasyon teknolojilerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) veya benzeri yöntemler kullanılmaktadır (7, 24).

Bazı klinik örneklerde mantar yükünün çok az olması nedeniyle, kültür ve serolojik tanının henüz yetersiz olduğu evrede PZR temelli tanı yöntemlerinin çok daha etkin olacağı söylenmektedir. Yeni moleküler yöntemlerin yakın bir gelecekte tanı sürecini kısaltıp, doğru tanı olasılığını artırması, en kısa zamanda etkene özgü tedavi olanağı sağlayıp, klinik başarı oranını yükseltilmesi hedeflenmektedir (7).

PZR çalışmalarında kültürden genomik DNA'nın ekstraksiyonu sırasında mayalardan DNA ekstraksiyonu daha kolay olurken, filamentöz mantarlarda zahmetli ve zaman alıcıdır (88).

Geleneksel mikrobiyolojik testlerle kıyaslandığında PZR büyük avantajlara sahiptir. Bütün mantarlarda ortak 18S ve 28S rRNA geninin korunmuş dizisi için spesifik Pan-fungal primerler klinik örneklerde patojen mantarların tespitinde kullanılmaktadır (78, 87). Fungal DNA'nın hastanın kanında saptanması konvansiyonel metotlara göre çok erken olmaktadır. Testin standardizasyonu henüz yapılamamıştır. PZR yönteminin duyarlılığının %79–100, özgüllüğünün %81–93 olduğu bazı çalışmalarda bildirilmektedir. Bu test için kan, bronkoalveoler lavaj (BAL), doku, parafin kesitler kullanılabilir. Doku örneklerinde PZR yöntemi kültürden daha duyarlıdır. BAL örneklerinde DNA'nın saptanması kolonizasyon ve hastalığı ayırttırmaz. PZR'nun klinik duyarlılığı antifungal tedavi ile etkilenebilir. Real-time metotlar kantitatif özelliklere de sahip olduğundan hem tanı hem de tedaviye yanıtı izlemede önemlidir. Mikroarray teknoloji (panfungal chip) ile hızlı identifikasyon mümkündür ve bu konuda çalışmalar yapılmaktadır (89).

Mantarların tanımlanmasında yaygın olarak büyük ribozomal alt-ünitesinin 28S ribozomal alt ünite (D1-D2 bölgesi) ile küçük ve büyük ribozomal alt-üniteleri arasında yer alan türe özgü internal transcribed spacer 1 ve 2'yi (ITS1 ve ITS2 bölgeleri) içeren ribozomal RNA gen kompleksi içerisinde hedef dizileri çoğaltan PZR metodu başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (84, 90).

Moleküler yöntemler sadece klinik örnekten mantarı tanımlamak için değil ayrıca tür tayini, ilaç direnci ve epidemiyolojik tiplendirme amacıyla da kullanılmaktadır.

2.5.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

2.5.3.1.1. PZR'nun Temel Bileşenleri

a) *Kalıp DNA*: PZR'nunda herhangi bir DNA parçası kalıp DNA olarak kullanılabilir ve araştırma laboratuvarı ya da klinik örneklerden izole edilmiş olabilir.

b)*Taq DNA polimeraz*: DNA polimeraz enzimleri kalıp DNA ipliğindeki bölgeye bağlanan oligonükleotid primerlerin 3' hidroksil ucuna ortamda serbest olan deoksiribonükleotid trifosfat (dNTP)'ları bağlayarak yeni DNA ipliğinin polimerizasyonunu sağlar.

c)*Primerler*: Çalışılacak kalıp DNA'daki istenen bölgeye tamamen komplementer olan primerler seçilir. Primer seçilirken çiftlerin 3' uçlarının birbirlerine ya da oligonükleotid dizinin içindeki başka bir yere komplementer olmamasına dikkat edilmelidir.

d)*dNTP ve Mg⁺²*: Reaksiyonda kullanılacak dört dNTP'in konsantrasyonları aynı olmalıdır. dNTP konsantrasyonunun yükselmesine bağlı olarak; primeri daha çok bağlayacak olan Mg⁺² konsantrasyonu artar. Mg⁺² iyonunun azalması ise Taq DNA polimerazın aktivitesini etkiler. Bu nedenle dNTP konsantrasyonu arttıkça Mg⁺² iyonunun konsantrasyonu artırılmalıdır.

2.5.3.1.2. PZR Yöntemi

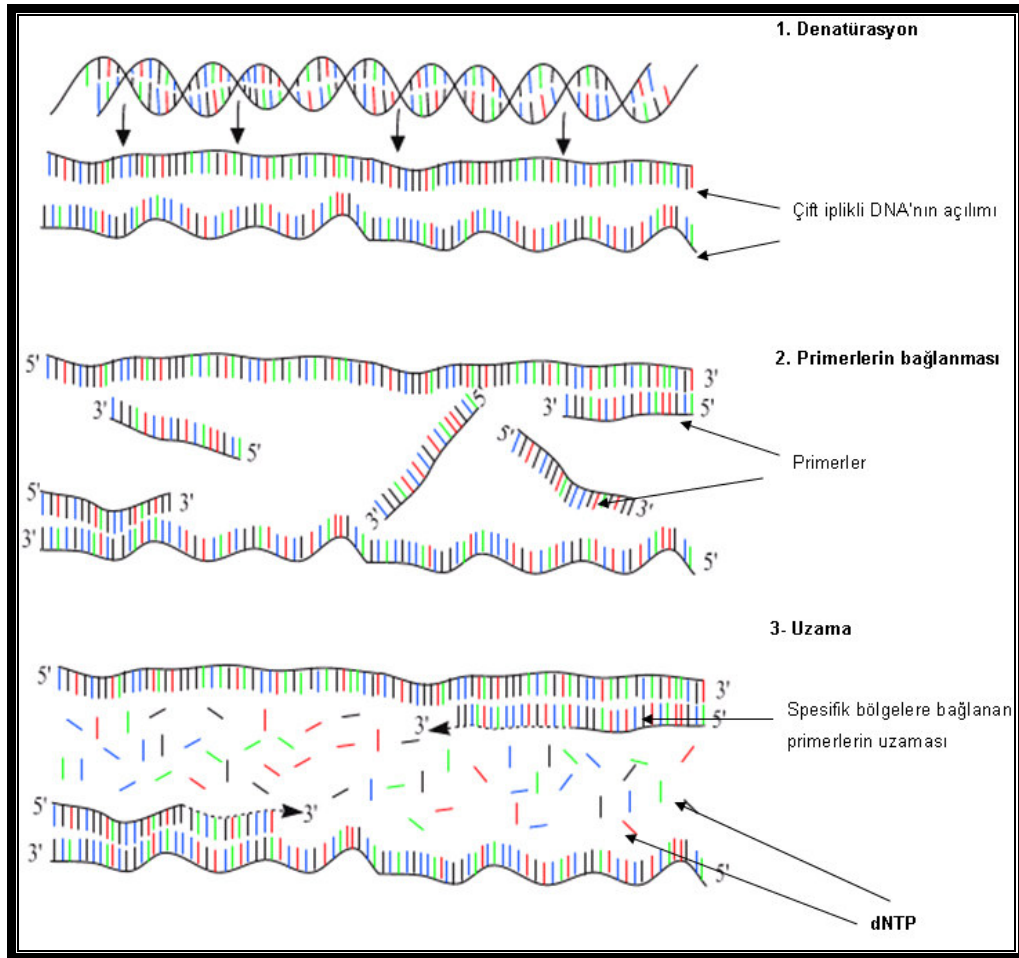
Denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzama olmak üzere üç aşamada gerçekleştirilir.

1. *Denatürasyon (Çift iplikli DNA'nın açılımı)*: Çift iplikli kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklıklarda (95–100°C) oligonükleotid primerlerin (amplimer) bağlanması için denatüre edilir. Denatürasyon için başlangıç ısısı çoğaltılmak istenen hedef bölgenin G+C içeriğine göre belirlenir. Sonuçta DNA'nın çift ipliğinin birbirinden ayrılması sağlanır. Her siklusun başında çift iplikli yapı yeniden ayrılmalıdır.
2. *Primerlerin bağlanması (Annealing)*: Denatürasyon aşamasından sonra tek iplikli kalıp DNA molekülü üzerinde bulunan hedef bölgeye oligonükleotid primerlerin bağlanması için ısının düşürülmesi gerekmektedir. Bu nedenle de bağlanma sıcaklığı (T_m) reaksiyonun gerçekleşmesi açısından önemlidir. Bu sıcaklık değeri

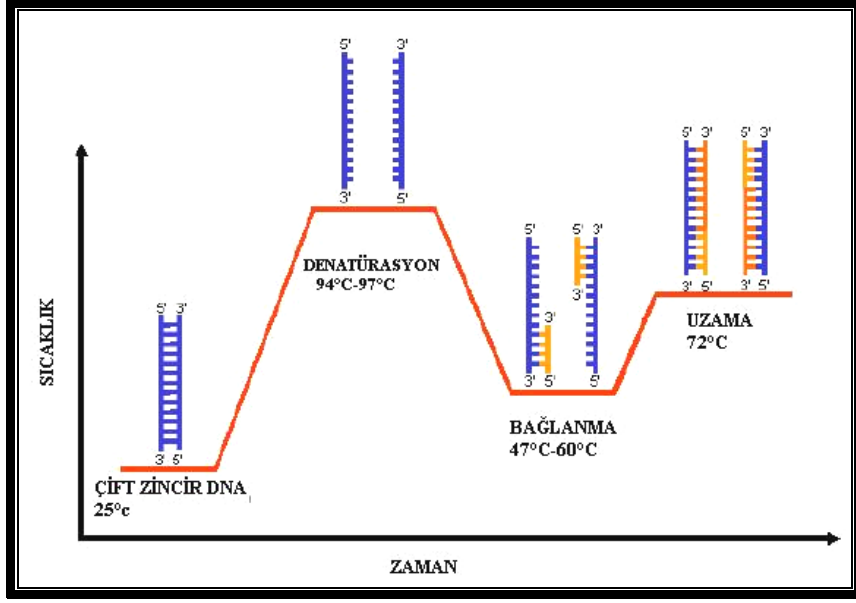
primerlerin baz sayısına göre değişir ve $[(A+T) \times 2^\circ C + (G+C) \times 4^\circ C]$ formülü ile hesaplanır. Bu formülde A: adenin, T: timin, G: guanin, C: sitozin nükleotidlerinin sayısıdır.

3. *Primerlerin uzaması (Extension)*: Oligonükleotid primerlerin uzama aşamasında Taq DNA polimerazın polimerizasyonu için en uygun sıcaklık olan $72^\circ C$ kullanılır. Enzim, ortamdaki dNTP'lar, primerlerin 3' ucuna bağlayarak uzamalarını sağlar.

Genelde toplam döngü sayısı 25–35 arasında değişmektedir. Sayının artması istenmeyen ürünlerin ortaya çıkmasını sağlarken, çoğaltılmak istenen bölgenin ürünlerinde bir artış olmaz. Bu nedenden dolayı 40'dan fazla siklusu olan PZR reaksiyonlarında istenilen sonuç elde edilmez.



Şekil 2.26. PZR'nun aşamaları (91)



Şekil 2.27. PZR sıcaklık-zaman grafiği (92)

2.5.3.2. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizleri ya da sekanslama, DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotid baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdir. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır. Bu hibridizasyon sırasında radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme yapılır.

DNA dizi analiz yöntemleri artık günümüzde otomatize sistemlerle yapılmaktadır. Otomatik DNA dizi analizleri zaman kazancı yanında, standart çalışma koşulları ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde de yarar sağlamaktadır.

Walter Gilbert ve Frederick Sanger'in 1980 yılında geliştirdiği yöntem ile belirli bir nükleotid ile sonlanan bir DNA zincirinin sentezi gerçekleştirilmektedir.

Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içermektedir. Bu yöntemde DNA'nın yapısında yer alan her bir nükleotid lazer ışını altında dört farklı renk veren floresans özellikteki boyalar ile işaretlenmektedir. Dideoksinükleotid yöntemi ile sentezlenen kısa DNA zincirleri kapiler elektroforezden geçerken büyüklüklerine göre ayrılırlar ve bu süreçte lazer ışını altında bir dedektör (CCD kamera) nükleotidlerin verdikleri floresans ışınları kaydederek dört renkli kromatogram oluşturmaktadır. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile

değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılmaktadır. Kalıp DNA'daki nükleotidlerin hepsi okunduktan sonra bilgisayar aracılığı ile dizilim analiz edilmektedir. DNA dizi analizi cihazlarında altı bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (93).

2.6. Antifungaller

Aktif ve güvenli antifungal ajanların geliştirilmesinde ilk dönüm noktası 1939 yılında Oxford tarafından griseofulvin'in antifungal aktivitesinin keşfiyle başlamıştır. Wolley 1944'te ilk azol olan benzimidazol'u keşfederken, Elson ise bir yıl sonra propamidin'in fungistatik özelliğinin olduğunu rapor etmiştir. Hazen ve Brown 1950 yılında ilk poliyen makrolid antifungal olan nistatini bulmuştur. 1955'te amfoterisin B keşfedilmiştir. Uzun bir süre herhangi bir antifungal geliştirilmezken bundan dokuz yıl sonra oral ajan olan 5-flourositozin bulunmuştur. Mikonazol ve klotrimazol 1969, ekonazol 1974, ketokanazol 1981, flukonazol 1990, itrakonazol 1992, kaspofungin ve vorikonazol 2001, mikafungin 2005 ve anidulafungin ve posakonazol 2006 yılında keşfedilerek antifungal tedavide kullanılmaya başlanmıştır (94).

Antifungal ilaçlar kimyasal yapılarına göre; poliyenler (amfoterisin B), pirimidin türevleri (flusitozin), alilamin türevleri (terbinafin, naftifin, tolnaftat), azol türevleri (mikonazol, ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, ravukonazol, albakonazol) ve kandinler (kaspofungin, anidulafungin, mikafungin) olmak üzere beş grupta sınıflandırılmaktadır. Bu antifungallerden, poliyenler, alilaminler ve azoller hücre zarına etki ederken, 5-flourositozinler protein/DNA sentezine ve ekinokandinler ise hücre duvarına etki ederek aktivitelerini göstermektedir (95).

Amfoterisin B, hayatı tehdit eden progresif sistemik mantar infeksiyonlarında en çok kullanılan antifungaldir. Fakat toksisitesi klinik kullanımını sınırlandıran en önemli faktördür. Etki mekanizması, membran sterollerıyla etkileşerek mantarın dış membranında delikler oluşturmaktadır. Böylece mantar hücresi içindeki makro moleküller hücre dışına sızarak mantarın ölümüne neden olmaktadır. Amfoterisin B'nin

önemli toksisitesi ise doz bağımlı oluşan nefrotoksisite ve kemik iliği süpresyonudur (24, 94).

Azol grubu antifungaller, mantar hücre duvarının önemli yapısal komponentlerinden biri olan ergosterol biosentezinde görev alan ve lanosterolü ergastrole çeviren lanosterol demetilaz enzimini inhibe ederek etkilerini gösterirler. Bu grup içerisinde imidazol ve triazol olmak üzere iki alt grup vardır. Yan etkileri diğer antifungal ajanlara göre daha azdır, fakat fazla kullanımları direnç oluşumuna yol açmaktadır (94).

Ekinokandinler, mantarın farklı bir yapısal komponentini hedefleyen ilaçlar üzerine odaklanmasıyla geliştirilmiştir. İnsanlarda hastalıklara neden olan birçok mantar hücresinin duvarında bulunan ancak memeli hücrelerinde bulunmayan kendine özgü komponentleri vardır. Bu duvarın dış yüzünü mannopteinler, iç yüzünü β -(1,3)-glukan/kitin ağı kaplar. β -(1,3)-glukan hücre duvarının yapısal bütünlüğünden sorumludur. Mannoproteinler, glukan ve kitin yeni antifungallerin hedeflerini oluşturmaktadır. Ekinokandinler β -(1,3)-glukan sentaz enzimini inhibe edip β -(1,3) glukan yapımını engelleyerek etki göstermektedir. Bu enzimin inhibe olması hücre duvar geçirgenliğinin artmasına ve hücre duvarının lizisine neden olmaktadır (94).

Bir florin analogu olan flusitozin, aslında antineoplastik bir ilaç olarak sentezlenmiştir. Ancak antitümoral etkisi zayıf olan bu bileşik *in vitro* ve *in vivo* antifungal etkinliğinin görülmesiyle antifungal tedavide kullanılmaya başlanmıştır. Flusitozin (5-fluorositozin) fungal bir enzim olan sitozin permeaz tarafından hücre içine alınarak deaminasyona uğrar ve yeni oluşan bu bileşik (5-fluorouracil) RNA sentezinde inhibitör rol oynar. Ayrıca flusitozin DNA sentezinde pürin ve pirimidin ile yarışarak DNA sentezini de inhibe etmektedir (94).

Günümüzde mantar infeksiyonlarının tedavisi halen büyük bir sorun oluşturmaktadır. Amfoterisin B'nin klinik kullanıma girmesinden bu yana uzun yıllar geçmesine rağmen antifungal tedavide kullanılacak ilaç sayısı halen çok sınırlıdır. Bu ilaçların kullanımı, ilaçların toksitesi veya uygun olmayan farmakokinetik özelliklerine bağlı olarak çeşitli ilaçlarla etkileşimleri nedeniyle oldukça kısıtlıdır. Ayrıca kullanımda olan antifungal ilaçlara karşı görülen direnç giderek artış göstermektedir. Bunda mantar hücrelerine ait özellikler önemli rol oynamaktadır.

Ökaryotik yapıdaki bu organizmalara etkili, ama memeli hücrelerinde toksik olmayan bileşiklerin bulunması oldukça zordur (60, 96, 97).

Yeni antifungal ilaçların geliştirilmesi, kombinasyon antifungal tedaviye ilginin artmasına yol açmıştır. Özellikle küf mantarlarına bağlı invaziv infeksiyonlarda mortalitenin hala çok yüksek oluşu, bu infeksiyonların tedavisinde kombinasyonun daha iyi sonuçlar verebileceği umudunu doğurmuştur (98).

2.7. Antifungal Duyarlılık Testleri

Klinik süreçte tedaviye erken başlanabilmesi için filamentöz mantar infeksiyonlarının hızla doğrulanması, erken tanı prosedürlerinin temel eksenini oluşturmaktadır. Günümüzde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında geniş bir yelpazedeki mayalar ve küfler için güvenilir *in vitro* duyarlılık testleri yapılmaktadır.

Antifungal ilaçların kullanımındaki artış, infeksiyon etkeni mantarlarda antifungal ilaçların bir ya da daha fazlasına karşı primer ve sekonder direnç gelişmesine neden olmaktadır. Buna bağlı olarak antifungal ilaçların *in vitro* duyarlılıklarını ölçen testlerin önemi artmıştır. Bu testlerden, yeni antifungal ajanların geliştirilmesinde ve bu ajanların klinik kullanım öncesi değerlendirilmelerinde de yararlanılmaktadır. Antifungal duyarlılık testlerine, etken mikroorganizmaya etkili olduğu bilinen antifungal ile tedaviye yanıt alınmadığı durumlarda, alternatif ilaçların araştırılmasının gerektiği ve özellikle seçilen ilaca karşı mantarın dirençli olduğu bilinen durumlarda, yeni ilaçların kullanıldığı durumlarda, ağır immün sistem yetmezliği bulunan hastalarda sistemik infeksiyon geliştiği zaman, *in vitro* ve *in vivo* uyumun belirlenmesini amaçlayan durumlarda bakılmalıdır (99).

Antibiyotik Duyarlılık Testleri Avrupa Komitesi (European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing -EUCAST) ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI)'nün referans metodları ile mayalar ve filamentöz mantarlar yüksek düzeyde MİK değerlerine sahip suşların saptanabildiğini göstermiştir (100).

Antifungal duyarlılık testleri, CLSI tarafından, flukonazol duyarlılığının *Candida*'lar için sınır değerlerinin standardize edilmesi amacıyla başlatılmıştır (101).

CLSI tarafından belirlenmiş olan duyarlılık testi yöntemlerinden M-38A belgesi, hifli mantarlar için geçerliliğini korumaktadır (101).

İnsanlarda yaygın olarak görülen patojen mantarların antifungal duyarlılık profilleri verilmiştir (102).

Maya ve filemantöz mantarlar için kullanılan antifungal duyarlılık testleri

1. Dilüsyon Testleri
 - a. Referans Sıvı Mikrodilüsyon Testi
 - b. Referans Sıvı Makrodilüsyon Testi
2. Kolorimetrik Mikrodilüsyon Testi
3. Agar Dilüsyon Testi
4. Agar Difüzyon Testi
 - a. Disk Difüzyon Testi
 - b. E-test
5. Flow Sitometri Testi
6. Ticari Antifungal Duyarlılık Sistemleri

2.7.1. Sıvı Makrodilüsyon Testi

Antifungal çalışmalarında en çok kullanılan yöntem olduğundan, bu yöntemin standardizasyonu için çalışmalar yapılmıştır. CLSI (eski adı National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS) 1992 yılında referans standart yöntemi olan M27-P belgesini açıklamıştır. Bu yöntem daha çok *Candida* cinsi mayalar için standardize edilmiştir. Sıvı makrodilüsyon testi, mantar suşlarına karşı tüm antifungallerin test edilmesi için uygun ve yeterli bir yöntemdir. Ancak çalışılacak örnek sayıları az olan küçük laboratuvarlar için daha uygundur (99).

Steril tüplerde antifungal ilaçların seri sulandırılmaları yapılarak üzerlerine değerlendirilecek olan maya veya filamentöz mantar eklenmektedir. Tüpler 35°C'de inkübasyona bırakılarak mantarın cinsine bağlı olarak 24, 48 ve 72 saat bekletilmektedir. Sonuçlar üreme skoruna göre;

- 0=berrak,
- 1=hafif bulanık,
- 2=üreme kontrol çukuruna kıyasla bulanıklık belirgin azalmış,
- 3=üreme kontrol çukuruna kıyasla bulanıklık hafif azalmış,
- 4=üreme kontrol çukuruna kıyasla bulanıklıkta fark yok,

şeklinde değerlendirilmekte ve MİK değeri saptanmaktadır.

CLSI mayalar için sıvı dilüsyon antifungal duyarlılık testlerinde referans metod olarak M27-A3 dökümanının 3. baskısını 28.04.2008 tarihinde, filamentöz mantarlar için sıvı dilüsyon antifungal duyarlılık testlerinde referans metod olarak M38-A2 dökümanının 2.baskısını ise 28.04.2008 tarihinde yayınlamıştır.

2.7.2. Sıvı Mikrodilüsyon Testi

Sıvı makrodilüsyon testine benzeyen bir yöntemdir. Farklı olarak daha fazla ilaç duyarlılığına bakılması amacı ile test daha küçük miktarlarda U tabanlı 96 kuyucuklu plaklarda yapılmaktadır. Antifungal ilaçların seri sulandırılmaları yapılarak üzerlerine 0,5 McFarland bulanıklığında maya veya filamentöz mantar eklenmekte 35°C'de 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirme yapılmaktadır.

2.7.3. Kolorimetrik Mikrodilüsyon Testi

Mikrodilüsyon yöntemini esas alan ancak MİK okuması için kolaylık ve daha objektif son nokta elde edilmesini sağlamak amacı ile ortama bir oksidasyon-redüksiyon indikatörü ilave edilerek yapılan bir yöntemdir. Oksidasyon-redüksiyon indikatörü olarak bir çok çalışmada Alamar mavisi kullanılmıştır. Başlangıçta mavi renkteki bu madde mantarın üremesi ile kırmızı renge dönmektedir. MİK değeri ise kırmızı rengin oluşmasını önleyen en düşük ilaç konsantrasyonudur. Yapılan çalışmalarda Alamar mavisi mikrodilüsyon MİK değerleri ile standart makrodilüsyon arasında %94, mikrodilüsyon arasında %97 oranında uyum görülmüştür. Kolorimetrik mikrodilüsyon

yöntemi, üremenin (bulanıklığın) görsel olarak değerlendirildiği yöntemlere göre daha üstün görülmektedir (99).

2.7.4. Agar Dilüsyon Testi

Referans yöntemlerde kullanılan ilaç konsantrasyonları ile aynı konsantrasyonda antifungaller hazırlanarak uygun şekilde eritilmiş agarlı besiyerlerine farklı konsantrasyonlarda eklenerek hazırlanır. Farklı antifungal çalışmaları için farklı besiyerleri kullanılmaktadır. İnokulümde kullanılacak miktarı 10^5 CFU/ml'den fazla olmamalıdır. Üreme kontrolü için aynı zamanda ilaçsız besiyerleri de hazırlanmaktadır. Ayrıca duyarlılığı ve direnci bilinen standart suşlar testte kontrol amacı ile kullanılmaktadır. İnkübasyon 30°C 'de yapılarak kontrol petrilerindeki üremeye göre süre belirlenerek gözle açıkça görünen olgun koloniler geliştiği zaman sonuçlar değerlendirilmektedir. MİK değerleri, makroskobik olarak gözlenen kolonilerin üremesini inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyonu olarak saptanmaktadır. Agar dilüsyon testi, mayalardan ziyade hızlı ve yavaş üreyen küfler için uygun bir yöntem olarak önerilmektedir (99).

2.7.5. Agar Difüzyon Testi

2.7.5.1. Disk Difüzyon Testi

Belirli konsantrasyonlarda antifungal ilaç emdirilip kurutulmuş 6 mm çapında filtre kağıdı şeklindeki diskler kullanılmaktadır. Bu diskler, fungal patojenlerin agar disk difüzyon testi prosedürüyle yarı-kantitatif *in vitro* duyarlılık testi için kullanılmaktadır. *Candida* türlerinin test edilmesi için bir disk difüzyon yöntemi geliştirilmiştir ve 2004 yılında, CLSI M44-A dökümanı ile Maya Antifungal Disk Difüzyonu Duyarlılık Test Yöntemi'ni standardize etmiştir.

Disk difüzyon yöntemi, antifungal duyarlılık testini daha çabuk kullanıma sunmakta ve azalan bir maliyet alternatifleriyle çoğu zaman sıvı dilüsyonundan 24 saat önce kalitatif sonuçlar sağlamaktadır.

Antifungal ajanlar içeren diskler, saf klinik suş kültürlerinin inoküle edildiği %2 glikoz ve 0,5 µg/mL metilen mavi boyası eklenmiş pH 7,2–7,4 Mueller Hinton Agar (GM-MHA) yüzeyine uygulanmaktadır. Besiyeri yüzeyi aşırı nemli olmamalıdır. Antifungal içeren diskler 4°C’de buzdolabında saklanmaktadır. İnokulum yoğunluğu için 35°C’de 24 saatlik kültürde saf olarak üremiş maya kolonisinden alınarak 5 ml SF bulunan steril tüp içerisinde homojen bir süspansiyon hazırlanmaktadır. Spektrofotometrede 530 nm’de McFarland 0,5 bulanıklığına (1×10^5 - 5×10^6 hücre/ml) göre ayarlanmalıdır. İnokulum besiyerinin tüm yüzeyine yayılmaktadır. Diskler arasındaki mesafe en az 25 mm olacak şekilde yerleştirilerek iğne ile hafifçe bastırılarak 35°C’de inkübasyona bırakılmakta ve zon çapları 20–24 saat sonra değerlendirilmektedir. Yeterince üreme gözlenmediği durumda inkübasyon süresi 48 saate çıkarılmaktadır. Diskleri çevreleyen inhibisyon alanları ölçülüp belirlenen zon çaplarıyla karşılaştırılarak antimikrobiyal tedavide kullanılmak için en uygun antifungal ajan/ajanlar tespit edilmektedir.

