



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-D-2009-001

**KÖPEKLERDE SİSTEMİK MANTAR ENFEKSİYONU
OLUŞTURAN *ASPERGİLLUS FUMİGATUS* VE BAZI
PATOJEN *CANDIDA* TÜRLERİNİN NESTED PCR
İLE SAPTANMASI**

Uzm. Vet. Hek. Serten TEKBIYIK

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA**

AYDIN-2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİK-D-2009-001

**KÖPEKLERDE SİSTEMİK MANTAR ENFEKSİYONU
OLUŞTURAN *ASPERGİLLUS FUMİGATUS* VE BAZI
PATOJEN *CANDIDA* TÜRLERİNİN NESTED PCR
İLE SAPTANMASI**

Uzm. Vet. Hek. Serten TEKBIYIK

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Osman KAYA**

AYDIN-2009

ÖNSÖZ

Mantarlar, Latince'de Fungus (tekil), Fungi (çoğul) ve Yunanca'da Myces sözcüklerinden türetilmiş, ökoryotik ve karbon heteretrof organizmalardır. Daha büyük, çok zehirli ve hakiki çekirdeğe sahip olmaları bakımından bakterilerden, fotosentetik pigmentleri olmadığı için bitki, alg ve mavi yeşil alglerden (Cynabacteria) ayrılırlar.

Mantarlar bir çok yönden insanlara faydalıdır. Bunlardan *Ascomycetes* türlerinin bazıları fermantasyon yan ürünlerinden peynir, ekmek, antibiyotik ve vitamin üretiminde rol aldıkları gibi bazı mantar türleri gliserin, enzim, yağ ve yem üretiminde rol oynarlar. Mantarlar hayvanlarda fırsatçı olarak yaşayıp hastalıklar meydana getirirler. Sistemik mantar infeksiyonları özellikle Veteriner alanda atlanan ve yanlış tedavi protokolleri ile kötü sonuçların ortaya çıktığı infeksiyonlardır.

Candidiazis prensipte oral mukoza ve deri gibi yüzeysel mukoz membranları etkileyen fırsatçı bir infeksiyondur. Sistemik candidiazis genellikle immunsupresyon, zayıf kondüsyon veya iatrojenik (uzun süreli antibiyotik alımı) uygulamalarla ilgilidir. Yine parvovirus, feline panleukopenia virus sekonder sistemik kandidiazisin nedenlerindedir.

Aspergillus fumigatus da alerjik bronkopulmoner aspergillozdan sistemik aspergilloza kadar geniş bir spektrumda infeksiyonlara sebep olan oportunistik bir patojendir.

Özellikle immun sistemi baskılanmış hastalarda invaziv mantar infeksiyonunun erken ve patojenin tür düzeyinde doğru tanısı tedavi için kritik bir noktadır.

Mantar infeksiyonlarının tanısında kullanılan biyokimyasal identifikasyon sistemlerinin tamamı mantar etkenlerinin yeterli derecede üremesini gerektirmektedir. Üreme, izolasyon, identifikasyon ve tiplendirme bir haftadan daha fazla zaman tutmakta ve elde edilen sonuçlar sıklıkla tanıda yetersiz olmaktadır. Oportunistik mantar infeksiyonlarının hızlı identifikasyon metodlarının geliştirilmesi sistemik mantar infeksiyonlarının tanısında da önem arz etmektedir. *Candida* türlerinin ve *Aspergillus fumigatus*'un daha hızlı ve tür düzeyinde tanısının yapılmasını sağlayan tekniklerin başında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) gelmektedir. Bilindiği üzere PCR, hızlı ve güvenilir en ideal çabuk tanı sistemidir.

Araştırmamızın amacı, bazı patojenik *Candida* türlerinin (*C. albicans*, *C. tropicalis II*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis I*, *C. parapsilosis II*) ve *Aspergillus fumigatus*'un nested polimeraz zincir reaksiyonu ile DNA topoisomerase II genine spesifik tanı ve identifikasyonlarının yapılmasıdır. Kullanılacak metot ile aynı PCR tüpü içerisinde beş *Candida* türü ve *Aspergillus fumigatus*'un tanısının yapılabilmesi hedeflenmektedir.

Bu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından SAE 08020 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

ADÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 25.10.2007 tarih ve B.30.2.ADÜ.0.06.00.00/124-HEK/2007/009 sayılı kararı ile bu araştırmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamıştır.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER	vi
ÇİZELGELER LİSTESİ	vii
RESİMLER LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Mikroskopik Morfolojilerine Göre Sınıflama	4
1.2. Üreme Özelliklerine Göre Sınıflama	4
1.2.1. Perfekt mantarlar	4
1.2.2. İmperfekt mantarlar	4
1.3. Yerleştikleri Bölgelere Göre Sınıflama	4
1.3.1. Kutan mikozezlere neden olanlar	4
1.3.2. Subkutan mikozezlere neden olanlar	4
1.3.3. Sistemik mikozezlere neden olanlar	5
1.4. Makroskopik Morfolojilerine Göre Sınıflama	5
1.5. Toksin Sentezlemelerine Göre Sınıflama	5
1.6. Mantar İnfeksiyonlarında Teşhis	6
1.6.1. Hasta örneklerinin mikroskopik incelenmesi ve bu örneklerden etkenin üretilmesi	7
1.6.2. Hastada şüphelenilen Mantar enfeksiyona karşı gelişmiş spesifik immun yanıtın gösterilmesi	8
1.6.3. Hasta örneklerinde etkenin antijenik yapısının gösterilmesi	9
1.6.4. Hasta örneklerinde etkenin metabolitlerinin ve yapısal komponentlerinin gösterilmesi	9
1.6.5. Hasta örneklerinde etkenin spesifik nükleik asitlerinin gösterilmesi	10
1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	11
1.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Prensipleri	12
1.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bileşenleri ve Koşullar	12

1.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çalışmalarında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar	14
1.7.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Analizi	15
1.7.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tabanlı Metotlar	16
1.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Mikolojide Uygulama Alanları	16
1.9. Mantar Teşhisinde PCR	20
1.10. Medikal Mikolojide PCR'ın Uygulama Alanları	21
2. GEREÇ VE YÖNTEM	33
2.1. Gereç	33
2.1.1. Örnekler	33
2.1.2. Standart Suşlar	34
2.1.3. Besiyerleri	34
2.1.4. DNA Ekstraksiyon Kiti	35
2.1.5. Primerler	35
2.1.6. Kod Dash DNA Polymerase	36
2.1.7. Solüsyonlar	37
2.1.8. Kullanılan Makine ve Teçhizat	37
2.2. Yöntem	38
2.2.1. Örnekler	38
2.2.2. DNA İzolasyonu	38
2.2.3. PCR'de amplifikasyonda kullanılan bileşenler ve reaksiyon konsantrasyonları	40
2.2.4. VI'lı Primer Karışımı (PsVI) hazırlanması	40
2.2.5. Pozitif Kontrol Karışım DNA hazırlanması	41
2.2.6. PCR inkubasyon sıcaklık ve süreleri	41
2.2.7. DNA elektroforezi ve PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi	42
2.2.8. Metodun Sensitivitesi	42
3. BULGULAR	43
4. TARTIŞMA	48
5.SONUÇ	58
6. ÖZET	59

7. SUMMARY	60
8. KAYNAKLAR	61
9. ÖZGEÇMİŞ	73
TEŞEKKÜR	74

KISALTMALAR VE SİMGELER

PCR	Polymerase Chain Reaction
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DGGE	Denatüre Gradient Jel Elektroforez
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rDNA	ribosomal DNA
ITS	Internal Transcribed Spacers
IGS	Intergenic Spacer
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
SCAR	Sequence-Characterized Amplified Region
IA	İnvaziv Aspergillozis

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1.7.2.1.:	Değişik PCR unsurlarının standart konsantrasyonları.	13
Çizelge 2.1.1.1.:	Alınan kan örneklerinin köpek ırklarına göre dağılımı	33
Çizelge 2.1.5.1.:	Primer isimleri, nükleotid sekansları ve primer çiftleri tarafından amplifiye edilen DNA ürünü.	36
Çizelge 2.2.3.1:	Nested PCR 1. Basamak PCR'da reaksiyon bileşen ve konsantrasyonları	40
Çizelge 2.2.4.1.:	Nested PCR II. Basamak reaksiyon bileşen ve konsantrasyonları	41
Çizelge 2.2.6.1.:	PCR inkubasyon sıcaklık ve süreleri	42
Çizelge 3.1.:	Pozitif örneklerinin köpek ırklarına göre dağılımı	43
Çizelge 3.2.:	Sistemik mantar infeksiyonu saptanan örneklerin köpek ırklarına göre dağılımı	45

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 3.1.1.: *Aspergillus fumigatus* ve *Candida* türleri için nested PCR 44
- Resim3.1.2.: *Aspergillus fumigatus* ve *Candida* türleri için nested PCR 46
- Resim 3.1.3.: PsVI ile nested PCR'ları dilusyonları yapılmış *Aspergillus fumigatus* Amplikonları 47

1. GİRİŞ

Mantarlar kök, gövde, yaprak, çiçek ve klorofile sahip olmayan ökaryotik, heterotrofik çok hücreli organizmalardır. Klorofilin bulunmaması nedeniyle fotosentez olayı mantarlarda görülmemektedir. Çok hücreli ve büyük olmaları, üreme tarzları, yaşam siklusları, çekirdek etrafında bir zarın bulunması, çok kromozoma sahip olmaları, nukleolus içermeleri ve hücre içi organellerin (mitokondrium, golgi aparatı, endoplasmik retikulum, vesikül, vakuol vs) bulunması gibi nedenlerle prokaryotiklerden ayrılırlar. Mantarlar doğada (kara ve sularda) çok yaygın bir yaşam spektrumu gösterirler. Büyük bir çoğunluğu saprofitik bir yaşantıya sahip olup kendilerine gerekli gıda maddelerini cansız materyallerden ve basit organiklerden temin ederler. Bir kısım mantarlar da, insan ve hayvanların yanı sıra, bitki, balık, kerevit, algler, insektler vs. canlılar üzerinde parazitik, simbiyotik veya kommensal bir yaşam içinde bulunurlar (Arda, M., 2000).

Günümüze kadar 110000' den fazla mantar türü (bunun 30000' den fazlası *Basidiomycetes*, 30000 den fazlası *Deuteromycetes*, 30000 den fazlası *Ascomycetes* sınıflarına aittir) saptanmış olup, bazılarının da karakterleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Çok doğaldır ki bu kadar fazla ve aynı zamanda çeşitlilik gösteren türlerin bütün özelliklerini ayrıntıları ile saptamak, açıklamak oldukça güçtür ve ayrıca zaman alıcıdır. Hatta, bazılarının biyokimyasal, sitolojik, fizyolojik ve genetik özellikleri de hala tam bir açıklığa kavuşturulamamıştır (Arda, M., 2000).

Doğadaki tüm mantarlar Alexopoulos (1979'da) tarafından yapılan sınıflamada *Mycetae* 'ye konulmaktadır. Bu da aşağıda belirtilen tarzda bir sınıflandırmaya tabi tutulmaktadır.

- Alem (Kingdom):** *Mycetae* (mantarlar)
- Divizyon:** *Mycota*
- Altdivizyon-1 :** *Myxomycota* (hücre duvarı olmayan mantarlar)
- Altdivizyon-2:** *Eumycota* (hücre duvarı olan mantarlar)
- Sınıf-1 :** *Mastigomycotina* (zoosporlu mantarlar)
- Sınıf-2 :** *Zygomycotina* (*Zygomycetes*)
- Sınıf-3 :** *Ascomycotina* (*Ascomycetes*)
- Sınıf-4 :** *Basidiomycotina* (*Basidiomycetes*)
- Sınıf-5 :** *Deuteromycotina* (*Deuteromycetes, fungi imperfecti*)

Mantarlar da aynen bakterilerde olduğu gibi, binomial sisteme göre iki kelime ile adlandırılırlar. Bunlardan ilki cins (genus) adı olup büyük harfle başlar. Diğeri ise tür (species) ismi olup küçük harfle başlar ve yazılır. Bu isimler de italik olarak yazılır (Arda, M., 2000).

Mantarların alt bölümlerinin belirlenmesinde de, genellikle, bitkilere uyulmaktadır. Bu sıralama aşağıdaki şekildedir.

Alem, divizyon, alt divizyon, sınıf, altsınıf, order, familya, seksiyon, kabile, cins ve tür.

Bu düzenlemeye göre, patojenik bir mantar olan *Histoplasma capsulatum*'un durumu aşağıdaki gibidir.

Alem:	<i>Mycetae</i>
Divizyon:	<i>Mycota</i>
Altdivizyon:	<i>Eumycota</i>
Sınıf:	<i>Deuteromycetes</i>
Order:	<i>Moniliales</i>
Familya:	<i>Moniliaceae</i>
Seksiyon:	<i>Amerosporeae</i>
Kabile :	<i>Eleuriosporeae</i>
Cins:	<i>Histoplasma</i>
Tür:	<i>Histoplasma capsulatum</i>

Yukarıda açıklanan mantar bölümlerini ifade etmede mantarların sonlarına bazı ekler konulmaktadır. Örneğin: divizyon ...mycota ; sınıf ..mycetes ; alt sınıf ...mycetidae ; orderales ; familya ...aceae gibi eklerle ifade edilirler (Arda, M., 2000).

Mantarları klasifiye etmede, bunların başlıca, makroskopik ve mikroskopik morfolojileri, miselyal özellikleri, spor, sporulasyon ve sporangium şekilleri, yaşam siklusları, üreme tarzları ve diğer önemli karakterleri dikkate alınmaktadır. Ancak, bakterilerde olduğu gibi, mantarlarda da henüz kesinleşmiş ve yerleşmiş bir sistematik bulunmamaktadır.

Mantarlar üreme şekillerine göre başlıca iki gruba ayrılırlar:

1. Mayalar: Tek hücreli, blastospor oluşturan, hem 37 C^o'de, hem de 28 C^o'de, 2-3 günde yuvarlak, iri, beyaz, ekşi kokulu maya kolonilerini oluşturan mikroorganizmalardır. Örnek olarak *Candida*, *Cryptococcus* verilebilir.

2. Küfler: Çok hücreli, hif adı verilen filamentöz iplikçikler oluştururlar ve en iyi oda ısısında ürerler. Mantarlar hayatlarını, tüm evrelerinde maya yada küf şeklinde sürdürürlerse bu tür mantarlara monofazik (tek biçim), 25 °C'de küf, 35°C'de maya

formunda olanlara difazik (iki biçim) mantarlar adı verilir. Difazik mantarlar oda ısısından veya doğada küf olarak, insan vücudunda maya şeklinde bulunurlar. Örneğin *Histoplazma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Sporothrix schenkii* gibi (Baydar S., 1990).

Patojenik mantarlar, yukarıda açıklanan kriterler dikkate alınarak bazı sınıflandırmalara tabi tutulmuşlardır. Bunlar da özetle şöyledir:

1.1. Mikroskopik Morfolojilerine Göre Sınıflama

Bu sınıflamaya göre, mantarların hifa yapısı (septumlu, septumsuz, branşlı, spiral, makro ve mikro konidiumlar, artrospor, klamidospor, blastospor, vs.), konidiumlar (basit, kompleks, vs.) ve sporangioforların özellikleri dikkate alınır.

1.2. Üreme Özelliklerine Göre Sınıflama

1.2.1. **Perfekt mantarlar:** Seksüel veya hem seksüel ve hem de aseksüel üreme yeteneğine sahip olan mantarlardır.

1.2.2. **İmperfekt mantarlar:** Sadece aseksüel üreme sistemine sahip olan mantarlar için kullanılan bir terimdir. Çünkü, böyle mantarların seksüel durumları henüz bilinmemektedir.

1.3. Yerleştikleri Bölgelere Göre Sınıflama

1.3.1. **Kutan mikozelelere neden olanlar:** Bunlar derinin kutan tabakasında yerleşerek hastalıklara neden olurlar. Epidermofiton, Mikrosporom, Trikofiton cinslerine ve diğer cinslere ait mantar türleri gibi.

1.3.2. **Subkutan mikozelelere neden olanlar:** *Sporotrichum schenkii*, *Rhinosporidium seeberi*, vs. mantarlar subkutan dokulara yerleşerek bozukluklara yol açarlar.

1.3.3. **Sistemik mikozezlere neden olanlar:** Bazı mantarlar da çeşitli iç organlara yerleşerek hastalık meydana getirirler. Bunlar arasında, *A. fumigatus*, *C. albicans*, *B. dermatitidis*, *C. immitis*, *C. neoformans*, *H. capsulatum*, *N. asteroides*, *N. brasiliensis* vs. vardır (Arda, M., 2000).

1.4. Makroskopik Morfolojilerine Göre Sınıflama

Bu tür sınıflamada koloni morfolojisi esas alınmaktadır. Miselyal ve maya benzeri koloniler, difazik ve monofazik mantarlar, yuvarlak, oval, vs. durumlar dikkate alınır.

1.5. Toksin Sentezlemelerine Göre Sınıflama

Mikotoksin sentezleyenler ve sentezlemeyenler olarak başlıca iki grup mantar oluşturulabilmektedir.

Mantarlar, çok çeşitli olmaları nedeniyle, makroskopik ve mikroskopik morfolojik karakterleri yönünden oldukça geniş bir varyasyon gösterirler. Bu durumları, her ne kadar, genetik özelliklerine bağlı ise de yaşlanma (kültürlerin eskiliği), beslenme ve çevresel koşulların etkisi ile de yakından ilişkilidir. Hatta aynı koloni içinde, yaşlanmaya bağlı olarak koloninin ortası ile çevresi arasında makrokonidiumların şekli, büyüklüğü ile hifaların morfolojileri yönünden farklar bulunmaktadır. Bu nedenle, özellikle patojenik mantarların birbirlerinden ayrılmasında, sadece bir iki karakter yanı sıra diğer özelliklerini de dikkate almakta büyük yararlar bulunmaktadır (Arda, M., 2006).

Mantarların büyük çoğunluğu (*Ascomycetes*, *Zygomycetes*, *Deuteromycetes* vs.) filamentöz bir koloni morfolojisine (küfler) sahip olmalarına karşın, bazıları da mukoid bir üreme gösterirler (mayalar). Böyle karakterde olanlar arasında *Candida*, *Saccharomyces* vs. cinslerine ait olan türler örnek olarak verilebilir (Arda, M., 2006).

1.6. Mantar İnfeksiyonlarında Teşhis

Mantarlar son yıllarda giderek önem kazanmaya başlayan mikroorganizmalardır. Doğada çok sayıda mantar türü bulunmakla beraber (yaklaşık 100,000-150,000), çok azı (150-200) insanlarda ve hayvanlarda hastalık oluşturur (Hoog G.S. ve ark., 2000). Bununla beraber; kanserli hastalara uygulanan agresif kemoterapötik yaklaşımlar, yoğun bakım hastalarına uygulanan ileri yaşam destekleri ve organ nakillerindeki başarılar hastaların yaşam sürelerini uzatmakta ve mantar infeksiyonları açısından risk altında olan bu hastaların örneklerinde, farklı türlerle de karşılaşılabilir. Bu nedenle, hasta örneklerinde üreyen (besiyeri kontaminasyonu olmamasına dikkat edilmelidir) her tür mantarın tanımlanması gerekir. Ancak mantarların tanımlanmasında morfolojik özelliklerin ön planda olması, mikoloji ile uğraşacak kişilerde deneyimi gerektirir (Fromtling R.A. ve ark., 2003).