CLSI mayaların antifungal disk difüzyon duyarlılık metodu için M44-A2 dökümanını 2. baskısını 28.08.2009 tarihinde, filamentöz mantarların antifungal disk difüzyon duyarlılık metodu için ise M51-P dökümanının 1. baskısını 30.06.2009 tarihinde yayınlamıştır.

Filamentöz mantarlar için disk difüzyon duyarlılık testleri amfoterisin B, kaspofungin, itraconazol, posakonazol, vorikanazol ve flukanazol diskleri kullanılarak yapılmaktadır.

2.7.5.2. E-Test

E-test doğrudan kantitatif antifungal duyarlılığı belirlemeye yarayan ticari bir testtir. MİK saptamaya yarayan bu test, bir uçtan diğer uca tedricen artan antifungal konsantrasyonu içeren plastik stripler kullanılarak yapılmaktadır (99, 103). Metod antifungal ilacın agarlı besiyerine geçişi ile gerçekleştirilen bir difüzyon testidir (99).

Bu metod antifungal ajanların bir çoğuna uyarlanmıştır. Amfoterisin B (konsantrasyon aralığı 0,002-32 µg/ml), flusitozin (0,002-32 µg/ml), flukonazol (0,016-256 µg/ml), itrakonazol (0,002-32 µg/ml), ketokonazol (0,002-32 µg/ml), vorikonazol (0,002-32 µg/ml), kaspofungin (0,002-32 µg/ml) ve posakonazol (0,002-32 µg/ml) E-test stripleri ticari olarak bulunmaktadır.

Şimdiye kadar yapılan çalışmaların sonucunda ve standardizasyon teknikleri ile E-test ve referans yöntemler arasındaki uyumu antifungal azol ajanları ve kandidalar için kabul edilebilir olarak değerlendirilmiştir. Bütün bunların yanında yapılan çalışmalar sonucunda E-test yöntemini kullanan kişilerin çok dikkatli çalışması gerektiği vurgulanmıştır.

İnokulum hazırlanırken bulanıklığın 0,5 McFarland standardına göre olması önerilmektedir. *A. flavus* için amfoterisin B'nin E-test MİK değerinin CLSI MİK değerinden oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (104).

Bir çok küf için, (*Aspergillus* dahil) amfoterisin B ve itrakonazol E-test çalışmasının, CLSI'nin M38 metoduyla MİK belirlenmesi arasında iyi bir uyum olduğu bildirilmiştir (103, 104, 105). E-test yönteminde birçok katı besiyeri kullanılmasına karşın RPMI bazlı agarların çok daha kullanışlı olduğu bildirilmiştir (103, 104).

E-test'in uygulamasının kolay ve basit olması ve ek malzemeye gerek duyulmaması gibi avantajlarının yanısıra, pahalı bir yöntem olduğu bildirilmiştir (104).

Bütün bunların yanında E-test yöntemi henüz referans bir yöntem olarak kabul edilmemiştir.

2.7.6. Flowsitometri Testi

DNA'ya bağlanan vital boyalar yardımı ile, ölü ve canlı hücreler birbirinden ayrılabilir. Floresanslı boyalar, antifungal ilaca bağlı olarak membran hasarı olursa hücre içine girebilir. Flow sitometri, *Candida* ve *Aspergillus* türleri için araştırılmış, inkübasyon süresini 3–4 saate kadar azalttığı ve antifungal aktivitenin çok kısa sürede saptanabildiği belirtilmiştir. Referans yöntemler ile genellikle iyi düzeyde korelasyon gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, özel donanım gerektirmesi nedeniyle, yaygın olarak kullanılmamaktadır (99, 106).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışması, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan araç ve gereçler kullanılarak yapılmıştır. Diğer kimyasal maddeler ve sarf malzemeleri, BAP-SBE TM (ŞD) 2008–10 DR nolu projeden sağlanan maddi kaynakla tedarik edilmiştir.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

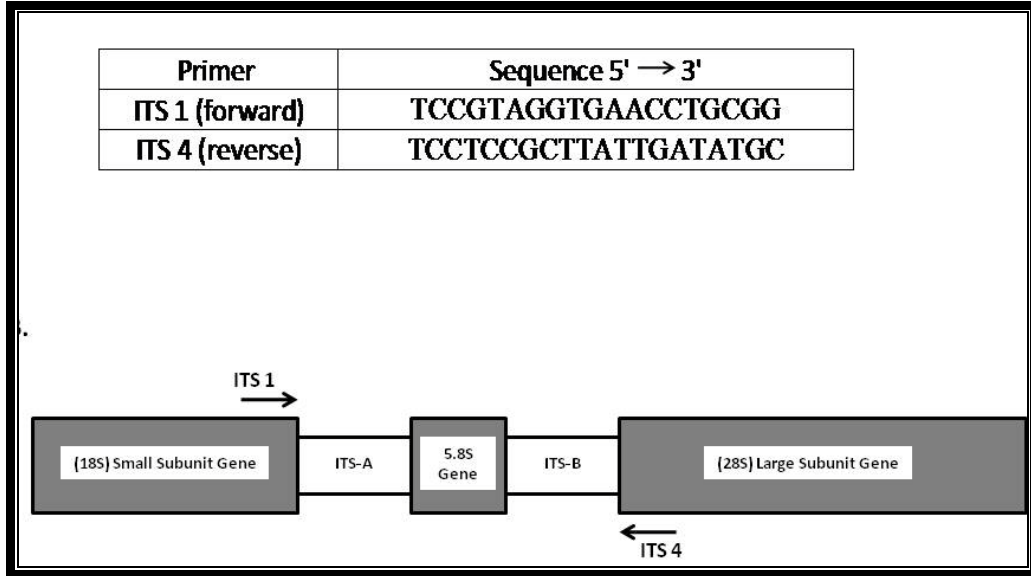
- Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
- Biyogüvenlik kabini (Nuair NU 425-300E Class II, ABD)
- Hassas terazi (Sartorius BL310, Almanya)
- Distile su cihazı (Millipore, Fransa)
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Hettich- Micro 200R, Avustralya)
- Midi santrifüj (Avustralya)
- Vortex (Nüve NM- 110, Türkiye)
- Sıcak su banyosu (Nüve BM 402 Türkiye)
- -80°C'lik Derin dondurucu (Heto, Çin)
- +4°C'lik soğutucu (Ariston, Türkiye)
- Otoklav (Hirayama- HA-300 M4, Japonya)
- Pasteur fırını (Mammert UE 500, İngiltere)
- Elektrik ocağı (Beko, 0.710, Türkiye)
- Işık mikroskobu (Olympus, Japonya)
- Dijital fotoğraf makinesi (Olympus, C7070, Japonya)
- Yatay çalkalayıcı (IKA, Werke Typ VX2, Brezilya)
- Bulaşık makinası (Beko, Türkiye)
- pH metre (Hanna, İtalya)

- Mikrodalga Fırın (Beko- MD 1500, Türkiye)
- Mikropipet Seti (Biohit, Proline 0,5µL-1000µL, Finlandiya))
- PZR cihazı (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler, Almanya)
- Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra, Almanya)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra P30, Almanya)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, Fransa)
- Nanodrop ND 1000 UV-Vis Spektrofotometre (NanoDrop Technologies, Houston, TX, ABD)
- Homojenizatör (Heidolph Tip F/F İngiltere)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Tris-hidroklorid (Sigma, T-5941, Lot 31 K5466)
- Etilen diamin tetra asetik asit disodyum salt dihydrate (EDTA) (Sigma, E5134)
- Sodyum dodezil sülfat (SDS) (Merck, L51736210)
- Magnezyum klorid (MgCl₂) (Promega, A351H)
- Sodyum klorid (NaCl₂) (Riedel-de Haän, Lot 33000/ 13423)
- β- 2 merkaptoetanol (Sigma, 024K0117)
- Proteinaz K (Sigma P2308 lot 065 K8603)
- Litikaz (Sigma, L4276)
- Sıvı fenol (Sigma, P4557-100ML)
- Kloroform (Merck)
- İzoamil alkol (Merck)
- İzopropil alkol (Merck, K-32883695 405)
- Etanol absolut (Riedel de Haän/ Lot 32221)
- 10x PZR Buffer (Mg free) (Vivantis)
- dNTP Mix (Sigma, Deoxynucleotide set DNTP-100)
- Taq DNA Polimeraz (Vivantis)
- DNase, RNase Free Su

- Agaroz (Sigma, A-5093)
- Potasyum asetat (Sigma K1190)
- Steril Distile su
- 100 bp Moleküler Ağırlık Standardı (Fermentas, GeneRuler 100 bp DNA Ladder, #SM0241)
- Brom fenol mavisi
- Etidyum bromid
- Tüm mantarlara özgü ITS-1 ve ITS-4 primerleri



Şekil 3.1. Mantarlara özgü ITS bölgesi (107)

3.1.3. Kullanılan Besiyerleri ve Boyalar

- Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)
- Patates Dekstroz Agar (PDA)
- Mueller Hinton Agar (MHA)
- Sabouraud Dekstroz Broth (SDB)
- Laktofenol Pamuk Mavisi (LFPM)

3.1.4. Kullanılan Antifungal Strip ve Diskler

- Flukonazol E-test (0,016-256 µg/ml) (AB Biodisk, Solna, İsveç)
- Vorikonazol E-test 0,002-32 µg/ml) (AB Biodisk, Solna, İsveç) (
- Amfoterisin B E-test (0,002-32 µg/ml) (AB Biodisk, Solna, İsveç)
- Kaspofungin E-test (0,002-32 µg/ml) (AB Biodisk, Solna, İsveç)
- Posakonazol E-test (0,002-32 µg/ml) (AB Biodisk, Solna, İsveç)
- Flukonazol (25-µg) disk (Oxoid, Basingstoke, İngiltere)
- Vorikonazol (1-µg) disk (Oxoid, Basingstoke, İngiltere)

3.1.5. Kullanılan Standart Suşlar

- *Aspergillus niger* standart suşu (RSHMB 04017)
- *Aspergillus fumigatus* standart suşu (RSHMB 04005)

3.1.6. Kullanılan Bilgisayar Programları

- FinchTv (Versiyon 1.4.0) www.geospiza.com/FinchTv
- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
- SPSS 11.5.1 for Windows
- Photoshop programı (Versiyon 10.0)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Besiyerleri ve Boyaların Hazırlanması ve Kalite Kontrollerinin Yapılması

3.2.1.1. Sabouraud Dekstroz Agar'ın (SDA) Hazırlanması

Hastalardan alınan klinik örnekler, mantarların üretilmesinde kullanılan bir genel üretim besiyeri olan SDA (Oxoid, Hampshire/İngiltere) besiyerine ekilerek küf üremesi

yönünden değerlendirilmiştir. Düşük pH içeriği nedeni ile bakterilerin üremesini inhibe etmektedir. Besiyerleri 90 mm çapındaki steril plastik petrilere döküldükten sonra kalite kontrolleri yapılarak kullanıldı.

Besiyerinin içeriği:

Mikolojik pepton	10 g/L
Glikoz	40 g/L
Agar	15 g/L
pH	5,6±0,2

Toz besiyerinden 65 g tartılarak bir balon jøjeye konulmuştur, üzerine 1 L'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenerek süspanse edilmiştir. Kaynar suda ısıtılarak besiyerinin çözünmesi sağlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. Steril petri kutularına kalınlığı 4 mm olacak şekilde 25'er ml dökülerek katılaşıncaya kadar bekletilmiştir ve kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.1.2. Patates Dekstroz Agar'nın (PDA) Hazırlanması

Küflerin morfolojik yapılarının gözlenmesi ve daha fazla spor oluşturmaları için PDA (Oxoid, Hampshire/İngiltere) kullanılmıştır.

Besiyerinin içeriği:

Patates özütü	4 g/L
Glikoz	20 g/L
Agar	15 g/L
pH	5,6±0,2

Toz besiyeri 39 g tartılarak bir balon jøjeye konulmuştur, üzerine 1 L'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenerek süspanse edilmiştir. Kaynar suda ısıtılarak besiyerinin çözünmesi sağlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta

sterilize edilmiştir. Steril petri kutularına kalınlığı 4 mm olacak şekilde 25'er ml dökülerek katılaşıncaya kadar bekletilmiştir ve kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.1.3. Mueller Hinton Agar'ın Hazırlanması (%2 glikoz ve 0,5 µg/ml metilen mavisi eklenmiş)

Küflerin antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla %2 glikoz ve 0,5 µg/ml metilen mavisi eklenmiş Mueller Hinton Agar (Oxoid, Hampshire/İngiltere) kullanılmıştır.

Besiyerinin içeriği:

Et özütü	300 g/L
Kazein hidrolizati	17,5 g/L
Nişasta	1,5 g/L
Glikoz	20 g/L
Metilen mavisi	0,5 mg/L
Agar	17 g/L
pH	7,3±0,1

Toz besiyerinden 38 g ve glikozdan 20 g tartılarak bir balon joje'ye konulmuştur, üzerine 1 L'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenerek süspanse edilmiştir. Kaynar suda ısıtılarak besiyerinin çözünmesi sağlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakikalık atm basınçta sterilize edilmiştir. Besiyeri sıcaklığı 50-55°C ye geldiğinde üzerine filtrasyon ile steril edilmiş metilen mavisi (0,5 mg/L) eklenerek iyice homojenize edilmiştir. Çapı 90 mm olan steril petri kutularına kalınlığı 4 mm olacak şekilde 25'er ml dökülerek katılaşıncaya kadar bekletilmiştir ve kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.1.4. Sabouraud Dekstroz Broth'un (SDB) Hazırlanması

Hastalardan alınan klinik örnekler mantarların üretilmesinde kullanılan bir genel üretim besiyeri olan SDB (Oxoid, Hampshire/İngiltere) besiyerine ekilerek küf üremesi değerlendirilmiştir. Düşük pH içeriği nedeni ile bakterilerin üremesini inhibe etmektedir. Besiyerleri 10 cm uzunluğundaki steril tüplere dağıtılmıştır. Daha sonra kalite kontrolleri yapılarak çalışmada kullanılmıştır.

Besiyerinin içeriği:

Mikolojik pepton	10 g/L
Dekstroz	20 g/L
Agar	15 g/L
pH	5,6±0,2

Toz besiyerinden 30 g tartılarak bir balon jøjeye konulmuştur, üzerine 1 L'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenerek süspanse edilmiştir. Kaynar suda ısıtılarak besiyerinin çözünmesi sağlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. Steril tüplere 5'er ml dağıtılarak kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.1.5. Besiyerlerinin Kalite Kontrolü

Hazırlanmış olan tüm besiyerlerinin pH ölçümleri petrilere veya tüplere dökülmeden önce yapılmıştır. Petri kutularının etrafı kontaminasyonu engellemek için parafilm ile sarılmıştır. Hazırlanmış besiyerleri ekim işleminden önce 25°C'de en az 5 gün bekletilerek herhangi bir mikroorganizma üreyip üremediği gözlenmiştir. Üreme yoksa ekim için kullanılmıştır. Ayrıca hazırlanmış besiyerlerine standart maya ve küf suşlarından ekim yapılarak besiyerlerinin kalite kontrolü yapılmıştır.

3.2.1.6. Laktofenol Pamuk Mavisi'nin (LFPM) Hazırlanması

Laktik asit	20 ml
Fenol kristal (veya fenol)	10 g
Gliserol (veya Gliserin)	40 ml
Pamuk mavisi	0,05 g
Distile su	20,0 ml

Laktik asit içinde fenol tamamen çözüldü, gliserol ve su hafifçe ısıtılmıştır. Pamuk mavisi eklenerek iyice karıştırılmıştır. Koyu renkli şişelerde ışıktan korunarak oda sıcaklığında 15–30°C'de saklanmıştır.

Laktik asit temizleyici özellik göstermekte ve fungal yapıları korumaktadır, fenol, öldürücü etki göstermekte, gliserol preparatın kurumasını önlemekte ve pamuk mavisi ise fungal yapıların boyanmasını sağlamaktadır.

Laktofenol Pamuk Mavisi Boyama Yöntemi: Özellikle küf tarzında üreyen mantarlardaki hif ve sporları incelemek amacıyla kullanılmaktadır. Pratik olarak temiz bir lam üzerine bir damla LFPM eriyiğinden konur. Selofan bandın yapışkan tarafı petri kutusunda üretilmiş olan mantar kolonisi üzerine temas ettirildikten sonra lamın üzerindeki LFPM üzerine bastırılarak, yapışkan kısmın lamın yüzeyine yapışması sağlanmıştır. Sonra 4-5 dakika oda ısısında bekletilerek 10X ve 40X objektifte mikroskopta incelenmiştir.

3.2.2. Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.2.1. DNA İzolasyonu için Kullanılan Solüsyonlar

3.2.2.1.1. Parçalama Tamponu (Lizis tamponu) (100 ml)

Tris-HCl	1,576 g
EDTA	1,116 g

SDS 0,500 g
[100 mM Tris HCl; 30mM EDTA (pH:8), % 0,5 SDS]

Koyu bir cam şişe içerisinde tartılan kimyasal maddeler distile su ile eritilerek 100 ml'ye tamamlanmıştır ve pH 8,0'e ayarlanmıştır. Tampon +4°C'de buzdolabı ısısında saklanmıştır.

3.2.2.1.2. Proteinaz-K (100 mg/mL)

Hazır olarak alınan liyofilize 100 mg Proteinaz-K (Sigma) 1 ml steril distile su ile çözülerek 100 mg/ml'lik konsantrasyona getirilmiştir. Çözelti 25 µL'lik porsiyonlara bölünerek -20°C'de saklanmıştır.

3.2.2.1.3. Fenol-Kloroform-İzoamil Alkol (25:24:1)

Sıvı fenol	25 ml
Kloroform	24 ml
İzoamil alkol	1 ml

Karışım hazırlanıp vortekslendikten sonra koyu bir cam şişe içerisine konularak buzdolabında + 4°C'de saklanmıştır.

3.2.2.1.4. Kloroform-İzoamil Alkol (24:1)

Kloroform	24 ml
İzoamil alkol	1 ml

Karışım hazırlanarak vortekslenip koyu bir cam şişe içerisine konularak buzdolabında + 4°C'de saklanmıştır.

3.2.2.1.5. %70'lik Etil Alkol

Etil alkol	70 ml
Steril distile su	30 ml

Karışım hazırlanarak 100 ml'lik koyu renkli bir şişeye konarak buzdolabında saklanmıştır.

3.2.2.2. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar

3.2.2.2.1. 10X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Tamponu Stok Solüsyonu

Tris Base	108 g
Borik Asit	55 g
EDTA	9,3 g

Kimyasallar tartılarak distile su ile eritilmiş ve pH 8,0'e ayarlanmıştır. Distile su ile 1 L'ye tamamlanarak, oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.2.2.2.2. Elektroforez Yürütme Tamponu (1X TBE)

10x TBE tamponu stok solüsyonundan alınarak distile su ile dilüe edilip 1X TBE tamponu haline getirilmiştir, elektroforez yürütme tamponu olarak elektroforez tankında kullanılmıştır.

3.2.2.2.3. Yükleme Tamponu (Loading Buffer), 20 ml için

Sükroz	4 g
Brom fenol mavisi	0,05 g

Tartılan kimyasallar 20 ml 1X TBE tamponunda çözülerek oda ısısında saklanmıştır.

3.2.2.2.4. Etidyum Bromid (Et-Br)

Stok Et-Br'den alınarak 10 mg/ml'lik olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.2.2.2.5. Agaroz Jel Solüsyonu (% 1,5)

Elektroforez için %1,5'luk agaroz jelin hazırlanmasında, 100 ml'lik bir balon jöjeye 0,75 g agaroz tartılarak 1X TBE tamponu ile 50 mL'ye tamamlanmıştır ve mikrodalga fırında homojen bir şekilde şeffaf hale gelinceye kadar ısıtıldı (yaklaşık iki-üç dakika). Sıcak jelin içerisine 10 mg/ml konsantrasyonundaki Et-Br'den 4 µL eklenmiştir. Et-Br'ün jel içerisinde iyice karışması sağlandıktan sonra sıcak jel PZR ürünlerinin yüklenmesi için kuyucukların oluşmasını sağlayan jel tarağı yerleştirilmiş jel tepsisine dikkatlice döküldü. Jelin içinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Yaklaşık 30 dakika oda ısısında beklenecek jelin katılaşıp donması sağlanmıştır. Daha sonra jel içerisinden tarak çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

3.2.3.Hasta Örneklerinin Toplanması

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde kritik ünitelerde (yoğun bakım üniteleri, reanimasyon, diyaliz üniteleri, transplantasyon, onkoloji) ve hastanenin diğer servislerinde (Göğüs Hastalıkları, Nefroloji, Hematoloji, Pediatri, Enfeksiyon Hastalıkları, Kardiyoloji, Dermatoloji ve tüm Cerrahi servisler) yatan, uzun süreli tedavi gören, invaziv girişim uygulanan hastalardan 01.04.2008 ile 01.01.2010 tarihleri arasında Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na gönderilen mikolojik kültür istenen ve istenmeyen toplam 6742 klinik örnek çalışma kapsamına alınmıştır. Ayrıca projelendirme tarihinden önce Mikoloji Laboratuvarı'mızda dört farklı hastadan filamentöz mantar suşları izole edilmiş ve bu olgular da çalışma kapsamına alınmıştır (Çizelge.4.1).

Toplanan klinik örnekler (kan, BOS, balgam, BAL, trakeal aspirat, kan, diyaliz sıvıları, steril vücut sıvısı, doku, endotrakeal tüp, yara) steril kaplar içerisinde aseptik koşullarda ulaştırılarak hemen işleme alınmış ve hastalara ait bilgiler kaydedilmiştir.

Çalışmaya bazı klinik örnekler (idrar, gaita ve boğaz) dahil edilmemiştir.

Çizelge 3.1. Klinik örneklerin örnek çeşidine göre dağılımı

Sıra	Örnek	Sayı	Sıra	Örnek	Sayı
1	Periferik Kan	1668	17	Sinoviyal sıvı	37
2	Yara	1103	18	Vajinal akıntı	36
3	Doku	580	19	Endo trakeal tüp	36
4	Trakeal aspirat	578	20	Konjunktiva sürüntüsü	31
5	BOS	450	21	Safra sıvısı	18
6	Balgam	409	22	Üretral akıntı	14
7	Periton diyaliz sıvısı	396	23	Aspirat	13
8	Apse	357	24	Dış kulak yolu akıntısı	13
9	Katater	227	25	Amniyon sıvısı	12
10	Plevra sıvısı	224	26	Korneal sürüntü	11
11	Diren	115	27	Prostat sıvısı	10
12	Burun sürüntüsü	103	28	Torasentez sıvısı	8
13	Göbek sürüntüsü	86	29	Perikard sıvısı	5
14	Ağız içi sürüntü	71	30	Asit sıvısı	4
15	Sperm	68	31	Kemik iliği	4
16	BAL	51	32	Transbronşiyal sıvı	4
			Toplam		6742

Çizelge 3.2. Klinik örneklerin gönderildiği bölümlere göre dağılımı

Sıra	Bölüm	Sayı	Sıra	Bölüm	Sayı
1	Pediyatri	1661	16	Nöroloji	172
2	Genel Cerrahi	690	17	Kardiyoloji	147
3	Plastik Cerrahi	412	18	KVC	135
4	Hematoloji	335	19	Acil	128
5	Enfeksiyon Hastalıkları	329	20	Dermatoloji	124
6	Beyin Cerrahi	286	21	GYB	107
7	Gastroentroloji	285	22	Göz	51
8	Üroloji	270	23	Dahiliye	35
9	Göğüs Hastalıkları	265	24	Algoloji	20
10	Ortopedi	260	25	Romatoloji	20
11	Kadın Doğum	229	26	Endokrinoloji	19
12	KBB	189	27	Psikiyatri	17
13	Nefroloji	182	28	Onkoloji	16
14	Reanmiasyon	177	29	YBÜ	7
15	Göğüs Cerrahi	174	Toplam		6742

3.2.4. Klinik Örneklerin Gram Boyama ile İncelenmesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ulaştırılan örnekler ekim işlemi yapıldıktan sonra temiz bir lam üzerine sürülerek oda ısısında kuruyuncaya kadar bekletilmiştir. Preparatlar alevde tespit edildikten sonra Gram boyama ile boyanarak, mikroskopta 100X objektifinde immersiyon yağı damlatılarak incelenmiştir.

3.2.5. Hasta Örneklerinin Kültürünün Yapılması

Rutin kültürde klinik örneklerin ekimi için %5 kanlı agar, Eosin Methylene Blue agar, çukulata agar ve SDA besiyerleri kullanılmıştır. Özellikle SDA besiyerleri kültür için kullanılmadan 5-7 gün önce oda ısısında bekletilerek herhangi bir istenmeyen küf kontaminasyonu açısından kontrolü yapılmıştır.

Ekim yapılan petriyerler 37°C'de bir gece (16-18 saat) inkübasyondan sonra bakteriyolojik açıdan değerlendirildikten sonra küf üremesinin takip edilmesi için 25°C'lik etüvde en az 7 gün daha bekletilmiştir.

3.2.6. Kültür Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Değerlendirme kriteri olarak ekim yapılan petriyerlerde üreme varlığı ve yaygın üreme göz önünde bulundurulmuştur. Şayet tek petride üreme varsa, üreme ekim çizgisi dışında ise ve bir-iki koloni görülmüşse havadan kontaminasyon olarak düşünülüp değerlendirmeye alınmamıştır. Küf üremesi gözlenmeyenler negatif olarak değerlendirilirken, küf üremesi gözlenenler ileri işlemler için değerlendirmeye alınmıştır. Üreme gözlenen küf kolonileri gerek makroskopik gerekse mikroskopik olarak değerlendirilip üreyen küf mantarının tanısı klasik olarak konulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla çeşitli mikoloji atlaslarından (34, 64) ve internetten (51) yararlanılmıştır.

3.2.6.1. Makroskobik Değerlendirme

Koloni üreme hızı: Besiyerinde üreyen küf mantarlarının koloni oluşturma hızları kaydedilmiştir. Yavaş üreyen mantarların küçük, hızlı üreyen mantarların ise büyük koloni oluşturdıkları gözlenmiştir.

Koloninin yüzeysel görünümü: Küf kolonisinin besiyeri yüzeyindeki yapıları ve besiyerinin arka yüzeyinde pigment oluşumu değerlendirilmiştir. Küf kolonileri öncelikle çıplak gözle, daha sonra stereo mikroskop altında incelenmiştir. Bu incelemede, koloninin şekli (düzgün kenarlı, girintili çıkıntılı kenarlı, dağınık, düğmemsi, kubbemsi), koloninin büyüklüğü, yüzey görünümü (çıplak, tüylü, pamuksu, tozlu, tanecikli, kadifemsi, buruşuk), besiyeri üzerindeki kısmın renk özellikleri (açık, koyu, dalgalı, harelî), pigment oluşturma, pigment rengi, belirgin bir koku oluşturma ve su damlacıkları oluşturup oluşturmama gibi makroskobik özellikleri değerlendirilmiştir.

3.2.6.2. Mikroskobik Değerlendirme

Üreme kontrolü günlük olarak takip edilmiş ve üreyen kolonilerin identifikasyonu konvansiyonel yöntemlere göre yapılmıştır. Kolonilerin identifikasyonu için makroskobik ve mikroskobik morfolojiler değerlendirilerek, gerektiğinde biyokimyasal testler yapılmıştır. Mikroskobik morfoloji için LFPM ile hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda incelenerek küf kolonilerine ait hiflerin dallanıp dallanmadığı, şekilleri, kalınlıkları, septalı veya septasız oluşları, saydamlıkları, rengi, konidiumların büyüklükleri, şekilleri, renkleri, dizilişleri, vezikül yapılarının olup olmadığı ve sporlarının özellikleri incelenerek bazı filamentöz mantarlar cins düzeyinde, bazıları ise tür düzeyinde tanımlanmıştır.

3.2.7.Hasta İzolatlarının Saklanması

3.2.7.1.Serum Fizyolojik İçerisinde Saklama

Klinik örneklerden üretilmiş olan suşlar SDA besiyerinde saf kültür olarak üretilmiştir ve küf kolonilerinden içerisinde steril serum fizyolojik bulunan 1,5 ml'lik steril ependorf tüpler içerisine öze yardımı ile alınarak -80°C'de saklanmıştır. Daha sonraki çalışmalarda saklanmış olan suşlar tekrar SDA besiyerine pasajlanarak üretilmiştir.

3.2.7.2. Kum İçerisinde Saklama

Hastaların klinik örneklerinden izole edilen suşlar aynı zamanda steril kum içerisinde saklanmıştır. Denizden alınmış olan ince kum üç defa musluk suyu ile yıkandıktan sonra bir saat distile su içerisinde bekletilmiştir. Yıkamış kum suyu süzöldükten sonra Pastör fırınında 100°C'de bir saat bekletilerek kurutulmuştur. Temiz cam flakon şişelerin içerisine yarısına gelecek kadar bu kurutulmuş kumdan eklenerek spanç ile ağızları kapatılmıştır. Şişeler Pastör fırınında 160°C'de 2 saat bekletilerek steril edilmiştir. Saklanacak olan suşların kolonilerinden iğne öze ile alınarak kum içerisinde yayılması sağlanmıştır. Şişelerin kapakları kapatılarak oda ısısında saklanmıştır. Tekrar canlandırma yapılacağında steril ekivyonlu çubuklar SDA besiyerinin bir kenarında hafifçe ıslatıldıktan sonra şişeden kum tanecikleri ile birlikte saklanan örnek alınarak SDA besiyerine pasaj yapılmıştır. Besiyeri etüvde 24°C'de inkübe edilerek suşlar canlandırılarak çalışmalarda tekrar kullanılmıştır.

SDA besiyerinde yapılan canlandırma pasajlarında koloniler 24 saat sonra gözle görülür hale gelirken *A. flavus* ve *Fusarium* kolonileri 48 saatten daha sonra gözle görülür hale gelmeye başlamıştır.

3.2.8. Moleküler Yöntemle İzolatların Tiplendirilmesi

3.2.8.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

3.2.8.1.1. DNA İzolasyonu (108)

1. Steril 1,5 ml'lik ependorf tüp içerisine 100 µl parçalama tamponundan eklenmiştir.
2. Üzerine SDA besiyerinde 72 saatte üretilmiş saf kültür halindeki küf kolonisinden steril distile su içerisinde soğutulmuş ıslatılmış iğne uçlu öze ile çok az miktarda alınmıştır.
3. Tüplere 100 mg/ml'lik proteinaz K'dan 10 µl ilave edilerek vortekslenmiştir.
4. Tüpler 65°C'ye ısıtılmış kuru ısı bloklarına konularak yarım saatte bir vortekslenerek 2 saat inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyon sonrasında tüpler 95°C'de 10 dakika inkübe edilerek proteinaz K denatüre edilmiştir.
6. Tüpler 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
7. Dip kısımdaki çökeltiyeye dokunmadan süpernatanttan 100 µl alınarak yeni bir ependorf tüpe aktarılmıştır.
8. Üzerine 150 µl fenol-kloroform-izoamilalkol (25:24:1) karışımından eklenerek vortekslenmiştir.
9. Tüpler 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
10. Süpernatant çökeltiyeye dokunmadan yeni bir tüpe alınarak üzerine 200 µl kloroform-izoamilalkol (24:1) karışımından ilave edilip vortekslenmiştir.
11. Tüpler 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
12. Süpernatant yeni bir tüpe alınarak üzerine 2,5 katı kadar %100 etil alkol eklenmiştir.
13. Sonra 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir.

14. Süpernatant atılarak çökeltinin üzerine 200 µl %70'lik etil alkolden eklenmiştir.
15. Tüpler 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
16. Süpernatant dökülerek pellet havada kurutulmuştur ve üzerine 30 µl Tris-EDTA (TE) solüsyonundan eklenerek -20°C'de saklanmıştır.

3.2.8.1.2. DNA İzolasyonu İçin Yapılan Diğer Denemeler

3.2.8.1.2.1. Dondurma-Kaynatma Yöntemi (109)

Daha önce bakterilerin DNA izolasyonunda kullanılan dondurma–kaynatma yöntemi küfler için de uygulanmıştır. SDA besiyerinde saf olarak üretilmiş olan 7 günlük küf kolonisinden çok az bir miktar alınarak içerisinde 1 ml serum fizyolojik bulunan steril ependof tüpe konulmuştur. Tüpler -80°C'de en az bir saat bekletilmiştir. Tüplerin içerisindeki sıvı çözülmeden kaynayan su içerisinde 15 dakika bekletilmiştir. Örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant amplifikasyonda kullanılmıştır.

3.2.8.1.2.2. Sıvı Nitrojen Yöntemi (110)

Bir çok makalede kullanıldığı gibi DNA izolasyonu için sıvı nitrojen yöntemi uygulanmıştır. Steril bir ependorf tüp içerisine kuru olarak alınan küf kolonileri zaman kaybetmeden içerisinde sıvı nitrojen bulunan kap içerisinde iki-üç dakika bekletilmiştir. Fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) karışımı ile DNA izolasyon yöntemine devam edilmiştir. Sonrasında %100 izopropanol ve %70 etil alkol ile DNA presipitasyonu yapılarak örnekler amplifikasyonda kullanılmıştır.

3.2.8.1.2.3. Mirhendi'nin Yöntemi (111)

Bir çok küf örneğinden DNA izolasyonu yapmış olan Mirhendi'nin uyguladığı yöntem denenmiştir. Hazırlanan lizis solüsyonuna proteinaz K (100 mg/mL) eklenerek inkübasyona bırakılmıştır. Yukardaki yöntemde uygulandığı gibi fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) ve alkol presipitasyonu yapılmıştır. Örnekler PZR uygulanarak değerlendirilmiştir.

3.2.8.1.2.4. Fuji Film Hazır Kit Yöntemi

Mayalar için genomik DNA izolasyonunda kullanılan yarı otomatize ticari Fuji Film kiti deneme amaçlı kullanılmıştır. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda kit protokolü uygulanarak DNA izolasyonu yapılmaya çalışılmıştır.

3.2.8.1.2.5. MagNa Pure Yöntemi (112)

Loeffler ve ark.(112) kullanmış oldukları, maya ve filamentöz küfler için tam otomatize MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit ile DNA izolasyonu yapılmaya çalışılmıştır. Sıvı ve katı besiyerlerinde üretilmiş küf kolonilerinden alınarak DNA izolasyonu üretici firma önerileri doğrultusunda yapılmıştır.

3.2.8.1.2.6. Qiagen Hazır Kit Yöntemi (113)

Çalışmada *Aspergillus*'ların DNA izolasyonunda sorunlar yaşandığı için Qiagen firmasına ait Qiamp DNA Mini kit DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Daha önceki ticari kitlerde uygulandığı gibi DNA izolasyonu protokolüne göre yapılmaya çalışılmıştır.

3.2.8.1.2.7. Modifiye Yöntem

Farklı makalelerden yola çıkılarak ortak bir protokol çıkartılmıştır. Bu protokole göre öncelikle bir lizis tamponu hazırlanmıştır. Bu tampona küf kolonisinden bir miktar alınıp proteinaz K (100 mg/mL) ilave edilerek 56°C’de bir gece inkübe edilmiştir. Ardından fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) ve alkol presipitasyonu uygulanmıştır. DNA örnekleri amplifiye edilerek jelde yürütülmüştür.

3.2.8.1.2.8. Beş Kez Dondurma- Kaynatma Yöntemi

İlk denenen kaynatma-dondurma yönteminin bir modifikasyonu olarak yapılmıştır. DNA izolasyonu için içerisinde 1 ml serum fizyolojik bulunan tüplere alınan örnekler derin dondurucuda -80°C’de en az 1 saat bekletilmiştir. Tüpler kaynar su içerisinde 15 dakika bekletilerek tekrar -80°C’ye konulmuştur. Bu işlem 5 kez tekrarlanmıştır. Sonra fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) ve alkol presipitasyon protokolü uygulanarak PZR işlemi yapılmıştır.

3.2.8.1.2.9. Homojenizatör Kullanarak Yapılan Yöntem

Serum fizyolojik içerisine alınan küf örnekleri homojenizatör cihazı (Heidolph Tip F/F İngiltere) ile 15 dakika işleme tabi tutulmuştur. İşlem sonrası klasik fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) ve alkol presipitasyon protokolü uygulanmıştır.

3.2.8.1.3. PZR Reaksiyon Karışımı

Hazırlanan PZR reaksiyon karışımı (Çizelge 3.3) vortekslelendikten sonra, her bir örnek için numaralandırılmış steril 0,4 mL’lik PZR üplerine 22 µl dağıtılıp, klinik örneklerden ekstrakte edilen DNA örneğinden 3 µl eklenip flash spin yapılarak termal döngü cihazına (Thermal Cycler, Eppendorf Mastercycler) yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. PZR reaksiyon karışımı

	Son konsantrasyon	Son hacim
Distile su	1X	16,4 µl
10X PZR tamponu	1X	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	2 µl
dNTP miks (10 mM)	30 µM	0,3 µl
ITS-1 primeri (100 µM)	1,2 µM	0,3 µl
ITS-4 primeri (100 µM)	1,2 µM	0,3 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0,04 U/µl	0,2 µl
DNA		3 µl
Toplam Hacim		25 µl

3.2.8.1.4. Amplifikasyon Şartları

Çalışmada DNA'ları çoğaltmak için kullanılan PZR amplifikasyon şartları çizelge 3.4'te verilmiştir

Çizelge 3.4. PZR amplifikasyon şartları

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön ısıtma (Baslangıç denatürasyonu)	94	5 dakika	1
Denatürasyon	94	20 saniye	40
Primer bağlanması (Annealing)	58	45 saniye	
Zincir uzama (Elongasyon)	72	90 saniye	
Son uzama (Post elongasyon)	72	7 dakika	1
Muhafaza	4		∞

3.2.8.1.5. Agaroz Jel Elektrofrezisi

PZR sonrası oluşan ürünlerin, hazırlanan jelde yürütülmesi ile DNA'ların bant büyüklükleri, belli DNA fragmentleri ihtiva eden DNA size marker ile kıyaslanarak

saptanmıştır. Elektroforez yürütme tamponu olarak 1X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) kullanılmıştır.

PZR ürünlerinden 7,5'er µl alınarak 2,5 µl 1X TBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 sükröz veya gliserol, %0,25 brom fenol mavisi) ile iyice karıştırılmıştır ve elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklenmiştir. Tankın kapağında bulunan elektrotlar yerleştirilerek güç kaynağına bağlanmıştır. Güç kaynağı 120 Volt ve 40 mA olacak şekilde ayarlanarak çalıştırılmıştır. Yükleme tamponunun jel üzerinde yürümesi takip edilerek yaklaşık 45–60 dakika jelin 3/4'lük kısmını yürümesi beklenerek elektroforez işlemi sonlandırılmıştır.

3.2.8.1.6. Elektroforez Sonuçlarının Gözlenmesi

Jel tanktan çıkararak 312 nm dalga boyunda ışık veren UV-translüminatöründe incelenmiştir ve elektroforez işlemi sonunda elde edilen bantlar jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France) gözlemlenerek kaydedilmiştir. Ayrıca jel görüntüsünün çıktısı alınmıştır (Sony printer).

3.2.8.2. DNA Dizi Analizi

Klinik suşların DNA dizi analizleri PZR işlemi yapıldıktan sonra PZR ürünleri ve primerleri kullanılarak Orta Doğu Teknik Üniversitesi yerleşkesi içerisinde bulunan Teknokent bölgesindeki özel bir laboratuvarında (RefGen) yaptırılmıştır.

Kullanılan cihaz: ABI 3100 Genetic Analyzer

Kullanılan kit: BigDye Cycle sequencing kit V.3.1

Kullanılan Sekans temizleme yöntemi: NaOAC-EDTA-EtOH purifikasyon

Kullanılan PZR temizleme kiti: Nucleospin Extract Kit, Macherey-Nagel

Dizi analizi verileri National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Md., ABD) BLAST sistemi (available at [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.2.9. İzolatların Antifungal Duyarlılık Testleri

3.2.9.1. Disk Difüzyon ve E-Test Yöntemi

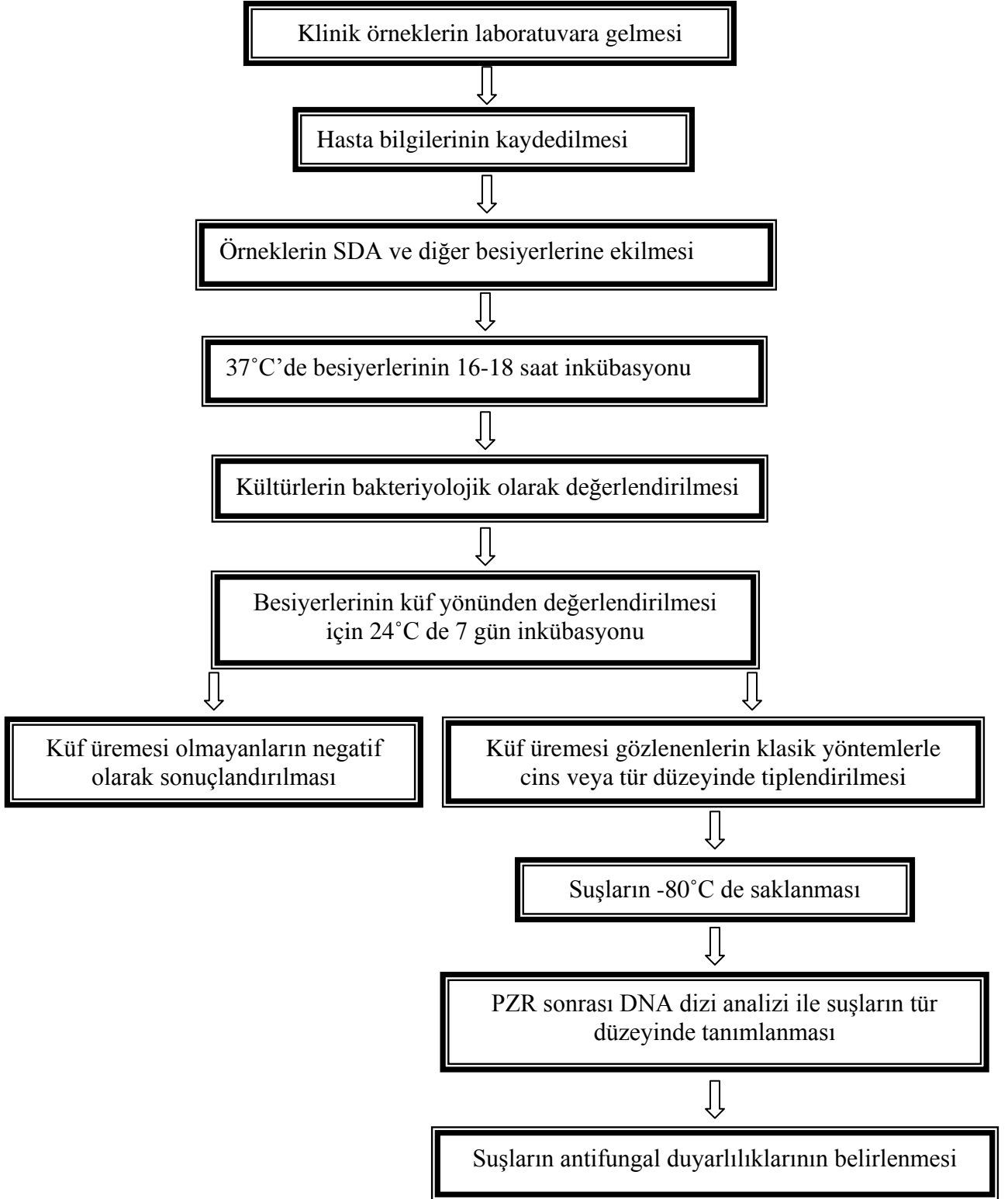
Her iki antifungal duyarlılık testi aynı zamanda gerçekleştirilmiştir. Her bir test için ayrı birer GM-MHA besiyeri kullanılmıştır.

İzolatlar PDA'da 35°C'de 7 gün boyunca inkübe edilerek yeterince sporulasyon oluşturmaları sağlanmıştır. İzolatların spor süspansiyonları içerisinde 10 ml %0,85'lik steril serum fizyolojik bulunan steril tüplerde hazırlanmıştır ve küf kolonisinden steril ekivyonlu çubukla alınarak tüp içerisinde süspanse edilmiştir. Homojen bir süspansiyon elde etmek için 30 saniye iyice vortekslenip 530 nm transmittans %68-82'e uygun olarak 1×10^6 spor/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

Süspansiyondan antifungal çalışmak için hazırlanmış GM-MHA besiyerlerinin yüzeyine 5 ml steril otomatik pipetle eklenmiştir. Oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra besiyeri yüzeyindeki fazla inokülasyon sıvısı hafif eğik pozisyonda steril pipet yardımıyla toplanarak atılmıştır. Besiyeri yüzeyinin kuruması için 15 dakika beklendikten sonra E-test stripleri veya antifungal diskler agar yüzeylerine uygun olarak yerleştirildi ve 35°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar 24 ve 48 saat sonra değerlendirilerek E-test MİK değerleri strip üzerinde işaretlenmiş skalaya göre üremenin olduğu en son nokta okunarak sınır değeri belirlenmiştir. Disk difüzyon testinde ise disk zon çapları ölçülmüştür. Üremenin görülmediği elips zon içerisinde görülen mikrokoloniler gözardı edilmiştir.

Çizelge 3.5. Çalışmada izlenen akış şeması

Çalışmada İzlenen Akış Şeması



4. BULGULAR

4.1.Klinik Örneklerden Küflerin İzolasyonu

Çalışmaya 01.04.2008 ile 01.01.2010 tarihleri arasında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yatmakta olan hastalardan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına gönderilen toplam 6742 klinik örnek dahil edilmiştir. Örneklerin çeşidine ve gönderildiği bölüme göre dağılımı Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Toplam 32 hastanın ardışık klinik örneklerinden 71 filamentöz mantar izole edilmiştir. Hastalardan izole edilen filamentöz mantarların klasik yöntemlerle tiplendirilmesi sonucunda altı *A. niger* (%18.75), altı *A. flavus* (%18.7), beş *A. fumigatus* (%15,62), dört *A. terreus* (%12.50), beş *Fusarium* spp. (%15.62), iki *Bipolaris* spp. (%6,25) ve birer *Aureobasidium* spp. (%3,12), *Acremonium* spp. (%3,12), *Mucor* spp. (%3,12), *Scedosporium* spp. (%3,12) identifiye edilmiştir.

4.2.Küf Mantarı İzole Edilen Hastalar (Çizelge 4.1 ve 4.2)

Hasta 1: Pediatrik Nefroloji Kliniği'nin infantil nefropatik sistinozis, hipotiroidizm, Kronik Böbrek Yetmezliği (KBY) tanısı ile takip ettiği ve sürekli ayaktan periton diyaliz (SAPD) uygulayan 13 yaşındaki erkek hastadan hastanede yattığı süre içinde alınan 13 periton diyaliz sıvısı kültüründe *Fusarium* cinsi filamentöz mantar üremiştir. Amfoterisin B ve oral flukonazol tedavisi uygulanan hastanın sonraki kültürlerinde üreme saptanmamıştır. Hastanın periyodik kontrollerindeki kültürlerinde de üreme olmamıştır. Hasta iyileşerek taburcu edilmiştir

Hasta 2: On gün önce gözüne toprak kaçması hikayesiyle hastanemize başvuran DM ve Diyabetik Retinopatisi olan 53 yaşındaki kadın hastanın ardışık iki konjunktiva sürüntüsü örneğinde *Fusarium* cinsi filamentöz mantar üremiştir. Hasta amfoterisin B

ile tedavi edilmiştir. Hastanın sonraki kültürlerinde üreme saptanmamıştır. Hasta taburcu edilmiştir

Hasta 3: Kalp-Damar Cerrahisi Kliniği'nde damar greft ameliyatı geçiren 67 yaşındaki erkek hastanın sol ayağında meydana gelen ülser lezyon örneklerinde mantar hüfleri görülmüş ve yara bölgesinden alınan üç ardışık klinik örneğinde *Fusarium* spp. üremiştir. Kontakt dermatit tanısı konulan hastaya sistemik terbinafin tedavisi uygulanmıştır. Hastadan tedaviden sonra alınan kültür örneğinde üreme olmamıştır.

Hasta 4: Plastik Cerrahi Kliniği'nde yatan, 15 yıldır DM ve KBY bulunan 55 yaşındaki kadın hastanın sol ayak yara bölgesinden alınan doku örneğinde *Fusarium* spp. üremiştir. Hastanın tekrar kültürleri gönderilmemiştir.

Hasta 5: Anamur Devlet Hastanesi'nden sağ gözüne yabancı cisim batması ile hastanemize sevk edilen 65 yaşındaki kadın hastanın sağ göz nazalındaki küçük apseden gönderilen örnekte *Scedosporium* cinsi filamentöz küf mantarı üremiştir. Antifungal tedavi uygulanmayan ve ayaktan takip edilen hastanın kontrol örnekleri istendiği halde tekrar gönderilmemiştir.

Hasta 6: Nefroloji Kliniği'nde KBY nedeniyle takip edilen Membranoproliferatif Glomerulonefrit (MPGN) tanısı almış 22 yaşındaki erkek hastanın solunum yetmezliği ve hemoptizisi olması üzerine balgam kültürü istenmiş ve yapılan kültür sonucunda *Bipolaris* cinsi filamentöz mantar üremiştir. Hastadan gönderilen ikinci balgam kültüründe üreme olmamıştır. Antifungal tedavi uygulanmayan hasta 14 gün sonra eksitus olmuştur.

Hasta 7: Üç yıldır Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) tedavisi gören 57 yaşındaki kadın hasta hastanemiz Göğüs Hastalıkları Kliniği'ne sevk edilerek yatırılmıştır. Noninvaziv mekanik ventilasyon uygulanan hastadan gönderilen tek balgam örneğinde *A.niger* türü filamentöz mantar üremiştir. Hastaya antifungal tedavi uygulanmamış ve kontrol kültürleri gönderilmemiştir.

Hasta 8: Çocuk Cerrahisi Kliniği'ne boynunda kitle ile başvuran 11 aylık erkek bebeğe meningomyelose tanısı konulmuştur. Hastanede yattığı süre içinde kitlenin perforasyonu üzerine acilen ameliyata alınan hastanın ameliyat sırasında alınan BOS örneğinin kültüründe *A. fumigatus* türü filamentöz mantar izole edilmiştir. Hastaya 14 gün süreyle vorikonazol tedavisi uygulanmıştır. Kontrol kültüründe üreme olmayan hasta taburcu olmuştur.

Hasta 9: KBY nedeniyle takip edilen sekiz yaşındaki kız hastaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde böbrek nakli yapılmıştır. Hastada aynı zamanda dilate kardiyomyopati ve anemi tanıları da konulmuştur. Çocuk Hastalıkları Kliniği'nde yatan hastadan ardışık iki gün arayla gönderilen dört periton diyaliz sıvısı kültürünün ikisinde *A. flavus* üremiştir. Hastaya antifungal tedavi uygulanmamıştır.

Hasta 10: Çocuk Nefroloji Servisi'nde yatan 16 yaşındaki erkek hastaya Alport sendromuna bağlı KBY tanısı konulmuştur. Bu hastadan gönderilen ardışık 15 periton diyaliz sıvısı örneklerinden birinde *Bipolaris* cinsi filamentöz mantar üremiştir. Hastaya 15 gün amfoterisin B uygulanmıştır. Hasta altı ay sonra eksitus olmuştur.

Hasta 11: Göğüs Hastalıkları Servisi'nde kronik astım tanısıyla yatan 48 yaşındaki kadın hastadan gönderilen balgam örneğinin mikrobiyolojik açıdan değerlendirilmesi sonucu kültüründe *A. terreus* üremiştir. Tek balgam örneği gönderilen hastaya antifungal tedavi de uygulanmamıştır.

Hasta 12: DM'a bağlı KBY tanısı ile Nefroloji Servisi tarafından takip edilen 59 yaşındaki kadın hastanın gönderilen periton diyaliz sıvısına yapılan kültür sonucunda *Acremonium* cinsi filamentöz mantar üremiştir. Tedavisi tamamlanmadan kendi isteği ile Mersin Devlet Hastanesi'ne nakledilen hastanın kültürünü doğrulamak amacıyla bu merkezden farklı zamanlarda alınan 5 periton diyaliz sıvısı örneğinde de aynı cins filamentöz mantar ürerken, alınan bir kan kültürü örneğinde üreme olmamıştır. Hasta tekrar filamentöz mantar tedavisi için hastanemize yatırılmıştır. Hastaya 28 gün süreyle Amfoterisin B ve oral flukonazol tedavisi verilmiştir ve hastanın kontrol kültürlerinde üreme olmamıştır. Hasta taburcu edilmiştir.

Hasta 13: Aplastik anemi tanısı ile Hematoloji Servisi'nde yatan 67 yaşındaki romatoid artritli kadın hastanın radyolojik tetkikleri sonucunda İPA'dan şüphelenilmiştir. Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na iki gün arayla gönderilen balgam kültüründe *A. fumigatus* üremiştir. Hastaya 25 gün antifungal tedavi olarak vorikonazol uygulanan hasta bir ay sonra eksitus olmuştur.

Hasta 14: Serebrovasküler hastalığı bulunan 77 yaşındaki erkek hastaya Nefroloji bölümünce Akut Böbrek Yetmezliği (ABY) tanısı konulmuştur. Özgeçmişinde daha önce geçirilmiş TBC öyküsü bulunan. hastanın toraks tomografisinde sol ve sağ akciğer üst loblarında kaviter lezyonlar gözlenmiştir. Solunum yetmezliği gözlenen hastada, İPA şüphesi üzerine birer gün arayla gönderilen dört balgam kültürlerinde *A. fumigatus* üremiştir. Vorikonazol tedavisine alınan hasta 15 gün sonra eksitus olmuştur.

Hasta 15: Göğüs Hastalıkları Kliniği'ni tarafından bronşektazi tanısı ile takip edilen ve geçirilmiş TBC öyküsü bulunan 53 yaşındaki erkek hastada nefes darlığı ve hemoptizisi şikayetleri gelişmiştir. Hastadan beş farklı zamanda gönderilen balgam kültüründe *A. fumigatus* üremiştir. Bu üremeler Göğüs Hastalıkları tarafından kolonizasyon olarak değerlendirilmiş, hastaya antifungal tedavi uygulanmamıştır.

Hasta 16: Rektum kanseri tanısı ile Onkoloji ve Nefroloji Klinikleri'nin ortak takip ettiği ve kemoterapi alan 60 yaşındaki erkek hastanın yatışında gönderilen ilk kan kültüründe *Fusarium* cinsi filamentöz mantar üretilmiştir Bunun üzerine farklı zamanlarda gönderilen yedi kan kültürü örneğinde üreme olmamıştır. Ayrıca hastanın yattığı odanın hava örneklerinde *Fusarium* cinsi küf mantarı araştırılmıştır. Antifungal tedavi uygulanmayan hasta taburcu olmuştur.

Hasta 17: Akciğer kanseri olan 52 yaşındaki erkek hastanın Patoloji Laboratuvarına gönderilen bronkoalveoler lavaj (BAL) örneğinde Aspergilloma hifleri görülmesi üzerine, Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği tarafından gönderilen balgam örneğine yapılan kültür sonucunda *A. flavus* üremiştir. Enfeksiyon Hastalıkları bölümü

tarafından yapılan değerlendirme sonucu hastaya İPA tanısı konulmuştur. Vorikonazol tedavisi başlanan hasta 14 gün sonra eksitus olmuştur.