Mantar infeksiyon etkenlerinin laboratuvar tanısında çeşitli yöntemler kullanılabilir. Laboratuvar çalışmasının, en doğru, en ucuz ve en kısa sürede sonuçlanacak yöntemi hastanın örneğine ve ön tanıya göre seçmesi gerekir.

Laboratuvar tanı yöntemleri aşağıdaki şekilde incelenebilir:

- 1- Hasta örneklerinin mikroskopik incelenmesi ve bu örneklerden etkenin üretilmesi
- 2- Hastada şüphelenilen mantar infeksiyona karşı gelişmiş spesifik immün yanıtın gösterilmesi
- 3- Hasta örneklerinde etkenin antijenik yapısının gösterilmesi
- 4- Hasta örneklerinde etkenin metabolitlerinin ve yapısal komponentlerinin gösterilmesi
- 5- Hasta örneklerinde etkenin spesifik nükleik asitlerinin gösterilmesi.

1.6.1. Hasta örneklerinin mikroskopik incelenmesi ve bu örneklerden etkenin üretilmesi

Hasta örneklerinin toplanması ve incelenmesi:

Başarılı sonuç alınabilmesi için hasta örneklerinin alınması ve laboratuvara naklinde dikkatli ve titiz olmak gerekir. Hızlı üreyen bakteriler ve saprofitik mantarların patojenleri baskılamaması ve ayrıca mantar elemanlarının canlılığının aşırı sıcak ve soğuktan etkilenmemesi için örneklerin oda ısısında 2 saat içinde laboratuvara ulaştırılması ideal olmaktadır (Merz W.G ve Roberts G.D., 2003).

Eğer gecikme kaçınılmaz ise, örneklerin çoğu yine oda ısısında bekletilmelidir. Ancak merkezi sinir sistemine ait örnekler 30°C'da, bakteri kontaminasyonu yoğun olan örnekler (dış kulak yolu sürüntüsü, alt solunum yolları örnekleri, idrar gibi) ve beyin omurilik sıvısı (BOS) dışındaki steril vücut sıvıları ise 4°C'da bekletilir (Ener B., 2006).

Direkt mikroskopik inceleme:

Uygun bir şekilde laboratuvara ulaştırılan ve işlenen hasta örnekleri öncelikle mikroskopik olarak incelenir. Direkt mikroskopik incelemenin çok büyük önemi vardır. Hasta örneklerinde patojen mantarların üremesi için uzun zamana ihtiyaç olabilir ve dolayısıyla birkaç dakika ya da saat içinde sonuçlanabilecek direkt mikroskopik inceleme laborant için çok yararlıdır. Bunun ötesinde bazı mantar elemanlarının bazı hasta örneklerinde görülmesi patognomonik olup kesin tanıyı da koydurabilir. Örneğin *Histoplasma capsulatum*'a ait maya hücrelerinin kan ya da kemik iliği makrofajları içinde; *Pneumocystis jiroveci (carinii)*'nin kistlerinin, *Blastomyces dermatitis*'in maya hücrelerinin ve *Coccidioides immitis*'in sferüllerinin balgam örneklerinde görülmesi oldukça önemli bulgulardır (Merz W.G ve Roberts G.D., 2003). Ancak; direkt mikroskopik incelemenin önemine rağmen, negatif sonuçların mantar infeksiyonu olasılığını ortadan kaldırmayacağını unutmamak gerekir.

Örneklerin alındığı anatomik bölgeye, incelenen örneğin miktarına, örnekte bulunan mantar elemanlarının yoğunluğuna ve inceleyen kişinin titizliğine bağlı olarak yalancı negatif sonuçlar oluşabilir. Bunun tersi yağ damlacıkları, parçalanmış lökositler maya hücreleri ile karışarak; kollagen lifler ya da ekivyonla alınan örneklerdeki lifler küf mantarlarıyla karışarak yalancı pozitiflikler de oluşturabilirler. Dolayısıyla hastanın zararına yol açmamak için incelemelerin büyük bir dikkatle yapılması gerekir (Ener B., 2006).

Hasta örneklerinin kültürü:

Direkt inceleme oldukça önemli olmakla beraber, hasta örnekleri mutlaka uygun besiyerlerine etken mantarların üretilmesi amacıyla ekilmelidir.

1.6.2. Hastada şüphelenilen mantar enfeksiyona karşı gelişmiş spesifik immun yanıtın gösterilmesi

Kompleman birleşme (KB), immundifüzyon (ID), lateks aglütinasyon (LA), enzim immünassay (EIA) gibi testler mantar antijenlerine karşı dolaşımdaki antikörleri belirlemek amacıyla en sık kullanılan serolojik yöntemlerdir. Ancak bu yöntemlerden hiçbiri mantar enfeksiyonlarını yüksek özgüllük ve duyarlılıkta tanımlayamamaktadır. Tek bir serum örneği ile tanıya ulaşmak, titre çok yüksek olmadıkça mümkün değildir. İki-üç hafta ara ile alınan örneklerde dört kat titre artışı enfeksiyon lehine bir bulgu olmakla beraber, mantar enfeksiyonları genellikle immunolojik olarak baskılanmış kişilerde geliştiğinden yeterli antikör yanıtı olmayıp, yalancı negatiflikler testlerin duyarlılığını düşürmektedir. *Candida*'larda sıklıkla görüldüğü gibi, mukoza yüzeylerindeki kolonizasyonlar ise yalancı pozitif sonuçlara yol açarak testlerin özgüllüklerini de ayrıca azaltmaktadır (McGinnis M.R., Tilton C.R., 1994).

1.6.3. Hasta örneklerinde etkenin antijenik yapısının gösterilmesi

Hasta serumlarında antikor tespitinin olumsuzlukları, spesifik mantar antijenlerinin aranmasını gerekli kılmış olup, bugün için kriptokokkoz, aspergilloz, kandidoz ve histoplazmozda antijen tarama testleri rutin laboratuvarlara girmiştir. Ticari olarak temin edilebilen LA ve EIA kitleri bulunmaktadır. Uygun çalışıldığı takdirde bu kitler ile özgül ve duyarlı sonuçlar almak mümkündür (Merz W.G ve Roberts G.D., 2003).

1.6.4. Hasta örneklerinde etkenin metabolitlerinin ve yapısal komponentlerinin gösterilmesi

Mantara özel metabolitlerin gösterilmesi tanı ve tedavinin izlenmesinde oldukça yararlı olmakla beraber, ticari olarak temin edilebilecek hiçbir standart kantitatif kit bulunmamaktadır. D-arabinitol ve D-mannitol mantarlara ait iki poliol olup, infeksiyonlarda in-vivo olarak ortaya çıkarlar. Bunların belirlenmesi tanıya destek olduğu gibi; konsantrasyonlarının azalması mantar metabolizmasının yavaşlaması ile iyi, yükselmesi ise mantar metabolizmasının hızlanması ile kötü hastalık seyrini gösterir (Walsh T.J. ve ark., 1995).

D-arabinitol *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* ve *Candida pseudotropicalis* tarafından oluşturulan mantar spesifik bir metabolittir. İdrar örneklerinde D-arabinitol / L-arabinitol oranı belirlenir. Bunun için gazlikit kromatografi ile her iki izomer ayrılır ve miktarları tesbit edilerek oran belirlenir. Oranın yükselmesi invazif infeksiyon lehine bir bulgudur. % 88 duyarlı bir yöntemdir (Christensson B. ve ark., 1997). Yeni doğanlar dahil olmak üzere birçok hasta grubunda çalışmalar yapılmıştır (Salonen J.H. ve ark., 2001, Sigmundsdottir G. ve ark., 2000). Bir başka yaklaşım ise D-arabinitol / kreatin oranının belirlenmesidir. D-arabinitol, bu sefer izomere spesifik enzimatik bir deneyle kantite edilir ve kreatin ile oranlanır. Bu yol ile yapılan çalışmalarda duyarlılık % 70, özgüllük % 86 olarak bulunmuştur (Walsh T.J. ve ark., 1995). D-mannitol bazı mantarlar tarafından oluşturulan diğer bir metabolittir. *Cryptococcus neoformans* menenjitlerinde tedavinin izlenmesinde iyi bir parametredir (Wong B. Ve ark., 1990).

Klonlanmış olan D-mannitol dehidrogenaz enzimi laboratuvar deneylerinde kullanılan enzimdir (Perfect J.R. ve ark., 1996).

Bir diğerk tanı yolu ise mantar hücre duvarı komponentlerinden D-glukanın serumda tanınmasıdır. Ancak bu komponent tek bir mantar türü için spesifik olmayıp *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* türleri için kullanılabilir. Deneyin esası *Limulus* koaglutinasyona dayanmaktadır. Kromojenik son noktası olan ve spektrofotometrik olarak okunan bir testtir. Test kantitatif olup 1 pg'a kadar olan miktarları ölçebilir. Kandidemilerde testin duyarlılığı % 84.4- 100 civarında, özgüllüğü ise % 88 olarak bulunmuştur (Obayashi T. ve ark., 1995). Yüksek riskli hastalardaki *Candida* infeksiyonlarında PCR ile karşılaştırmalı çalışmalarda D-glukan testi % 75 duyarlı bulunurken PCR % 54 duyarlı bulunmuştur (Mori T., Matsumura M., 1999). Hasta örneklerinde metabolitler ve yapısal komponentlere dayanarak yapılmaya çalışılan laboratuvar tanı halen kolay olmayıp her koşullarda yapılamaz. Bunun ötesinde ümit verici sonuçlar olsa da standart ve tekrarlanabilirlik az olduğundan rutin için bu testler önerilemez (Ener B., 2006) .

1.6.5. Hasta örneklerinde etkenin spesifik nükleik asitlerinin gösterilmesi

Hasta ve doku örneklerinin mikroskopik incelemesi, mantar infeksiyonlarının tanısında oldukça özgül ve bu nedenle çok önemli olmakla beraber, duyarlılığın düşük olması farklı tanı yollarını gerekli kılmıştır. Klinik örneklerin ekimi ve etkenin üretilerek gösterilmesi daha duyarlı olmasa da mantarlar geç üreyen mikroorganizmalar olduğundan üremenin beklenmesi zaman kaybına yol açmaktadır. Oysa bağışıklığı bozuk hastalarda mantar infeksiyonları aniden başlar, hızlı seyir gösterir ve tedavi edilmez ise ölümle sonuçlanır. Bu tür hastalarda antikor yanıtı da iyi olmadığından serolojik testlerin başarısı ne yazık ki düşüktür. Antijen ve metabolit tarayan testler ümit verici olmakla beraber altın standartta bir test henüz geliştirilememiştir. Dolayısıyla nükleik asit tespitine dayalı tanı yolları gündeme gelmiş, daha yeni olmakla beraber bazı sonuçlar alınmaya başlanmıştır (Merz W.G., Roberts G.D., 2003).

Nükleik asit tespitine dayalı yöntemleri kullanmadan önce mutlaka amplifikasyonun yapılması gerekir. Bu PCR ya da başka bir yol ile olabilir. Mantar infeksiyonlarının tanısında önemli bir hasta örneği olan solunum yolu örnekleri, ne yazık ki bir çok mantar türü ve bakteriler ile karışık olan örneklerdir. Dolayısıyla mantar nükleik asitlerini yıkabilecek DNase ve RNase'in bol olabileceği bu örneklerden doğru amplifikasyon kolay değildir (Merz W.G., Roberts G.D., 2003).

Ulaşılması gereken hedef doğru konsantrasyon ve saflaştırmayı sağlamaktır. Steril vücut sıvılarında ise özellikle küf mantarları oldukça seyrek bulunur. Bununla beraber çalışmalar kandidoz ve aspergilloz tanısında yoğunluk kazanmıştır. En heyecan verici amplifikasyon sonuçları "realtime PCR" ile elde edilmiştir. Bu yol ile aspergilloz tanısında oldukça önemli gelişmeler vardır (Buchheid D. ve ark., 2001 , Costa C.D. ve ark., 2001). Ancak çalışmalar araştırma programları olan akademik merkezlerde sınırlı kalmıştır. Ayrıca maliyet oldukça yüksektir. Duyarlılığı artıracak ve maliyeti düşürecek bir çok çalışmanın daha yapılması gereklidir (Merz W.G., Roberts G.D., 2003).

1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu moleküler biyolojide yaygın uygulama alanı bulan etkili bir metottur. Bu enzimatik reaksiyon, kompleks DNA örneklerinden spesifik DNA fragmentlerinin in vitro amplifikasyonuna ve mikrogram düzeyde hedef DNA oluşmasına olanak sağlar. PCR amplifikasyonu ile herhangi bir nükleik asit sekansı klonlanabilir, analiz veya modifiye edilebilir ve hatta nadir sekanslar keşfedilebilir. 1985'te keşfinden bu yana bu teknolojinin özgünlüğü, duyarlılığı ve hızı tüm organizma sınıflarındaki biyolojik araştırma alanlarında yeni metodların gelişmesine olanak sağlamıştır. Mantar genetiğini ve sistematüğini içeren mikolojinin birçok alanında, ekoloji ve toprak mikrobiyolojisi, bitki patolojisi, medikal mikoloji, mantar biyoteknoloji ve daha birçok alanda PCR için geniş uygulama alanları bulunmuştur. Ayrıca, mantar çalışmaları PCR ile ilerleyerek devam edecektir. Pek çok gelişme, modifikasyonlar ve yeni uygulamalar düzenli olarak rapor edilmiştir (Edel V., 1998).

1.7.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Prensipleri

Polimeraz Zincir Reaksiyonu, in vitro DNA sentezi ile spesifik DNA fragmentlerinin amplifikasyonuna olanak sağlar (Saiki ve ark., 1985, Mullis ve ark., 1986, Mullis ve Faloona, 1987). Standart metod amplifiye edilmiş genomic DNA ve bu hedef bölge yanında yer alan iki oligonukleotid primer içerir. Amplifikasyon Taq polimeraz denen ve *Thermus aquaticus*'tan izole edilen ısıya dayanıklı bir DNA polimeraza dayanır (Saiki ve ark., 1988). Bütün PCR reaksiyon unsurları karıştırılır ve bunu takiben DNA denatürasyonu, primer bağlanması ve uzatma aşamalarını içeren prosedür takip edilir. İlk basamakta reaksiyon karışımı yüksek sıcaklıkta (90-95 °C) inkübe edilerek çift zincirli DNA denatürasyonu sağlanır. Karışımın 55°C civarındaki bağlanma sıcaklığına soğutulması ile beraber, hedef spesifik primerler iki adet tek zincirli DNA iplikçığının 5' ucuna bağlanır. Uzama basamağında sıcaklık 72 °C ye yükseltilir ve hedef primer hibridizasyonları yeni DNA zincirinin sentezi için başlangıç noktası olur. Her basamak için inkubasyon süresi yaklaşık 1-2 dakikadır. Birbirini izleyen bu üç basamak PCR'ın bir siklusuna tekabül eder. İkinci siklуста yeni sentezlenmiş DNA zincirleri orijinal zincirden denatürasyon ile ayrılır, her zincir uzama ve bağlanma basamaklarının uygulanması ile siklus tamamlanır. Teorik olarak PCR da n siklus sonucunda, 2n hedef DNA zincirinin amplifikasyonu şekillenir. Tipik olarak, PCR 30-40 siklustan oluşur. Reaksiyonun başlangıcından itibaren PCR karışımının içinde ısıya dayanıklı DNA polimeraz içeren bütün unsurlar bulunduğu için amplifikasyon prosedürü otomatize edilebilir ve termal cycler ile birlikte programlı ısıtma ve soğutma ile yapılabilir (Edel V., 1998).

1.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bileşenleri ve Koşullar

Genomic DNA, oligonukleotid primerler, DNA polimeraz ve deoksiribonukleotid trifosfatlar (dNTPs) magnezyum iyonları (MgCl₂) içeren uygun bir tamponda karıştırılır. Reaksiyon karışımının hacmi genellikle 25-100 µl arasındadır. Aşağıda çizelge 1.7.2.1'de değişik PCR unsurlarının standart konsantrasyonları verilmiştir. Bunlar birçok hedef dizilimin amplifikasyonunu sağlar, fakat her yeni PCR uygulaması için optimize edilebilir (Innis ve Gelfand, 1990). Örnek olarak, MgCl₂ nin Taq DNA polimeraz ile amplifikasyonda başlangıç konsantrasyonu 1,5 mM dır. Eğer tatmin edici sonuçlar elde

edilmezse, bu konsantrasyon optimize edilir. Daha yüksek $MgCl_2$ konsantrasyonu amplifiye ürünleri artırır fakat özgünlüğü azaltır ve düşük konsantrasyon özgünlüğü arttırdığı gibi ürünü azaltır. Buna benzer şekilde, her basamaktaki ısı ve zaman koşulları özellikle bağlanma basamağında her hedef dizilim ve primer çifti için optimize edilebilir. Bağlanma sıcaklığı genellikle amplifikasyon ürünü ve spesifitede en iyi sonuç alınana dek yükselttilerek ampirik olarak optimize edilir (Edel V., 1998).

Çizelge 1.7.2.1: Değişik PCR unsurlarının standart konsantrasyonları.

Bileşen	Konsantrasyon
Genomic DNA	10-100 ng
Amplifikasyon buffer	Final hacmin 1/10'u
$MgCl_2$	0.5- 5 mM (genellikle 1.5 mM)
dNTPs	20-200 μM herhangi bir dATP, dCTP, dGTP ve dTTP
Primer 1	0.1-0.5 μM
Primer 2	0.1-0.5 μM
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.5-2.5 ünite
Steril Distile su	Final hacime kadar
Final hacim	25-100 μl

Klasik PCR amplifikasyonu için seçilen uygun primerlerden minimal dizi bilgisi gereklidir. Primerler genellikle 18-28 nükleotid uzunluktadır ve amplifiye edilecek DNA sekansına göre hazırlanır. Primerler 5'→3' şeklinde yazılır. Primer dizaynında iki parametre çok önemlidir: amplifikasyonun verimlilik ve özgünlüğü. Örneğin, önemli kural primerlerin 3' sonları arasında tamamlayıcılık şekillenmemelidir, primer-dimerlerin oluşmasından kaçınmak amplifiye edilmiş ürünün verimliliğini azaltabilir. Primer dizaynındaki genel kavramlar tanımlanmıştır (Dieffenbach ve ark., 1993; He ve ark., 1994; Rychlik, 1995). Primerlerin spesifitesi reaksiyon karışımına özel bileşiklerin eklenmesi (Filichkin ve Gelvin, 1992) veya 'touchdown' (Don ve ark., 1991), 'hot start' PCR gibi özel yöntemlerin kullanılmasıyla artırılabilir (Chou ve ark., 1992). Touchdown polimeraz zincir reaksiyonunda, ilk siklus normalden daha yüksek bir bağlanma sıcaklığına çıkılır (10°C daha yüksek). Bu sıcaklık daha sonra her siklusta, en iyi bağlanma sıcaklığını

yakalayana kadar 1°C düşürülür ve kalan sikluslar bu sıcaklıkla tamamlanır. Hot start PCR'unda, PCR için gerekli en az bir unsur ilk ısıl denatürasyon basamağında amplifikasyon karışımından fiziksel olarak balmumu vasıtasıyla ayrılır. İlk ısıtma basamağı balmumunu eritir ve tüm içeriğin iyice karışmasını sağlar. Bu 'hot start' protokol templeyitin ilk ısıl denatürasyonu aşamasında primerlerle olan non-spesifik bağlanmalarını engeller.