Hasta 18: Kulak tıkanıklığına bağlı işitme kaybı olan 52 yaşındaki kadın hasta KBB Kliniği'nce değerlendirilmiştir. Hastadan bir gün arayla gönderilen dış kulak yolu sürüntü kültürlerinde *A. niger* üremiştir. Hastaya lokal tedavi olarak asit borik uygulanmıştır.

Hasta 19: Bir yıl önce Konya'da sol göz üzerinde beyinde apse nedeniyle opere edilmiş olan 25 yaşındaki kadın hasta burnunun sol tarafında bulunan kitleye bağlı burun tıkanıklığı nedeniyle KBB Kliniği'ne başvurmuştur. Hastanede 39 gün süreyle yatan hastadan yatışının ikinci, beşinci, sekizinci, onyedinci ve yirmiyedinci günlerinde alınan beş burun sürüntü kültüründe *A. terreus* üremiştir. Herhangi bir antifungal tedavi uygulanmayan hasta taburcu olmuştur.

Hasta 20: Altmış dokuz yaşındaki kadın hasta Göğüs Cerrahisi Kliniği tarafından akciğerinde kitle nedeni ile değerlendirmeye alınmıştır. Hastanın patoloji sonucu fungusla uyumlu olarak rapor edilmiştir. Hastadan gönderilen iki farklı balgam kültüründe *A. niger* üremiştir. Toraks tomografisi de uyumlu bulununca hastaya İPA tanısı konularak amfoterisin B ile antifungal tedaviye alınmıştır. Ancak alerji gelişmesi üzerine iki ay boyunca vorikonazol tedavisi uygulanmıştır. Hasta taburcu olmuştur.

Hasta 21: Akut Lenfoid Lösemi (ALL) ve DM tanıları ile Hematoloji Kliniği tarafından takip edilen 40 yaşındaki erkek hastanın özgeçmişinde geçirilmiş Bypass ameliyatı da bulunmaktaymış. Çekilen toraks bilgisayarlı tomografi sonucunda aspergilloz ile uyumlu bölgeler olduğu rapor edilmiştir. İki gün arayla gönderilen iki balgam kültüründe *A. flavus* üremiştir. İPA tanısı konularak vorikonazol tedavisi uygulanan hasta taburcu olmuştur.

Hasta 22: Sol elini kıyma makinesine kaptıran 50 yaşındaki kadın hasta Plastik Cerrahi Kliniği tarafından opere edilmiştir. Bir süre sonra sol el parmak ucundaki yara yerinde apse oluşmuştur. Bir gün arayla gönderilen iki apse kültüründe *A. terreus* türü

filamentöz mantar üremiştir. Hastaya antifungal tedavi uygulanmayan hasta taburcu olmuştur.

Hasta 23: Çocuk Hastalıkları Kliniği tarafından aplastik anemi tanısı konulan yedi aylık erkek bebekte solunum sıkıntısı gelişmiştir. Yapılan klinik değerlendirmede *Mucor* infeksiyonu olabileceği düşünülmüştür. Yoğun bakıma yatırılan hastanın damağında bulunan apse örneğinden *Mucor* spp. izole edilmiştir. Vorikonazol ve amfoterisin B antifungal tedavisi uygulanan hasta yatışının 34. gününde eksitus olmuştur.

Hasta 24: Yaklaşık yedi yıldır DM tanısı ile Endokrinoloji Kliniği tarafından takip edilen 48 yaşındaki erkek hastadan gönderilen iki balgam örneğinin birinde *A. flavus* üremiştir. Antifungal tedavi uygulanmayan hasta taburcu edilmiştir.

Hasta 25: Göğüs Hastalıkları Kliniği tarafından takip edilen bronşektazili 54 yaşındaki erkek hasta hemoptizi şikayetiyle yatırılmıştır. Hastadan gönderilen tek balgam örneğinde *A. flavus* üremiştir. Hastaya antifungal tedavi uygulanmamıştır. Hasta taburcu edilmiştir.

Hasta 26: Daha önce başka bir merkez tarafından penil protez takılan 39 yaşındaki erkek hastada protezin takıldığı bölgede oluşan yara nedeniyle Üroloji servisine yatırılmıştır. Bu bölgeden alınan örneğin kültüründe *Auerobasidium* spp. üremiştir. Antifungal tedavi uygulanmayan hasta taburcu edilmiştir.

Hasta 27: Hematoloji Kliniği tarafından takip edilen Akut Myeloid Lösemili (AML) ve KOAH'lı 57 yaşındaki erkek hasta İPA tanısı ile yatırılmış, hastanın iki farklı zamanda gönderilen balgam örneklerinden *A. flavus* izole edilmiştir. Amfoterisin B tedavisi uygulanan hasta tedavinin altıncı gününde eksitus olmuştur.

Hasta 28: Sol kulağında akıntı şikayetiyle KBB Kliniği'ne başvuran 69 yaşındaki kadın hastadan alınan dış kulak yolu akıntı kültüründe *A. niger* üremiştir. Hastaya lokal tedavi olarak asit borik uygulanmıştır.

Hasta 29: Sol kulak otomikozu nedeniyle 49 yaşındaki erkek hastadan gönderilen dış kulak yolu akıntı örneğinde Gram boyama ile mantar hifleri görülmüş ve *A. niger* üremiştir. Hastaya lokal tedavi olarak asit borik uygulanmıştır.

Hasta 30: Göğüs Hastalıkları Kliniği tarafından 10 yıldır KOAH nedeniyle takip edilen 76 yaşındaki erkek hasta nefes darlığı şikayetiyle servise yatırılmıştır. Hastadan iki farklı zamanda alınan balgam örneği kültüründe *A. fumigatus* üretilmiştir. Antifungal tedavi uygulanmayan hasta taburcu edilmiştir

Hasta 31: Altı yıldır serebrovasküler hastalığı bulunan 71 yaşındaki erkek hastaya Nefroloji Kliniği'nce ABY ön tanısı konularak hastaneye yatırılmıştır. Hastanın sağ ayak başparmağında nekrotik yara gelişmiştir. Yara yerinden alınan örnekte *A. niger* üremiştir. Antifungal tedavi uygulanmayan hasta taburcu edilmiştir.

Hasta 32: Sol el ikinci parmağında kesik bulunan 26 yaşındaki erkek hasta Plastik Cerrahi Kliniği tarafından hastaneye yatırılmıştır. Kesi yerinden alınan örneğin kültüründe *A. terreus* üremiştir. Antifungal tedavi uygulanmayan hasta taburcu edilmiştir.

Çizelge 4.1. Filamentöz mantar üreyen hastaların verileri

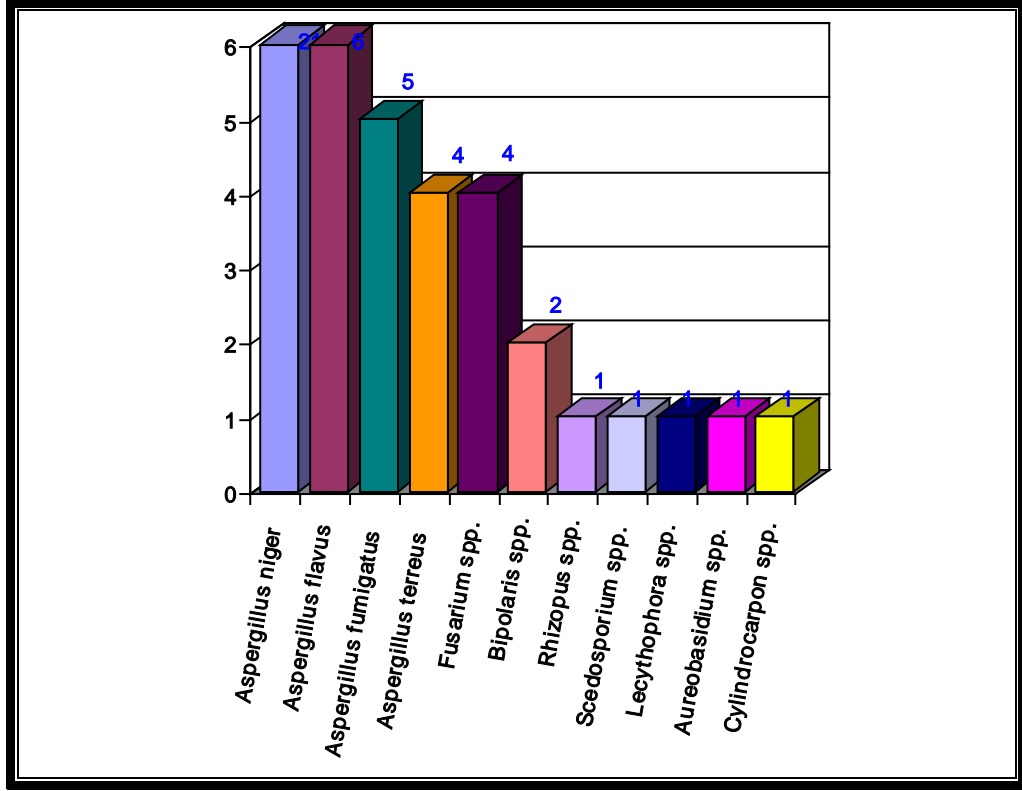
Hasta	Yaş	İzolasyon tarihi	Klinik örnek	Üreme / Kültür	Servis	Klasik yöntem	DNA dizi analizi	BLAST no	Şekil no /sayfa
1 *	12	23.10.07	Periton diyaliz sıvısı	13/19	Pediyatrik Nefroloji	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	GQ376117.1	2.11/19
2 *	52	19.11.07	Konjunktiva sürüntüsü	2/4	Göz Polikliniği	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium solani</i>	AFI30141.1	
3	67	13.06.08	Yara	3/4	Dermatoloji	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Cylindrocarpum lichenicola</i>	AFI33843.1	
4	54	12.06.08	Doku	1/1	Plastik Cerrahi	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium brachygybbosum</i>	HM130707.1	
5 *	64	17.06.08	Apse	1/1	Göz Polikliniği	<i>Scedosporium</i> spp.	<i>Scedosporium aptiospermum</i>	FJ345358.1	2.16/24
6	21	10.06.08	Balgam	1/2	Nefroloji	<i>Bipolaris</i> spp.	<i>Bipolaris spicifera</i>	GU596488.1	2.18/25
7	57	28.08.08	Balgam	1/1	Göğüs Hast	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	EF625687.1	2.7/216
8	10 ay	18.09.08	BOS	1/2	Pediyatrik Cerrahi	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	GU594752.1	2.3/14
9	8	18.09.08	Periton diyaliz sıvısı	2/4	Pediyatri	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	GU594738.1	2.5/15
10	16	19.04.08	Periton diyaliz sıvısı	1/15	Pediyatrik Nefroloji	<i>Bipolaris</i> spp.	<i>Bipolaris spicifera</i>	GU183125.1	
11	48	08.07.08	Balgam	1/1	Göğüs Hast	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	FN811183.1	2.9/17
12 *	59	21.06.09	Periton diyaliz sıvısı	6/6	Nefroloji	<i>Acremonium</i> spp.	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	AB231012.1	2.22/28
13	67	07.05.09	Balgam	2/3	Hematoloji	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	GU594756.1	
14	77	22.05.09	Balgam	4/5	Nefroloji	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	GU594749.1	
15	53	25.05.09	Balgam	5/6	Göğüs Hast	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	GU594757.1	
16	60	15.01.09	Kan	1/8	Nefroloji	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Fusarium equiseti</i>	HM062514.1	
17	52	04.10.09	Balgam	1/1	Enfeksiyon Hast.	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	DQ198161.1	
18	52	02.10.09	Dış kulak yolu akıntısı	2/3	KBB	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	EF625687.1	
19	25	16.10.09	Burun sürüntüsü	5/7	KBB	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	EU645689.1	
20	69	20.10.09	Balgam	2/3	Göğüs Cer.	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	EF625687.1	
21	40	22.10.09	Balgam	2/2	Hematoloji	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	DQ198161.1	
22	50	26.10.09	Apse	2/2	Plastik Cerrahi	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	GU594778.1	
23	7 ay	03.08.09	Apse	1/2	Pediyatri	<i>Mucor</i> spp.	<i>Rhizopus oryzae</i>	GU594768.1	2.14/22
24	48	01.12.09	Balgam	1/2	Endokrinoloji	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	GU594740.1	
25	54	14.12.09	Balgam	1/1	Göğüs Hast	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	DQ198161.1	
26	39	21.12.09	Yara	1/1	Üroloji	<i>Aureobasidium</i> spp.	<i>Aureobasidium pullulans</i>	AFI21283.1	2.20/26
27	57	21.12.09	Balgam	2/3	Hematoloji	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	DQ198161.1	
28	69	23.12.09	Dış kulak yolu akıntısı	1/2	KBB	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	FJ537110.1	
29	49	28.12.09	Dış kulak yolu akıntısı	1/1	KBB	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	EF625687.1	
30	76	18.12.09	Balgam	2/2	Göğüs Hast	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	GU594757.1	
31	71	30.12.09	Ayak başparmakta yara	1/1	Nefroloji	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	EF625687.1	
32	26	11.01.10	El 2. parmak yarası	1/2	Plastik Cerrahi	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	EF592171.1	

* Projelendirme tarihinden önce izole edilen ve çalışma kapsamına eklenen filamentöz suşlar

Çizelge 4-2. Filamentöz mantar üreyen hastaların altta yatan hastalıkları ve tedavi durumları

Hasta	Altta yatan hastalık	Tedavi
1	KBY + Infantil nefropatik sistinozis	Amfoterisin B + Flukonazol
2	DM + Diyabetik Retinopati	Amfoterisin B
3	Alerjik Kontakt Dermatit +aterosklerotik kalp hast.	Terbinafin
4	DM + KBY	?
5	Yabancı cisim batması	?
6	KBY + Solunum yetmezliği	?
7	KOAH	?
8	Meningoel Aspergiloz + Boyunda kitle	Amfoterisin B + Vorikonazol
9	KBY + Dilate kardiyomyopati	?
10	KBY + Reflu Nefropati	Amfoterisin B
11	Kronik Astım	?
12	KBY + DM + nefropati + retinopati	Amfoterisin B+ Flukonazol
13	RA+Bronşektazi+pansitopeni + Aplastik anemi + İPA	Vorikonazol
14	İPA + TBC+ ABY + Solunum yetmezliği + SVH	Vorikonazol
15	Bronşektazi + hemoptizi + nefes darlığı+ Nüks Tbc	?
16	Rektum CA	?
17	AC CA + Solunum yetmezliği + İPA	Amfoterisin B + Vorikonazol
18	Kulakta tıkanıklık + iştme kaybı+sıkışmış serümen	Lokal asit borik
19	Sol burunda tıktıleye bağlı burun tıkanıklığı	?
20	Akeğerde kitle +İPA	Amfoterisin B + Vorikonazol
21	ALL + DM + Bypass+İPA+aterosklerotik kalp hast	Vorikonazol
22	Ampute sol el parmak ucunda yara	?
23	Aplastik anemi + pansitopeni + solunum sıkıntısı + Mucor inf?	Amfoterisin B + Vorikonazol
24	DM	?
25	Bronşektazi + hemoptizi	?
26	Penil protez implantasyonu	?
27	Solunum yetmezliği+AML+İPA	Amfoterisin B
28	Sol kulak akıntısı+otitis media	Lokal asit borik
29	Sol kulak otomikoz+otitis media	Lokal asit borik
30	KOAH	?
31	ABY + SVH + hemipleji	?
32	Sol el 2. parmak kesisi	?

ABY:Akut böbrek yetmezliği, **KBY:** Kronik böbrek yetmezliği, **KOAH:**Kronik obstrüktif akciğer hastalığı **DM:**Diabetes mellitus
İPA:İnvaziv pulmoner aspergiloz, **TBC:**Tüberküloz, **SVH:**Serebrovasküler hastalık, **ALL:**Akut lenfoid lösemi, **AML:**Akut myeloid lösemi, **RA:** Romatoid artirit, **CA:** Kanser

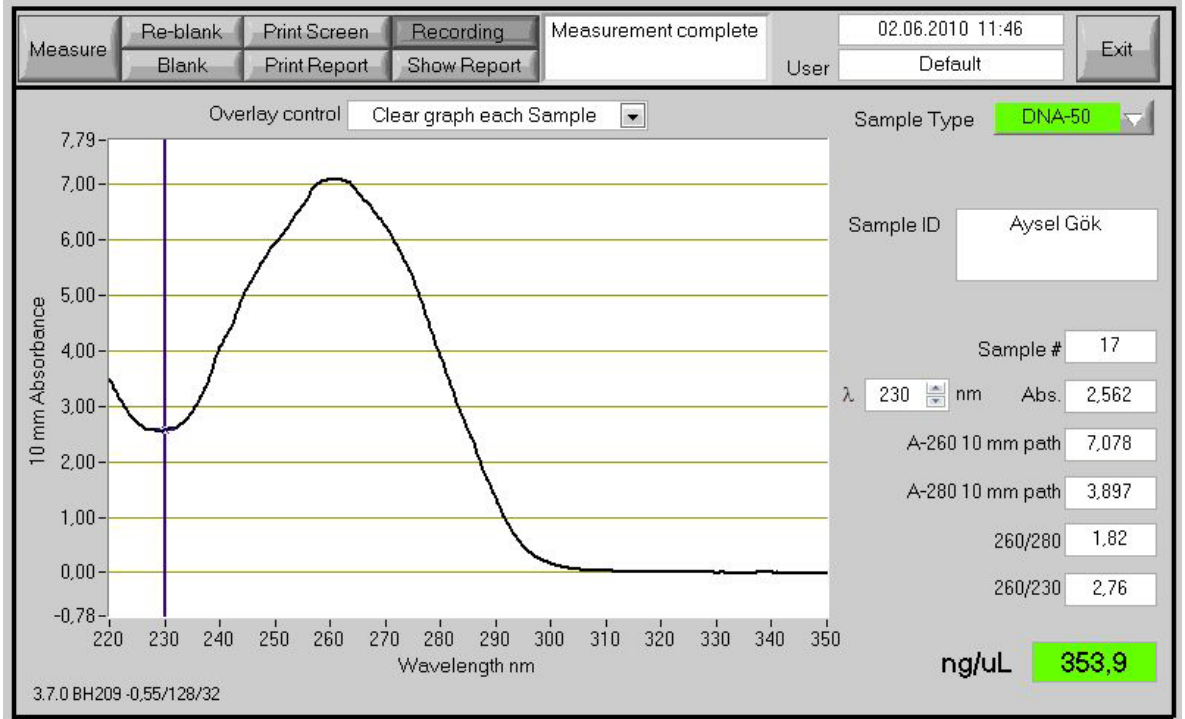
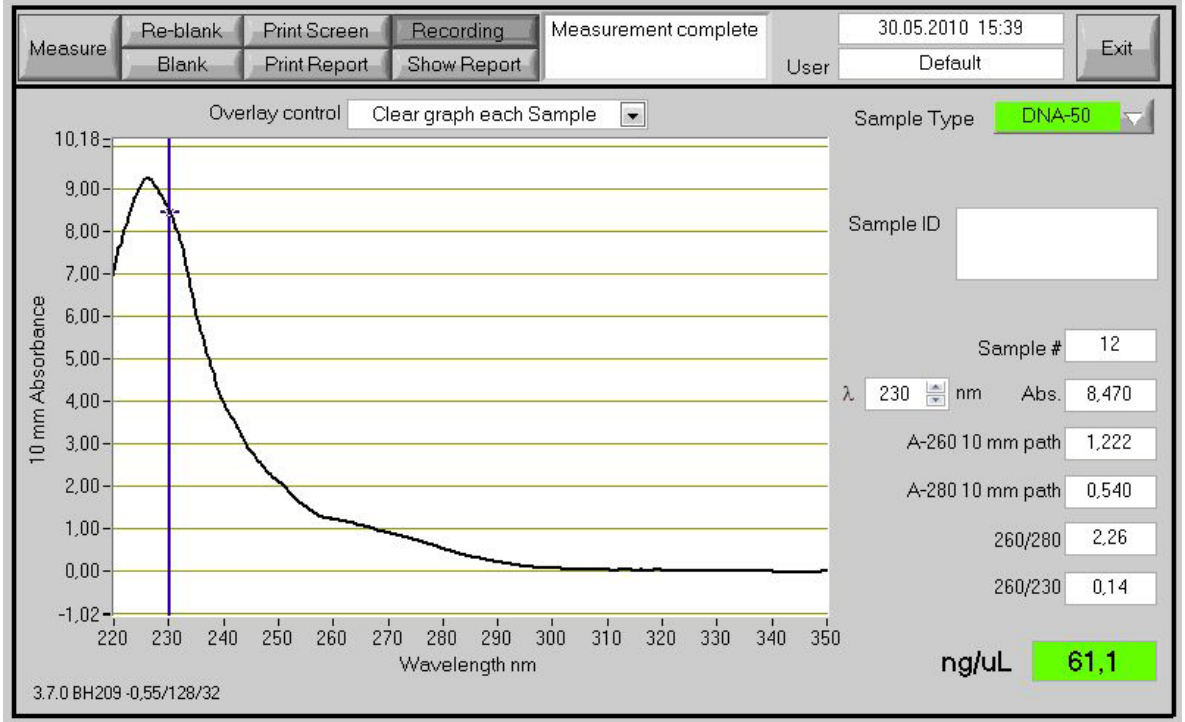


Şekil 4.1. DNA dizi analiz sonuçlarına göre suşlarının dağılımı

4.3.Kültürde Üretilen Suşlardan Elde Edilen DNA'ların Ölçüm Sonuçları

Saklanan suşlar SDA/PDA'da üretildikten sonra elde edilen PZR öncesi ve PZR sonrası DNA'lar Nanodrop ND 1000 UV-Vis Spektrofotometre (NanoDrop Technologies, Houston, TX, ABD) cihazı ile saflık ve miktarlarının belirlenmesi amacıyla ölçülmüştür. Bu işlemler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. NanoDrop ND-1000 DNA, RNA, protein ve boyanın absorbanısını ölçmek için fullspektrum bir spektrofotometredir. Cihaz 220-750 nm aralığındaki bir spektrumu otomatik olarak ölçebilmektedir. Kapiller veya küvet olmadan 1,5 µl hacimdeki örneği ölçebilmektedir. DNA konsantrasyonu ve optik dansite (OD) oranı 260/280 nm'de DNA'nın saflığını değerlendirerek aynı zamanda hesaplayabilmektedir.

Ölçüm işleminde PZR sonrası DNA miktarlarının yükseldiği görülmüştür. Bu örnekler DNA dizi analizinde kullanılmıştır.



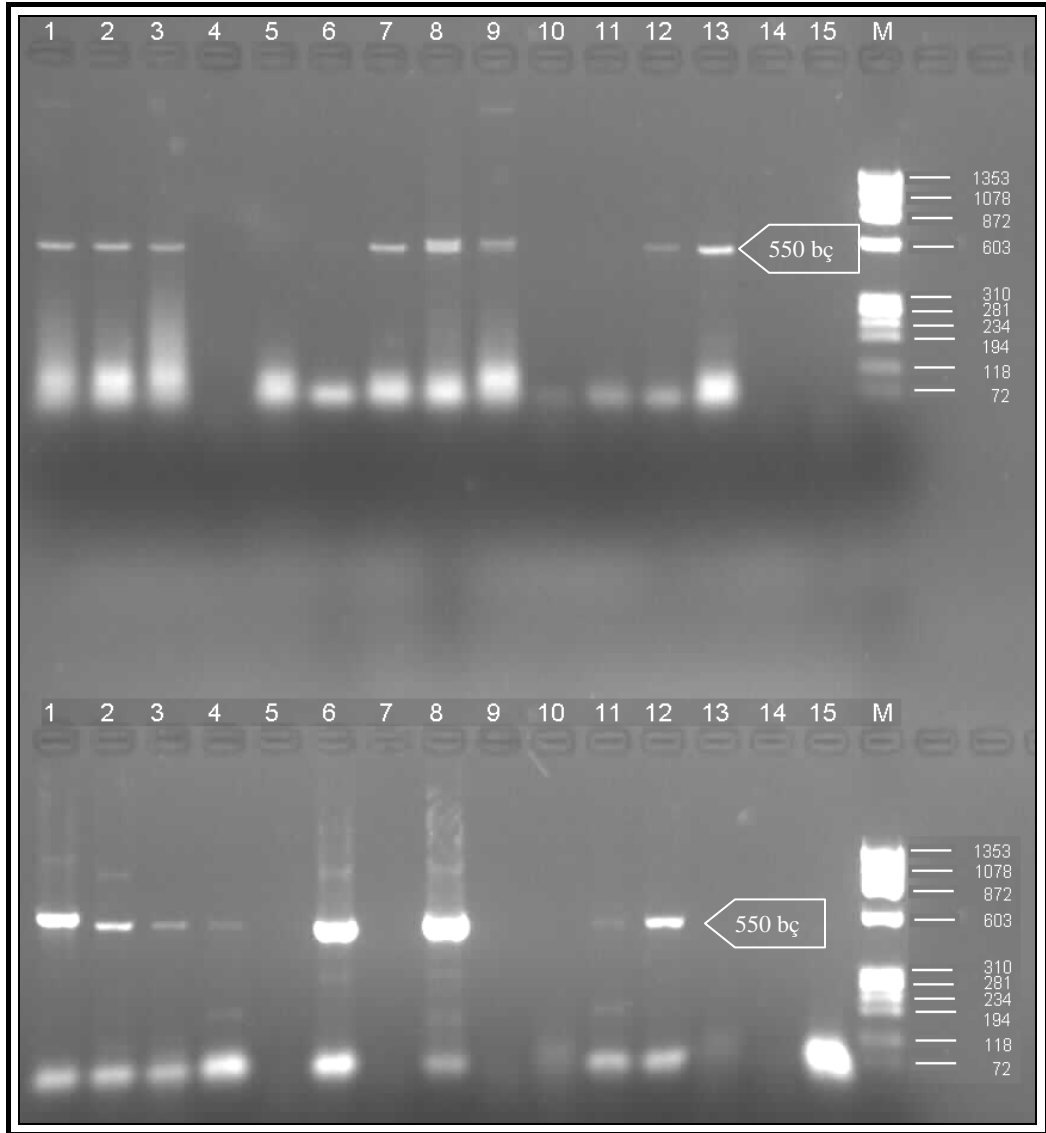
Şekil 4.2. PZR öncesi ve sonrası bir suşa ait DNA konsantrasyonu ölçüm rapor örneği

Çizelge 4.3. Suşların PZR öncesi ve sonrası DNA konsantrasyonu ölçüm sonuçları (ng/µl)

Hasta	Üreyen mikroorganizma	PZR öncesi DNA ölçüm sonucu (ng/µl)	PZR sonrası DNA ölçüm sonucu (ng/µl)
1	<i>Fusarium oxysporum</i>	67,6	332,4
2	<i>Fusarium solani</i>	70,3	359,0
3	<i>Fusarium spp.</i>	51,1	371,4
4	<i>Fusarium spp.</i>	45,4	319,8
5	<i>Scedosporium spp.</i>	86,7	281,5
6	<i>Bipolaris spp.</i>	65,8	164,6
7	<i>Aspergillus niger</i>	8,7	370,8
8	<i>Aspergillus fumigatus</i>	10,9	170,8
9	<i>Aspergillus flavus</i>	119,3	173,2
10	<i>Bipolaris spp.</i>	61,1	319,6
11	<i>Aspergillus terreus</i>	41,3	302,1
12	<i>Lecythophora spp.</i>	177,9	218,2
13	<i>Aspergillus fumigatus</i>	25,6	304,0
14	<i>Aspergillus fumigatus</i>	27,5	322,4
15	<i>Aspergillus fumigatus</i>	11,6	326,1
16	<i>Fusarium spp.</i>	47,7	172,0
17	<i>Aspergillus flavus</i>	26,9	339,8
18	<i>Aspergillus niger</i>	28,6	316,9
19	<i>Aspergillus terreus</i>	29,4	331,0
20	<i>Aspergillus niger</i>	18,8	353,9
21	<i>Aspergillus flavus</i>	8,9	326,3
22	<i>Aspergillus terreus</i>	57,1	356,6
23	<i>Rhizopus spp.</i>	186,8	301,2
24	<i>Aspergillus flavus</i>	34,4	214,2
25	<i>Aspergillus flavus</i>	25,1	203,0
26	<i>Aureobasidium spp.</i>	25,7	245,6
27	<i>Aspergillus flavus</i>	43,3	339,0
28	<i>Aspergillus niger</i>	24,3	309,4
29	<i>Aspergillus niger</i>	16,7	150,8
30	<i>Aspergillus fumigatus</i>	66,0	233,8
31	<i>Aspergillus niger</i>	20,2	334,7
32	<i>Aspergillus terreus</i>	57,1	203,4
RSHMB 04005	<i>Aspergillus fumigatus</i>	28,3	309,5
RSHMB 04017	<i>Aspergillus niger</i>	22,7	300,8

4.4. PZR Sonuçları

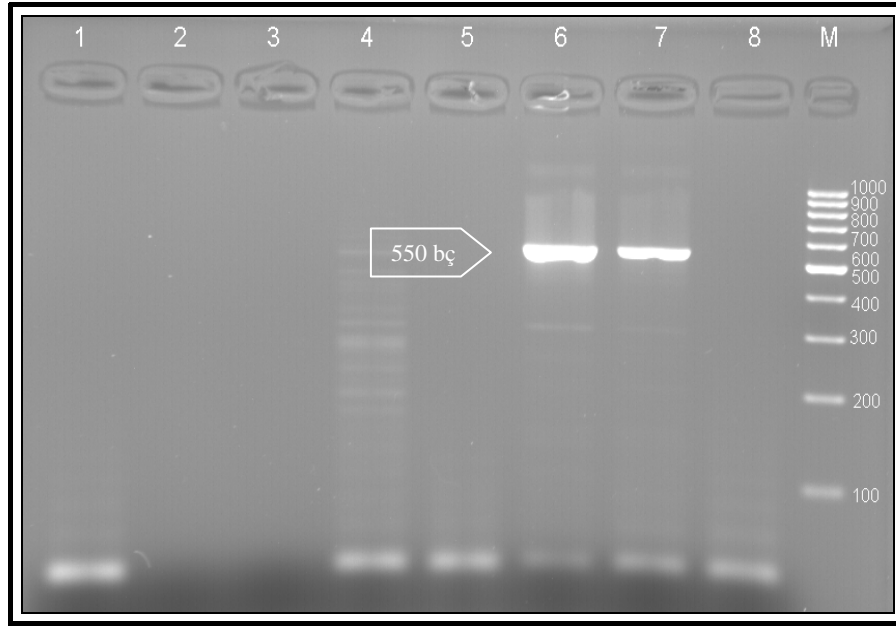
Mantarlar için ITS-1 ve ITS-4 üniversal primerleri kullanılarak yapılan PZR sonrası agaroz jelde yapılan elektroforez görüntüleri şekil 4.3'te verilmiştir. Örneklere ait jel görüntüsünde yaklaşık 500-550 baz çift (bç)'lik bölgede bant görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Bant gözlenmeyen örneklerden tekrar DNA ekstraksiyonu yapılarak PZR yapılmıştır.



Şekil 4.3. Suşların PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü, Üst sıra kolon 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 PZR pozitif örnekler, kolon 4, 5, 10, 14 PZR negatif örnekler, Alt sıra kolon 1, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 12 PZR pozitif örnekler, kolon 5, 7, 9, 10, 13, 14 PZR negatif örnekler, Üst-Alt kolon 15 Negatif kontrol Üst-Alt sıra kolon 16 (M); moleküler ağırlık standartı (Φ X174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, Fermentas),

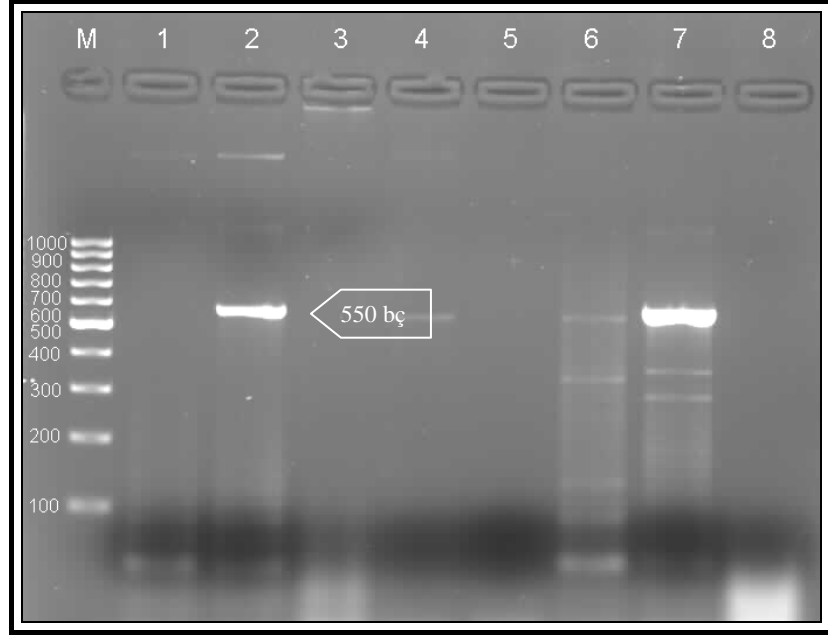
4.5.DNA İzolasyonu için Yapılan Diğer Denemelerin Sonuçları

Dondurma-kaynatma yöntemi ile yapılan DNA izolasyonu sonrasında amplifikasyon ve agaroz jel elektroforezi sonucuna göre değerlendirilmiştir. *Fusarium* cinsi küf mantarı izole edilen örneklerde beklenen bant gözlenirken diğer cinslerde bant gözlenmemiştir. Deneyin tekrarında da sonuç değişmemiştir.



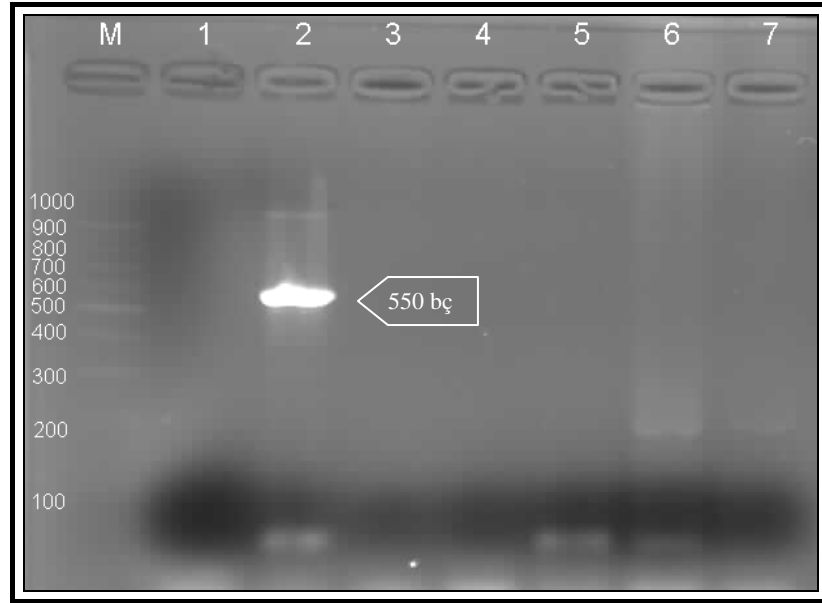
Şekil 4.4. Dondurma-kaynatma yöntemi ile agaroz jel elektroforez görüntüsü (1-*A. niger*, 2-*A.flavus*, 3-*A.fumigatus*, 4-*Rhizopus*, 5-*A.terreus*, 6-*Fusarium*, 7- *Fusarium*, 8-Negatif kontrol, Marker)

Sıvı nitrojen yönteminde agaroz jel elektroforezi sonucuna göre *Fusarium*, *Rhizopus* ve *Scedosporium* cinsi küf mantarlarının bulunduğu örneklerde bant gözlenirken özellikle *Aspergillus* cinsi küf mantarlarının hiç bir örneğinde bant gözlenmemiştir. Deney tekrarında sonuç değişmemiştir.



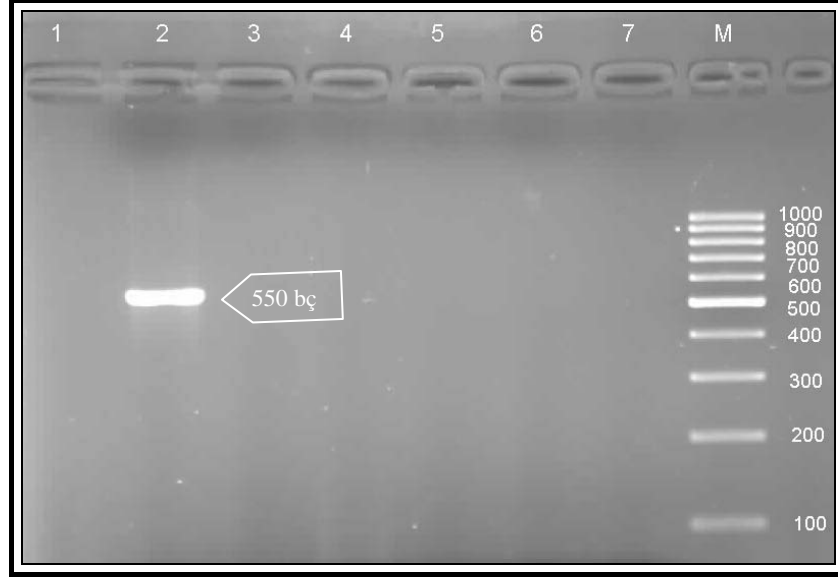
Şekil 4.5. Sıvı nitrojen yöntemi ile agaroz jel elektroforez görüntüsü (Marker, 1-*A. niger*, 2-*Fusarium*, 3-*A. fumigatus*, 4-*Rhizopus*, 5-*A. terreus*, 6- *A. flavus*, 7-*Scedosporium*, 8-Negatif kontrol)

Mirhendi'nin uyguladığı yönteme göre *Aspergillus*'lardan sonuç alınmazken *Fusarium* örneğinde pozitiflik saptanmıştır.



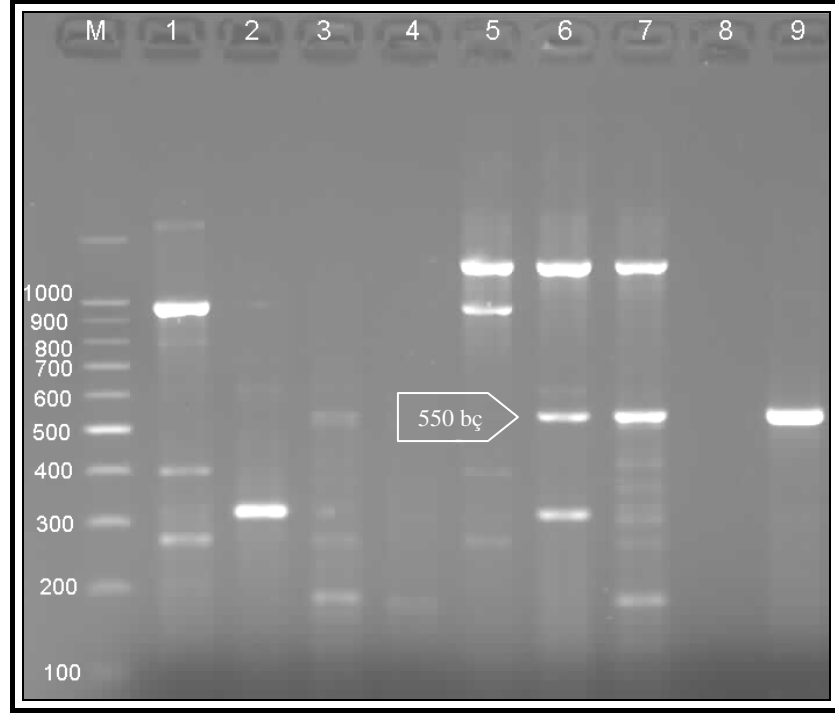
Şekil 4.6. Mirhendi'nin yöntemi ile agaroz jel elektroforez görüntüsü (Marker, 1-*A. niger*, 2-*Fusarium*, 3-*A. fumigatus*, 4- *A. niger*, 5-*A. terreus*, 6- *A. flavus*, 7-Negatif kontrol)

Fuji Film Hazır kitle DNA ekstraksiyon yapıp PZR sonrası değerlendirilmede yine *Aspergillus* cinsi küflerde bant gözlenmezken *Scedosporium* cinsi küf mantarında bant gözlenmiştir.



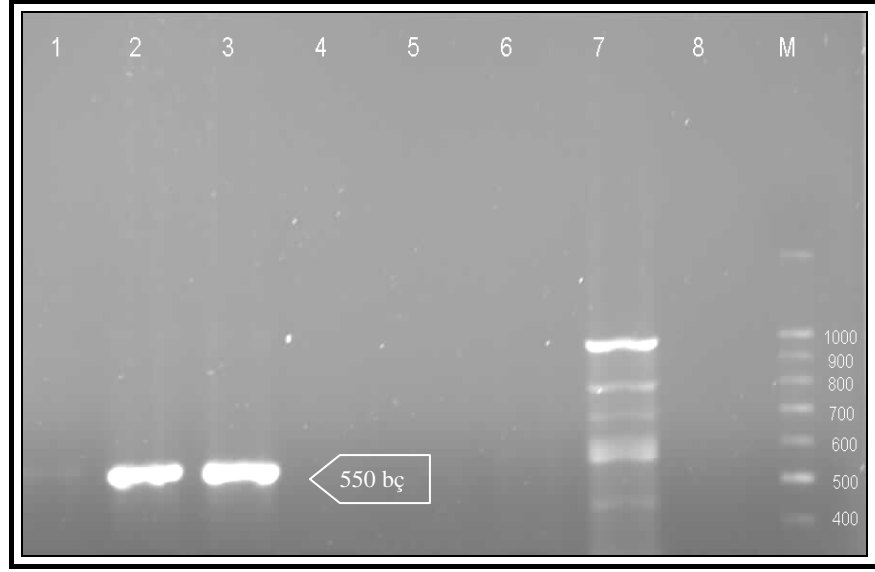
Şekil 4.7. Fuji Film DNA izolasyon kitle ile agaroz jel elektroforez görüntüsü (1-*A. niger*, 2-*Scedosporium*3-*A.fumigatus*, 4- *A. niger*, 5-*A.terreus*, 6- *A.flavus*, 7-Negatif kontrol, Marker)

MagNa Pure yöntemiyle yapılan DNA izolasyon sonrası PZR işlemi yapılarak agaroz jel elektroforezi uygulandı. Sonuçlar değerlendirildiğinde örneklerde non-spesifik birçok bandın çıktığı görülmüştür.



Şekil 4.8. MagNa Pure yöntemi ile agaroz jel elektroforez görüntüsü (Marker, 1-*Rhizopus*, 2- *Aureobasidium*,3-*A.fumigatus*, 4- *A. niger*, 5-*A.terreus*, 6- *A.flavus*, 7-*Scedosporium* 8-Negatif kontrol, 9-*Fusarium*)

Qiagen Mini hazır kit ekstraksiyonu ile yapılan PZR sonuçları gözleendiğinde *Aspergillus* cinsi küf mantarlarından alınan örneklerde bir *A. fumigatus* ve bir de *A. flavus* suşunun PZR sonucunda pozitif bant görülürken diğer *Aspergillus* türlerinde pozitiflik gözlenmemiştir. Diğer bütün suşların bu hazır kit ile DNA izolasyonları yapılmıştır. Ancak yapılan sonraki Qiagen denemelerinde pozitif bant gözlenmezken dört örnekte nonspesifik bantlar gözlenmiştir. Qiagen kiti ile farklı denemeler yapılmıştır ancak *Aspergillus*'lar için sağlıklı bir sonuç alınamamıştır.



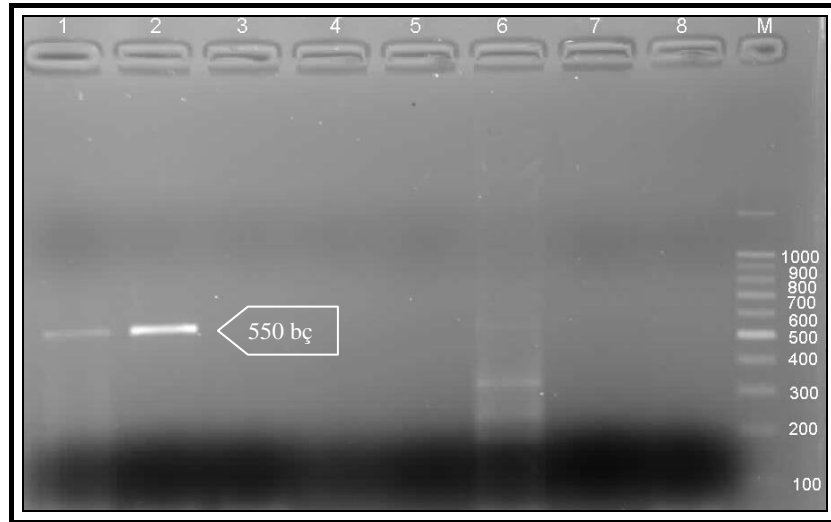
Şekil 4.9. Qiagen DNA izolasyon kitiyle agaroz jel elektroforez görüntüsü (1-*A. niger*, 2-*A.fumigatus*, 3-*A.flavus*, 4- *A. niger*, 5-*A.terreus*, 6- *A.terreus*,7-*A.flavus*, 8-Negatif kontrol, Marker)

Modifiye yöntemin değerlendirme sonucunda sadece bir örnekte zayıf bir bant gözlenirken diğer örnekler negatif olarak belirlenmiştir. DNA konsantrasyonlarının yüksek olabileceği düşünülerek DNA örnekleri 1/2, 1/5 ve 1/10 oranında dilüe edilmiştir. PZR sonrası jelde sonuçların aynı çıktığı görülünce PZR reaksiyon karışımında ve amplifikasyon şartlarında değişikliklere gidilmiştir. Primer miktarları yarı yarıya azaltılmış, amplifikasyon şartları tekrar düzenlenmiştir: annealing sıcaklığı 58°C'den 55°C'ye, siklus sayısı 40'tan 35'e düşürülmüştür. Ancak beklenen sonuçlar elde edilememiştir.



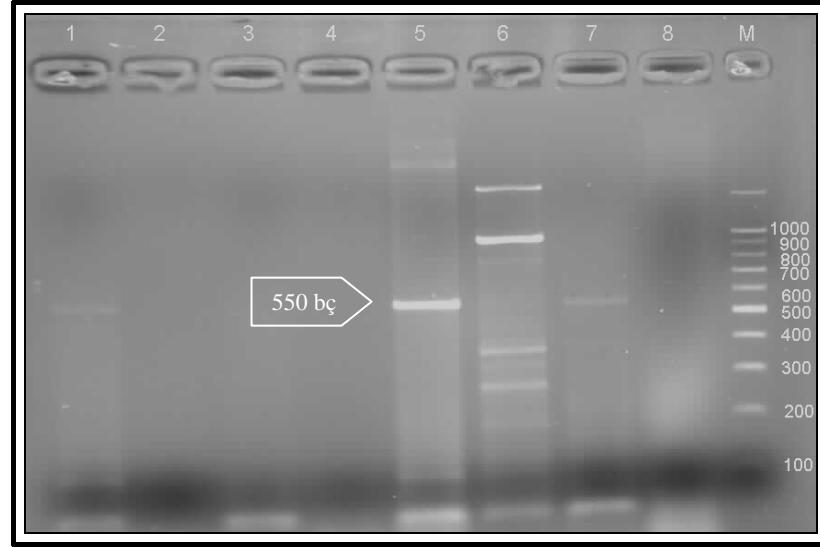
Şekil 4.10. Modifiye yöntemi ile agaroz jel elektroforez görüntüsü (1-*A. fumigatus*, 2-*A. niger*, 3-*A. flavus*, 4- *A. niger*, 5-*A. terreus*, 6- *A. terreus*,7-*A. flavus*, 8-*Fusarium*, Marker)

Beş kez doundurup-kaynatma yönteminde birer *A. fumigatus* ve *A. flavus* pozitifliği tespit edilirken diğer örnekler negatif bulunmuştur. Deneyin tekrarında benzer sonuçlar alınmıştır.



Şekil 4.11. Beş kez doundurup-kaynatma yöntemi ile agaroz jel elektroforez görüntüsü (1-*A. flavus*, 2-*A. fumigatus*, 3-*A. niger*, 4- *A. terreus*, 5-*A. terreus*, 6- *A. niger*,7-*A. fumigatus*, 8- *A. flavus*, Marker)

Homojenizatör ekstraksiyon denemesinde bir hastaya ait olan *A. fumigatus* suşının iki farklı kuyucukta yürütülen örneklerinde ve bir *Fusarium* örneğinde pozitif bant zayıf gözlenirken diğer örneklerde pozitiflik tespit edilememiştir.



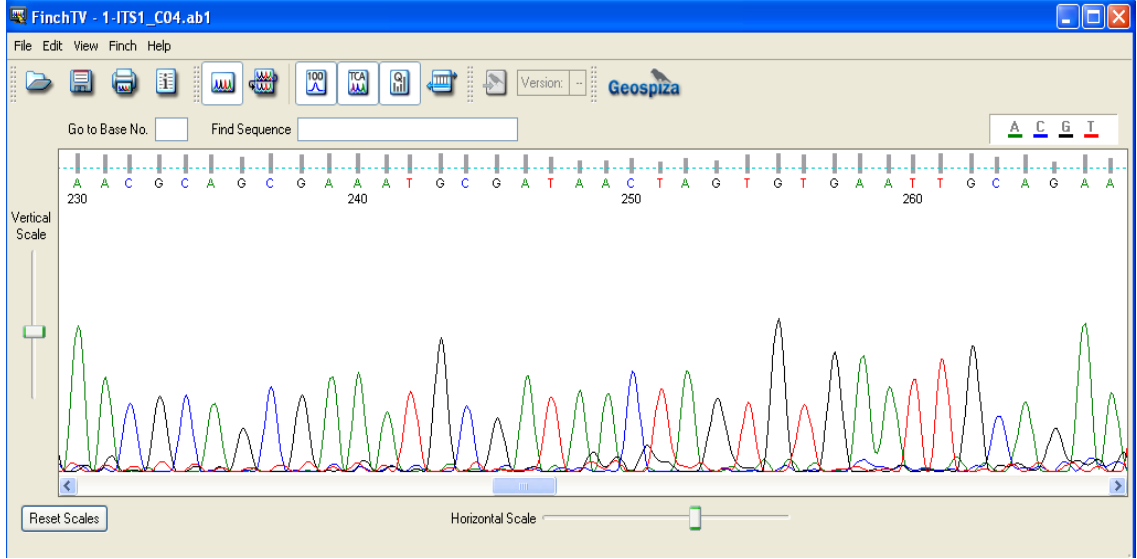
Şekil 4.12. Homojenizatör yöntemi ile agaroz jel elektroforez görüntüsü (1-*A. fumigatus*, 2-*A. terreus* 3-*A. niger*, 4- *A. flavus*, 5-*Fusarium*, 6- *A. niger*,7-*A.fumigatus*, 8- *A. flavus*, Marker)

4.6. DNA Dizi Analizi Sonuçları

Suşların moleküler identifikasyonu ITS bölgesinde PZR bazlı DNA dizi analizi ile belirlenmiştir. PZR ürünleri ve forward primerler DNA dizi analizi için başka bir özel laboatuvara gönderilmiştir. DNA dizi analizi, ABI 3100 Genetic Analyzer cihazıyla BigDye Cycle sequencing kit V.3.1 kullanılarak yapılmıştır. PCR temizleme Nucleospin Extract Kit, Macherey-Nagel kiti ve Sekans temizleme yöntemi olarak NaOAC-EDTA-EtOH purifikasyon kullanılmıştır. Buradan alınan sonuçlar Finch Tv bilgisayar programı kullanılarak nükleotid dizileri şekil 4.13'te gösterildiği gibi nükleotid dizileri farklı renklerde görünür hale getirilmiştir.

Bu DNA dizilerine ait analizi verileri National Center for Biotechnology Information (Bethesda, Md., USA) BLAST sistemi (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) kullanılarak internet ortamında analiz edilmiştir.

Suşların maksimum identifikasyon yzdelelerinin %92 ile %100 arasında değiştiği belirlenmiştir.



şekil 4.13. DNA dizi analizi sonrasında Finch TV programı ile bir suşa ait farklı renklerdeki nükleotid dizilerinin gösterilmesi

Çizelge 4.4. Klasik identifikasyon ve DNA dizi analiz sonuçlarının karşılaştırılması

Hasta	Klasik identifikasyon	DNA Dizi analizi	Max id %
1	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	99
2	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Fusarium solani</i>	100
3	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Cylindrocarpon lichenicola</i>	99
4	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	99
5	<i>Scedosporium spp.</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>	100
6	<i>Bipolaris spp.</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	100
7	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98
8	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	98
9	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	100
10	<i>Bipolaris spp.</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	100
11	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	96
12	<i>Acremonium spp.</i>	<i>Lecythophora hoffmannii</i>	100
13	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	96
14	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	98
15	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	98
16	<i>Fusarium spp.</i>	<i>Fusarium equiseti</i>	99
17	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	95
18	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98
19	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	98
20	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98
21	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	94
22	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	96
23	<i>Mucor spp.</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	100
24	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	100
25	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	96
26	<i>Aureobasidium spp.</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	99
27	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	99
28	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	92
29	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98
30	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	97
31	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	98
32	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	95
*STD1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100
*STD2	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	100

* Refik Saydam Hıfzısıhha Referans Laboratuvarı'ndan elde edilen standart suşlar

4.7.Disk Difüzyon Test Sonuçları

Hasta suşlarının vorikonazol ve flukonazol'e antifungal duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile çalışılmıştır. Hasta suşlarına ait farklı duyarlılık profilleri şekil 4.14'te verilmiştir.