Standart PCR'nda *Taq* DNA polimeraz kullanılır fakat diğer termostabil DNA polimerazlar da PCR amplifikasyonları için uygundur. Son zamanlarda rekombinant DNA polimerazlar da geliştirilmiştir. DNA polimeraz seçimi PCR uygulamasına ve kullanılan çeşitli enzimlerin özelliklerine dayanır (Arnheim ve Erlich, 1992). PCR, klasik olarak 4000 baz çiftinden daha kısa uzunluktaki hedef DNA sekanslarını amplifiye eder, ancak daha uzun DNA parçalarını amplifiye eden protokoller de geliştirilmiştir (Kainz ve ark., 1992; Cheng ve ark., 1994).

1.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çalışmalarında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

Reaksiyonlar klasik olarak her bir bileşenden küçük hacimler katılarak 25–100 µl final hacim ile yapılır. Bu çok basamaklı pipetleme hata olasılığını artırır. Birçok örnek genellikle aynı durumda amplifiye edilir ve tüm örnekler için bileşenleri içeren karışımın DNA eklenmeden hazırlanması tavsiye edilir. Bu karışım daha sonra tüplere dağıtılır ve son olarak DNA templete ilave edilir. Çünkü PCR'ın küçük DNA dizilerini amplifiye edebilme yeteneği DNA templete'inin yabancı bir DNA ile kontaminasyonunda her iki hem hedef hem de kontaminant DNA'nın amplifikasyonunu gerçekleştirir. Bu özellikle non-spesifik primerlerin kullanımında daha çok şekillenir. Kontaminasyona karşı yalancı pozitif amplifikasyonları tespit etmek için denemeler diğer örneklerle aynı bileşenleri içeren fakat DNA içermeyen negatif kontrol içermelidir. PCR çalışmaları pozitif kontrol de içermelidir (amplifiye edilmiş referans templeyt DNA). Yanlış negatif amplifikasyonlar thermocycler, reagent veya DNA polimerazlardaki inhibisyona bağlı da şekillenebilir.

PCR da bazı tedbirler almak kontaminasyon riskini minimize eder. Bu tedbirlerden ilk önerilen PCR çalışmaları için laboratuarda sabit bir alan belirlemek ve sabit otomatik

pipetlerin kullanılmasıdır. Ayrıca PCR çalışmalarında steril tüp, steril pipet uçları kullanılmalı ve mutlaka eldiven giyilmelidir. Bu önlemler steril kabin kullanılarak UV ışık altında yapılabilir. Bunun yanında, PCR’da kullanılan değişik bileşenler kontamine olabilir ve bundan kaçınmak için primer stok solusyonları, dNTP’ler, buffer ve steril su küçük miktarlarda hazırlanabilir. Bu aynı stoktan birçok kere pipetleme yapılmasının önüne geçer ve bir problem şekillendiğinde yeni stoktan kullanma şansı sağlar. dTTP (Longo ve ark., 1990) ve urasil glikolaz yerine dUTP kullanımı veya gama ışınlamadan kaçınma (Deragon ve ark., 1990) kontaminasyonu minimize etmek için kullanılması gereken diğer spesifik prosedürlerdir.

1.7.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Analizi

Birçok uygulamada, PCR ürünleri gözle görülür hale getirilir. PCR ürünleri Agaroz veya poliakrilamid jellerde boyutlarına göre elektroforetik olarak ayrılır ve ethidium bromide veya gümüş boyama ile görünür hale getirilirler. PCR esnasında işaretlenmiş dNTP ve primerler kullanılarak veya spesifik problemlerle hibridizasyon sağlanarak daha hassas bir PCR sağlanabilir (Höltke ve ark., 1995; Inazuka ve ark., 1996). Kapillar elektroforez gibi diğer yaklaşım tarzları ürün analizinin otomatize edilmesine olanak sağlamaktadır (Martin ve ark., 1993). Kapillar elektroforez DNA fragmentlerini büyüklüklerine göre ayırır ve sonuçlar bir elektroforegram olarak gösterilebilir. Analiz edilen DNA örneğine bilinen konsantrasyonda standart DNA merdiveni eklenmesi PCR ürünlerinin hem büyüklük hem de niceliklerinin saptanmasına izin verir.

PCR amplifikasyonu ile meydana getirilmiş hedef DNA’lar çeşitli genetik analizler ile karakterize edilir. PCR ile amplifiye edilmiş DNA fragmentlerinin direkt sekansına dair birçok strateji geliştirilmiştir (Bevan ve ark., 1992, Rao, 1994). Denatüre Gradient Jel Elektroforez (DGGE), sekans dışında amplifiye edilmiş DNA’nın direkt olarak analizi için kullanılmaktadır. Bu teknik özellikle hedef dizideki mutasyonların tanımlanmasında kullanışlıdır ve aynı uzunluk fakat farklı nukleotid dizilerindeki DNA ürünlerinin ayrılmasına izin verir (Fisher ve Lerman, 1983; Sheffield ve ark., 1989). Buna benzer, tek zincir konformizm polimorfizm [Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)] analizi de (Orita ve ark., 1989; Fujita ve Silver, 1994) amplifiye edilmiş ürünlerdeki sekans

varyasyonlarını ve nokta mutasyonları tespit etmede güçlü bir metottur. DGGE'ye karşılık, SSCP analizi poliakrilamid jellerde denatürasyon yapılmayan durumlarda uygulanır, fakat DNA örnekleri elektroforezden önce denatüre edilir. PCR ürünleri arasındaki varyasyonlar restriksiyon endonükleaz sindirimi ile gösterilir. Değişik suşlardan elde edilen PCR ürünleri birçok enzimle muamele edilir ve son muameleden sonra elektroforezle ayırt edilir. Eğer sekans farklılıkları, özel enzimler için restriksiyon bölgeleri içinde lokalize olursa, PCR ürünlerinin birçok enzim ile kesilmesi farklı elektroforetik paternlerin oluşmasına neden olacaktır. RFLP (restriction fragment length polymorphism)'in stratejisi büyük örneklerin görünür hale getirilmesidir ve genellikle taksonomik, ekolojik çalışmalarda kullanılır (Edel V., 1998).

1.7.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tabanlı Metotlar

PCR ilk tanımlandığından beri orijinal prosedürün birçok modifikasyonu geliştirilmiştir. Nested PCR'nda olduğu gibi standart prosedür basit modifikasyonlarla daha sensitif ve spesifik yapılabilir. Nested PCR'da, PCR ürünleri ilk primerlerin orta kısmında bulunan ikinci çift primerlerle ikinci bir amplifikasyona tabi tutulur (Dieffenbach ve ark., 1993). 'Quantitative PCR' metodu hedef DNA sekansının sayısı hakkında fikir verir (Cross, 1995). Templatde (DNA yerine RNA) veya primer tiplerinde (hedef spesifik primer yerine rasgele seçilmiş) orijinal prosedürden farklı olarak yapılacak basit değişimler yeni gelişimler sağlanmıştır ve bunlar PCR teknolojisinde uygulama alanlarını oldukça artırmıştır. Sonuç olarak, yeni gelişen in-situ PCR metodları hem tanı hem de genetik analizler açısından umut vericidir.

1.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Mikolojide Uygulama Alanları

PCR'da ilk basamak template DNA'nın hazırlanmasıdır. Mantarlardan nükleik asit ekstraksiyonu ile ilgili birçok protokol mevcuttur. Bunlardan bazıları, restriksiyon enzim analizleri ve diğer moleküler uygulamalar için uygun olan mikrogram düzeylerde saf genomik DNA izolasyonuna izin verir (Raeder ve Broda, 1985, Rogers ve Bendich, 1988). Bununla birlikte, genellikle basit ve hızlı prosedürler kullanılır çünkü PCR amplifikasyonu

için çok küçük miktarlarda DNA'ya ihtiyaç vardır (Lee ve Taylor, 1990; Steiner ve ark., 1995). DNA; toprak, bitki (Zhou ve ark., 1996) veya klinik örnekler (De Barbeyrac ve ark., 1996) gibi kompleks ve çevreden alınan örneklerden ekstrakte edilebilir. Spesifik primerlerin kullanılması ile böyle karışık DNA'lardan direkt mantar DNA amplifikasyonu mümkündür. Bu teknikler özellikle, ekolojik çalışmalar için ve çeşitli numunelerde ön izolasyon yapılmadan mantarların bulması için çok yararlıdır.

Mikolojide PCR ile ilgili ilk uygulamalar White ve arkadaşları tarafından 1990 yılında tanımlanmıştır. Bu uygulamalar mantarlarda taksonomik ve filogenetik ilişkinin saptanması için ribosomal DNA'nın (rDNA) amplifikasyonu ve direkt sekansı ile ilgili olmuştur. rDNA sekansları sıklıkla taksonomik ve filogenetik çalışmalarda kullanılır. Çünkü önemli fonksiyonlara sahiptir, sıklıkla canlı hücrelerde bulunur ve evrimleri tüm genomun evrimini etkiler.

Bu sekanslar hem değişken hemde kararlı bölgeleri içerir ve değişik taksonomik seviyedeki organizmaların ayırımına izin verir. Mantarlarda nükleer rDNA, çifte tekrarlanan bir rDNA ünitesi olarak düzenlenir. Bir ünite üç rRNA genlerini ihtiva eder: küçük nükleer (18S-benzeri) rRNA, 5S rRNA ve büyük (28S-benzeri) rRNA genleri. Bir ünite, genler ITS1 ve ITS2 (internal transcribed spacers) ile ve iki rDNA ünitesi de IGS (intergenic spacer) ile ayrılır. Son rRNA geni mantarın taksonomisine göre tekrarlanan ünite de bulunur veya bulunmaz (Edel V., 1998).

18S rDNA uzaktan ilgili organizmaları kıyaslamak için faydalıdır. Bununla beraber 18S rDNA kodlanmayan bölgeleri (ITS ve IGS gibi) bir genus içinde mantar türlerini veya bir türün içinde suşları kıyaslamak için faydalıdır. 28S rDNA'nın bazı bölgeleri, türler arasında değişkendir. PCR'in gelişmesi ve çeşitli rDNA bölgelerinin amplifikasyonu için primerlerin tasarımı mantarların taksonomik çalışmalarını oldukça kolaylaştırmıştır (White ve ark., 1990). Bu primerler, mantarların çoğunda bulunan parçaların amplifikasyonu için korunan bölgelerden tasarlanmıştır.

ITS primerleri White ve arkadaşları tarafından (1990) dizayn edilmiş ve değişik mantarlardan birçok ITS sekansını tespit etmeye imkan vermiştir ve bu primerler

Colletotrichum (Sreenivasaprasad ve ark., 1996a), Phytophthora (Lee ve Taylor, 1992) ve Penicillium (Lobuglio ve ark., 1993) gibi farklı cinslerin içinde türler arası taksonomik ve filogenetik ilişkilerin araştırılmasını sağlamıştır. ITS sekansları genellikle sabittir veya türler içinde az değişim gösterir ama bir cinste türler arasında değişir ve bundan dolayı bu sekanslar geniş ölçüde, PCR-RFLP analizi ile mantar türlerinin teşhisi için hızlı prosedürleri geliştirmek (Chen, 1992; Edel ve ark., 1997), ve tür spesifik primerlerin dizaynı için kullanılmaktadır (Beck ve Ligon, 1995; Sreenivasaprasad ve ark., 1996b). İntraspesifik düzeyde, birbirine yakın mantar suşlarının ayrımı, ribosomal IGS sekansları gibi daha değişken DNA bölgelerini kıyaslayarak başarılabilir (Henrion ve ark., 1992; Edel ve ark., 1995). Mitokondrial rDNA, mantarlar arasında konsensus primerleri ile amplifikasyondan sonra kolayca analiz edilebilir (White ve ark., 1990).

Rastgele PCR yaklaşımları, taksonomi ve mantar popülasyonlarının karakterizasyonu için faydalı olan moleküler işaretleyicileri oluşturmak için gittikçe artarak kullanılmaktadır. Bu yaklaşımların ana avantajı, DNA sıralarının önceki bilgisinin gerekmemesidir, öyle ki herhangi bir rastgele primer herhangi bir mantar DNA'sının amplifikasyonu için test edilebilir. RAPD (random amplified polymorphic DNA) primerleri deneysel olarak seçilir ve taksonun arasında değişken olan RAPD bandlarını deneysel olarak bulmak için test edilir. RAPD metod mantarları intraspesifik (Nicholson ve Rezanoor, 1994) ve interspesifik (Lehmann ve ark., 1992) seviyede ayırmak ve tanımlamak için başarıyla kullanılır. Buna benzer, değişken ve tekrarlanan sekansları tespit eden primerlerle oluşturulan PCR ürünleri mantar suşları ve türler arasındaki taksonomik ilişkilerin ortaya çıkarılması için kullanılmaktadır (Van Belkum ve ark., 1993).

RAPD ve interrepeat PCR, her ikisi de non spesifik primerler ile DNA'yı amplifiye eder, saf DNA templatına ihtiyaç duyarlar ve karışık örneklerden mantarları tespit etmede kullanılmazlar. Yakın zamanda, değişik organizmalar arasındaki polimorfizimleri değerlendirmek için AFLP (amplified fragment length polymorphism) tanımlaması geliştirilmiş ve mantarlardaki inter ve intraspesifik genetik farklılıkların tanımlanmasında kullanılmıştır (Majer ve ark., 1996, Mueller ve ark., 1996). AFLP'nin RAPD'ye oranla kopya çıkarmak ve tepkime başına kararlılık düzeyi gibi avantajları vardır ve metod özellikle intraspesifik düzeyde olmak üzere birçok mantarın arasında değişimleri göstermek için büyük potansiyeli vardır.

DNA topoisomerase II geni tüm ökaryotlarda bulunur ve nükleotid sekansı tür spesifik bölgelere dağılmış çok korunaklı bölgelerden ibarettir. DNA topoisomerase II (DNA giraz) geninin bakteriyel türlerdeki sekans analizleri sadece filogenetik ilişkilerin belirlenmesi için değil ayrıca medikal önemi bulunan geniş bakteri türlerinin PCR ile tanısal identifikasyon sistemlerinin geliştirilmesi için de uygulanmaktadır (Kanbe ve ark., 2002).

DNA topoisomeraselar, geçici bir kırılma ve DNA'nın çift helikal zincirlerine bağlanma yolu ile DNA'daki topolojik değişiklikleri katalize eden enzim ailesidir (Wang, 1996). Tip II DNA topoisomeraselar (DNA topoisomerase II) bükülme ve noktaları temizlemek için her iki DNA zincirini aynı zamanda keser ve sonradan yapıştırır (Watt ve Hickson, 1994; Berger et al., 1996). Bunların fonksiyonları DNA replikasyonları, gen ekspresyonları tamir ve birleşmesi gibi kromozom fonksiyonları için vazgeçilmezdir. Bu tip enzim DNA giraz olarak bilinir ve prokaryotlarda iki fonksiyonel alt üniteden meydana gelir. Ökaryotlarda bir polipeptid molekül olarak tanımlanır.

Çeşitli bakterilerin giraz genlerinin DNA sekansları uluslararası veri tabanlarında toplanmış ve filogenetik çalışmalarda kullanılmaktadır (Huang, 1996). DNA topoisomeraselar ayrıca klinik olarak önemli ilaçlar için de tanımlanmış hedeflerdir (Ishida ve ark., 1995). Bununla birlikte mantar DNA topoisomerase II için birçok çalışma bulunmaktadır (Keller et al., 1997). Bu şartlar altında, mantar DNA topoisomerase II geni sadece filogenetik analizler için değil hasta dokularını infekte eden mantar türlerinin teşhisi için de uygundur.

Kato ve ark. (2001) mantar topoisomerase II genine dikkat çekmiş, birçok patojenik candida türünün DNA topoisomerase II geni nükleotid sekanslarını belirlemiş ve nükleotid sekanslarına göre filogenetik ilişkilerini ve karakteristiklerini rapor etmişlerdir (Kato ve ark., 2001). Ayrıca *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*'in DNA topoisomerase II genine göre iki genotipinin olduğunu göstermişlerdir (Kato ve ark., 2001).

Candida DNA topoisomerase II geni karakterine göre, birçok *Candida* türünün PCR tabanlı identifikasyonu için uygun hedeflerdir (Kato ve ark., 2001).

1.9. Mantar Teşhisinde PCR

Özgünlüğü ve duyarlılığından dolayı, PCR mantarların tespiti için çekici bir metottur. Şimdiden tıbbi ve bitki patolojilerinde mantarların tespiti için geliştirilen PCR temelli testlerin birçok örneği vardır. PCR, uygun oligonükleotid primerler kullanıldığında suşları, patotipleri, türleri veya cinsleri tespit etmede kullanılır. Böylece, PCR temelli tespit prosedürlerinin gelişmesi, spesifik primerlerin dizaynı için hedef DNA bölgesinin en az bir parçasının sekans bilgisini gerektirir. Bu metotların ilkesi, hedef ve hedef olmayan organizmaların sekanslarını sıraya koymak, hedef olmayan organizmalarda uygun olmayan primerlerin seçimi, bütün hedef organizmalarda verimli hazırlık ve amplifikasyon için yeterli eşleşmedir (Dieffenbach ve ark., 1993). ITS'ler gibi mantar türleri arasında polimorfik olan DNA sıraları, türlerin tespiti için iyi adaylardır.

Örneğin, ITS sekansları arasındaki farklar mantarın ilk izolasyonuna gerek kalmadan konakçı bitkilerde birçok fitopatojenik türlerin tespiti için kullanılan PCR tabanlı testlerin gelişmesini sağlamıştır (Beck ve Ligon, 1995, Goodwin ve ark., 1995, Sreenivasaprasad ve ark., 1996b). 18S rDNA (Di Bonito ve ark., 1995), 28S rDNA (Fell, 1995) ve mitokondrial rDNA (Li ve ark., 1994) gibi rDNA'nın diğer sekansları da spesifik primerlerin dizaynı için kullanılmıştır. rDNA sekanslarından klinik numunelerde mantar türlerinin bulması için de PCR prosedürleri kullanılmıştır (Spreadbury ve ark., 1993, Holmes ve ark., 1994). rDNA sekanslarının mantar genomunda yüksek kopya sayısında mevcut olduğu gibi, onların kullanımı genellikle bir tespit testinin sensitivitesini artırır. Hedef organizmalarda nadir sekanslar diğer yaklaşımlar ile bulunabilir. Spesifik primerler, klonlanan genomik DNA parçalarından (Ersek ve ark., 1994, Doss ve Welty, 1995) veya PCR ile amplifiye edilmiş özel parçalardan tasarlanabilir.

Gerçekte, RAPD veya diğer PCR-parmak izi metotları ile oluşturulan takson-spesifik markerlar, klonlanabilir ve sekanslanabilir, ve bu SCAR'lar (sequence-characterized amplified region) tespit analizleri için spesifik primerlerin dizaynında kullanılabilir. Bunun bir örneği RAPD'lerden elde edilen ve tür spesifik SCAR'lardan tasarlanan primerlerle *Fusarium* türlerinin tespit edilmesidir (Parry ve Nicholson, 1996, Schilling ve ark., 1996). Sonuç olarak, PCR parmak izi veya spesifik sekanslı PCR ürünleri

tarafından oluşturulan takson-spesifik parçalar, dot-blot hibridizasyona dayalı diagnostik analizlerde spesifik problemler olarak kullanılabilirler (Klassen ve ark., 1996).

Spesifik mantar primerleri ile yapılan PCR amplifikasyon metodları sadece tanı için değil su, toprak, bitki veya klinik örnekler gibi mantarları, ekolojik çalışmalarda doğal çevrelerinde izlemek için etkili araçlardır. Ayrıca, spesifik primerlerin geliştirilmesi simbiyotik ve obligat parazitler ile ilgili çalışmaları kolaylaştırmıştır. Örnek olarak, mycorrhizal mantar DNA'sının spesifik amplifikasyonu kolonize olduğu bitki köklerinden yapılabilir (Di Bonito ve ark., 1995).

1.10. Medikal Mikolojide PCR'in Uygulama Alanları

Diagnostik PCR'in spesifitesi, amplifikasyon için uygun hedef sekansın belirlenmesi ile doğru orantılıdır. Örnek olarak dünyada görülen bütün mantarlarda olan bir gen sekansı, hastalığın mantar yada bakteri orijini olup olmadığının belirlenmesi için uygun bir hedefdir. Bu genler, mantar ribozomal RNA genleri olarak kabul edilmiştir.

Mantar kaynaklı DNA'nın cins yada tür bazında belirlenmesinde değişik metodlar kullanılmaktadır. RNA genleri bu strateji için en uygun olanıdır çünkü bütün DNA'ların amplifiye edilebilmesini sağlayacak gen bölgelerini içerir. Bir diğer avantajı ise rRNA'ların PCR'da yüksek sensitiviteyi sağlayacak kadar sayıda kopya oluşturmalarıdır. Makimura'nın grubu bu yöntemle 18S rRNA genlerinden 78 türden medikal açıdan önemli olan 25 tane mantar tanımlenmiştir. Haynes ve arkadaşları (1995), mantarların geniş bir bölümünün subunit rRNA gen sekanslarını içeren *S. Cerevisiae* nin V3 bölgesinden bir çift primer bulmuşlardır. Daha sonra bulunan bu tür spesifik primerler, *A. fumigatus*, *Cr. neoformans* ve *C. albicans*'ın DNA'larının amplifikasyonunda kullanılmak üzere tasarlanmıştır.

Hopfer ve arkadaşları (1993), mantarlarda daha önce kullanılan rRNA gen sekanslarından faydalanmıştır ve bunları 42 değişik mantarda 306-311 bp hedeflerini amplifiye etmek için kullanmışlardır. Amplikonlar, enzim analizlerine göre gruplandırılmış ve HaeIII ile doyurulmuştur. Daha sonra ise agaroz jel elektroforezinde ayrılmıştır.

Sonuçta çıkan bantlar *Candida* sp., mayalar ve *Aspergillus* sp.'leri de içeren 5 mantar grubunun DNA larının gruplandırılmasında kullanılmıştır.

Alternatif olarak yüksek çeşitlilik içeren bölgeler tür veya cins belirlenmesinde daha yüksek spesifite verebilir. Genelde daha çeşitli hedef bölge PCR'da daha disiplinli bir çalışmayı sağlar (Mitchell ve ark.,1994b). Tang ve arkadaşları (1993), *A. fumigatus* ve *A. flavus* un alkaline proteaz genlerini belirlemek için bir PCR yöntemi bulmuşlardır. Bu yöntem hem *A. fumigatus* hem de *A. flavus* un pulmoner aspergillozisli hastaların bronkoalveoler lavaj örneklerinden izole edilmesi için kullanılmıştır.

PCR protokolünün iyi sonuç vermesi açısından klinik materyalin seçimi ve DNA ekstraksiyonu kritik önem taşır. İdeal olarak seçilen türde hedef DNA'nın bulunması klinik olarak önemlidir. *Candida*'nın belirlenmesinde diğer kommensal patojenler ayrılmalıdır, aynı şekilde *Aspergillus*'un belirlenmesinde diğer çevresel kontaminant türler de ayrı tutulmalıdır. *Candida*'nın teşhisinde bir çok PCR protokolünde kan örneklerinin alınması ve mantarın kanda aranması klinik olarak önemlidir. İnvaziv Aspergilloz'un PCR tanısı ise daha komplikedir. Mantarın kandan izolasyonu ve DNA'nın kandan izole edilmesi ise çok güçtür. Sistemik yada pulmoner mantar infeksiyonuna yakalanmış hastalar immunokompromizedir.

DNA ekstraksiyonunun başlıca iki hedefi vardır: Birincisi, mantar DNA'sını minimal kayıpla purifiye etmek ve ikincisi alınan örnekten yapılan PCR'dan inhibitörleri elimine etmektir. Mantar hücresinin duvarını açmak zordur, fakat bu olay enzimatik yada mekanik olarak yapılabilir. Zymolyase enzimi ile yapılan lizis işlemi DNA ekstraksiyonuna yardım edebilir yada *Cr. Neoformans*'ta olduğu gibi partiküler olarak cam malzemelerle hücre duvarının kalın polisakkarit yapısı penetre edilebilir (Tanaka ve ark., 1996). Ekstrakte edilen DNA'nın bölümleri, hücrenin lize edilmesinden sonra elde edilen proteinler uygun kitlelerle geliştirilebilir (ör. QIAamp Tissue Kit, Qiagen, Crawley). Bu uygulamalar, genellikle yayınlanan metodlardan daha hızlıdır ve fenol, kloroform kullanılmasından kaçınılır. Fakat protokollerin maliyetleri nedeniyle fenol ve kloroform önemli ölçüde kullanılmaktadır.

Amplikonların saptanması için yapılan metot PCR sonucunda hem hassas hem de spesifik sonuç verebilir. En basit metot ise PCR ürünlerinin elektroforez yapmadan önce agaroz jeline ethidium bromid ilave edilmesidir. Bu uygulamada her amplifiye edilen bant başına 20 ng belirlenme limiti koyulmaktadır. Buna ek olarak da PCR ürününün ölçüsü hakkında da yol gösterir. Yamakami ve arkadaşları (1996), hasta serumlarından invaziv olarak yerleşen *Aspergillus* türlerini PCR ile belirlenmesini jel boyama ile 50 pg'dan 50 fg'a kadar olan aralıkta bulmuşlardır. Southern analiz metodu ise hassasiyeti 10 kata kadar artırmıştır.

Southern blottingde kullanılan spesifik oligonükleotid araştırmaları, az görülen 50 fungus izolatlarından 28S rRNA genlerinin identifikasyonu için geliştirilmiştir (Sandhu ve ark. 1995). Bu 50 izolatın 21 tanesindeki çeşitli bölgeler, tür spesifik araştırmalar için kullanılmıştır.

Alternatif olarak proplar, enzim immunoassay belirleme yönteminde de kullanılabilir. Tür spesifik proplar, mikrotitre pleytlerinin duvarlarına bağlanır ve digoksjenin ile etiketlenmiş denatüre PCR ürünleri proplarda hibritlenir.

Kanser tedavisinde geniş spektrumlu antibiyotiklerle uygulanan kemik iliği nakli gibi immunosupresif terapi yöntemleri, son zamanlarda immunokompromize hastaların sayısında artışa neden olmuştur. Buna ek olarak HIV pandemisi de immunitesi yetersiz bireyler meydana getirmiştir. Bu bireyler sistemik mantar infeksiyonlara karşı risk altındadır. Kemik iliği transplantasyonlarından sonra invaziv mantar infeksiyonların insidensinde % 50 ve mortalitede ise % 80 artış rapor edilmiştir (Tang ve Cohen, 1992).

Kriptokokal antijen lateks aglutinasyon testi dışındaki tanı yöntemleri, mantar infeksiyonlar için hem zaman kaybıdır hem de duyarsızdır. Örnek olarak kan testleri invaziv *Aspergilloz* açısından daima negatif sonuç vermektedir (Richardson ve Warnock, 1993). Eğer uygun tedavi, hastanın prognozunu belirlemek amacı taşıyor ise, tanının erken yapılması gereklidir.

Diagnostik testler açısından hastanın antikor oluşturması genelde yetersizdir. Fakat *histoplasmosis*, *coccidioidomycosis* ve *paracoccidioidomycosis*, *candidiosis* ve *aspergillozis* tanısı için yüksek bütçeli araştırmalar yapılmaktadır. Bu testler çabuk sonuç vermektedir ve düşük duyarlılık da henüz rapor edilmemiştir (De Repentigny ve ark., 1994). İnvaziv aspergillozislili hastalarda kandaki galaktomannan, monoklonal antikor kullanılarak serum örneklerinden lateks aglutinasyon testi ile saptanabilmektedir (Pastorex *Aspergillus*, Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-La Coquette, France). Fakat bu testlerin yararları çeşitlilik göstermektedir. Diğer mantar infeksiyonlarına ek olarak kriptomkozis tanısı için kriptomkokal lateks antijen testi güvenilir sonuç verir, fakat buna benzer diğer testler her zaman duyarlı değildir ve negatif sonuç verebilir. Maya izolatlarının Vitek ve API identifikasyon sistemleriyle tanısı genel olarak yararlıdır fakat spesifik olarak yabancı türler tespit edilemeyebilir (Fenn ve ark., 1994).

Candida'lar *Deuteromycota*'da *Blastomyces* sınıfının *Cryptococcales* takımında *Cryptococcaceae* ailesinde sınıflandırılan, blastosporlarla çoğalan, yalancı misel yapan, ve eşeyli şekilleri *Hemiascomycetes* sınıfında bulunan bir grup anamorf mayadır. Bugün için kabul edilmiş 220 kadar türü bulunmaktadır. *Candida*'lar küre şeklinde, silindirik olabilen, 2-8 x 3-15 mm boyutlarında ökaryonlu mikroorganizmalardır; maya hücreleri ve yalancı misel oluştururlar ve tomurcuklanarak çoğalırlar (Yücel A. ve Kantarcıoğlu S., 1999).

Cins içindeki başlıca ve ortak olan patojen *C. albicans*'tır. Bunun yanında, vaginal infeksiyonlu hastaların %5'inden sorumlu olan *C. glabrata*, genellikle deri lezyonlarından izole edilen *C. parapsilosis*, derin mikozlara sebep olan ve *C. albicans*'tan sonra en sık rastlanan *C. tropicalis* gibi diğer *Candida* türleri, yeni patojenler olarak addedilmektedir. Bu cinsin türleri, meyve ve meyve suları, hafif içecekler, alkollü içecekler, yüksek şeker içeren gıdalar, sebzeler ve tahıllar, tuzlu ve asit katkılı gıdalar, günlük ürünler, et ve et ürünleri gibi gıdalarda ve gıda üretimi yapılan çevrelerde kontaminant olarak bulunurlar. Gıdaları bozarak oluşturdukları ekonomik kayıp ve patojen olarak rolleri göz önüne alındığında bu cinsin türlerinin hızlı identifikasyonu çok önemlidir (Frutos R. L. ve ark., 2004).

Candida türleri memelilerde, sindirim, genital ve üst solunum yolunun doğal konakçısıdır. Bu maya benzeri mantarlar antibiyotik, kortikosteroid, sitotoksik ajan ve immunsupresif ilaçlarla tedavi edilen hayvanlarda oportunistik infeksiyonlara yol açarlar.

Veteriner literatürde *Candida* türleri tarafından oluşturulan deri ve barsak infeksiyonları sık olmasa da bildirilmiştir.(Khosravi ve ark., 2009).

Candida türleri içerisinde *C. albicans* hayvanlardan en çok izole edilen türdür. *Candida albicans* dimorfik bir mantardır ve sıcak kanlı hayvanlarda kommensal olarak bulunduğu mukozal yüzeylere ve mukokutanöz alanlara affinitesi vardır Yaşam alanı mikrobiyal floranın küçük bir üyesi olduğu sindirim sistemidir fakat özel durumlarda *Candida albicans* dış kulak yolu, perineum, tırnak, oral mukoza, kornea ve üriner sistemde ciddi lokal infeksiyonlar veya böbrek, karaciğer, akciğerler, beyin zarları ve kalp gibi iç organlarda sistemik invazyon gösteren oportunistik patojenik bir mikroorganizmadır (Khosravi ve ark., 2009).

Candida cinsine ait birçok tür (*Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. aloffi*, *C. bovina*, *C. keyfr*) çeşitli hayvanların (sığır, koyun, keçi, domuz, köpek, kedi, kanatlı, rodentler v.s.) ve insanların mukozalarında bulunurlar ve bunların bazıları hastalık meydana getirirler. İnfeksiyon genellikle sindirim kanalına (ağız, yemek borusu, kursak, mide, barsaklar) lokalize olur. Ancak deri ve derialtı dokularına, akciğer, uterus, meme, testis ve diğer organlarda da *candida*'lardan ileri gelen lezyonlara rastlanabilir (Arda M. ve ark., 1997).

Etken doğada insan ve hayvanların sindirim sisteminde, deri ve mukozalarında normal olarak bulunmaktadır. Hastalığın oluşmasında bazı predispoze edici faktörlerin, vücut direncinin kırılması, antibiyotik, kortikosteroid veya sitotoksik ilaçların gereksiz ve fazla kullanılması hallerinde, diabetes mellitus'lu hastalarda (insanlarda, beslenme bozukluğu olanlarda) iyi bir bakım ve beslenmenin uygulanmadığı hayvanlarda görülür. Gençler infeksiyona daha duyarlıdır. Fazla antibiyotik kullanıldığı zamanlarda ve barsak mikroflorasının ekolojik dengesinin değişmesi sonucu (antimantar madde oluşturan bakterilerin ölmesi, gıdaya ortak olan bakterilerin ortadan kalkması, mantarların üremesini artırması gibi) burada bulunan *candida*'lar hastalık oluşturabilirler.

Candida cinsi, tür sayısı olarak en büyük ve genellikle her çevrede bulunur duruma gelmiştir. Bu cinsin mayaları doğada, karada ve denizde hayvanlarla veya bitkilerle ve cansız nesnelere ilişkili olarak geniş bir dağılım gösterir. Bu cins insanlar ve hayvanlarla

ilişkili türleri kapsar ve gastrointestinal sistem ile üreme organları hayvanlarda en sık rastlanan kaynağı oluşturur (Frutos R. L. ve ark., 2004) .

Son zamanlarda, *C. albicans* tarafından oluşturulan infeksiyonlar azollere düşük duyarlılık gösteren *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* gibi bu cinsin diğer türleri tarafından oluşturulan infeksiyonların insidensine göre düşüş göstermektedir.

İnfeksiyon oluşturan *C. albicans*, laboratuarlarda kullanılan mikolojik besi yerlerinde kolayca üreyebilir. Sabouraud Dekstroz Agar ve Sabouraud Dekstroz Buyyonu, kandida türlerinin izolasyon ve üretilmesi için uygundur. Besi yerlerinde 26-37° C ler arasında 24-48 saat içinde 1-2 mm. çapında mukoid ve krema renginde, üzerleri düzgün, sonraları kırışık koloniler meydana gelir (Arda M. ve ark., 1997).

Candidalar patolojik materyallerde oval, yuvarlak, tomurcuklu hücreler (2-5 µm. çapında) ve pseudomiseller halinde görülürler. *C. krusei*, *C. parapsilosis* hariç olmak üzere, diğerleri SDA ve Mycosel Agarda ürerler. *C. tropicalis* ise bu ortamlarda yavaş ürer. *C. tropicalis* ve *C. albicans*'ın spesifik identifikasyonu immunofloresens yardımıyla sağlanır.

Candida türlerinin tanısında:

- 1- Koloni topografisi, rengi, kokusu, yapısı (SDA ortamında),
- 2- Mikroskopik morfolojisi (mısır unlu-Tween Agar),
- 3- Klamidospor oluşumu (mısır unlu-Tween Agar),
- 4- Bazı karbonhidratların fermentasyonu,
- 5- Patolojik materyallerde pseudohifa, tomurcuklu hücrelerin varlığı,
- 6- Blastospor oluşumu (mısır unlu-Tween Agar) gibi kriterlerden yararlanılır (Arda M. ve ark. (1997).

Son zamanlarda, *Candida* türlerini identifiye etmede moleküler teknikler geliştirilmiştir fakat veteriner alanda klinik örneklerden mantar DNA'sının PCR analizi ile tanısı iyi tanımlanmamıştır (Kano R. ve ark., 2002).

Aspergillozis, aspergillus türleri (*A. fumigatus*, *A. flavus* ve diğer türleri) tarafından oluşturulan ve genellikle solunum yollarına yerleşen ve bazen de sistemik infeksiyonlara yol açan bir mantar hastalığıdır. İnfeksiyonlara en fazla kanatlılarda daha az olarak diğer hayvanlarda ve insanlarda rastlanır.

Hastalığın çıkışında predispoze edici faktörlerin, fazla antibiyotik ve kortikosteroid kullanılması, kötü bakım ve beslenme, hijyenik olmayan ve kötü barınaklar, hayvanların çok sık bulunmaları, v.s. faktörlerin önemli hazırlayıcı ve kolaylaştırıcı etkisi vardır (Arda M. ve ark., 1997).

Aspergillus'lar yeryüzünde her yerde yaygın olarak bulunan hifli mantarlardır; doğal yaşam ortamları toprak ve çürüyen bitki materyalidir; doğadaki temel işlevleri karbon ve nitrojen çevrimiyle ilgilidir, biyodegradasyonda rol alırlar. Bu mantarlar ürettikleri enzimler sayesinde tüm organik maddeleri ayrıştırarak kullanır ve saprofit olarak yaşarlar; uygun koşullarda bitki, hayvan ve insanlarda patojen hale geçebilirler. Yaşam çemberlerini tamamlamak için konak olarak insana gereksinimleri yoktur. Üreme hız ve kapasiteleri yüksektir. Atmosfere dağılan konidyumlar havada asılı kalabilir, toz ve diğer parçacıklarla her yere taşınabilirler, havada en yüksek yoğunlukta bulunan mantarlardan biridir. Ortam çalışmalarında insanların solunumla günde en az birkaç yüz konidi aldıkları belirlenmiştir (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003).

Bağışıklığı tam bireylerde solunumla alınan konidiler doğal direnç mekanizmaları ile zararsız hale getirilir. Dolayısıyla yakın zamanlara kadar *Aspergillus*'lara yalnız alerjik reaksiyonlara ve tedavisi başarılı olmuş tüberkülozlu veya sarkoidozlu hastalardaki daha önceden oluşmuş kaviterlerde aspergilloma'ya (mantar topu) sebep olan zayıf bir patojen gözüyle bakılmıştır. *Aspergillus*'lara bağlı (alerjik bronkopulmoner aspergilloz, astım, alerjik sinüzit, alveolit gibi) alerjik hastalıklar miselli kolonizasyon olmaksızın *Aspergillus* konidi ve antijenleriyle tekrarlarlayan karşılaşmanın ardından oluşurlar ve çoğunlukla hastanın ortamdaki kaynaktan uzaklaştırılmasıyla klinik iyileşme ile seyreder (Latgé, 1999).