Hastaların klinik örneklerinden izole edilen tüm filamentöz mantarların 24 ve 48 saatlik antifungal disk difüzyon test sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge. 4.5. Suşların E-test ve Disk difüzyon yöntemi ile antifungal duyarlılık sonuçları

Hasta	Üreyen suş	E-test sonuçları						DD (mm) 24/48 saat	
		(VOR)	(FLU)	(AMP B)	(CAS)	(POS)	(VORI µg)	(FLU 25 µg)	
1	<i>Fusarium oxysporum</i>	0,50/0,50	>256/>256	>32/>32	>32/>32	1/1,5	<6/<6	<6/<6	
2	<i>Fusarium solani</i>	>32/>32	>256/>256	>32/>32	>32/>32	1/1,5	<6/<6	<6/<6	
3	<i>Cyindrocarron lichenicola</i>	>32/>32	>256/>256	0,50/0,50	>32/>32	>32/>32	<6/<6	<6/<6	
4	<i>Fusarium brachygibbosum</i>	>32/>32	>256/>256	>32/>32	>32/>32	1/1,5	<6/<6	<6/<6	
5	<i>Scedosporium apiospermum</i>	0,25/0,38	6/6	>32/>32	>32/>32	0,94/0,125	25/23	22/20	
6	<i>Bipolaris spicifera</i>	0,125/0,125	>256/>256	0,064/0,064	>32/>32	0,50/0,50	17/16	<6/<6	
7	<i>Aspergillus niger</i>	0,19/0,25	>256/>256	0,19/0,38	0,19/0,25	0,25/0,38	20/15	<6/<6	
8	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,064/0,064	>256/>256	0,25/0,25	0,094/0,19	0,50/0,75	27/26	<6/<6	
9	<i>Aspergillus flavus</i>	0,25/0,50	>256/>256	1,5/2	0,064/0,064	0,25/0,25	21/17	<6/<6	
10	<i>Bipolaris spicifera</i>	0,125/0,125	>256/>256	0,064/0,064	>32/>32	0,50/0,50	17/16	<6/<6	
11	<i>Aspergillus terreus</i>	0,125/0,125	>256/>256	>32/>32	0,094/0,125	0,19/0,19	23/22	<6/<6	
12	<i>Lecytophora hoffmannii</i>	6/4	>256/>256	0,38/0,38	1,5/2	0,50/0,50	<6/<6	<6/<6	
13	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,38/0,38	>256/>256	0,094/0,19	0,094/0,094	0,125/0,125	18/14	<6/<6	
14	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,19/0,19	>256/>256	0,125/0,125	0,094/0,125	0,25/0,25	20/18	<6/<6	
15	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,25/0,25	>256/>256	0,25/0,50	0,125/0,125	0,19/0,25	20/18	<6/<6	
16	<i>Fusarium equiseti</i>	>32/>32	>256/>256	>32/>32	>32/>32	>32/>32	<6/<6	<6/<6	
17	<i>Aspergillus flavus</i>	0,50/0,50	>256/>256	0,50/1	0,125/0,19	0,25/0,38	20/14	<6/<6	
18	<i>Aspergillus niger</i>	0,125/0,19	>256/>256	0,25/0,50	0,012/0,012	0,25/0,38	19/13	<6/<6	
19	<i>Aspergillus terreus</i>	0,38/0,38	>256/>256	>32/>32	0,032/0,047	0,032/0,064	19/16	<6/<6	
20	<i>Aspergillus niger</i>	0,38/0,38	>256/>256	0,064/0,25	0,094/0,125	0,016/0,032	17/15	<6/<6	
21	<i>Aspergillus flavus</i>	0,19/0,19	>256/>256	1,5/3	0,032/0,047	0,094/0,25	24/22	<6/<6	
22	<i>Aspergillus terreus</i>	0,38/0,50	>256/>256	>32/>32	0,023/0,032	0,064/0,125	16/14	<6/<6	
23	<i>Rhizopus oryzae</i>	>32/>32	>256/>256	>32/>32	>32/>32	>32/>32	<6/<6	<6/<6	
24	<i>Aspergillus flavus</i>	0,19/0,25	>256/>256	0,50/1	0,125/0,19	0,19/0,19	22/19	<6/<6	
25	<i>Aspergillus flavus</i>	0,19/0,25	>256/>256	2/3	1/1,5	0,38/0,50	15/12	<6/<6	
26	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0,094/0,094	>256/>256	0,25/0,38	>32/>32	0,032/0,032	25/24	<6/<6	
27	<i>Aspergillus flavus</i>	0,19/0,25	>256/>256	1/1,5	0,032/0,032	0,19/0,25	22/21	<6/<6	
28	<i>Aspergillus niger</i>	0,38/0,38	>256/>256	0,25/0,38	0,006/0,012	0,25/0,25	17/16	<6/<6	
29	<i>Aspergillus niger</i>	0,125/0,25	>256/>256	0,125/0,25	0,016/0,032	0,19/0,38	23/17	<6/<6	
30	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,38/0,38	>256/>256	0,25/0,25	0,064/0,094	0,064/0,064	19/19	<6/<6	
31	<i>Aspergillus niger</i>	0,25/0,38	>256/>256	0,125/0,25	0,016/0,023	0,50/0,75	19/13	<6/<6	
32	<i>Aspergillus terreus</i>	0,38/0,38	>256/>256	>32/>32	0,032/0,064	0,25/0,38	15/10	<6/<6	
STD1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,25/0,25	>256/>256	0,125/0,25	0,094/0,125	0,125/0,125	20/19	<6/<6	
STD2	<i>Aspergillus niger</i>	0,125/0,19	>256/>256	0,125/0,19	0,016/0,023	0,25/0,25	20/18	<6/<6	



Şekil 4.14. Farklı hastaların disk difüzyon antifungal duyarlılık test görüntüleri
(Hasta 21: Vorikonazol: 24 mm, Flukonazol: <6 mm, ve Hasta 1: Vorikonazol: <6 mm Flukonazol: <6 mm)

4.8.E-Test sonuçları

Hastaların klinik örneklerinden izole ettiğimiz filamentöz mantarların 24 ve 48 saatlik E-test antifungal test sonuçları çizelge 4.5'te verilmiştir.

Hasta suşlarının beş farklı antifungal'e duyarlılıkları E-test yöntemi ile çalışılmıştır. Şekil 4.15'te hasta suşlarına ait farklı duyarlılık profilleri verilmiştir.



Şekil 4.15. Bir hastanın E-test antifungal duyarlılık görüntüleri
(Hasta 26: Vorikonazol MİK: 0.094 mg/L, Flukonazol MİK: >256 mg/L)

4.9.İstatistiksel Analiz

Klinik örneklerinde filamentöz mantar üreyen hastalar arasında yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre immün sistemi baskılanmış (altta yatan bir hastalığı olan) hastaların (%62,3), immün sistemi baskılayan bir hastalığı olmayan hastalara (%37,7) göre filamentöz mantar üremesi yönünden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Mini tab version 12.0 İki oran karşılaştırma testi, $p=0,046$).

Üreyen filamentöz mantarlar cins düzeyinde değerlendirildiğinde *Aspergillus*'lar anlamlı derecede diğer cinslerden yüksek bulunmuştur (SPSS 11.5.1 for Windows Kikare dağılıma uygunluk testi, $p=0,001$).

Aspergillus suşlarının türleri arasında görülme sıklığı açısından bir uyum gözlenirken, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (SPSS 11.5.1 for Windows Kikare testi $p=0,914$).

Üreme görülen cinsler ile gönderilen bölüm arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (SPSS 11.5.1 for Windows Kikare uyum testi).

Kültür pozitif örnekler arasında gözlemlenme sıklığına bakıldığında anlamlı bir fark bulunmuş olup, balgam örneklerinde daha fazla üreme gözlemlenmiştir (SPSS 11.5.1 for Windows Kikare testi $p=0,001$).

İncelemeye alınan örneklerin gönderildiği bölümlere göre dağılımına bakıldığında Pediatri Bölümü'nden gelen örneklerin istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu görülmüştür (SPSS 11.5.1 for Windows Kikare uyum testi $p=0,001$).

Laboratuvara inceleme amaçlı gönderilen örneklerin yoğunluğuna göre birinci sırada kan ve ikinci sırada yara örnekleri diğer örneklerden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (SPSS 11.5.1 for Windows Kikare uyum testi $p=0,001$).

Hastaların altta yatan hastalığı ile ölüm arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (SPSS 11.5.1 for Windows Fisher exact test).

Kültürde izole edilen suşların tiplendirilmesinde klasik yöntem ile moleküler yöntem arasındaki uyum oranı %90 bulunmuştur (SPSS 11.5.1 for Windows Cohen Kappa testi).

5. TARTIŞMA

Küf mantarları dünyamızda çok yaygın olarak bulunmaktadır (9). Organik madde ve su içeren tüm yüzeylerde hızla gelişip çoğalabilme yeteneğine sahip olan küfler, her zaman ve her yerde bulunabilir, akla gelen her türlü maddeyi substrat olarak kullanarak üreyip ortamı istila edebilmektedir (44). Hatta bazı türleri sağlıklı insanların solunum ve gastrointestinal sistemlerinde % 2 oranında saprofitik olarak yaşamını sürdürmektedir (9).

Mantarlar doğada yaygın olarak bulunmalarına karşın insanın yüksek doğal direnci nedeniyle sağlıklı kişilerde derin mikoz oluşturmaları oldukça zordur. Bu nedenle yakın zamanlara kadar dermatomikoz, onikomikoz, otomikoz, keratit gibi ciddi morbidite ve mortalite sebebi olmayan yüzeysel infeksiyonlara yol açmaktadırlar. Ancak konak savunması yetersiz kaldığında artan duyarlılığa bağlı olarak geniş bir yelpazede yer alan çeşitli infeksiyonlar gelişmektedir (7).

Son zamanlarda havanın kimyasal ve fiziksel kirlenmesiyle fungal sporlar da artmıştır (41). Hastalar genellikle infekte mantar sporlarının inhalasyonu ile infekte olmaktadır. İnsanlar günde yaklaşık olarak 200 mantar sporu inhale etmektedirler. Bu sporlar alveoler makrofajlar tarafından fagosite edilerek yok edilmektedir. Makrofajların etkisinden kaçan ve hif oluşturan mantarlar, savunma sisteminin diğer bir elemanı olan polimorfonükleer lökositler tarafından hasara uğrattırılırlar. Bu savunma sistemi zayıf veya bulunmadığı zaman filamentöz mantarlar lokal veya dissemine infeksiyonlara neden olmaktadır (18).

Normalde anatomik bariyerler mantar infeksiyonlarına karşı vücut savunmasının ilk hattını oluşturmaktadır. Deri ve yüzeysel mukozalar mikroorganizmaların vücuda girişini durdurur ve asidik pH, enzimler, mukus ve diğer antimikrobiyal sekresyonlar ile kendilerini korurlar. Bu bariyerler bozulduğunda (yanıklar, bazı viral infeksiyonlar, bazı bakteriyel infeksiyonlar, kemoterapi, radyoterapi, graft-versus-host hastalığı) mantar hücreleri vücuda girerek infeksiyonlara neden olmaktadır (10).

Doğal direncin azaldığı durumda mikoza yol açan değişik türden birçok mantar, şartlara uyma ve yayılma yetenekleri sayesinde, “*muhtemelen bütün mantarların potansiyel olarak patojen sayılabileceklerini*” de göstermektedir (13).

Ağır klinik tablosu olan veya cerrahi girişim uygulanan hastalar açısından, tanı ve tedavi yaklaşımlarındaki gelişmeler, gerçek patojen ya da fırsatçı mantarlara bağlı yaşamı tehdit edici infeksiyonların artışını da beraberinde getirmiştir. Özellikle immünbaskılanmış hastalarda tanı ve tedavinin erken dönemde gerçekleştirilmesi yüksek mortalite hızının düşmesine neden olmaktadır.

Sporları doğada yaygın olan *Hyalohyphomycetes* türleri (*A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*) *Zygomycetes* türleri (*Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*), *Fusarium* türleri ve diğer (*Pseudallescheria*, *Alternaria*, *Cladosporium*) küfler en sık hastalık etkeni olabilen türlerdir (42).

Bu tez çalışmasında hastanemizde yatarak tedavi gören hastaların klinik örneklerinden filamentöz mantarların izole edilerek klasik ve moleküler yöntemlerle tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na 22 aylık dönemde 29 farklı klinikten rutin kültür amaçıyla gönderilen 32 farklı örnek çeşidi olmak üzere toplam 6742 klinik örnek filamentöz mantar açısından da değerlendirmeye alınmıştır.

Otuziki hastaya ait kimi ardışık kimi tek olmak üzere 71 örnekten filamentöz mantar izole edilmiştir. Klasik yöntemle altı *A. niger*, altı *A. flavus*, beş *A. fumigatus*, dört *A. terreus*, beş *Fusarium* spp., iki *Bipolaris* spp. ve birer *Scedosporium* spp., *Acremonium* spp., *Mucor* spp., *Aureobasidium* spp. cinsi olarak tanımladığımız filamentöz mantarlar daha sonra DNA dizi analiziyle doğrulanmak üzere Ankara'da bulunan özel bir moleküler identifikasyon laboratuvarına gönderilmiştir.

DNA Dizi analizi sonuçları ile bizim bulgularımız kıyaslandığında *Aspergillus*'ların tamamını klasik yöntemlerle tür düzeyinde, *Fusarium*'lardan biri hariç diğerlerini cins düzeyinde, *Bipolaris*, *Scedosporium* ve *Aureobasidium*'u cins düzeyinde doğru olarak tanımladığımız anlaşılmıştır. Klasik yöntemle sırasıyla *Acremonium*, *Mucor* ve *Fusarium* olarak tanımladığımız suşlar dizi analizi sonucuna göre yine sırasıyla *Lecythophora*, *Rhizopus* ve *Cylindrocarpon* olarak tanımlanmıştır.

Retrospektif bir çalışmada, Marr ve ark. (21) Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde bulunan Fred Hutchinson Kanser Araştırma Merkezi'nde 1993 ile 1998 yılları arasında hematopoetik kök hücre transplantasyon yapılan 358 hastanın klinik örneklerinde (akiğer, sinüs, diğer) farklı *Aspergillus* cinsi kf mantarı izole edildiğini, hastaların invaziv aspergilloz tanısı aldığını bildirmişlerdir. *Aspergillus*'ların bir çoğu

tür düzeyinde tanımlanırken (213 *A. fumigatus*, 43 *A. niger*, 17 *A. flavus*, 7 *A. terreus* suşu) bir kısmı ise sadece cins düzeyinde tanımlanabilmiştir.

Çalışmamızda, mikoloji atlaslarından yararlanılarak yaygın olarak izole edilen filamentöz mantarların doğru olarak kolayca tanımlanabileceğini gördük. Sık olarak izole edilmeyen ve klasik yöntemlerle tanımlanması zor olan suşların ise referans laboratuvarlarda tanımlanması uygun olacaktır.

Çalışmada en sık izole edilen *Aspergillus* türleri KBY, KOAH, kanser, DM ve periferik damar hastalığı bulunan hastalardan izole edilmiştir. *Fusarium* ikinci sıklıkta izole edilmiş olup KBY, DM ve kanserli hastalardan izole edilmiştir. *Bipolaris* türleri KBY ve DM'lu hastalardan, *Lecytophora* KBY ve DM'u bulunan bir hastadan, *Rhizopus* pansitopenisi olan hastadan, *Scedosporium* yabancı cisim batması olan hastadan, *Aureobasidium* penil protez implantasyonu yapılan hastadan izole edilmiştir.

Filamentöz mantar üretilen hastaların çoğunda hastanın altta yatan bir hastalığı bulunmaktadır. Ran Nir-Paz ve ark.(65) İsrail'de bir üniversite hastanesi (18 vaka 15 yıl) ve bir sağlık merkezinde (71 vaka 10 yıl) 89 hastadan alınan klinik örneklerde (alt ekstremité 48, göz 12, akciğer 6, genitoüriner yol 5, kan 3, nazofarinks 3, gastrointestinal yol veya periton 4) *Fusarium* spp. izole ettiklerini bildirmişlerdir. Hastaların 22'sinde KBY, 27'sinde DM, 15'inde periferik damar hastalığı, 14'ünde iskemik kalp hastalığı, sekizinde yanık olduğu bildirilmiştir (65). Benzer şekilde bizim hastalarımızın çoğunda da altta yatan bir hastalığı olduğu görülmektedir. Hastaların sekizinde KBY, altısında KOAH, altısında kanser, beşinde DM, beşinde periferik damar hastalığı olduğu belirlenmiştir.

Soubani ve ark. (53) hastanede yatan 65 yaş üstü 66 hastanın alt solunum yolu örneklerinde *Aspergillus* spp. üretmişlerdir. Bu hastaların ikisi aspergilloz, üçü İPA tanısı alırken 61 hastada ise sadece *Aspergillus* kolonizasyonu olduğuna karar vermişlerdir. Bizim hastalarımızdan da *Aspergillus* üreyen 21 hastadan altısı İPA ve biri meningoel aspergilloz tanısı almıştır. Filamentöz mantar üreyen hastaların klinik örneklerinin dağılımına bakıldığında; 13 hastanın balgam, dörder hastanın yara ve periton diyaliz sıvısı, üçer hastanın dış kulak yolu akıntısı ve apse, birer hastanın BOS, burun sürüntüsü, doku, periferik kan ve konjunktiva sürüntü örneklerinde üreme gözlenmiştir. Yaş ortalaması 46,6 olan (7 ay ile 77 yaş) hastaların yedisi (%21,8) filamentöz mantar izolasyonundan sonraki bir tarihte hayatını kaybedilmiştir.

Çalışmamızda farklı kliniklerden gönderilen çeşitli klinik örneklerde farklı cins ve türde filamentöz mantarlar izole edilmiştir. Benzer şekilde daha önce yapılan çalışmalarda, *Aspergillus* türlerinin giderek arttığı, sıklıkla infeksiyon etkeni olarak izole edildiği ve klinik olarak aspergillozdan ayırımı zor olan *Zygomycetes*, *Fusarium* türleri ve granülositopenik hastalarda etken olan *Scedosporium* türlerinin de yoğun bakım ünitelerinden izole edildiği bildirilmiştir (52).

Ülkemizde, Kantarcıoğlu ve ark., Nisan 1999-Mart 2001 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde çeşitli kliniklerinden Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiş olan 384 klinik örnekten izole edilen maya ve küfleri incelemişlerdir. İki yıllık dönemde 146 maya ve 12 hifli mantar suşu, klasik mikolojik yöntemler kullanılarak tür düzeyinde tanımlanmıştır. İzole edilen maya türlerinden kandidaların (%66,4) ilk sırayı aldığı bildirirken, küf mantarlarının dağılımının ise dört (%33,3) *A. flavus*, iki (%16,6) *A. fumigatus*, üç (%25) *A. niger*, bir (%8,3) *A. versicolor*, bir (%8,3) *Cladosporium cladosporioides*, bir (%8,3) *Scopulariopsis candida* suşu olduğu bildirilmiştir (4).

Eren ve ark. (114) 10 aylık dönemde (Temmuz 2003-Mart 2004) Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde kritik ünitelerde (yoğun bakımlar, böbrek ve kemik iliği nakil üniteleri, çocuk ve erişkin hematoloji ve onkoloji servisleri) yatan immün sistemi baskılanmış 43 hastadan alınan balgam, BAL, endotrakeal tüp ve sinüs dokusu örneklerini mikolojik olarak değerlendirmişler ve klinik örneklerin dördünde (4 balgam) *Penicillium chrysogenum*, ikisinde (balgam ve BAL) *A. fumigatus*, birinde (BAL) *A. flavus* ve birinde (sinüs dokusu) *Valsa sordida* olmak üzere toplam sekiz örnekte filamentöz mantar izole ederek moleküler yöntemlerle doğrulamışlardır. Bizim çalışmamızda en çok balgam örneklerinde küf mantarı izole edilmiş olup en sık olarak *Aspergillus* türleri izole edilirken, *Penicillium* cinsine rastlanmamıştır. Bunun nedeni Eren ve ark. çalışma sırasında hastaların odalarından almış oldukları iç ortam hava örneklerinde de en yoğun olarak *Penicillium* türlerini (%50,6) izole ederken, *Aspergillus* türleri dördüncü sıklıkta (%10,6) izole etmiş olmalarından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bizim hastanemizin kritik ünitelerinden daha önce alınan hava örneklerinde ise *Aspergillus*'lar ikinci sıklıkta izole edilmiştir (47).

Casto'n ve ark. (57) retrospektif olarak yaptıkları çalışmada 10 yıllık dönemde (1994-2004) bir hastanede yatan veya ayakta tedavi gören yaşları 3 ay ile 93 yaş

arasında değişen 332 hastanın solunum yolu örneklerinden (balgam, BAL, bronşiyal aspirat, iğne aspirasyonu ve akciğer biyopsi) 505 ardışık filamentöz mantar izole ettiklerini bildirmişlerdir. Hastalardan üretilen filamentöz mantarların, *Aspergillus* spp. (%80,5), *Penicillium* spp. (%7,9), *Fusarium* spp. (%2,1), *Scedosporium* spp. (%5,3), *Alternaria* spp. (%1,4) *Paecilomyces* spp. (%0,8) *Cladosporium* spp. (%0,8) *Mucor* spp. (%0,6), *Rhizomucor* spp. (%0,2) ve *Trichoderma* spp. (%0,2) olduğunu belirlemişlerdir.

Bizim çalışmamızda izole ettiğimiz mantar türlerine benzer şekilde Husain ve ark. çok merkezli olarak dört yıllık dönemde yapmış oldukları çalışmada invaziv küf infeksiyonu bulunan 53 karaciğer veya kalp transplant alıcısından 37 *Aspergillus* cinsi, beş non-*Aspergillus hyalohyphomycetes* (*S. apiospermum* ve *Fusarium* spp.), beş *Phaeohyphomycetes* (dematiaceous), üç *Zygomycetes* (*Rhizopus* ve *Mucor* spp.) ve üç diğer olmak üzere toplam 53 filamentöz mantar izole etmişlerdir (115).

Aasma ve ark., (54) Roswell Park Cancer Enstitüsü'nde 1995 ile 1999 yılları arasında 22 hematopoetik kök hücre transplantasyon alıcısında (16 erkek, 6 kadın) filamentöz mantar izole etmişlerdir. Örneklerin 18'inde (%82) *Aspergillus* cinsi, dört (%18) örnekte *Zygomycetes* grubu izole edilirken, altı örnekte iki farklı filamentöz mantar izole edilmişlerdir. Bu hastalardan 20'sinin invaziv mantar infeksiyon tanısı aldıktan belirli bir süre sonra (41-833 gün) öldüğü, iki hastanın ise hala hayatta olduğu bildirilmiştir.

Ülkemizde ise Karacan ve ark. (116) retrospektif olarak yaptıkları çalışmada, solid organ transplantasyonu yapılan 207 hastayı (27 karaciğer, 180 böbrek nakli) üç yıllık dönemde İPA yönünden değerlendirmişlerdir. Dördü histopatolojik, üçü kültürde üreme şeklinde toplam yedi olgu (dört böbrek, üç karaciğer alıcısı) bildirmişlerdir. Ayrıca hastaların İPA tanıları radyolojik bulgu ve klinik değerlendirmelerle de desteklenmiştir. Bu olguların hepsinin antifungal tedavi almasına rağmen, beş hastanın ilk iki ay içerisinde hayatını kaybettiği bildirilmiştir.

Çizelge 5.1.'de farklı ülkelerden ve Türkiye'den bildirilen, filamentöz mantar izole edilen belirli bir dönem içerisinde ve belirli hasta gruplarında yapılmış olan çalışmalar gösterilmiştir.

Çizelge 5.1. Klinik örneklerden izole edilen filamentöz mantarlarla ilgili yapılan diğer çalışmalar

Çalışma									
Araştırmacı	Kaynak no	Yılı	Yeri	Dönemi	Grubu	Filamentöz m.	Hasta sayısı		
Nir-Paz R	65	2002	İsrail	1987-2002	DM, KBY,SVH, diyaliz	<i>Fusarium</i> spp.	89		
Walsh TJ	117	2002	Fransa	2001	İmmün süprese çocuklar	<i>Aspergillus, Fusarium Scedosporium</i> spp.	54		
Cornet M	118	2002	Fransa	1994-1999	Hematolojik hast, organ trans, HIV	<i>Aspergillus</i> spp.	673		
Husain S	115	2003	ABD	1998-2002	Organ transplant alıcıları	<i>Aspergillus, Fusarium Scedosporium</i> spp.	53		
Karacan Ö	116	2003	Türkiye	1998-2001	Organ transplant alıcıları	<i>Aspergillus</i> spp.	7		
Soubani AO	53	2004	ABD	1995-2000	<i>Aspergillus</i> üreyen yaşlı hastalar	<i>Aspergillus</i> spp.	66		
Morgan J	119	2005	ABD	2001-2002	Hemopoetik kök hücre ve org. trans	<i>Aspergillus</i> spp.	92		
Labbe AC	120	2007	Kanada	2000-2006	Graft versus host hastası	<i>Aspergillus</i> spp.	13		
Sinko J	121	2007	Macaristan	2003-2006	Hemopoetik kök hücre alıcıları	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Zygomycetes</i> spp.	8		
Upton A	122	2007	ABD	1990-2004	Hemopoetik kök hücre alıcıları	<i>Aspergillus</i> spp.	405		
Gürcan Ş	123	2007	Türkiye	2002-2006	<i>Aspergillus</i> üreyen hastalar	<i>Afumigatus, A.flavus, A.niger</i>	22		
Nivoix Y	124	2008	Fransa	1997-2006	Hematolojik hast, organ trans, HIV	<i>Aspergillus</i> spp.	289		
Chander J	125	2008	Hindistan	1999-2003	Keratomikoz	<i>Asp. Fus. Pen. Seedo, Curvu, Bipol</i>	64		
Eren A	114	2008	Türkiye	2003-2004	Yöğun bakım, onkoloji, hematoloji Transplant hastaları	<i>Penicillium</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Valsa</i>	8		
Stelzmueller I	126	2008	Avusturya	1995-2006	Organ transplant alıcıları	<i>Mucor, Rhizopus</i> spp. <i>Alternaria, Absidia</i>	11		
Tilak R	127	2009	Hindistan	2004-2008	Keratitli hastalar	<i>Aspergillus. Fusarium Penicillium. Alternaria Scedosporium Bipolaris, ,</i>	36		

Bir çok çalışmada hastaların klinik örneklerinden en sık *Aspergillus* cinsi küf mantarları izole edilirken (Aasma %82 (54), Serdar %85 (4), Casto'n (57) %79,8,

Husain (115) %69,8) bizim çalışmamızda da ilk sırayı %62,5 izolasyon oranı ile *Aspergillus*'lar almıştır. İmmün sistemi baskılanmış hastalarda uygun üreme ortamı bularak infeksiyonlara neden olan *Aspergillus*'lara bağlı salgınlar ve olgu sunumları bildirilmiştir. Ülkemize ait farklı illerden bildirilen bazı olgu sunumları Çizelge 5.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.2. Ülkemizde farklı illerden bildirilen aspergilloz olguları

Araştırmacı	Hastanın kliniği	İl	Yılı	Filamentöz mantar	Tedavi	Kaynak no
Bülbül M	Diyaliz hast.	Ankara	1997	<i>A. niger</i>	Flukonazol	128
Mansuroğlu D	Kalp nakli	İstanbul	1998	<i>A. flavus</i>	Amfoterisin B	129
Uçan ES	Ülseratif kolit	İzmir	2001	<i>Aspergillus</i> spp.	Amfoterisin B İtrakonazol	130
Çalıkoğlu M	KOAH	Mersin	2003	<i>A. niger</i>	Amfoterisin B	131
Kantarcıoğlu AS	DM	İstanbul	2003	<i>A. niger</i>	İtrakonazol	132
Özden SŞ	KOAH	İzmir	2004	<i>Aspergillus</i> spp.	Amfoterisin B İtrakonazol	133
Ayyıldız O	ALL	Diyarbakır	2004	<i>Aspergillus</i> spp.	Amfoterisin B	134
Kadakal F	Öksürük	İstanbul	2004	<i>A. fumigatus</i>	?	135
Büyüksirin M	AC kanseri	İzmir	2005	<i>Aspergillus</i> spp.	İtrakonazol Amfoterisin B	136
Elmalı M	ALL	Samsun	2005	<i>Aspergillus v</i>	?	137
Bor Ö	ALL	Eskişehir	2006	<i>A. flavus</i>	Amfoterisin B	138
Uçan ES	Diabet	İzmir	2006	<i>Aspergillus</i> spp.	Amfoterisin B Vorikonazol	139
Lakadamyalı H	Akciğer kanseri	Antalya	2007	<i>Aspergillus</i> spp.	İtrakonazol	140
Erkekol FÖ	Astım	Ankara	2007	<i>Aspergillus</i> spp.	İtrakonazol	141
Sırmatel Ö	DM	Bolu	2008	<i>A. flavus</i>	Kaspofungin	142
Özçelik T	ALL	Bursa	2009	<i>A. flavus</i>	Kaspofungin Vorikonazol	143

Fungal keratit, tropikal ve subtropikal iklimlere sahip gelişmekte olan ÷lkelerde oldukça yaygın olarak gör÷lmektedir. Bu bölgelerde filamentöz türler iklime bağlı olarak infeksiyonlardan sıklıkla izole edilmektedir. *Fusarium*, *Aspergillus*, *Candida* türleri ve diğer hyaline ve *dematiaceous hyphomycetes*'ler en sık izole edilen mantarlardır (144). Kontak lens kullanımına bağlı birçok *Fusarium* vaka ve salgınları bildirilmiştir (145). Gorscak ve ark. (146) ABD'inde 11 aylık bir dönemde (Temmuz 2005-Mayıs 2006) iki ayrı merkezde kontak lens kullanan kişilerde *Fusarium*'a bağlı keratitleri incelemişlerdir. Bu dönemde 15 hastaya *Fusarium* keratiti tanısı konulurken yıllık ortalama vaka sayısı 16,4 olarak bildirilmiştir. Araştırmacılar aynı merkezlerde bir önceki dönemde 30 aylık (Ocak 2003-Haziran 2005) periyotta belirlenen *Fusarium* keratitine bağlı yıllık vaka sayısının 2,4 olduğunu bildirirken bir sonraki dönemde yaklaşık 7 kat artığını vurgulamışlardır. Ng ve ark. (147) ise 11 aylık bir dönemde kontak lens kullanan 16 hastanın kültüründe *Fusarium* üretmişlerdir. Bizim çalışmamızda da Göz Hastalıkları Kliniği'nden gönderilen bir hastanın konjunktiva sürüntüsünde *Fusarium solani* izole edilmiştir.