Mantarların etkisiyle bazı besinlerde oluşan zehirlerin yenmesiyle ortaya çıkan *Mycotoxicosis*'de de bu mantarın önemli bir yeri vardır. *Aspergillus flavus* ve benzeri mantarların ürediği tahıl ve meyvelerde gelişen aflatoksinlerle aflatoksikoz; aflatoksin B ile karaciğerde adenoma ve kanser oluşumu; *A. ochraceus*'un yaptığı okratoksin A ve B'nin hayvanlarda böbrek ve karaciğeri bozduğu bildirilmiştir (Bennett, 1987)

Alerji ve mikotoksikoz dışında *Aspergillus* türlerinin sebep oldukları hastalıklar aspergilloz olarak tanımlanmaktadır. Bu mantarlar; tüberküloz, sarkoidoz, bronşektazi, pnömonilerin ardından akciğerlerdeki kavitelere, ekseri üst lobda yerleşik olarak aspergilloma denilen mantar topu oluşturabilirler ve hastalar ekseri asemptomatiktir. Bu hazırlayıcı sebeplerle birlikte alkolizm, diabetes mellitus, uzun süreli steroid tedavisi gibi bağışıklığı baskılayıcı uygulamalar da bulunduğu kronik nekrotize akciğer mikozları görülebilmektedir (Kwon Chung ve Bennett, 1992, Verschraegen ve ark., 1997).

Son yıllarda bağışıklığı baskılanmış hasta sayısının artmasıyla *Aspergillus*'lar prevalansı en yüksek hava kaynaklı potansiyel patojenler olarak ortaya çıkmışlardır. Bu cinsin üyeleri halen lösemi tedavi merkezlerinde ve solid organ transplantasyonu birimlerinde başta gelen ölüm sebeplerindedir. Erken tanının erken tedaviye olanak vererek prognozu etkileyeceği düşünülmektedir (Barnes ve ark., 1999, Sulahian ve ark., 2001).

Aspergillus'lar yeryüzünde Antarktika dahil her yerde, toprakta ve özellikle çürüyen organik maddelerde yaygındır. Sahip oldukları zengin enzim sistemleriyle hemen tüm organik materyalleri ayrıştırarak kullanabildikleri ve diğer mikroorganizmalar için çok düşük olan nem düzeylerinde bile gelişebildikleri için, depolanmış tahıl ve tohumlarda, unlarda, deri ve tekstil ürünlerine kadar çeşitli gıda ve eşyalarda; ayrıca dış ortamda ve hastane ve evlerin iç ortamlarındaki havada asılı olarak bol bulunurlar. *Aspergillus* cinsi ile ilgili olarak Raper ve Fennel'in yayınladıkları monografda 132 tür sayılmıştır. Bugün bu cinsin kabul edilmiş 180'den fazla türü ve 70 teleomorfu bulunmakta ve yeni türler de tanımlanmaktadır (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003).

Dokularda veya patolojik maddelerde genellikle konidiumlara ve az olarak da konidiofor ve miselyal elementlere rastlanır. *Aspergillus* mantarlar monomorfik (monofazik) bir özellik gösterdiğinden, gerek dokularda gerekse kültürlerde aynı formlar halinde bulunur.

İnvaziv aspergillozis (IA)'a en sıklıkla sebep olduğu bildirilen türler *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*'dir.

Daha nadir olarak hastalığa sebep olan türler *A. amstelodami*, *A. avenaceus*, *A. caesiellus*, *A. candidus*, *A. carneus*, *A. chevalieri*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. granulatus*, *A. oryzae*, *A. quadrilineatus*, *A. restrictus*, *A. sydowi*, *A. ustus*, *A. versicolor*, *A. wentii*, *Neosartoria fisceri* olarak sayılmaktadır (Latgé, 1999, Kwon Chung ve Bennett, 1992, Denning, 1998).

IA olgularının yaklaşık % 90'ından sorumlu olduğu bildirilen *A. fumigatus*'un önde gelen yaşam ortamının çürüyen bitki materyali olduğu düşünülmekte ve kırsal kesimde yaşayan kistik fibröz hastalarda *A. fumigatus*'la kolonizasyon oranının çok yüksek olduğu öne sürülmektedir. *A. fumigatus* ile ilgili son yıllarda geliştirilen çeşitli moleküler tiplendirme sistemlerinin IA'un epidemiyolojisini açıklamakta yararı olmuştur. ABD ve Avrupa'da identik genotiplerin hastalığa sebep oldukları ve *A. fumigatus* genotipinin yeryüzünde yaygın olduğu gösterilmiştir. Bu türün, hastalardan elde edilen iki üç genotipi bulunmakla beraber infeksiyonların çoğuna tek bir genotipin sebep olduğu bildirilmiştir ve bulgular *A. fumigatus*'un primer patojen bir mantar olabileceğine işaret etmektedir (Denning, 1998).

Aspergillus türleri zincirler halinde çok miktarda konidi üretirler ve bunlar olgunlaştıklarında ortama dağılırlar. Konidyumlar genelde 2-5 µ çapındadırlar ve hava ile taşınırlar.

Aspergillus türlerinin sınıflandırılması kültür ve morfoloji özelliklerindeki farklılıklara dayanır; kimyasal ve biyokimyasal yöntemlerinin tanım değeri düşüktür. *Aspergillus* hücre duvarlarında N-asetilglukozamin, glukoz, mannoz ve galaktoz

bulunduğu belirlenmiştir. Moleküler biyoloji ve genetik yaklaşımlar daha güvenilir bulunmaktaysa da henüz bilgi birikimi yeterli değildir (Latgé, 1999, Kwon Chung ve Bennett, 1992).

Tanım için hazırlanmış anahtarların dayandırıldığı esas özellikler şunlardır.

- Konidili başların biçimi ve rengi
- Sterigmata (fiyalidler) sayısı
- Vezikül biçimi
- Konidyoforların yapı ve rengi
- Hülle cells (dinlenme hücreleri) biçimi

Tür tanımı için üreme yapıları, cleistothecia (eşeyli sporların üretildiği tam kapalı askokarplar) bulunup bulunmadığı, askosporların ve konidilerin biçimi, boyut ve renkleri gibi özellikler kullanılır. Tanım için tarif edilmiş standart besiyerleri Czapek Dox agar (CD) (%3 sukroz) ve %2 Malt Özüdü agar (MEA)'dır. *A. glaucus* ve *A. restrictus* grupları gibi ozmofilik türler tanıma uygun gelişme ve konidyulanma için yüksek (%20-40) glukoz veya sükroz yoğunluğuna gerek duyarlar. Çeşitli sistematikciler ve araştırıcıların küf çalışmalarında bazı görüş ayrılıkları vardır. Samson bir kısım küfler için besiyerlerine pepton eklenmemesini, bu maddenin koloni formlarında doğal özelliklerinden sapmalara sebep olduğunu öne sürerken Pitt, tanımda peptonlu Malt agara yer vermiştir. Diğer yandan küflerde çıplak gözle ve/veya mikroskoptaki görünümleri birbirine yakın benzerlikler gösteren durumlarla olduğuça sık karşılaşılır. Mantarlarda tanım ve tiplendirmenin deneyim ve birikim gerektirdiği kabul edilmektedir (Kantarıcıoğlu ve Yücel, 2003).

Genelde bu cinsin üyeleri hızlı gelişirlerse de gelişme hızları değişiktir ve türlerin ayırt edilmesinde önem taşır. Tanım için tarif edilmiş besiyerlerinde, sıcaklık ve ışık bakımından standart koşullar altında belirli bir gündeki koloni çapı ve kadifemsi, pamuksu, yünsü, tanecikli, kubbemsi, yassı gibi koloninin makroskobik görünümü tanım için kullanılır. Koloni rengi tanım için kabul edilmiş standart renk skalalarıyla karşılaştırılarak belirlenir (Kantarıcıoğlu ve Yücel, 2003).

Koloniler ekseri hızlı gelişirler; renkleri türlere ve gelişme koşullarına bağlı olarak beyaz, sarı, sarımsı kahverengi, siyaha yakın kahverengi, kırmızı. veya yeşil tonlarında harelidir; sık konidyoforların oluşturduğu bir keçe görünümündedir. Konloni rengi daima, vejetatif hiflerin, konidyumlu başların ve varsa eşeyli yapıların rengine bağlıdır. Besiyerine dağılan pigment üretebilirler ve bu pigmentin rengi koloninin hava miselli kısmının renginden farklı olabilir. Hifler bölmelidir, ince veya kalın olabilir; hif hücreleri ekseri çok çekirdeklidir. Miselyum birçok enzimler ve bazı mikotoksinler üretme yeteneğine sahiptir (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003).

Vejetatif hifanın “ayak hücresi” denen özelleşmiş bir hücresinden dik olarak çıkan konidyofor denen konidyum taşıyıcı hifaların ucu şişkinleşmiştir, yukarı doğru oluşturdukları yuvarlak veya oval biçimdeki baş kısmına “vezikül” adı verilir. Vezikül üzerindeki alan türlere göre farklıdır ve bu özellik tür tanımında kullanılır. Konidyum yapıcı hücreler olan “fiyalidler” ya doğrudan vezikülün üzerinde (uniseriate) veya metulaların üzerinde (biseriate) doğarlar ve altındaki sap (stibe) denilen hücre ile birlikte konidyumlu baş denen tipik görünümü oluştururlar. Konidyoforun uzunluğu; bölmeli, bölmesiz veya dallanmış oluşu ve duvarının düz, pürüklü, dikenli olması gibi özellikleri türlere göre farklıdır. Yeni bir duvarla sarılmış olan konidyumların oluşumu sırasında konidyum yapıcı hücrenin (fiyalid) kendisi büyümez ve bunun dış tabakası konidyumu örtmek üzere uzamaz (enteroblastik gelişim) (Kantarcıoğlu ve Yücel, 2003).

Konidyumlar ardarda dizilerek tesbih şeklinde zincirler oluştururlar ve böyle bir zincirde en genç hücre en diptekidir. Konidyum zincirleri ya tıkız sütunlar halinde (kolonvari) veya yayınlık (ışınsal)’dır. Konidyumlar bir hücreli, duvarları düz veya pürüzlü, dikenli; seffaf veya pigmentli olabilirler. Bazı türler “hülle cells” denen dinlenme hücreleri veya sklerot denen tıkız hif kitleleri üretirler. Bu özellikler türlerin ayırımında önem taşır. Teleomorfların tanımında olgunlaşmış klaystotesyum, ask ve askosporların biçimleri ve renkleri önem taşır (Kwon Chung KJ ve Bennett JE, 1992).

Aspergillus türleri arasında hayvanlarda hastalık oluşturanların başında *Aspergillus fumigatus* bulunmaktadır. Daha az olarak da *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, v.s. gibi türler yer almaktadır. *Aspergillus* türleri, Sabouraud Dekstroz Agar ve diğer

mikolojik besi yerlerinde kolayca ürerler. İlk izolasyonlar için ortamlara antibiyotikler katılabilir. Katı ortamlarda, görülebilecek kadar büyüklükte kolonilere 24-30 saat içinde rastlanabilir. Bazı türler daha geç üreme gösterirler. Aerobik koşullarda ve 37°C de üretilen *A. fumigatus* kolonileri, önceleri beyaz, sonraları sarı, yeşil, mavi-yeşil, dumanımsı bir renk alırlar ve ince granüler görünüme sahip olurlar (Arda M. ve ark., 1997).

Oportunistik mantar infeksiyonlarının bu epidomiyolojik dağılımlarından dolayı hızlı identifikasyon metodlarının geliştirilmesi sistemik mantar ineksiyonlarının kontrolünde gereklidir, çünkü özellikle immun sistemi baskılanmış hastalarda invaziv mantar infeksiyonunun erken ve patojenin tür düzeyinde doğru tanısı tedavi için kritik noktadır. Moleküler biyoloji tabanlı teknikler özellikle PCR tabanlı teknikler mantar infeksiyonlarının tanısında güvenilir ve hassas teknikler olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Kanbe T. ve ark., 2003).

Morfolojik, serolojik veya biyokimyasal testler *Candida* türlerinin identifikasyonunda kullanılmaktadır. Direkt mikroskopik bakı hızlı bir tanı metodudur, ancak bunun yanında *Candidaları*, *Aspergillusları* da içeren diğer mantarlardan ayırt etmek zordur. Klinik örneklerden patojenik organizmaların kültüre edilerek identifikasyonu en azından bir hafta gerektirmektedir.

Son zamanlarda, mantar patojenlerinin identifikasyonlarında moleküler biyoloji tabanlı testler konvansiyonel testlere nazaran daha kolay ve etkili bir biçimde kullanılmaya başlanmıştır. Tanısal Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) testlerinin hızı, yüksek sensitivite ve özgüllüğünden dolayı birçok mantar türünün identifikasyonunda laboratuarlarda hızla artarak kullanılmaya başlanmıştır (Kano R. Ve ark. 2002).

Bu tez çalışması ile köpeklerde sistemik mikozislere sebep olan bazı patojenik *Candida* türleri ve *Aspergillus fumigatus*'un nested Polimeraz Zincir Reaksiyonuyla varlığının ortaya konulması amaçlanmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Örnekler

Aydın ili ve çevresinde bulunan sahipli köpeklerden tekniğine uygun olarak alınan 200 adet tam kan örneği Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilmiştir. Kan örnekleri DNA izolasyonu yapılincaya kadar -20 °C derin dondurucuda saklanmıştır. Araştırma materyalini oluşturan köpek kan örneklerinin 116 (% 56.5)'sı erkek köpeklere ve 84 (% 43.5)'ü dişi köpeklere aittir. Örneklerin köpek ırklarına göre dağılımı Çizelge 2.1.1.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1.1.1.: Alınan kan örneklerinin köpek ırklarına göre dağılımı.

Örnekleme Yapılan Köpek Irkları	Örneklenen Köpek Sayısı (adet)	Erkek Köpek Sayısı (adet)	Dişi Köpek Sayısı (adet)
Alman Çoban Köpeği	16	11	5
Kangal	33	23	10
Pointer	18	9	9
Setter	19	10	9
Melez	76	42	34
Barak	12	7	5
Doberman	12	6	6
Terrier	14	8	6
TOPLAM	200	116	84

2.1.2. Standart Suşlar

Çalışmada kullanılan standart suşlar (*Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ve *Aspergillus fumigatus* ATCC 16903) Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir.

2.1.3. Besiyerleri

%4 Sabouraud Dextrose Agar (Merck 1.05438)

%4 Sabouraud Dextrose Agar	65 g
Distile Su	1000 ml

Karışımın pH'sı 5.6'ya ayarlanıp, 15 dakika otoklav edildikten sonra, 50 °C'ye kadar soğutulup, içerisine antibiyotik ilave edilip steril petrilere döküldü.

%2 Sabouraud Dextrose Broth (Merck 1.08339)

%2 Sabouraud Dextrose Broth	30 g
Distile Su	1000 ml

Karışımın pH'sı 5.6'ya ayarlandıktan sonra tüplere 5'er mililitre aktarılıp 15 dakika otoklavda steril edildi.

2.1.4. DNA Ekstraksiyon Kiti

Mantar sporları ve bakteriler dahil birçok mikroorganizmadan yüksek kaliteli genomic DNA'nın izolasyonu için dizayn edilmiş UltraClean Microbial DNA Isolation Kit® (MO BIO Laboratories, Inc.) kullanılmıştır.

2.1.5. Primerler

Çalışma iki aşamalı olarak planlanmıştır. Çalışmada ilk amplifikasyon aşaması için CDF28 ve CDR148 esas primerler kullanılmıştır (Kanbe ve ark., 2003).

Tür spesifik primerlerin dizaynında Kanbe ve ark. (2003) bildirdikleri *Candida* türleri ve *Aspergillus fumigatus* DNA topoisomerase II geni nükleotid sekansları kullanılmıştır. Tez çalışmasında kullanılan primerler, nükleotid sekansları, primer çifti ve primer çiftleri tarafından oluşturulan DNA ürünü aşağıda çizelge 2.1.5.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1.5.1.: Primer isimleri, nükleotid sekansları ve primer çiftleri tarafından amplifiye edilen DNA ürünü.

Mantar Türü ve Primerler	Yön	Sekans (5'-3')	Ürün (bp)
Esas Primerler			
CDF28	F	GGTGGWMGDAA YGGDTWYGGYGC	1,200
CDR148	R	CCRTCNTGATCYTGATCBGYCAT	
Spesifik Primerler			
<i>Candida albicans</i>			
CABF094	F	CCTGAACCACAAGATGGACCATTA	490
CABR143	R	CGCAGTTTTCTACTACCATCG	
<i>Candida parapsilosis I</i>			
CPP1F034	F	CGGCTGATTTGAACTGGTAAAC	880
CPP1R122	R	TGTCAAGATCAACGTACATTTTAGT	
<i>Candida parapsilosis II</i>			
CPP2F038	F	GGACAACATGACAAAAGTCGGCA	310
CPP2R069	R	TTGTGGTGTAATCTTGGGAG	
<i>Candida glabrata</i>			
CGBF035	F	CCCAAAAATGGCCGTAAGTATG	672
CGBR102	R	AGTCGCTACTAATATCACACC	
<i>Candida tropicalis II</i>			
CTR2F049	F	GGACAGTTTGGATGAAGATTTA	777
CTR2R126	R	GAGACCAGCCACGGACAAATTCAAC	
<i>Aspergillus fumigatus</i>			
AFMF067	F	TCTTCTCCACCGAATTCACG	1,097
AFMR176	R	TCATCAAATGACCGTAGCGCAA	

2.1.6. Kod Dash DNA Polymerase (LPD-101)

Tez çalışmasında Kanbe ve ark. (2003) nın bildirdiği gibi LPD-101 Kod Dash DNA polimeraz kullanılmıştır. Kod Dash polimerazın özellikleri aşağıda belirtilmektedir;

-Bu enzim karışımı düşük template miktarlarında değişik hedeflerin amplifikasyonunda etkilidir. Bu enzimin uzatma kabiliyeti normal Taq DNA polimeraza göre daha büyüktür.

-KOD DNA'nın özelliği sebebiyle bu enzim karışımı Taq DNA polymerase (2 misli) ve Pfu DNA polymerase'a (6 misli) göre daha yüksek uzama hızına sahiptir.

-Bu enzim karışımının hata oranı Taq DNA polymerase'a göre yaklaşık olarak 3-4 kat daha düşüktür.

2.1.7. Solüsyonlar

TE buffer : Araştırmada kullanılan primerlerin sulandırılmasında MBI Fermentas[®] firmasının ürettiği kullanıma hazır pH 9.0 buffer kullanılmıştır.

TAE buffer : Araştırmada MBI Fermentas[®] firmasının ürettiği kullanıma hazır buffer kullanılmıştır.

Ethidium bromide : Araştırmada Sigma[®] firmasının ürettiği kullanıma hazır agarose gel elektroforezi için uygun ethidium bromide solusyonu kullanılmıştır.

2.1.8. Kullanılan Makine ve Teçhizat

Araştırmada Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin teşhis laboratuvarında bulunan Eppendorf Mastercycler personal marka Thermal Cycler, Eppendorf Mini Spin Plus Santrifüj, BIO RAD Mini SubCell GT marka elektroforez tankları ve tarakları, THERMO EC250-90 Güç Kaynağı, Arçelik -20 derin dondurucu, Nüve FN 500 sterilizatör, Nüve EN 500 Etüv, Nüve ES 500 Soğutmalı etüv, Nüve OT 4060 Otoklav, Nüve BM 402 Benmari, Nüve Steril kabin, otomatik pipetler ve diğer alet-ekipmanlar kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örnekler

Aydın ili ve çevresinde bulunan sahipli köpeklerden alınan 200 adet kan örneği Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Rutin Teşhis Laboratuvarına soğuk zincirde getirilmiştir. Kan örneklerinden DNA izolasyonu UltraClean Microbial DNA Isolation Kit ile prosedüre uygun olarak yapılmıştır. Ayrılan DNA'lar PCR çalışmaları yapılana kadar cryo tüplerde -20 °C derin dondurucuda saklanmıştır.

2.2.2. DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan standart suşlar (*Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ve *Aspergillus fumigatus* ATCC 16903) Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilmiştir. %4 Sabouraud Dextrose Agarda üretilen standart suşlar Sabouraud Dextrose Broth'a pasajlanıp UltraClean Microbial DNA Isolation kitin prosedürüne uygun olarak DNA'ları ekstrakte edilmiştir. *A. fumigatus*'un DNA'sı Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında bulunan ROCHE marka MagNA Pure Compact otomatik DNA ekstraksiyon cihazı ile ekstrakte edilmiştir.

UltraClean Microbial DNA Isolation Kit Prosedürü:

- 1.8 ml (kan, sıvı kültür) örnek ependorf tüpe aktarılıp 10000 devirde 30 saniye santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra tekrar 10000 devirde 30 saniye santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı.
- Pelete 300 µl microbead solüsyonu eklendi ve microbead tüplere aktarıldı.
- 50 µl MD1 solüsyonu eklendi ve 65 °C de 10 dakika Benmari' de inkübe edildi.
- Microbead tüpler 10 dakika ardından yatık olarak çalkalayıcıya kondu ve 10 dakika tutuldu.
- Microbead tüpler 10 dakikanın ardından fazla sarsılmadan 10000 devirde 30 saniye santrifüj edildi.
- Süpernatant steril temiz ependorfa transfer edildi
- Üzerine 100 µl MD 2 solusyonu eklendi ve 5 saniye vortekslendi. Ardından 4 °C de 5 dakika inkubasyona bırakıldı.
- 5 dakikayı takiben 10000 devirde 1 dakika santrifüj edildi.
- Yaklaşık 450 µl süpernatant pipetle alıdı ve steril ependorfa aktarıldı.
- Üzerine 900 µl MD3 solusyonu eklendi ve 5 saniye vortekslendi.
- Karışımın 700 µl'si Spin Filtreli tüpe aktarıldı ve 10000 devirde 30 saniye santrifüj edildi. Alt sıvı atıldı ve aynı işlem kalan karışım için tekrarlandı.
- Spin filtreli tüpe 300 µl MD4 ilave edildi ve 10000 devirde 30 saniye santrifüj edildi. Altta kalan sıvı kısım atıldıktan sonra tekrar boş olarak santrifuj edildi.
- Filtre yeni steril tüpe aktarıldı.
- Üzerine 50 µl MD5 filtrenin üzerine gelecek şekilde eklendi ve 10000 devirde 30 saniye santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra filtre atıldı ve altta kalan sıvı DNA olarak kullanıldı.

2.2.3. PCR'de amplifikasyonda kullanılan bileşenler ve reaksiyon konsantrasyonları

PCR'de amplifikasyonda kullanılan bileşenler ve bunların reaksiyon konsantrasyonları aşağıdaki çizelgelerde gösterilmiştir.

Çizelge 2.2.3.1: Nested PCR 1. Basamak PCR'da reaksiyon bileşen ve konsantrasyonları

Reaksiyon bileşeni	Konsantrasyonu
10xPCR buffer	1.25 µl
10x dNTP mix (2mM)	1.25 µl
Primer 1 (CDF28) (5µM)	0.75 µl
Primer 2 (CDR148) (5µM)	0.75 µl
Kod Dash DNA Polymerase (2.5 U/µl)	0.25 µl
Mili Q	12.0 µl 'ye tamamlanır

PCR'de kullanılan örnek sayısına göre hazırlanan reaksiyon karışımı DNase-free PCR tüplerine dağıtıldı. Her birinin üzerine 0.5 µl'lik izole DNA'lar eklendi. Tüpler thermal cycler'a yerleştirilip Nested PCR I. Basamak çizelge 2.2.3.1'de verilen PCR kondüsyonlarında gerçekleştirildi.

2.2.4. VI'lı Primer Karışımı (PsVI) hazırlanması

Nested PCR birinci basamaktan sonra elde edilen ürünler, ikinci basamak PCR için template DNA olarak kullanıldı. 5 µM olarak sulandırılan tür spesifik primerlerin her birinden 10'ar µl alındı. Bu miktardaki spesifik primerler yeni bir eppendorf tüpte karıştırılarak PsVI forward ve PsVI reverse primer miksleri hazırlandı. PsVI forward ve PsVI reverse primer karışımları alikotlar halinde bulundurulmuş ve ihtiyaç halinde kullanılmıştır.

Çizelge 2.2.4.1 . Nested PCR II. Basamak reaksiyon bileşen ve konsantrasyonları.

Reaksiyon bileşeni	Konsantrasyonu
10xPCR buffer	1.25 µl
10x dNTP mix (2mM)	1.25 µl
PsVI Forward (5µM)	0.75 µl
PsVI Reverse (5µM)	0.75 µl
Kod Dash DNA Polymerase (2.5 U/µl)	0.25 µl
MiliQ	11.5 µl 'ye tamamlanır

PCR'de kullanılan örnek sayısına göre hazırlanan reaksiyon karışımı DNase-free PCR tüplerine dağıtıldı. Her birinin üzerine 1 µl birinci basamak PCR ile elde edilen ürünlerden eklendi ve ürünler template DNA olarak kullanıldı. Tüpler thermal cycler'a yerleştirilip PCR işlemi çizelge 2.2.4.1'de verilen kondüsyonlarda gerçekleştirildi.

2.2.5. Pozitif Kontrol Karışım DNA hazırlanması

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından temin edilen standart suşlar (*Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 ve *Aspergillus fumigatus* ATCC 16903)'dan elde edilen template DNAlar ve *C. parapsilosis I* saha izolatu aynı tüp içinde en az 1 pg miktarında olacak şekilde karıştırılmıştır (Kanbe ve ark., 2003). Hazırlanan pozitif DNA karışımı Nested PCR I. ve II. aşamalarında işlenerek elde edilen bant görüntüleri fotoğraflanmıştır.

2.2.6. PCR inkubasyon sıcaklık ve süreleri

PCR toplam 30 siklusa gerçekleştirildi. PCR inkubasyon sıcaklık ve süreleri çizelge 2.2.6.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2.6.1: PCR inkubasyon sıcaklık ve süreleri.

Ön Isıtma	96 °C	2 dakika
Denaturasyon	96 °C	30 saniye
Primer bağlanması	57 °C	3 saniye
Ekstensiyon	74 °C	30 saniye

2.2.7. DNA elektroforezi ve PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

PCR ürünleri ethidium bromid eklenen %1.2'lik agaroz jelde, 15 µl'lik hacimlerde, sabit akımda, 80 volta, 45 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonuçları UV transilluminatörde oluşan band görüntülerine göre değerlendirildi. Amplikonların yaklaşık olarak *C.parapsilosis* II 310 bp, *C. albicans* 490 bp, *C. glabrata* 672 bp, *C. tropicalis* II 777 bp, *C. parapsilosis* I 880 bp ve *A. fumigatus* 1,097 bp hedeflerdeki varlıkları araştırıldı (Kanbe ve ark., 2003).

2.2.8. Metodun Sensitivitesi

Metodun sensitivitesi için, ekstraksiyonu MagNA Pure Compact otomatik DNA ekstraksiyon cihazı ile yapılan, *Aspergillus fumigatus* pozitif kontrolü kullanıldı. Ekstraksiyonu yapılan pozitif kontrol *Aspergillus fumigatus* suşunun DNA miktarı 10,6 µg/ml olarak ölçülmüştür. *Aspergillus fumigatus* DNA'sı 1,10,100,1000 pg/ml olacak şekilde sulandırılmış ve metodun sensitivitesi için bu örnekler nested PCR işlemine tabi tutulmuştur.

3. BULGULAR

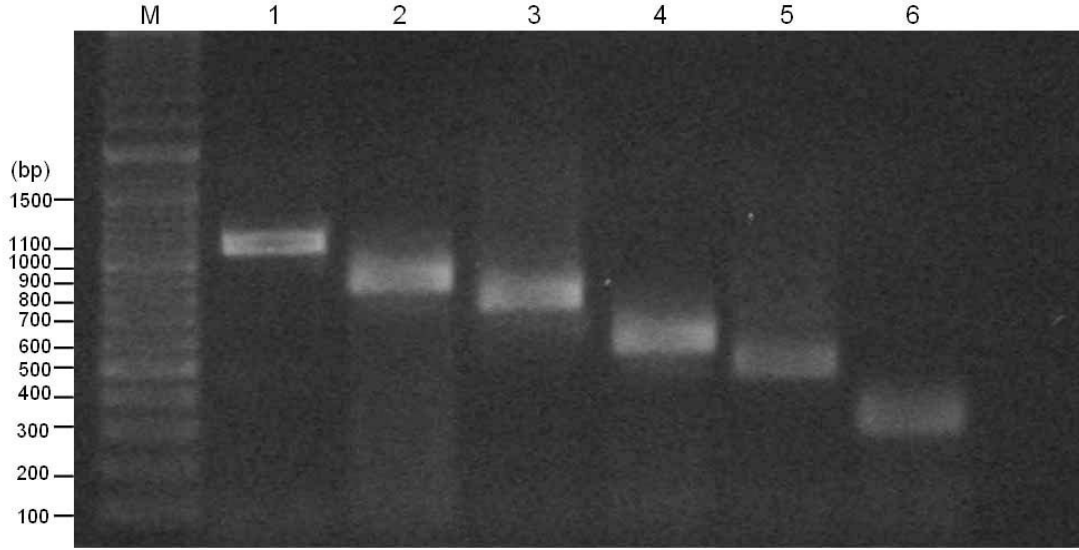
Bu tez çalışması ile köpeklerde görülen ve klinik tanısı konulamayan sistemik *Candida* ve *Aspergillus fumigatus* infeksiyonlarının DNA topoisomerase II geni nükleotid sekansları kullanılarak tanıları yapılmıştır. Araştırmamızda Aydın ili ve çevresinde bulunan sahipli köpeklerden toplanan 200 adet erişkin köpek kan örneğinin 68 (%34)'inde sistemik mantar infeksiyonu saptanmıştır. Elde edilen pozitiflik oranlarının köpek ırklarına göre dağılımı Çizelge 3.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1.: Pozitif örneklerinin köpek ırklarına göre dağılımı

Örnekleme Yapılan Köpek Irkları	Pozitif Erkek Köpek Sayısı (adet)	Pozitif Dişi Köpek Sayısı (adet)
Alman Çoban Köpeği	3	2
Kangal	7	3
Pointer	4	4
Setter	5	3
Barak	4	3
Doberman	2	3
Terrier	2	2
Melez	16	5
TOPLAM	43	25

Araştırmamızda kullanılan *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida tropicalis II* (ATCC 750), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 16903) DNA'ları ve *C. parapsilosis I* saha izolatu DNA'sı için tek tek PCR miskleri hazırlanmış ve PsVI ile nested PCR I ve II. basamakları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bantlar ultraviyole transilluminatörde görüntülenerek

fotoğrafları çekilmiş ve bu bant görüntüleri Resim 3.1.1'de gösterilmiştir. Kullanılan standart *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) suşunun DNA topoisomerase II genine spesifik primerlere göre *Candida parapsilosis II* olarak tanımlanması dikkat çekmektedir.



Resim 3.1.1 *Aspergillus fumigatus* ve *Candida* türleri için nested PCR (Amplikonların yaklaşık olarak *C.parapsilosis II* 310 bp, *C. albicans* 490 bp, *C. glabrata* 672 bp, *C. tropicalis II* 777 bp, *C. parapsilosis I* 880 bp ve *A. fumigatus* 1,097 aralığındadır). Sütun M: 100+500 bp'lik Moleküler ağırlık işaretleyicisi (100+500 bp ladder), Sütun 1: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 16903), Sütun 2: *C. parapsilosis I* saha izolatu, Sütun 3: *Candida tropicalis II* (ATCC 750), Sütun 4: *Candida glabrata* (ATCC 90030), Sütun 5: *Candida albicans* (ATCC 90028), Sütun 6: *Candida parapsilosis II* (ATCC 22019).

Araştırmamızda kullanılan nested PCR metodu ile kan örneklerinden ekstrakte edilen DNA'lardan, PsVI miks forward ve reverse primerleri kullanılarak, hem *Candida* türlerinin (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis II*, *Candida parapsilosis I* ve *II*) hem de *Aspergillus fumigatus*'un tek PCR tüpü ile tanıları gerçekleştirilmiştir. Araştırmamızda 68 pozitif örneğin 40 (% 58.8)'ında tek mantar enfeksiyonu ve 28 (% 41.2)'inde ise miks mantar enfeksiyonları görülmüştür. 40 (% 58.8) pozitif örneğin, 16 (% 8)'sı *C. albicans*, 12 (% 6)'si *A. fumigatus*, 4 (% 2)'ü *C. tropicalis II*, 4 (% 2)'ü *C. parapsilosis I*, 4 (% 2)'ü *C. glabrata* olarak tanımlanmıştır. 28 (% 41.2) miks örnekte ise, 8 (% 28.57) *C. albicans* ve *C. tropicalis II*, 8 (% 28.57) *C. albicans* ve *C. parapsilosis I*, 4 (% 14.28) *C. parapsilosis I-II* ve *C tropicalis II*, 4 (% 14.28) *A. fumigatus* ve *C. parapsilosis II* ve 4 (% 14.28) *C. glabrata* ve *C. parapsilosis I* saptanmıştır. Sistemik mantar enfeksiyonu saptanan örneklerin ırklara göre dağılımı Çizelge 3.2.'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.2.: Sistemik mantar infeksiyonu saptanan örneklerin köpek ırklarına göre dağılımı.

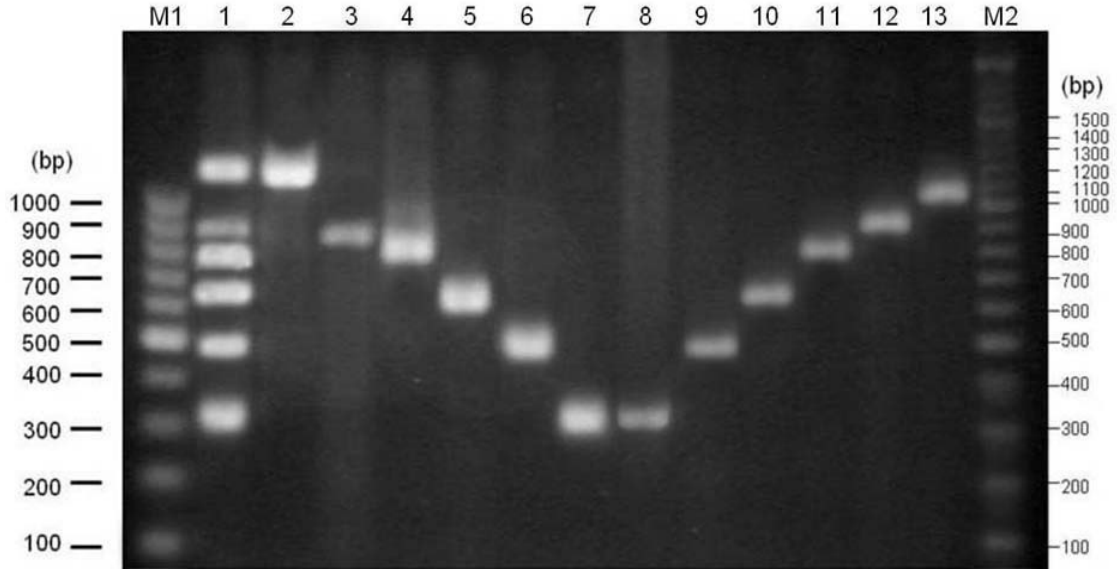
	<i>C.albicans</i> (n:16)		<i>A.fumigatus</i> (n:12)		<i>C. tropicalis</i> II (n:4)		<i>C. parapsilosis</i> I (n:4)		<i>C.glabrata</i> (n:4)		<i>C. albicans/ C. tropicalis II</i> (n:8)		<i>C. albicans/ C.parapsilosis I</i> (n:8)		<i>C. parapsilosis I-II/ C. tropicalis II</i> (n:4)		<i>A. fumigatus/ C.parapsilosis II</i> (n:4)		<i>C.glabrata/ C. parapsilosis I</i> (n:16)	
	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D
Alman Çoban	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	1	-
Kangal	2	1	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	1	1	1
Pointer	1	1	2	1	1	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Setter	1	-	1	-	1	-	-	1	-	-	2	1	-	1	-	-	-	-	-	-
Barak	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	-	-	-	-	-
Doberman	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1	-	1	-	-	-	-
Terrier	1	1	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melez	3	2	3	1	1	-	-	-	1	2	1	-	3	-	2	-	1	-	1	-

E: Erkek köpek

D: Dişi köpek

İdentifikasyonları yapılan bazı pozitif örneklerin jel fotoğraf görüntüleri Resim 3.1.2’de gösterilmiştir. Bazı örneklerde, nested PCR’ın I. basamağı sonucunda hedeflenen 1200 bp bölgede bant görülmemiştir. Ancak bu örneklerin yapılan nested PCR’ın II. basamağı sonucunda hedef olarak belirlenmiş bantlar görülmüş ve bu örneklerin de identifikasyonları yapılmıştır.

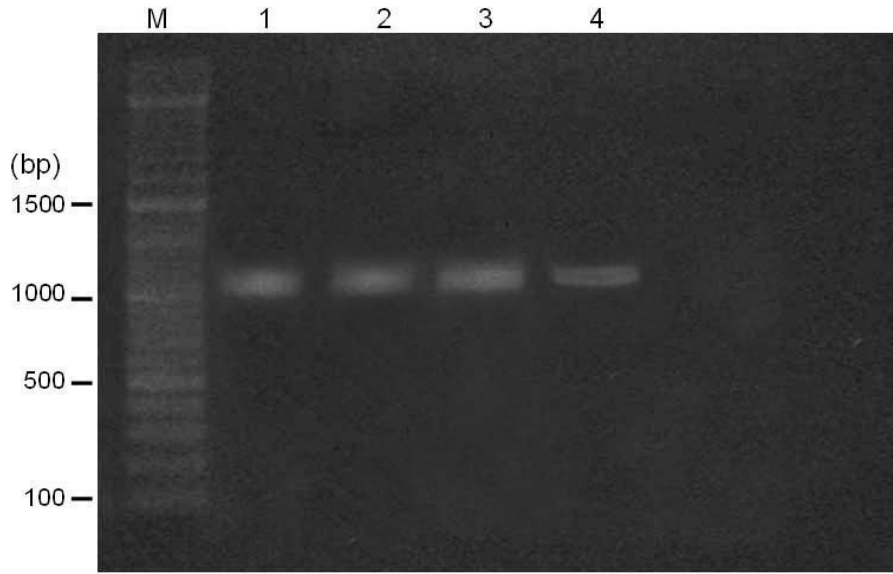
Araştırmamızda kullanılan *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida tropicalis II* (ATCC 750), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 16903) DNA’ları ve *C. parapsilosis I* saha izolatu DNA’larından 6’lı DNA miksi hazırlanmış ve PsVI ile nested PCR I ve II. basamakları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bantlar ultraviyole transilluminatörde görüntülenerek fotoğrafları çekilmiş ve bu bant görüntüleri Resim 3.1.2’de gösterilmiştir.