Yine *Fusarium* keratiti ile ilgili başka bir restrospektif çalışmada Xie ve ark. (148) Çin'in Shandong bölgesinde bulunan bir göz enstitüsünde altı yıllık dönemde (2001-2006) 674 fungal keratitli hastanın 549 (%81,5)'unda kültür pozitifliği belirlemişlerdir. Baskın olarak üreyen patojenin *Fusarium* cinsi (%77,6) (*F. solani* %37,3, *F. moniliforme* %30,0, *F. oxysporum* %27,9) olduğunu görmüşlerdir. İkinci sıklıktaki patojenin ise *Aspergillus* (%10,8) (*A. flavus* %49,2, *A. fumigatus* %35,6) olduğunu bildirmişlerdir.

Kontak lens ve solüsyonlarında kolayca üreyen *Fusarium* cinsi küf mantarları farklı ÷lkelerde salgınlara neden olmuştur. ÷lkemizde ve diğer ÷lkelerde gör÷len *Fusarium* keratiti salgınları çizelge 5.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.3. Farklı ülkelerden bildirilen *Fusarium*'a bağlı keratit salgınları

Araştırmacı	Hastanın kliniği	Yer	Yılı	Filamentöz mantar	Hasta sayısı	Çalışma dönemi	Kaynak no
Khor WB	Kontak lens kullanıcıları	Singapur	2006	<i>Fusarium</i> spp	58	2005-2006	149
Alfonso EC	Kontak lens kullanıcıları	ABD	2006	<i>F.solani</i> <i>F.oxysporum</i>	34	2004-2006	150
Chang DC	Kontak lens kullanıcıları	ABD	2006	<i>Fusarium</i> spp.	164	2004-2006	151
Iyer SA	Fungal keratitli	ABD	2006	<i>Fusarium</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. <i>Bipolaris</i> spp.	59	1999-2006	152
Gorscak JJ	Kontak lens kullanıcıları	ABD	2007	<i>Fusarium</i> spp.	15	2005-2006	146
Donnio A	keratomikoz	Fransa	2007	<i>F.solani</i>	5	2005-2006	153
Kaufmann C	Kontak lens kullanıcıları	İsviçre	2008	<i>Fusarium</i> spp.	6	2005-2007	154
Gaujoux T	Kontak lens kullanıcıları	Fransa	2008	<i>F.solani</i> <i>F.oxysporum</i> <i>F.dimerum</i>	17	2004-2006	155
Ma SK	Kontak lens kullanıcıları	Hong Kong	2009	<i>Fusarium</i> spp	33	2005-2006	156
Çakır M	Endoftalmit	Türkiye	2009	<i>Fusarium</i> spp	8	2008	157
Gower EW	Fungal keratit	ABD	2010	<i>Fusarium</i> spp	271	2001-2007	158

SAPD uygulamaları KBY'li hastalarda oldukça önemlidir. Bu uygulamaya bağlı peritonitlerden genellikle Gram pozitif ve negatif bakteriler izole edilirken %1-15 arasında değişen oranlarda fungal etkenler izole edilmektedir. Bunların büyük bir çoğunluğunu *Candida* cinsi mayalar oluştururken, nadir olarak *Mucor*, *Fusarium*, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinsi filamentöz mantarlarda izole edilmektedir (159). Çizelge 5.4.'de farklı ülkelerden bildirilen periton diyaliz sıvılarından izole edilen *Fusarium* olguları verilmiştir.

Çizelge 5.4. Farklı ülkelerden bildirilen *Fusarium* spp.'ye bağlı peritonit olguları

Araştırmacı	Hastanın kliniği	Yer	Yılı	Filamentöz mantar	Tedavi	Kaynak no
Flynn JT	KBY	ABD	1996	<i>Fusarium</i> spp.	?	160
García-Tapia A	KBY	İspanya	1999	<i>F. oxysporum</i>	?	161
Bibashi E	KBY	Kanada	2002	<i>F. solani</i>	Amfoterisin B Ketakonazol	162
Garbino J	Böbrek transplant.	İsviçre	2005	<i>Fusarium</i> spp.	Vorikonazol	163
Garcia-Martos P	KBY	İspanya	2009	<i>F. oxysporum</i>	Flukonazol	164
Ünal A	KBY	Türkiye	2010	<i>Fusarium</i> spp.	?	165
Gaur S	KBY+DM	İngiltere	2010	<i>F. dimeru</i>	Amfoterisin B Flostozin	166

Hastaların klinik örneklerinden izole edilen filamentöz mantarların DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. İzolatların DNA konsantrasyonları Nanodrop ND 1000 UV-Vis Spektrofotometre ile ölçüldüğünde bazı suşlara ait DNA ölçümlerinin düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durumun filamentöz mantar cinslerinin farklı oluşuna ve el manüplasyonuna bağlı olarak değiştiğini düşünmekteyiz. Bu çalışmada ITS primerleri kullanılarak PZR yapılmıştır. PZR amplifikasyon sonrası elektroforez uygulandığında bazı suşlara ait örneklerde beklenen bant gözlenmemiştir. Daha sonra aynı örneklerin DNA ekstraksiyonları tekrarlanmıştır ve tekrar PZR yapıldı. İkinci sefer yapılan PZR sonrası elektroforez sonucunda bantlar görülmüştür.

DNA ekstraksiyonu sırasında bazı problemlerle karşılaşmıştır. Farklı DNA ekstraksiyon yöntemlerinde bazı cinslerde sonuç alınırken bazılarında sonuç alınamamıştır. Denenmiş olan bir çok yöntem sırasında en çok *Aspergillus*'ların DNA ekstraksiyonunda sorunla karşılaşmıştır.

Elde edilen PZR ürünlerinin DNA konsantrasyonları tekrar ölçülmüştür. PZR ürünleri ve ITS1 (Forward) primerleri kullanılarak ABI 3100 Genetic Analyzer cihazında dizi analizi yaptırılmıştır. Elde edilen suşlar tür düzeyinde tanımlanmıştır. Klasik yöntemlerle yapılan tiplendirme ile DNA dizi analizi ile yapılan yöntem karşılaştırıldığında 32 örneğin 29'unda (%90) uyum görülürken üç (%10) örnekte farklılık tespit edilmiştir. Ancak bu üç örnekten izole edilen suşların klasik yöntemle tanımlanan cinslerin aynı aile grubu içerisinde olduğu belirlenmiştir. Bunun klasik yöntemlerle tiplendirme yapılırken gözden kaçırılmış olan küçük ayrıntıdan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çalışmamızda klasik yöntemle tüm *Aspergillus*'lar tür

düzeyinde tanımlanırken moleküler yöntemle uyum (%100) bulunmuştur. Diğer filamentöz mantarlar ise cins düzeyinde tanımlanabilmiştir.

Filamentöz mantarların tanısında mikroskopik inceleme için en çok kullanılan boyama yöntemi LFPM'dir. Bu yöntemle yapılan preparatlarda aynı aileye ait bazı filamentöz mantar cinslerinin ayırımında güçlükler yaşanabilmektedir. Cinslere ait bütün özellikler aynı anda görülmeyebilmektedir.

Ahmad ve ark. da (167) bir peritonit vakasında önce klasik yöntemle *Aureobasidium pullulans* olarak tiplendirdikleri izolatin DNA dizi analiziyle *Lecythophora mutabilis* olduğunu bildirmiştir.

Antifungal duyarlılık testlerinin standardizasyonu antifungal ilaç direncinin tesbitinde büyük bir avantaj sunmaktadır (100).

Filamentöz mantarların antifungal duyarlılıklarının belirlenmesinde uzun zamandır standardize olmayan test metodları kullanıldığı için direnç durumlarının yorumlanması oldukça zordur. *Aspergillus*'lar için antifungal duyarlılık testleri hastanelerdeki rutin Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarları için önerilmemektedir (85).

Çeşitli çalışmalar antifungal duyarlılık testi olan E-test ile makro ve mikro dilüsyon testleri arasında iyi bir uyum olduğunu bildirmişlerdir (168). Pfaller ve ark. (105) yaptıkları çalışmada *Aspergillus*'lar için yapılan referans sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile E-test yöntemi arasındaki uyumun %100 olduğunu bildirilirken, başka bir çalışmada ise (*Fusarium* ve *Aspergillus*) E-test ile altın standart olarak kabul edilen makrodilüsyon arasındaki uyumun %80 olduğu bildirilmiştir (169).

Flukonazol *Aspergillus* türlerine karşı temel olarak etkisizken, amfoterisin, yeni azoller ve ekinokandinler genellikle etkilidir. Ancak, amfoterisin B, itrakonazol, vorikonazol ve kaspofungin'e karşı dirençli suşlarda bildirilmiştir (17, 85). Xei ve ark. (148) yaptıkları antifungal duyarlılık testlerinde *Aspergillus* ve *Fusarium* suşlarının flukonazol'e dirençli olduğunu bildirirken, bizim çalışmamızda da *Scedosporium* spp. suşu hariç bütün suşlar E-test ile flukonazol için >256 mg/L ve disk difüzyon ile <6 mm olduğu görülmüştür.

Vorikonazol'un *Aspergillus* türlerine karşı *in vitro* ve *in vivo* mükemmel bir aktivite sergilediği vurgulanmıştır (86). Bizim çalışmamızda E-test ile yapılan antifungal duyarlılık testinde tüm *Aspergillus*'lar için MİK değeri E-test ile 24 saatte <0,38 mg/L bulunurken, disk difüzyon ile ≥ 15 mm olduğu görülmüştür.

Kaspofungin; *Fusarium*, *Scedosporium*, *Zygomycetes*, *P. boydii* ve *dematiaceous* küflere karşı ya sınırlı bir etkiye sahiptir veya etkisizdir (17). Bizim çalışmamızda da *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Rhizopus* spp., ve *Bipolaris* spp. suşlarında kaspofungin E-test MİK değerlerini >32 mg/L olarak tespit edilmiştir. Martos ve ark. (170) 2010 yılında *Aspergillus*'larda (67 suş) kaspofungin duyarlılığını E-test yöntemi ile 24 saatlik değerlendirmede MİK değerlerini 0.015 -1 mg/L arasında bulduklarını belirtirken, biz de bu çalışmayla uyumlu olarak 0.006 -0.125 mg/L olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada ayrıca 10 *Fusarium* spp. suşlarının MİK değerlerini > 8 mg/L olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Posakonazol sıklıkla izole edilen birçok maya (kandida) ve filamentöz mantara (*Aspergillus*, *Zygomycetes*) karşı etkilidir (17). Çalışmamızda üç suş (bir *Fusarium* spp., bir *Cylindrocarpum* spp. ve bir *Rhizopus* spp. suşu) E-test ile posakonazol MİK değeri >32 mg/L bulunurken diğer suşların MİK değeri <1,5 mg/L olarak tesbit edildi. Özellikle *Aspergillus* suşlarının düşük MİK değerine sahip olduğu görülmüştür.

A. terreus suşlarının genellikle amfoterisin B'ye dirençli olduğu bildirilirken (85), bizim izole ettiğimiz bütün *A. terreus* suşlarının da E-test ile MİK değerinin >32 mg/L olduğu görülmüştür. Ayrıca *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Rhizopus* spp. amfoterisin B E-test MİK değerleri >32 mg/L olarak bulunurken diğer suşların MİK değeri < 2 mg/L olarak bulunmuştur.

Sistemik fungal infeksiyonlar için etkili bir tanı tekniğinin bulunmaması hastalık yönetiminde profilaksi ve ampirik tedavide anahtar rol oynamaktadır (10).

Bir hastadan izole ettiğimiz *Rhizopus* spp. suşına uyguladığımız E-test ve Disk difüzyon testi ile tüm antifungallere karşı dirençli olduğu görülmüştür.

Yapılan bir çok çalışmada ve referans antifungal duyarlılık testleri için difüzyon testlerinde MOPS ve RPMI 1640 ile hazırlanmış besiyerleri önerilirken bazı çalışmalarda GM-MHA önerilmektedir.

Pfaller ve ark. (105) Iowa Üniversitesinde 24'ü *Aspergillus*, 13'ü *Fusarium*, beşi *Pseudallescheria*, altısı *Rhizopus*, biri *Paecilomyces* ve biri *Acremonium* cinsi olmak üzere toplam 50 klinik filamentöz mantar suşuna E-test yöntemiyle RPMI agarda antifungal duyarlılık testi yapmışlardır. *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Acremonium*'larda E-test yöntemiyle itrakonazol duyarlılığının, referans mikrodilüsyon yöntemiyle arasındaki uyumun %100 olduğunu bildirmişlerdir.

Martín de la Escalera ve ark. (171) yapmış oldukları çalışmada 51 *Aspergillus*, 20 dematiaceous mantar, 18 hyaline *Hyphomycetes* ve 14 *Zygomycetes* cinsi olmak üzere toplam 103 küf mantarının yeni bir triazol grubu olan BAL 4815 'e karşı duyarlılığı incelemiştir. *Aspergillus*'lara karşı BAL 4815'in mükemmel bir invitro aktivite gösterdiği diğer filamentöz mantarlara karşı değişken bir aktivite gösterdiği bildirilmiştir.

Mersin'de yapılan bir çalışmada mevsimlere göre dış ortam küf yoğunluğunun değiştiği, Ocak-Şubat aylarında yoğunluğun en düşük düzeyde gözleendiği, Nisan-Mayıs aylarında en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir (32). Bizim suşlarımızın izolasyon tarihlerine bakıldığında dönemsel olarak bir artış veya azalma görülmemiştir.

Hastanede ya da yakınında inşaat yapılması ile aspergilloz epidemileri görülebileceği bildirilmiştir (55). Bizim hastanemiz daha yeni kurulan bir hastane olduğu için dönem dönem tadilatlar ve yeni hizmet binaları yapılmaktadır. Bu inşaatlara bağlı küf yoğunluğunun değiştiğini hastanemizde daha önceden yapılmış olan çalışmalar doğrulamaktadır (47). Ayrıca hastanemizde tam anlamıyla hizmet veren bir havalandırma sistemi bulunmamaktadır.

Hastalık Koruma ve Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention-CDC) yüksek riskli bölümlerde yatan hastaların korunmaları için çevre stratejilerinin uygulanması gerektiğini önermiştir. Bu kritik ünitelerde yatan hastaların koşullarındaki mantar yükünün devamlı olarak takip edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Bu bölümlerde yatan hastalar yüksek riskli hastalar olduğu için mantar sporlarının konsantrasyonu yüksek çıktığında katı koruyucu önlemler alınması gerektiğinin altı çizilmiştir. Yüzeylerin dezenfektanlarla günlük olarak dezenfekte edilmesi gerektiği bildirilmesine karşın, gece boyunca UV lambaları kullanılsa bile mantarların eradikasyonu için yeterli olmayacağı vurgulanmıştır. Özellikle havalandırma ünitelerinde mantarların yoğun bir şekilde kolonize olabileceği belirtilmiştir (18).

İmmünsüpresyonlu hastalar invaziv aspergilloz yönünden her zaman korunmalıdır. Odalara toz tutucu filtreler takılmalı, hastalar dışarı çıktıklarında maske takmalı, hasta odalarında bitki ve çiçek bulundurulmamalı ve hastalar inşaat alanlarından mümkün olduğunca uzak tutulmalıdır (25).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yatmakta olan hastalardan gönderilen klinik örneklerden izole edilen filamentöz mantarları klasik ve moleküler (DNA dizi analizi) yöntemlerle tanımlanmıştır.

Mersin'de bulunan hastanelerde böyle bir prospektif çalışmanın ilk defa yapılıyor olması çalışmamızın önemini arttırmaktadır.

Toplam incelenen 6742 klinik örnekten 32 hastaya ait 71 (%1.05) örnekte filamentöz mantar üremiştir. İzole edilen filamentöz mantarların klasik yöntemlerle tiplendirilmesi sonucunda altı *A. niger* (%18.75), altı *A. flavus* (%18.75), beş *A. fumigatus* (%15,62), dört *A. terreus* (%12.50), beş *Fusarium* spp. (%15.62), iki *Bipolaris* spp. (%6,25) ve birer *Aureobasidium* spp. (%3,12), *Acremonium* spp. (%3,12), *Mucor* spp. (%3,12) ve *Scedosporium* spp. (%3,12) olarak belirlenmiştir. Klinik örneklerden kültürde üretilerek izole edilen suşların klasik tiplendirme metodu ile moleküler tiplendirme metodu karşılaştırıldığında sadece üç suшта farklılık gözlenirken uyum oranı tüm suşlar gözönüne alındığında %90 olarak bulunmuştur. *Aspergillus*'lar değerlendirildiğinde tür düzeyinde uyum oranının ise %100 olarak belirlenmiştir.

Filamentöz mantar üretilen hastaların altta yatan klinik durumları değerlendirildiğinde, sekizinde KBY, altısında KOAH, altısında kanser, beşinde DM, beşinde periferel damar hastalığı olduğu belirlenmiştir. Hastalarımızın yedisi çalışma süresi içerisinde hayatını kaybetmiştir.

İzolatların E-test yöntemiyle beş farklı (flukonazol, vorikonazol, amfoterisin B, kaspofungin, posakonazol) antifungale ve disk difüzyon yöntemi ile iki farklı (vorikonazol, flukonazol) antifungale duyarlılıkları belirlenmiştir.

Scedosporium spp. suşu hariç bütün suşlar E-test ile flukonazol MİK değeri >256 mg/L ve disk difüzyon ile <6 mm olduğu saptanmıştır. Vorikonazol'ün tüm *Aspergillus*'lar için MİK değeri E-test ile <0,38 mg/L bulunurken, disk difüzyon ile ≥ 15 mm olduğu görülmüştür.

A. terreus, *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Rhizopus* spp. suşlarının amfoterisin B E-test MİK değeri >32 mg/L, diğer suşların MİK değeri < 2 mg/L olarak belirlenmiştir.

Bir *Fusarium* spp., bir *Cylindrocarpon* spp. ve bir *Rhizopus* spp. suşu E-test posakonazol MİK değeri >32 mg/L bulunurken diğer suşların MİK değeri <1,5 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Bütün *Aspergillus* spp. ve *Lecythophora* spp. E-test Kaspofungin MİK değerleri ≤ 1,5 mg/L olarak bulunurken diğer tüm suşlarda MİK değeri >32 mg/L olarak belirlenmiştir.

Ayrıca *Rhizopus oryzae* suşunun tüm antifungallere dirençli olduğu görülmüştür.

Çalışmamız sırasında klinik-laboratuvar işbirliği sayesinde mikoloji laboratuvarının önemi anlaşılmış olup klinik örneklerden küf mantarlarının aranması ile ilgili talepler artmıştır.

Bağışıklık yetmezliği olan hastalarda mantar infeksiyonunun tanımlanması hastanın kısa zamanda tedavisi açısından büyük yarar sağlayacaktır. Bu bakımdan bu hastaların örneklerinin aynı zamanda mantar yönünden değerlendirilmesi yapılmalıdır.

Çalışmamızın, bölgemiz ve ülkemizdeki klinik örneklerden izole edilen filamentöz mantarların epidemiyolojik durumunun belirlenmesi ve antifungal duyarlılıklarının saptanması noktasında daha sonra yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. **Dixon DM, Fromtling RA.** Morphology, Taxonomy and Classification of the Fungi. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 6. ed. Washington DC: ASM pres, **1995**:699-708.
2. **Hajdu S, Obradovic A, Presterl E, Vécsei V.** Invasive mycoses following trauma. *Injury*, **2009**;40(5):548-554.
3. **Ener B.** Fungal infeksiyonların tanı ve izlemindeki yenilikler. *ANKEM Derg*, **2006**;20(Ek 2):28-32.
4. **Kantarçioğlu AS, Yücel A.** Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Derin Mikoz Laboratuvarında 01 Nisan 1999- 27 Mart 2001 arasında ayrılan maya ve küflerin tür dağılımları ve duyarlılık paterni. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, **2002**;33(1):7-19.
5. **Kannan P, Janaki C, Selvi GS.** Prevalence of dermatophytes and other fungal agents isolated from clinical samples. *Indian J Med Microbiol*, **2006**;24(3):212-215.
6. **İnci R.** Mantarların yapıları, üreme özellikleri ve sınıflandırılması. Ustaçelebi Ş. (Ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:1015-1021.
7. **Yegenoglu Y, Şatana D, Erturan Z, Kiraz M, Uzun M, Ang Ö.** İmmun sistem yetmezlikli hastalarda mantar infeksiyonları (Dört Olgu Nedeniyle). *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **2003**;32:239-243.
8. Erişim: <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx> Erişim tarihi: 12.06.2010.
9. **Özen M.** Küf mantarlarının sebep olduğu invaziv enfeksiyonlar. *Çocuk Enf Derg*, **2009**;3(1):105-107.
10. **Maertens J, Vrebos M, Boogaerts M.** Assessing risk factors for systemic fungal infections. *European J Cancer Care*, **2001**;10:56-62.
11. **Özyaral O, Keskin Y, Başkaya R, Lülecı E, Dumrul G.** Şeker ve şeker katkı besin maddelerinde kseroofilik-kserotoleran küfler. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, **2007**;37(1):43-50.

12. **Cramer RA, Perfect JR.** Recent advances in understanding human opportunistic fungal pathogenesis mechanisms. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. (Eds). *Clinical Mycology*, 2. Ed. Churchill Livingstone: Elsevier, **2009**:15-31.
13. **Yücel A.** Medical Mycology: Yesterday and Today. *Cerrahpasa Journal of Medicine*, **1999**;30(2):191-198.
14. **Kaçmaz B, Sipahi AB, Aksoy A.** *Candida* Türlerinin Tanımlanmasında ‘‘API ID 32’’ ve’’ Rapid Yeast Plus’’ Sistemlerinin karşılaştırılması. *Ankem Derg*, **2006**;20(4):214-216.
15. **Martinez-Rossi NM, Peres NT, Rossi A.** Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. *Mycopathologia*, **2008**;166(5-6):369-383.
16. **Turgut M, Ozsunar Y, Oncu S, Akyuz O, Ertugrul MB, Tekin C, Gultekin B, Sakarya S.** Invasive fungal granuloma of the brain caused by *Aspergillus fumigatus*: a case report and review of the literature. *Surg Neurol*, **2008**;69(2):169-174.
17. **Cornely OA.** Aspergillus to Zygomycetes: Causes, Risk Factors, Prevention, and Treatment of Invasive Fungal Infections. *Infection*. **2008**;36(6):605-606.
18. **Panagopoulou P, Filioti J, Farmaki E, Maloukou A, Roilides E.** Filamentous fungi in a tertiary care hospital: environmental surveillance and susceptibility to antifungal drugs. *Infect Control Hosp Epidemiol*, **2007**;28(1):60-67.
19. **Park SB, Kang MJ, Whang EA, Han SY, Kim HC, Park KK.** A Case of Primary Cutaneous Aspergillosis in a Renal Transplant Recipient. *Transplantation Proceedings*, **2004**;36:2156-2157.
20. **Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM.** Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol*, **2006**;55(7):809-818.
21. **Marr KA, Carter RA, Crippa F, Wald A, Corey L.** Epidemiology and Outcome of Mould Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*, **2002**;34(7):909-917.
22. **Vitrat-Hincky V, Lebeau B, Bozonnet E, Falcon D, Pradel P, Faure O, Aubert A, Piolat C, Grillot R, Pelloux H.** Severe filamentous fungal infections after widespread tissue damage due to traumatic injury: Six cases and review of the literature. *Scand J Infect Dis*. **2009**;41(6-7):491-500.
23. **Blum G, Perkhofers S, Grif K, Mayr A, Kropshofer G, Nachbaur D, Kafka-Ritsch R, Dierich MP, Lass-Flörl C.** A 1-year *Aspergillus terreus* surveillance study at the University Hospital of Innsbruck: molecular typing of environmental and clinical isolates. *Clin Microbiol Infect*, **2008**;14:1146-1151.
24. **Bayındır Y.** Aspergillozun tanı ve sağaltımı. XIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Antalya, **2007**:265-269.

25. **İnci R.** Aspergilloz. Ustaçelebi Ş. (Ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:1093-1098.
26. **Rubin RH.** Fungal infections in the organ transplant recipient. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. (Eds). *Clinical Mycology*, 2. Ed. Churchill Livingstone: Elsevier, **2009**:473-480.
27. **Marr KA.** Fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Med Mycol*, **2008**;46(4):293-302.
28. **Takeda K, Morioka D, Matsuo K, Endo I, Sekido H, Moroboshi T, Togo S, Shimada H.** A case of successful resection after long-term medical treatment of invasive pulmonary aspergilloz following living donor liver transplantation. *Transplantation Proceedings*, **2007**;39:3505-3508.
29. **Anaissie EJ, Graziutti M, Nucci M.** İnvazive fungal infections in cancer patient. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. (Eds). *Clinical Mycology*, 2. Ed. Churchill Livingstone: Elsevier, **2009**:431-471.
30. **Kalkanci A, Kustimur S, Sucak GT, Senol E, Sugita T, Adams G, Verkley G, Summerbell R.** Fulminating fungal sinusitis caused by *Valsa sordida*, a plant pathogen, in a patient immunocompromised by acute myeloid leukemia. *Med Mycol*, **2006**;44(6):531-539.
31. **Boyaç HF.** Patlıcanlarda *Fusarium* solgunluğuna dayanıklılık kaynakları ve dayanıklılığın kalıtımı. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2007**.
32. **Coşkun T.** Ev ortam havasındaki küf ve mayaların ve ev karakteristiklerinin çocuklarda allerjik astımla ilişkisi. Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin, **2009**.
33. **Yücel A.** Tıp mikolojisinin dünü ve bugünü. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi. İzmir, **1999**:3-15.
34. **Andreoni S, Farina C, Lombardi G, Faggi E, Fazii P, Manso E, Mazzoni A.** Medical mycology atlas. Sysstem comunicazioni. Italy **2003**.
35. **Haşçelik G.** Enfeksiyon etkenlerinin genel özellikleri. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Eds). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 3. Baskı. İstanbul: Nobel Kitabevi, **2008**:3-30.
36. **Terr AI.** Are indoor molds causing a new disease? *J Allergy Clin Immunol*, **2004**;113(2):221-226.
37. **Hilmioğlu S.** Mantarlarda Dimorfizm. Ustaçelebi Ş. (Ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:1065-1066.
38. **Warren NG, Hazen KC.** Candida, Cryptococcus and other yeast of medical importance. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 6. ed. Washington Dc: ASM pres, **1995**:723-737.