Resim 3.1.2 *Aspergillus fumigatus* ve *Candida* türleri için nested PCR (Amplikonların yaklaşık olarak *C.parapsilosis II* 310 bp, *C. albicans* 490 bp, *C. glabrata* 672 bp, *C. tropicalis II* 777 bp, *C. parapsilosis I* 880 bp ve *A. fumigatus* 1,097 aralığındadır). Sütun M1: 100 bp’lik Moleküler ağırlık işaretleyicisi (100 bp ladder), Sütun 1: 6’lı DNA miksi, Sütun 2: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 16903), Sütun 3: *C. parapsilosis I* saha izolatu, Sütun 4: *Candida tropicalis II* (ATCC 750), Sütun 5: *Candida glabrata* (ATCC 90030), Sütun 6: *Candida albicans* (ATCC 90028), Sütun 7: *Candida parapsilosis II* (ATCC 22019), Sütun 8: *Candida parapsilosis II* pozitif örnek, Sütun 9: *Candida albicans* pozitif örnek, Sütun 10: *Candida glabrata* pozitif örnek, Sütun 11: *Candida tropicalis II* pozitif örnek, Sütun 12: *C. parapsilosis I* pozitif örnek Sütun 13: *Aspergillus fumigatus* pozitif örnek, Sütun M2: 100+500 bp’lik Moleküler ağırlık işaretleyicisi (100+500 bp ladder)

Araştırmamızın sensitivitesi için *Aspergillus fumigatus* (ATCC 16903) pozitif kontrolü kullanılmıştır. *Aspergillus fumigatus* (ATCC 16903) pozitif kontrol DNA'sı metoduna uygun olarak 1, 10, 100, 1000 pg/ml olarak sulandırılmıştır. Bu sulandırmaları yapılmış *Aspergillus fumigatus* DNA'larının ayrı ayrı PsVI ile nested PCR'ları yapılmıştır. Elde edilen bantlar ultraviyole transilluminatörde görüntülenerek fotoğrafları çekilmiş ve bu bant görüntüleri Resim 3.1.3'de gösterilmiştir.

Aspergillus fumigatus DNA sulandırmalarının ayrı ayrı PsVI ile yapılan nested PCR'ları sonucunda 1 pg/ml'de görüntü elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuç, yapılan PCR işleminin sensitivitesinin yüksek olduğunu göstermektedir.



Resim 3.1.3 PsVI ile nested PCR'ları dilusyonları yapılmış *Aspergillus fumigatus* Amplikonları
Sütun M: 100+500 bp'lik Moleküler ağırlık işaretleyicisi (100+500 bp ladder), Sütun 1: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 16903) 1pg/ml, Sütun 2: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 16903) 10 pg/ml, Sütun 3: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 16903) 100 pg/ml, Sütun 4: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 16903) 1000pg/ml.

4. TARTIŞMA

Candida türleri immun sistemi baskılanmış hasta bireylerde en fazla görülen derin kutanöz ve tırnak infeksiyonlarına neden olan mantar patojenlerindendir. Teşhiste süperfisiyal infeksiyonlardan yararlanılır fakat daha invaziv formlar kronik infeksiyonlara yol açar (Dupont 1990). *Candida* infeksiyonlarının başlıca ajanı olan *Candida albicans* için tanı metotları geliştirilmeye çalışılmaktadır, fakat diğer *Candida* türlerinin de infeksiyonlardan izole edildiği görülmüştür. Geçmişte yapılan kan kültürü çalışmalarında kanser hastalarından izole edilen *Candida* türlerinin yarısından *Candida albicans* izole edilmiştir. Diğer izolatlar da *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* ve miks infeksiyon olarak *C. albicans* ve *Candida glabrata* beraber saptanmıştır (Meunier ve ark 1992). Yayınlanmış olan birçok PCR protokolleri de hem *C. albicans*, hem de diğer *Candida* türlerinin saptanması için geliştirilmiştir.

Mantar infeksiyonların PCR ile saptanmasında ilk diagnostik çalışma Buchman ve arkadaşları (1990) tarafından yapılmıştır. *Candida* türleri için ergosterol biyosentezindeki rolünden dolayı sitokrom P₄₅₀ lanosterol-14 α -demetilaz enzimi genini kodlayan hedef bölge amplifikasyon için seçilmiştir. PCR çalışmasının duyarlılığı tam olarak ortaya konamamasına rağmen 10²-10³ c.f.u ml⁻¹ deneysel aşamada etkili olmuştur. Cerrahi operasyon geçiren altı hastadan alınan idrar, balgam, yara sıvısı gibi örnekleri içeren marazi maddelerden yapılan PCR çalışmasında 15 örnekten pozitif sonuç elde edilmiştir. Fakat bu sonuçların sensitivitesi tartışılmamıştır.

Candida albicans mitokondrial DNA'sından duplike edilmiş bölgeden yapılan sekans analizi *Candida albicans* spesifik PCR çalışması olarak Miyakawa ve arkadaşları (1992) tarafından yapılmıştır. Primerler 40 adet *Candida albicans* türünden 1.8 kb fragment elde edilmesini sağlamıştır. Diğer *Candida* türleri, *Cr. Neoformans*, *Saccharomyces cereviciae*, üç adet bakteriyel izolat ve insan hücrelerini içeren 38 adet

izolattan herhangi bir sonuç elde edilememiştir. PCR çalışmasının duyarlılığı maya hücrelerinin tuz içeren soluyonda ve insan idrarında dilüe edilmesi sonucu saptama limiti tuz solusyonunda 2-10 hücre ve idrarda 100 hücre olmak üzere etidium bromid ile boyanan jelde kontrol edilmiştir. Bu analiz, Southern hibridizasyon ile geliştirilmiştir. Metot sonucu araştırmacılar, bu şekilde az miktarda *Candida albicans* spesifik fragment (400-500 bp) içeren örnekler için metodun pratik olduğunu, fakat kan gibi çok sayıda amplikon içeren örnekler için metodun uygun olmadığını kabul etmişlerdir.

Niester ve arkadaşları (1993), çeşitli *Candida* türlerinin saptanması için nested PCR metodunu kullanmışlardır. *C. albicans*, *C. glabrata* ve *S. cerevisiae* türlerinin küçük ünite rRNA genlerinin, tüm geni amplifiye ettiğinden dolayı sekanslama analizleri elde edilmiştir. Ürünler *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea* ve *C. tropicalis* türlerinden elde edilmiştir. Direkt sekanslama, Southern hibridizasyon, restriksiyon enzim mapping ve interrepeat PCR yöntemleri ile tür spesifik parmak izleri çıkarılmış, adı geçen sekiz adet *Candida* izolatlarının identifikasyonunda kullanılmıştır.

Kan 1993 yılında *Candida albicans* türünün aktin geninin 158 bp segmentinin amplifikasyonu yapmıştır. Amplikonlar 30 bp internal prob ile işaretlenmiş PCR reaksiyon tüpleri hibridize edilmiştir ve daha sonra akrilamid jel ile elektroforez yapılmış ve otoradyografi ile pozlanmıştır. Testin duyarlılığı 25 fg DNA yada on adet maya hücresi olarak belirlenmiştir. Duyarlılık testi de tür spesifik olarak değerlendirilmiştir.

İlk PCR değerlendirmesi, immunokompetent fare modeli ve hasta örnekleri kullanılarak yapılmıştır. Kemirgen kandidiyemi olgusundan elde edilen kan örneklerinden kültür ve plazma örnekleri PCR ile test edilmiştir. Bütün örnekler, infeksiyonun başlamasından sonraki dört günlük periyotta pozitif olarak değerlendirilmiştir. İkinci modelde ise uylukta lokalize olan infeksiyon indüklenmiş ve 15 gün sürmek üzere her üç günde bir örnek alınmıştır. Bu test sonunda ise PCR ve kan kültüründen pozitif sonuç elde edilmemiştir. Aynı durum ise kan kültürü yapılan hastalarda da saptanmıştır. Serum örnekleri, daha önce *Candida* izole edilen 14 hastadan toplanmış ve 11 adedi pozitif örnek elde edilmiştir. Bu protokolle birlikte hem fare örneklerinden hem de klinik hastaların örneklerinden *Candida* türlerinin izole edilebileceği ortaya konmuştur ve bununla birlikte

PCR ile yanlış pozitif sonuç eldesi olmaksızın noninfeksiyöz kommensal ve yayılma eğilimi göstermeyen *Candida* türlerinin izolasyonu da yapılmıştır.

Crampin ve Matthews (1993) düşük sayıda gen içeren heat shock protein 90'ı (HSP90) PCR amplifikasyonunda kullanmışlardır. Kullanılan primerler ise *Candida albicans* genlerinden oluşan amplikonlardan elde edilmiştir. Buna ek olarak *Candida* türlerine ait olmayan nonspesifik ürünler de saptanmıştır. Araştırmacılar da nonspesifik ürünlerin klinik örneklerden elde edilemeyeceğini belirtmişlerdir.

Candida albicans türünde bulunan kitin sentetaz (CHS1) geni de, diğer memelilerde bu genin olmadığı belirlenmesi için PCR çalışmalarında hedef olarak kullanılmıştır (Jordan 1994). İdentifiye edilmiş olan primerler, *Candida albicans* (122 bp), *Candida parapsilosis* (311 bp), *C. tropicalis* (519 bp), *C. glabrata* (535 bp) türlerinin amplikonlarından elde edilmiştir ve bu dört *Candida* türü, neonatal kandidemi vakalarının %90'ından sorumlu olmaktadır. Bu metot, medikal önemi olan *Candida* türlerinin tek basamakta saptanması açısından ilk olarak uygulanmıştır. Tür spesifik problemler ise Southern hibridizasyonda kullanılmak için dizayn edilmiştir. PCR ve kan kültürünün karşılaştırılması açısından muayene edilen 27 adet serumun 26 tanesi uyumluluk göstermiştir. Yüksek risk taşıyan 29 hastanın serumundan ve kemik iliği transplantasyonu olan mukozal kolonizasyonlu 5 hastadan alınan örneklerden hiçbirinde PCR sonucu pozitif izolat elde edilememiştir. Bu protokol, kan kültürüne göre daha duyarlı olmamasına rağmen hızlı uygulanmaktadır ve tür diferansiyasyonu açısından daha avantajlı olarak belirlenmiştir.

Bu arada rRNA genleri de hedef olarak seçilme özelliğini sürdürmektedir. Holmes ve arkadaşları (1994) 5S rRNA gen tabanlı 2 adet primer çifti elde etmiştir ve bu çiftlerden biri 105 bp'lik, diğeri de 684 bp'lik olarak saptanmıştır.

Buna benzer olarak SSU rRNA geninde bulunan V4 bölgesi, PCR için baz olarak Southern blotlama tekniğinde ve tür spesifik problemlerde kullanılmış, nötrojenik bir faredeki *C. albicans* türü izole edilebilmiştir (Van Deventer ve ark 1995). İmmunokompetent farelerde gastrointestinal kolonizasyon belirlenmiş ve aynı metotla

PCR protokolünün kommensal mantarları değil, sadece invaziv mantar hücrelerini belirlediği ortaya konmuştur. PCR ve kan kültürünün karşılaştırılması sonucunda bu metotla pozitif örneklerin sayısında artış belirlenmiştir. Ayrıca değişik türlere ait genetik problemler kullanılmasıyla da tür çeşitliliği de belirlenebilmektedir.

Fujita ve arkadaşları (1995), *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. glabrata* türlerinin, 5S rRNA geninin ve ITS bölgesinin sekanslanması sonucu elde edilen primerler ile belirlenebildiği bir evrensel PCR protokolü geliştirmişlerdir. Protokolün duyarlılığını test etmek için enzim immunoassay kullanılmış ve kolorimetrik metot yerine etidium bromid boyama metodundan sonra hücre yoğunluğunun 10^2 kat arttığı belirlenmiştir.

Haynes ve arkadaşları (1995) ve Haynes ve Westerneng (1996) geniş subunit (LSU) rRNA gen sekansının baz alındığı reverz primer kullanmış ve patojen *Candida* türlerinin 4 ayrı forward primer ile belirlenebileceğini ortaya koymuştur. Dört PCR protokolünde de aynı sıcaklık derecesi kullanılmış ve dokuz adet *C. albicans* izolatu, 18 adet *C. glabrata* izolatu, *C. parapsilosis* izolatu, 18 adet *C. krusei* izolatu tür bazında tanımlanmıştır. DNA ekstraksiyonunun da dahil olduğu test prosedürü zaman olarak 3 saat sürdüğü belirlenmiştir.

L₁A₁ geninin ekspresyonuna dayalı olan bir PCR çalışmasında da *C. albicans*, *S. cerevisiae* ve *Blastoschizomyces capitatus* türlerinin de tanımlanabileceği bildirilmiştir (Morace ve ark 1997). PCR çalışması sonucu 200 fg *Candida* DNA'sı elde edilmiş ve yedi değişik türe ait restriksiyon enzim mapping tanımlanmıştır. Bu metot, mantar enfeksiyonu geçirmiş olduğu belirlenen hastalardan alınan kan örneklerine uygulanmış ve 21 adet örneğin 15 adedinden PCR pozitif sonuç elde edilmiştir, bu sonuçların da kültür sonuçları ile pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Araştırmacılar ise kesin bir yorum yapılabilmesi için bu protokolün çok sayıda hasta örneği üzerinde uygulanmasını vurgulamışlardır. Sonuçlar cesaret verici olsa da rutin teşhis için örneklemenin yüksek yapılması gerekmektedir.

Kanbe ve ark. (2002) *Candida* türlerinin hızlı ve tür seviyesinde tanımlanması için DNA topoisomerase II geni sekanslarına dayalı bir metod geliştirmişlerdir. Nested

PCR ile *Candida* türlerinin DNA topoisomerase II genlerine ait primerlerin kullanıldığı çalışmada klinik materyallerden kolay hızlı ve tür düzeyinde identifikasyon sağlanmıştır.

Araştırmamızda Aydın ili ve çevresinde bulunan sahipli köpeklerden toplanan 200 adet erişkin köpek kan örneğinin 68 (% 34)'inde sistemik mantar infeksiyonu saptanmıştır. Bu 68 (% 34) pozitif örneğin 52 (% 76,5)'inden *Candida* türlerinin identifikasyonu yapılmıştır.

Aspergillus cinsinin üyeleri sık rastlanan saprofit mikroorganizmalardır ve toprakta bol miktarda bulunurlar. Havada bulunan spor formlarının %0.1-22 kadarı *Aspergillus conidia* tarafından oluşturulmaktadır (Anassie 1992). 200'e yakın *Apergillus* türü bulunmasına karşın bunlardan sadece bazıları hastalık oluşturma yeteneğine sahiptir. Hastalıklardan en fazla izole edilen tür *A. fumigatus*'tur (Rinaldi 1983). Etkenin vücuda giriş yolu genellikle solunum yolu ile olur. 2-3 µ büyüklüğünde olan *A. fumigatus* konidiaları alveoler aralıktan kolayca geçebilirler. Bu sebepten dolayı infeksiyonların büyük bölümünden *A. fumigatus* izole edildiği düşünülmektedir (Kwon-Chung ve Bennett 1992). Predispoze hastalarda etken kolayca lokalize olabilmekte, hematojen yolla organlara yerleşmekte, morbidite ve mortalitesi yüksek seyretmektedir (Cohen 1990). Erken antimantar terapi uygulanması, hastalığın prognozunun iyi olması açısından önemlidir (Burch ve ark 1987). Fakat erken teşhis hastalık açısından zor olmaktadır.

Bronşioalveoler sıvı ve balgam gibi örneklerin kültür ve sitolojik muayenesi geçmişte bazı çalışmalarda uygulanmıştır. Nalesnik ve ark. (1980) tek bir adet balgam kültürünün pozitif olmasının malign olarak değerlendirilmesi gerektiğini belirtmiştir. Bronşioalveoler sıvı örneklerinin sitolojik muayenesinin, kültür muayenesinden daha fazla güvenilir sonuç verdiği bildirilmiştir (Levy ve ark., 1992). Ayrıca akut lökemi bulunan hastalarda bronşioalveoler sıvı muayenesinin de *P. Carini* indentifikasyonunda daha kesin sonuç verdiği saptanmıştır (Saito ve ark 1988). Solunum yolunda bulunan mikroorgnizmaların büyük çoğunluğu sitoloji ve kültür yöntemleri sonucunda aspergillozis negatif olarak saptanmıştır. Kritik hastalarda açık cerrahi yöntem kontraendike olmasına rağmen sitoloji ve kültür yöntemleri altın standart olarak kabul edilmiştir.

Reddy ve arkadaşları (1993), bronkoalveolar sıvı örneği toplanmasındaki kontaminasyondan etkilenilmemesi için idrardan alınan örneklerden *Aspergillus fumigatus* identifikasyonu için PCR metodu geliştirmişlerdir. Kullanılan primerler için *A. restrictus*'un ribotoksinleri ve *A. giganteus*'un alfa sarkin proteini ile yüksek homolog yapıya sahip olan parsiyel protein sekansları baz alınmıştır. *A. fumigatus* ve *A. restrictus* DNA'ları için yapılan PCR amplifikasyonu limiti Southern analiz yöntemi ile 0.6 pg olarak belirlenmiştir. Kemik iliği transplantasyonu yapılacak olan 13 adet hastadan alınan idrar örneklerinden iki adet pozitif elde edilmiş, fakat bu iki örnekten sadece bir tanesinde invaziv aspergillozis teşhisi konulmuştur.

Spreadbury ve arkadaşları (1993), klinik olarak aspergillozis teşhisi konulmuş ve kültür pozitif olan üç hastada *Aspergillus fumigatus* türünün rRNA kompleksinde bulunan 26 S intergenik aralığın amplifikasyonu ile yapılan PCR testinde pozitif sonuç elde etmişlerdir. Fakat, havada solunum havasında bulunan aspergilloz etkenlerinin inhalasyonu söz konusu olduğundan dolayı respiratorik yoldan alınan örnekler ile etken identifikasyonu tartışmalı hale gelmektedir. Pozitif PCR sonucunun değerlendirilmesi için, kültür sonucu negatif çıkan immunsupresif hastalardan ve diğer akciğer hastalığı olan immunompetent hastalardan PCR çalışması yapılmış, immunsupresif 10 hastanın 2 adedinde ve immunkompetent 7 hastanın 2 adedinde pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu sonuçların, Southern hibridizasyonun aşırı duyarlı olmasına bağlı olduğu düşünülmüş, fakat klinik örneklerin kültür sonuçları ve PCR sonuçlarının korelasyon açısından benzer olması, PCR yönteminin invaziv aspergillozis için kullanılabilir olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, daha sonra yapılan çalışmalar ile birlikte doğrulanmıştır.

Tang ve arkadaşları (1993), *A. fumigatus* ve *A. flavus* türlerinin Alkalın proteaz (Alp) genlerinin baz alındığı primer çiftleri kullanarak aspergillozis teşhisi konulmuş 4 hastanın bronkoalveolar sıvılarından PCR yöntemi ile etken identifikasyonu çalışması yapmıştır. Bu çalışma sonucunda da 1 adet hastadan pozitif sonuç elde etmiştir.

Verweij ve arkadaşları (1994), düşük infeksiyon riski taşıyan daha geniş bir hasta popülasyonunda yaptığı çalışmada aspergilloz kolonizasyonunu saptamıştır. Nötropenik olmayan 70 adet hastadan alınan bronkoalveolar örneklerden 11 adet pozitif sonuç elde edilmiştir. *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. nidulans* ve *A. niger* türlerinin 18S rRNA

genlerinden elde edilen primerler, diğerk fırsatçı patojenlerin de saptanabilmesi için kullanılmıştır (Cohen 1990). *Paecilomyces variotii*, *Penicillium marneffei* ve *Penicillium chrysogenum* ile yüksek kros reaksiyonlar belirlenmiş fakat bu kros reaksiyon Southern hibridizasyon metodunda restriksiyon enzimi digesyonu ile *Aspergillus* türlerinden ayrılmıştır. Testin duyarlılığı, rRNA'nın cDNA'ya amplifikasyondan sonra kopyalanması ile 1 pg'den 10 fg'ye yükselmiş, buna rağmen ekstra basamakla daha fazla pozitif sonuç elde edilemeyeceği varsayılmıştır. Aspergillozis infeksiyonu taşıyan 6 farenin 5 adedinden pozitif PCR sonucu elde edilmiştir.