39. Erişim: www.bakeinfo.co.nz/school/images/yeast.jpg (Erişim tarihi: 25.07.2010).
40. Erişim: www.atsu.edu/faculty/chamberlain/Website/Lects/Fungi.htm (Erişim tarihi: 07.08.2010)
41. **Çetinkaya Z, Fidan F, Ünlü M, Hasenekoglu I, Tetik L, Demirel R.** Afyon atmosferinde alerjen fungus sporları. *Akciger Arşivi*, **2005**;6:140-144.
42. **Rainer J, Peintner U, Pöder R.** Biodiversity and concentration of airborne fungi in a hospital environment. *Mycopathologia*, **2000**;149:87-97.
43. **Yuluğ N.** Mantar infeksiyonlarına genel bakış. Ustaçelebi Ş. (Ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:1023-1024.
44. **Özyaral O, Keskin Y, Erkan F, Hayran O.** Nedeni Bilinmeyen Semptomların Ardındaki Hasta Bina Sendromu Olguları. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, **2006**;5(5):552-563.
45. **Ren P, Jankun T. M, Belanger K, Bracken MB, Leaderer BP.** The relation between fungal propagules in indoor air and home characteristics. *Allergy*, **2001**;56:419-424.
46. **Lockhart SR, Diekema DJ, Pfaller MA.** The epidemiology of fungal infections. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. (Eds). *Clinical Mycology*, 2. Ed. Chuchill Livingstone: Elsevier, **2009**:1-14.
47. **Otağ F, Aslan A, Ersöz G, Coşkun T, Sumak M, Emekdaş G.** Hastanedeki kritik ünitelerin hava örneklerinden izole edilen küf mantarlarının araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, **2008**;22(3)(Ek):55.
48. **Kurup VP, Kumar A.** Immunodiagnosis of Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* **1991**;4(4):439-56.
49. **Warris A, Voss A, Verweij PE.** Hospital sources of *Aspergillus* species: New routes of transmission? *Rev Iberoam Micol.* **2001**;18(4):156-612.
50. **Powderly WG.** Oral fungal infections. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. (Eds). *Clinical Mycology*, 2. Ed. Chuchill Livingstone: Elsevier, **2009**:501-508.
51. Erişim: www.doctorfungus.org/mycoses/human/aspergillus/aspergillosis.htm Erişim tarihi: 19.06.2010.
52. **Yapar N.** Aspergillus ve diğer mantarlar. *Klinik dergisi*, **2007**;20(2):30-32.
53. **Soubani AO, Khanchandani G, Ahmed HP.** Clinical significance of lower respiratory tract Aspergillus culture in elderly hospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2004**;23(6):491-494.

54. **Shaukat A, Bakri F, Young P, Hahn T, Ball D, Baer MR, Wetzler M, Slack JL, Loud P, Czuczman M, McCarthy PL, Walsh TJ, Segal BH.** Invasive filamentous fungal infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients after recovery from neutropenia: Clinical, radiologic, and pathologic characteristics. *Mycopathologia*, **2005**;159(2):181-188.
55. **Uzun Ö.** Yoğun Bakım Ünitesinde Fungal İnfeksiyonlara Yaklaşım. *Yoğun Bakım Dergisi*, **2003**;3(2):135-144.
56. **Kennedy MJ, Sigler L.** Aspergillus, Fusarium, and other opportunistic Moniliaceous Fungi. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolken RH. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 6. ed. Washington Dc: ASM pres, **1995**:765-790.
57. **Casto'n JJ, Linares MJ, Gallego C, Rivero A, Font P, Soli's F, Casal M, Torre-Cisneros J.** Risk Factors for Pulmonary Aspergillus terreus Infection in patients with positive culture for filamentous fungi. *Chest*, **2007**;131:230-236.
58. **Saccante M.** Fungal infections in the patient with human immunodeficiency virus infection. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. (Eds). *Clinical Mycology*, 2. Ed. Chuchill Livingstone: Elsevier, **2009**:417-429.
59. **R. Martino, M. Subirà.** Invasive fungal infections in hematology: new trends. *Ann Hematol*, **2002**;81:233-243.
60. **Dalgıç N, İnce E.** Sistemik Etkili Antifungal İlaçlar. *Klinik Pediatri*, **2005**;4(3):90-98.
61. **Groll AH, Roilides E, Walsh TJ.** Fungal infections in pediatric patients. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. (Eds). *Clinical Mycology*, 2. Ed. Chuchill Livingstone: Elsevier, **2009**:481-499.
62. **Mele L, Ricci P, Nosari A, Tonso A, Fianchi L, Cudillo L, Pagano L.** Filamentous Fungi Infection in Patients with Myelodysplastic Syndrome. A Report of Twelve Cases. *Leuk Lymphoma*, **2002**;43(7):1421-1425.
63. **Ener B.** Otomikoz, mikotik sinüzit ve oküler mikozlar. Ustaçelebi Ş. (Ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:1117-1121.
64. **Larone DH.** *Medically important fungi*. 4. Ed, Washington DC: ASM press, **2002**:255-289.
65. **Nir-Paz R, Strahilevitz J, Shapiro M, Keller N, Goldschmied-Reouven A, Yarden O, Block C, Polacheck I.** Clinical and Epidemiological Aspects of Infections Caused by *Fusarium* Species: a Collaborative Study from Israel. *J Clin Microbiol*, **2004**;42(8):3456-3461.
66. **Leslie JF, Summerell BA, Bullock S.** The *Fusarium* Laboratory Manual. 1. Edition. Iowa: Blackwell Publishing, **2006**:1-2.

79. **Pfaller MA, McGinnis MR.** The laboratory and clinical mycology. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. (Eds). *Clinical Mycology*, 2. Ed. Churchill Livingstone: Elsevier, **2009**:55-77.
80. **Yıldıran ŞT.** Mantar infeksiyonlarında laboratuvar tanı. Ustaçelebi Ş. (Ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:1129-1144.
81. **Çerikçioğlu N.** Mantar İnfeksiyonlarında Seroloji ve deri testi. Ustaçelebi Ş. (Ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:1145-1153.
82. **Ener B.** Hastane enfeksiyonu olarak mantarlar. Ustaçelebi Ş. (Ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:1123-1127.
83. **Richardson MD, Hope W.** Aspergillus. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. (Eds). *Clinical Mycology*, 2. Ed. Churchill Livingstone: Elsevier, **2009**:271-296.
84. **Hope WW, Walsh TJ, Denning DW.** Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis*, **2005**;5(10):609-622.
85. **Singh N, Paterson DL.** Aspergillus infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev*, **2005**;18(1):44-69.
86. **Latgé JP.** *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, **1999**;12(2):310-350.
87. **Embong Z, Hitam WHW, Yean CY, Rashid NHA, Kamarudin B, Ağabeydin SKZ, Osman S, Zainuddin ZF, Ravichandran M.** Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis. *BMC Ophthalmology*, **2008**;8(7):1-8.
88. **Suzuki S, Taketani H, Kusumoto K, Kashiwagi Y.** High-Throughput Genotyping of filamentous Fungus *Aspergillus oryzae* based on colony direct polymerase chain reaction. *J Biosci Bioeng*, **2006**;102(6):572-574.
89. **Doğru Ü.** İnvaziv Mantar infeksiyonlarının Tanısı. *Güncel Pediatri*, **2006**;4(1):150-152.
90. **Hinrikson HP, Hurst SF, De Aguirre L, Morrison CJ.** Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species. *Med Mycol*, **2005**;43(Suppl 1):129-137.
91. Erişim: www.le.ac.uk/ge/genie/vgec/images/PCR_000.jpg. (Erişim tarihi: 28.07.2010).
92. Erişim: www.genetiklab.com/yontemler/pcr1.jpg. (Erişim tarihi: 26.07.2010).
93. Erişim: www.gen-tr.gen.tr/dna.html. (Erişim tarihi: 02.08.2010)
94. **Gubbin PO, Anaissie EJ.** Antifungal therapy. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. (Eds). *Clinical Mycology*, 2. Ed. Churchill Livingstone: Elsevier, **2009**:161-195.

95. **İnci R.** Antifungal ilaçlar. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Eds). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 3. Baskı. İstanbul: Nobel Kitabevi, **2008**:387-399.
96. **Sancak B.** Araştırılmakta Olan Antifungal Etkili Diğer Bileşikler. *İnfeksiyon Dergisi*, **2007**;21(Ek):189-194.
97. **Gündüz K.** Safety of systemic antifungal drugs. *Türkdern*, **2003**;37(4):294-301.
98. **Uzun Ö.** Antifungal Kombinasyon Tedavisi. *İnfeksiyon Dergisi*, **2007**;21(Ek):195-196.
99. **Kuştimur S.** Antifungal duyarlılık testleri. Ustaçelebi Ş. (Ed). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabı*. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**:1159-1166.
100. **Rodriguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Cuesta I, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Mellado E, Cuenca-Estrella M.** Clinical relevance of resistance to antifungals. *Int J Antimicrob Agents*, **2008**;32(Suppl 2):111-113.
101. **Graeme Forrest.** Hasta izleminde antifungal duyarlılık testlerinin rolü. *Current Opinion in Infectious Diseases (Türkçe baskı)*, **2007**;2(1):17-25.
102. Erişim: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Laboratory_Methods/Antifungal_Susceptibility_Testing/methods.html (Erişim tarihi:20.07.2010).
103. **Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW.** Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. *Clin Microbiol Rev*, **2001**;14(4):643-658.
104. **Lass-Flörl C, Perkhofer S.** In vitro susceptibility-testing in *Aspergillus* species. *Mycoses*, **2008**;51(5):437-446.
105. **Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmström A.** In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *J Clin Microbiol*, **2000**;38(9):3359-3361.
106. **Arıkan S.** Antifungal duyarlılık testleri: neredeyiz. *İnfeksiyon Dergisi*, **2007**;21(Ek):69-70.
107. Erişim: <http://www.biotechniques.org/students/2008/tarbell>.(Erişim tarihi: 19.07.2010).
108. **Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H.** Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol*, **1994**;40:358-364.
109. **Griffiths LJ, Anyim M, Doffman SR, Wilks M, Millar MR, Agrawal SG.** Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. *J Med Microbiol*, **2006**;55(9):1187-1191.

110. **Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M.** PCR Detection of DNA specific for *aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*, **1996**;34(10):2464-2468.
111. **Mirhendi H, Moazeni M, Nikaeen M, Makimura K.** Typing of *Aspergillus Fumigatus* and *Aspergillus Niger* Strains by Random Amplification of Polymorphic DNA Analysis Using a Six Primer Set. *Shiraz E-Medical Journal*, **2009**;10(4):1-5.
112. **Loeffler J, Schmidt K, Hebart H, Schumacher U, Einsele H.** Automated extraction of genomic DNA in medically important yeast species and filamentous fungi by using the MagNA Pure LC system. *J Clin Microbiol*, **2002**;40(6):2240-2243.
113. **Işık N.** Mantarlara Ait DNA Eldesinde iki Farklı Ekstraksiyon Yönteminin Karşılaştırılması ve Sekans Analizlerinin Değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **2003**;33:66-70.
114. **Eren A, Kuştımur S, Kalkancı A, Ünverdi S, Aktaş F, Sucak GT.** Hastanede yapılan inşaat çalışmalarının immün sistemi baskılanmış hastaların bulunduğu çevre ve fırsatçı küf enfeksiyonları gelişimi üzerindeki etkisinin araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, **2008**;42:83-93.
115. **Husain S, Alexander BD, Munoz P, Avery RK, Houston S, Pruett T, Jacobs R, Dominguez EA, Tollemar JG, Baumgarten K, Yu CM, Wagener MM, Linden P, Kusne S, Singh N.** Opportunistic Mycelial Fungal Infections in Organ Transplant Recipients: Emerging Importance of Non-*Aspergillus* Mycelial Fungi. *Clin Infect Dis*, **2003**;37(2):221-229.
116. **Karacan Ö, Akçay Ş, Eyüboğlu FÖ, Çelik N, Çolak T, Timurkaynak F, Demirhan B.** Solid Organ Transplant Alıcılarında İnvaziv Pulmoner Aspergillozis. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* **2003**;51(2): 177-182.
117. **Walsh TJ, Lutsar I, Driscoll T, Dupont B, Roden M, Ghahramani P, Hodges M, Groll AH, Perfect JR.** Voriconazole in the treatment of aspergillosis, scedosporiosis and other invasive fungal infections in children. *Pediatr Infect Dis J*, **2002**;21(3):240-248.
118. **Cornet M, Fleury L, Maslo C, Bernard JF, Brücker G.** Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area. *J Hosp Infect*, **2002**;51(4):288-296.
119. **Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, Hadley S, Kontoyiannis DP, Walsh TJ, Fridkin SK, Pappas PG, Warnock DW.** Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Med Mycol*, **2005**;43(1):49-58.
120. **Labbé AC, Su SH, Laverdière M, Pépin J, Patiño C, Cohen S, Kiss T, Lachance S, Sauvageau G, Busque L, Roy DC, Roy J.** High incidence of invasive aspergillosis associated with intestinal graft-versus-host disease following nonmyeloablative transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, **2007**;13(10):1192-1200.

121. **Sinkó J, Csomor J, Nikolova R, Lueff S, Kriván G, Reményi P, Bártai A, Masszi T.** Invasive fungal disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: an autopsy-driven survey. *Transpl Infect Dis*, **2008**;10(2):106-109.
122. **Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA.** Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis*, **2007**;44(4):531-540.
123. **Gürcan Ş, Demir M, Altay G, Tikveşli M, Kılıç H, Oktun M.** Trakya Üniversitesi Hastanesi'nde solunum yolu örneklerinde *Aspergillus* spp. İzolasyonları. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, **2007**;55(2):160-166.
124. **Nivoix Y, Velten M, Letscher-Bru V, Moghaddam A, Natarajan-Amé S, Fohrer C, Lioure B, Bilger K, Lutun P, Marcellin L, Launoy A, Freys G, Bergerat JP, Herbrecht R.** Factors associated with overall and attributable mortality in invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*, **2008**;47(9):1176-1184.
125. **Chander J, Singla N, Agnihotri N, Arya SK, Deep A.** Keratomycosis in and around Chandigarh: a five-year study from a north Indian tertiary care hospital. *Indian J Pathol Microbiol*, **2008**;51(2):304-306.
126. **Stelzmueller I, Lass-Floerl C, Geltner C, Graziadei I, Schneeberger S, Antretter H, Mueller L, Zelger B, Singh N, Pruett TL, Margreiter R, Bonatti H.** Zygomycosis and other rare filamentous fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transpl Int*, **2008**;21(6):534-546.
127. **Tilak R, Singh A, Maurya OPS, Chandra A, Tilak V, Gulati AK.** Mycotic keratitis in India: a five-year retrospective study. *J Infect Dev Ctries*, **2010**;4(3):171-174.
128. **Bülbül M, Demircin G, Oner A, Erdoğan Ö.** Bir Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi Hastasında *Aspergillus niger* Peritoniti. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*, **1997**;1-2:88-90.
129. **Mansuroğlu D, Tuncer A, Eren E, Kırallı İpek G, Yakut C.** Kalp Transplantasyonu sonrası gelişen *Aspergillus flavus*'a Bağlı Akciğer Absesi. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg*, **2002**;10:35-37
130. **Uçan ES, Oğuz VA, Güngör Ö, Gülşen A, Sezak NU, Tertemiz KC, Ceylan E, Kargı A, Balcı P, Ada E, Şanlı A.** Vorikonazol İle Tedavi Edilen Dirençli Pulmoner ve Serebral Aspergilloz Olgusu. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* **2006**;54(1):75-79.
131. **Çalıköğlü M, Ersöz G, Otağ F, Özge C.** Hastane Kaynaklı invaziv pulmoner Aspergillozis Etkeni Olarak *Aspergillus niger*: Bir Olgu Sunumu. XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve enfeksiyon Hastalıkları Kongresi İstanbul, **2003**:284.
132. **Kantarçioğlu AS, Yücel A, Keskinel İ, Erk M.** Olgu Bildirimi: Bir Akciğer Aspergillozu Olgusunun Mikoloji Yönünden İzlenmesi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, **2003**;34(4):194-203.

133. **Özden SŞ, Ertuğrul G, Dereli Ş, Binçmen C, Özacar R.** Subakut Nekrotizan Pulmoner Aspergillozis: Olgu Sunumu. *İzmir Göğüs Hastanesi Dergisi*, **2004**;18(2):83-88.
134. **Ayyıldız O, Işıkdoğan A, Çelik M, Altıntaş A, Hoşoğlu S.** İnvazif Pulmoner Aspergilloz Gelişen Bir Akut Lenfoblastik Lösemi Olgusu. *Dicle Tıp Dergisi*, **2004**;31(3):57-61.
135. **Kadakal F, Uysal MA, Özgül MA, Elibol S, Urer N, Gürses A, Yılmaz V.** A case report of endobronchial semi-invasive aspergillosis. *Tuberk Toraks*, **2004**;52(2):179-82.
136. **Büyükşirin, Polat G, Usalan A, Ürpek G, Yılmaz U, Aydoğdu Z, Tibet G.** Endobronfiyal Aspergillozis ile Gizli Akciğer Kanseri ve Topikal Amfoterisin B ile Oral itrakonazolün Etkinliği. *Toraks Dergisi*, **2005**;6(3):267-270.
137. **Elmalı M, Bayrak İK, Nural MS, Ceyhan M.** Olgu Bildirisi: Anjiyovazif Pulmoner Aspergillozis, BT ve MRG Bulguları. *O.M.Ü. Tıp Dergisi* **2007**;24(2):62-66.
138. **Bor O, Dinleyici EC, Kiraz N, Dundar E, Akgun NA.** Successful treatment of tongue aspergillosis caused by *Aspergillus flavus* with liposomal amphotericin B in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Medical Mycology*, **2006**;44:767-770.
139. **Uçan ES, Sevinç C, Kurtar N, Hayrettaş AY, Osma E, Şimşek İ, Kargı A.** Ülseratif Kolitin Bronşektazi, Bronşiyolitisi Obliterans ve invazif pulmoner Aspergilloz ile Seyreden ilerleyici Akciğer Tutulumu. *Toraks Dergisi*, **2001**;2(1):44-49.
140. **Lakadamyalı H, Erdogan H, Lakadamyalı H, Akçaş, Özyılkan Ö.** Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Olguda Kronik Nekrotizan Pulmoner Aspergilloz. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* **2007**;27:142-145.
141. **Erkeköl FÖ, Bavbek S, Göksel Ö, Mungan D, Aydın Ö, Can AB, Mısırlıgil Z, Demirel Y.** Allerjik bronkopulmoner aspergilloz: 3 olgu nedeniyle. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, **2007**;55(4):418-428.
142. **Sırmatel Ö, Sırmatel F, Gürsoy B, Peksel H, Tavşan Ö, Duygu F, Karaağaç L, Hamidanoğlu M, Unutmaz G.** Diyabetik Bir Hastada Atipik Seyirli *Aspergillus* Meningitisi. *İnfeksiyon Dergisi*, **2008**;22(1):59-64.
143. **Özçelik T, Özkalemkaş F, Kocaeli H, Altundal Y, Ener B, Ali R, Özkocaman V, Hakyemez B, Tunali A.** Akut Lenfoblastik Lösemili Bir Olguda Gelişen Nöroaspergillozun Başarılı Tedavisi: Cerrahi, Sistemik Antifungal Tedavi ve İntrakaviter Tedavinin Rollerini. *Mikrobiyol Bul*, **2009**;43:499-506.
144. **Bagyalakshmi R, Therese KL, Prasanna S, Madhavan HN.** Newer emerging pathogens of ocular non-sporulating molds (NSM) identified by polymerase chain reaction (PCR)-based DNA sequencing technique targeting internal transcribed spacer (ITS) region. *Curr Eye Res*, **2008**;33(2):139-147.

145. **Patel A, Hammersmith K.** Contact lens-related microbial keratitis: recent outbreaks. *Curr Opin Ophthalmol*, **2008**;19(4):302-306.
146. **Gorscak JJ, Ayres BD, Bhagat N, Hammersmith KM, Rapuano CJ, Cohen EJ, Burday M, Mirani N, Jungkind D, Chu DS.** An outbreak of *Fusarium* keratitis associated with contact lens use in the northeastern United States. *Cornea*, **2007**;26(10):1187-1194.
147. **Ng ASY, Lau WWY, Yu DKH, Wong CC, Chan CWN,** Clinical Features and Outcomes of *Fusarium* Keratitis Associated With Contact Lens Wear. *Eye & Contact Lens* **2008**;34(2):113-116.
148. **Xie L, Zhai H, Zhao J, Sun S, Shi W, Dong X.** Antifungal susceptibility for common pathogens of fungal keratitis in Shandong Province, China. *Am J Ophthalmol*, **2008**;146(2):260-265.
149. **Khor WB, Aung T, Saw SM, Wong TY, Tambyah PA, Tan AL, Beuerman R, Lim L, Chan WK, Heng WJ, Lim J, Loh RS, Lee SB, Tan DT.** An outbreak of *Fusarium* keratitis associated with contact lens wear in Singapore. *JAMA*,. **2006**;295(24):2867-2873.
150. **Alfonso EC, Cantu-Dibildox J, Munir WM, Miller D, O'Brien TP, Karp CL, Yoo SH, Forster RK, Culbertson WW, Donaldson K, Rodila J, Lee Y.** Insurgence of *Fusarium* keratitis associated with contact lens wear. *Arch Ophthalmol*, **2006**;124(7):941-794.
151. **Chang DC, Grant GB, O'Donnell K, Wannemuehler KA, Noble-Wang J, Rao CY, Jacobson LM, Crowell CS, Sneed RS, Lewis FM, Schaffzin JK, Kainer MA, Genese CA, Alfonso EC, Jones DB, Srinivasan A, Fridkin SK, Park BJ.** Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. *JAMA*, **2006**;296(8):953-963.
152. **Iyer SA, Tuli SS, Wagoner RC.** Fungal keratitis: emerging trends and treatment outcomes. *Eye Contact Lens*, **2006**;32(6):267-271.
153. **Donnio A, Van Nui DN, Catanese M, Desbois N, Ayeboua L, Merle H.** Outbreak of keratomycosis attributable to *Fusarium solani* in the French West Indies. *Am J Ophthalmol*, **2007**;143(2):356-358.
154. **Kaufmann C, Frueh BE, Messerli J, Bernauer W, Thiel MA.** Contact lens-associated *Fusarium* keratitis in Switzerland. *Klin Monbl Augenheilkd*, **2008**;225(5):418-421.
155. **Gaujoux T, Chatel MA, Chaumeil C, Laroche L, Borderie VM.** Outbreak of contact lens-related *Fusarium* keratitis in France. *Cornea*, **2008**;27(9):1018-1021.
156. **Ma SK, So K, Chung PH, Tsang HF, Chuang SK.** A multi-country outbreak of fungal keratitis associated with a brand of contact lens solution: the Hong Kong experience. *Int J Infect Dis*, **2009**;13(4):443-448.

157. **Cakir M, Imamoglu S, Cekic O, Bozkurt E, Alagoz N, Oksuz L, Yilmaz OF.** An outbreak of early-onset endophthalmitis caused by *Fusarium* species following cataract surgery. *Curr Eye Res*, **2009**;34(11):988-995.
158. **Gower EW, Keay LJ, Oechsler RA, Iovieno A, Alfonso EC, Jones DB, Colby K, Tuli SS, Patel SR, Lee SM, Irvine J, Stulting RD, Mauger TF, Schein OD.** Trends in Fungal Keratitis in the United States, 2001 to 2007. *Ophthalmology*, **2010** (basımda)
159. **Febré N, Silva V, Medeiros EAS, Godoy P, Reyes E, Hakler E, Fischman O.** Contamination of peritoneal dialysis fluid by filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol*, **1999**;16:238-239.
160. **Flynn JT, Meislich D, Kaiser BA, Polinsky MS, Baluarte HJ.** *Fusarium* Peritonitis in A Child On Peritoneal Dialysis: Case Report And Review Of The Literature. *Peritoneal Dialysis International*, **1996**;16:52-57
161. **García-Tapia A, Aznar E, García-Martos P, Marín P, Márquez A, Lozano C, Mira J.** *Fusarium* peritonitis in a patient on peritoneal dialysis. *Rev Iberoam Micol*, **1999**;16:166-167.
162. **Bibashi E, Kokolina E, Sigler L, Sofianou D, Tsakiris D, Visvardis G, Papadimitriou M, Memmos D.** Three cases of uncommon fungal peritonitis in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*, **2002**;22(4):523-525.
163. **Garbino J, Uckay I, Rohner P, Lew D, Van Delden C.** *Fusarium* peritonitis concomitant to kidney transplantation successfully managed with voriconazole: case report and review of the literature. *Transpl Int*, **2005**;18(5):613-618.
164. **García-Martos P, Gil de Sola F, Marín P, García-Agudo L, García-Agudo R, Tejuca F, Calle L.** Fungal peritonitis in ambulatory continuous peritoneal dialysis: description of 10 cases. *Nefrologia*, **2009**;29(6):534-539.
165. **Unal A, Kocyigit I, Sipahioglu MH, Tokgoz B, Oymak O, Utas C.** Fungal peritonitis in peritoneal dialysis: an analysis of 21 cases. *Int Urol Nephrol*, 2010 (Basımda)
166. **Gaur S, Rajgopal A, Ashbee R.** A successfully treated case of peritonitis due to *Fusarium dimerum*. *J Infect*, **2010**;61(1):86-88.
167. **Ahmad S, Johnson RJ, Hillier S, Shelton WR, Rinaldi MG.** Fungal peritonitis caused by *Lecythophora mutabilis*. *Journal Of Clinical Microbiology*, **1985**,22(2):182-186.
168. **Mukherjee PK, Sheehan DJ, Hitchcock CA, Ghannoum MA.** Combination Treatment of Invasive Fungal Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, **2005**;18:1163-194.
169. **Lalitha P, Shapiro BL, Srinivasan M, Prajna NV, Acharya NR, Fothergill AW, Ruiz J, Chidambaram JD, Maxey KJ, Hong KC, McLeod SD, Lietman TM.** Antimicrobial susceptibility of *Fusarium*, *Aspergillus*, and other filamentous fungi isolated from keratitis. *Arch Ophthalmol*, **2007**;125(6):789-793.

170. **Martos AI, Romero A, González MT, González A, Serrano C, Castro C, Pemán J, Cantón E, Martín-Mazuelos E.** Evaluation Of The Etest Method For Susceptibility Testing Of *Aspergillus* Spp. And *Fusarium* Spp. To Three Echinocandins. *Medical Mycology*, **2010**, Early Online, 1-4
171. **Martín de la Escalera C, Aller AI, López-Oviedo E, Romero A, Martos AI, Cantón E, Pemán J, García Martos P, Martín-Mazuelos E.** Activity of BAL 4815 against filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother*, **2008**;61(5):1083-1086.

ÖZGEÇMİŞ

Mersin ilinin Silifke ilçesinde 14.05.1971 yılında doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Mersin’de tamamladı. 1988 yılında Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Tıbbi Laboratuvar bölümüne girdi. Buradan 1990 yılında mezun oldu. 1992 yılında İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 1996 yılında mezun oldu. 1997 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2000 yılında bilim uzmanı olarak mezun oldu. 2003 yılında Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı. Buradan bir yıl sonra ayrıldı. 2004 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora eğitimine başladı.

Evli ve üç çocuk babası olup, yabancı dili İngilizce’dir.