Bretagne ve ark. tarafından 1995 yılında karşılaştırmalı PCR metodu geliştirilmiş ve bu metotta PCR inhibisyonuna ve negatif sonuçların elde edilmesine yol açan internal nedenlerin önlenmesine çalışılmıştır. *Aspergillus fumigatus* spesifik primerlerin M13mp18 faj DNA'sı ile birleştirilmesi ile daha küçük olan amplikonlar ayrılmış ve yanlış negatif sonuçlar bu sayede önlenmiştir. Başarılı bir amplifikasyon sonunda da 135 bp fragment segmentinde ürün elde edilmiştir. Daha önceki amplifikasyonlarda elde edilen ürünlerin kontaminasyonu sonucu ortaya çıkacak olası yanlış pozitif sonuçlar da dTTP yerine dUTP'nin urasil-N-glikozilaz ile muamelesi sonucu önlenmiştir. Bu yer değiştirme metodu, yüksek yanlış pozitif reaksiyon verebilecek *Mycobacterium tuberculosis* bulunan 7 hastada uygulanmıştır (Vanechouette ve Van Eldere 1997). Çalışmada 55 bronkoalveoler sıvı örneği test edilmiş, 15 adet pozitif sonuç elde edilmiştir. Fakat araştırmacılar, antimantar terapi alan ve klinik olarak aspergilloz teşhisi konulan hastalardan alınan örneklerle elde edilen PCR pozitif sonuçlarının öneminin olmadığını belirtmişlerdir. Çünkü bu araştırmacılara göre rutin teşhis yöntemleri yeterlidir ve yüksek riskli hastalarda yapılan PCR testlerinin tahmin edilebilir duyarlılığı saptanamamıştır. Verweij ise erken teşhis açısından klinik belirti göstermeyen hastalardan alınan örneklerden PCR metodu ile identifikasyon yapılabileceğini önermiştir (Verweij ve ark. 1996).

Yamakami ve arkadaşları (1996), deneysel olarak infekte edilen farelerden elde edilmiş olan serum örnekleri ile 18S rRNA geninin baz alındığı tür spesifik nested PCR metodunu uygulamıştır. Southern DNA analizi ise testin duyarlılığını artırmıştır. Deneysel infeksiyondan 4 gün sonra hayvanlardan alınan serum örnekleri PCR metodu ve Pastorex *Aspergillus* lateks aglutinasyon testi ile muayene edilmiş ve bu testler sonucu toplam sekiz örnekten beşi PCR pozitif ve sekiz örnekten üçü aglutinasyon pozitif olarak belirlenmiştir.

Fakat fareler uygun cerrahi yöntemle intratrakeal olarak infekte edilmiş ve bu deney invaziv aspergilloz için uygun olmamıştır. Klinik hastalardan alınan 20 örneğin 14 adedi PCR pozitif, 12 adedi de aglutinasyon pozitif olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar umut vericidir fakat alınan örnek miktarının düşük olduğu durumlarda gerekli düzenlemelerin yapılması gerekmektedir.

Kanbe ve ark. (2002) candidalarda olduğu gibi DNA topoisomerase II geni sekanslarına dayalı primerler kullanarak aspergillusların tür düzeyinde identifikasyonlarını gerçekleştirmişlerdir. Nested PCR metodu ile klinik materyalden kolay, hızlı ve tür düzeyinde identifikasyonlar yapılmıştır.

Araştırmamızda Aydın ili ve çevresinde bulunan sahipli köpeklerden toplanan 200 adet erişkin köpek kan örneğinin 68 (% 34)'inde sistemik mantar infeksiyonu saptanmıştır. Bu 68 (% 34) pozitif örneğin 16 (% 23,5)'sından *Aspergillus fumigatus* identifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Kanbe ve arkadaşlarının daha önceki çalışmalarında (Kanbe ve ark. 2002a, Kanbe ve ark. 2002b), *Candida* ve *Aspergillus* türlerinin identifikasyonu için DNA topoizomerez II genini hedefleyen PCR yapmışlardır. Kanbe ve ark. (2003), yukarıdaki araştırmaları baz alarak tek primer seti ile *Aspergillus fumigatus* ve *Candida*'ları tür düzeyinde identifiye eden yeni bir nested PCR metodu geliştirmişlerdir. Ayrıca bu araştırmada, PsVI ile amplifiye edilen DNA mikstürlerinde nested PCR sonucunda birden fazla DNA fragmenti elde ettiklerini bildirmektedirler. Bu geliştirilen metot ile nested PCR metodunun birinci basamağında CDF28 ve CDR148 ortak primerler kullanılmış ve işlem sonucunda template DNA'ların her birini ayrı olarak amplifiye ettiği görülmüştür. Nested PCR metodunun ikinci basamağında kullanılan PsVI ile birinci basamak ürünlerinden tür spesifik DNA fragmentlerinin elde edildiği gösterilmiştir. Klinik örneklerden elde edilen DNA örneklerinin PsVI kullanılarak nested PCR ile amplifiye edildiği durumlarda birden fazla DNA bantları da elde edilebilmektedir. Kanbe ve ark.'nın bu sonuçlarına göre; daha önce yapılmış (Kanbe ve ark. 2002a, Kanbe ve ark. 2002b) PCR tabanlı tanılarda önemli mantar türlerinin identifikasyonu için dört set primerin kullanıldığı, ancak bu araştırma sonucunda (Kanbe ve ark. 2003) ise sadece tek bir primer seti ile nested PCR yapıldığı ve önemli mantar türlerinin identifiye edildiği anlaşılmaktadır.

Tez çalışmasında DNA topoisomerase II geni sekanslarına dayalı primerler kullanılmıştır. 200 adet köpek kanından elde edilen genomic DNA ile yapılan Nested PCR metodu ile % 34 oranında sistemik mantar infeksiyonu tespit edilmiştir.

Elde edilen % 34'lük pozitiflik oranı köpeklerde sistemik mantar infeksiyonlarının yoğun bir şekilde görüldüğünü göstermektedir. Ülkemizde yapılan mantar infeksiyonu araştırmaları (OR E ve ark. 1999, BAĞCIGİL AF ve ark. 2005, TEL Y ve AKAN M 2008) daha çok kutanöz mikozislere yönelik olup, sistemik mantar infeksiyonlarına açısından yapılmış bir araştırmaya tarafımızca rastlanılmamıştır. Köpeklerde sistemik mantar infeksiyonları ile ilgili araştırma ve yayın sayısının yok denecek kadar az olması % 34'lük pozitiflik oranının önemini daha da arttırmaktadır.

Araştırmamızda 68 pozitif örneğin 40 (% 58.8)'ında tek mantar infeksiyonu ve 28 (% 41.2)'inde ise miks mantar infeksiyonları görülmüştür. 40 (% 58.8) pozitif örneğin, 16 (% 8)'sı *C. albicans*, 12 (% 6)'si *A. fumigatus*, 4 (% 2)'ü *C. tropicalis II*, 4 (% 2)'ü *C. parapsilosis I*, 4 (% 2)'ü *C. glabrata* olarak tanımlanmıştır. 28 (% 41.2) miks örnekte ise, 8 (% 28.57) *C. albicans* ve *C. tropicalis II*, 8 (% 28.57) *C. albicans* ve *C. parapsilosis I*, 4 (% 14.28) *C. parapsilosis I-II* ve *C. tropicalis II*, 4 (% 14.28) *A. fumigatus* ve *C. parapsilosis II* ve 4 (% 14.28) *C. glabrata* ve *C. parapsilosis I* saptanmıştır.

Elde edilen bu veriler ışığında, DNA topoisomerase II geni sekanslarına dayalı primerler kullanılarak yapılan nested PCR metodu ile teşhis edilen sistemik mantar infeksiyonlarının önemli bir yüzde oranına sahip olduğu görülmektedir. Veteriner klinikte ve sahada sistemik mantar infeksiyonlarının tanısının rutin tanı metotları ile yapılamadığı düşünüldüğünde bu oran daha fazla önem arz etmektedir.

Tez çalışması sonuçlarına bakıldığında, Kanbe ve ark. (2003)'larının kullandığı metodun köpeklerde sistemik mantar infeksiyonlarının tanısında kullanılmasının yarar sağlayacağı sonucuna varılmıştır. Bu tez çalışması ile *Candida* ve *Aspergillus*'ların tür düzeyinde kolay ve hızlı tanısı için laboratuara ve klinik tanıya yönelik yararlı sonuçlar

elde edilmiştir. Veteriner alanda göz ardı edilen mantar infeksiyonları, DNA topoisomerase II geni kökenli nested PCR metodu ile kolay ve hızlı bir biçimde tanımlanabilecektir. Bu araştırma, sistemik mantar infeksiyonlarının tanısı açısından ülkemizde Veteriner alanda yapılan ilk moleküler çalışma olmasından dolayı da önem arz etmektedir.

5. SONUÇ

Tez çalışmasında, DNA topoisomerase II genine spesifik primerler ile Nested PCR metodu kullanılmıştır. Araştırmada, Aydın ili ve çevresinde bulunan sahipli köpeklerden toplanan 200 adet erişkin köpek kan örneğinin 68 (%34)'inde sistemik mantar infeksiyonu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, DNA Topoisomerase II geni kullanılarak yapılan Nested PCR metodu ile önemli *Candida* ve *Aspergillus* türlerinin kolay ve hızlı tanısının yapılabileceği ortaya çıkarılmıştır.

Araştırmamızın % 34 oranında sistemik mantar infeksiyonu yönünden pozitiflik göstermesi, Veteriner Hekimlik alanında bu sistemik mantar infeksiyonlarının göz ardı edildiğini ve köpeklerde fazla miktarda antibiyotik ve kortikosteroid kullanılmış olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak bu tez çalışması, ülkemizde sistemik mantar infeksiyonlarının tanısı açısından Veteriner alanda yapılan ilk moleküler çalışmadır. Ülkemizde sistemik mantar infeksiyonları ile ilgili sağlıklı veriler elde edilebilmesi için, çalışmaların yaygınlaştırılması ve devam ettirilmesi önerilmektedir.

6. ÖZET

Sistemik mantar infeksiyonları özellikle veteriner alanda göz ardı edilen ve yanlış tedavi protokolleri ile kötü sonuçların ortaya çıktığı infeksiyonlardır. Candidiazis prensipte oral mukoza ve deri gibi yüzeysel mukoz membranları etkileyen oportunistik bir infeksiyondur. Sistemik candidiazis genellikle immunsupresyon, zayıf kondüsyon veya iatrojenik (uzun süreli antibiyotik alımı) uygulamalarla ilgilidir. *Aspergillus fumigatus* da alerjik bronkopulmoner aspergillozdan sistemik aspergilloza kadar geniş bir spektrumda infeksiyonlara sebep olan oportunistik bir patojendir.

Tez çalışmasında DNA topoisomerase II geni sekanslarına dayalı primerler kullanılmıştır. Aydın ili ve çevresinden toplanan 200 adet köpek kanından elde edilen genomik DNA ile yapılan Nested PCR metodu ile % 34 oranında sistemik mantar infeksiyonu tespit edilmiştir. Araştırmamızda 68 pozitif örneğin 40 (% 58.8)'ında tek mantar infeksiyonu ve 28 (% 41.2)'inde ise miks mantar infeksiyonları görülmüştür. 40 (% 58.8) pozitif örneğin, 16 (% 8)'sı *C. albicans*, 12 (% 6)'si *A. fumigatus*, 4 (% 2)'ü *C. tropicalis II*, 4 (% 2)'ü *C. parapsilosis I*, 4 (% 2)'ü *C. glabrata* olarak tanımlanmıştır. 28 (% 41.2) miks örnekte ise, 8 (% 28.57) *C. albicans* ve *C. tropicalis II*, 8 (% 28.57) *C. albicans* ve *C. parapsilosis I*, 4 (% 14.28) *C. parapsilosis I-II* ve *C. tropicalis II*, 4 (% 14.28) *A. fumigatus* ve *C. parapsilosis II* ve 4 (% 14.28) *C. glabrata* ve *C. parapsilosis I* saptanmıştır.

Araştırmamızın, köpeklerde % 34 oranında sistemik mantar infeksiyonu yönünden pozitiflik göstermesi, Veteriner Hekimlik alanında bu sistemik mantar infeksiyonlarının göz ardı edildiğini ortaya çıkarmaktadır. Ülkemizde sistemik mantar infeksiyonları ile ilgili sağlıklı veriler elde edilebilmesi için, çalışmaların yaygınlaştırılması ve devam ettirilmesi önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Candida sp.*, *Aspergillus fumigatus*, DNA Topoisomerase II Geni, Nested PCR

7. SUMMARY

Systemic fungal diseases are the infections caused by false treatment protocols and generally are not taken into consideration especially in Veterinary field. Candidiasis is an opportunistic infection affecting mucosal membranes such as oral mucosa and skin. Systemic candidiasis is generally associated with immune deficiency, low condition or iatrogenic applications such as long-term antibiotic consumption. *Aspergillus fumigatus* is an opportunistic pathogen causing a wide infection spectrum from allergic bronkopulmoner aspergillosis to systemic aspergillosis.

In this study, specific primers for DNA topoisomerase II gene sequences were used. Fungal infection rate was found to be as 34% in genomic DNA's obtained from 200 dog blood samples by using Nested PCR. 68 samples were found to be positive and 40 of these (58.8%) were caused by only one fungal agent, and 28 samples (41.2%) were called as mixed fungal infection. The incidences of *C. albicans*, *A. fumigatus*, *C. tropicalis II*, *C. parapsilosis I*, and *C. glabrata* were 16(8%), 12 (6%), 4 (2%), 4 (2%) and 4 (2%), respectively in 40 (58.8%) positive samples identified. 28 (41.2%) of positive mixed samples were identified as *C. albicans* and *C. tropicalis II* in 8 samples (28.57%), *C. albicans* and *C. parapsilosis I* in 8 samples (28.57%), *C. parapsilosis I-II* and *C tropicalis II* in 4 samples (14.28%), *A. fumigatus* and *C. parapsilosis II* in 4 samples (14.28%), *C. glabrata* and *C. parapsilosis I* in 4 samples (14.28%).

In conclusion, 34% positive systemic fungal infection rate in dogs observed in the present study showed that the systemic fungal infections are not taken into considerations in Veterinary medicine. Further studies are suggested in order to obtain and to maintain extensive data for systemic fungal diseases in our country

Key Words: *Candida sp.*, *Aspergillus fumigatus*, DNA Topoisomerase II Gene, Nested PCR

8. KAYNAKLAR

Anaissie E (1992). Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer centre and review. *Clinical Infectious Diseases* 14 (Suppl.1), S43–S53.

Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker KS (1997). Özel Mikrobiyoloji Sistemik Mikozisler “Kandidiazis, Aspergillozis”, Medisan Yayın Serisi No:26, 4. Baskı 324-327, 332-336.

Arda M (2000). Temel Mikrobiyoloji, Mantarların Genel Karakterleri (GENEL MİKOLOJİ) Medisan Yayın Serisi, 2. Baskı.

Arda M (2006). Temel Mikrobiyoloji, Mantarların Genel Karakterleri (GENEL MİKOLOJİ) Medisan Yayın Serisi No:46, 3. Baskı; 315-369.

Arnheim N and Erlich H (1992). Polymerase chain reaction strategy. *Annual Review of Biochemistry* 61, 131–156.

Bağcıgil AF, İkiz S, Özgür NY, Or E, Ilgaz A (2005). Klinik Olarak Mantar Şüpheli Köpek ve Kedilerde Mikolojik Çalışmalar. 4. ULUSAL MANTAR HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ KONGRESİ 3-6 Mayıs KONYA. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.49.

Barnes AJ, Oppenheim BA, Chang J, Mongenstern GR, Scarffe JH (1999). Early investigation and initiation of therapy for invazive pulmonary aspergillosis in leukaemic and bone marrow transplant patients. *Mycoses*; 5-6: 403-408.

Baydar S (1990). Tohumuz Bitkilerin Sistematiği. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fatih Eğitim Fakültesi. Yayın No:151, Fakülte yayın No:46, İkinci Baskı. Trabzon.

Beck JJ, Ligon JM (1995). Polymerase chain reaction assays for the detection of *Stagonospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat. *Phytopathology* 85, 319–324.

Bennett JW (1987). Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxycology and Mycopathologia. *Mycopathologia* ; 100: 3-5.

Berger JM, Gamblin SJ, Harrison SC, Wang JC (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 379, 225-232.

Bevan IS, Rapley R, Walker MR (1992). Sequencing of PCR-amplified DNA. *PCR Methods and Applications* 1, 222–228.

Bretagne S, Costa J-M, Marmorat-Khuong A, Poron F, Cordonnier C, Vivaud M, Fleury-Feith J (1995). Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 1164–1168.

Buchheidt D., Baust C., Skladny H., Ritter J., Suedhoff T., Baldus M., Seifarth W., Leib-Moesch C., Hehlmann R. (2001). Detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients by means of 2-step polymerase chain reaction: clinical results. *Clin. Infect. Dis.*;33(4):428-35.

Buchman TG, Rossier M, Merz WG, Charache P (1990). Detection of surgical pathogens by *in vitro* DNA amplification. Part I. Rapid identification of *Candida albicans* by *in vitro* amplification of a fungus-specific gene. *Surgery* 108, 338–347.

Burch PA, Karp JE, Merz WG, Kuhlman JE, Fishman EK (1987). Favourable outcome of invasive aspergillosis in patients with acute leukaemia. *Journal of Clinical Oncology* 5, 1985–1993.

Chen W (1992). Restriction fragment length polymorphisms in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species. *Phytopathology* 82, 1467–1472.

Cheng S., Chang S.-Y., Gravitt P. and Respass R. (1994). Long PCR. *Nature* 369, 684–685.

Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W (1992). Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research* 20, 1717–1723.

Christensson B, Wiebe T, Pehrson C, Larsson L (1997). Diagnosis of invasive candidiasis in neutropenic children with cancer by determination of D-arabinitol / L-arabinitol ratios in urine. *J. Clin. Microbiol.*;35(3): 636-40.

Cohen J., (1990). Clinical manifestation and management of aspergillosis in the compromised patient. In: Warnock, D.W. and Richardson M.D. (eds) *Fungal Infection in the Compromised Patient*, 2nd edn. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 117–152.

Costa CD, Vidaud D, Olivi M, Bart-Delabesse E, Vidaud M, Bretagne S (2001). Development of two real-time quantitative TaqMan PCR assays to detect circulating *Aspergillus fumigatus* DNA in serum. *Journal Microbiol. Methods.*;44(3):263-9.

Crampin AC, Matthews RC (1993). Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of candidosis by amplification of an HSP90 gene fragment. *Journal of Medical Microbiology* 39, 233–238.

Cross NCP (1995). Quantitative PCR techniques and applications. *British Journal of Haematology* 89, 693–697.

De Barbeyrac B, Bebear C, Taylor-Robinson D (1996). PCR: preparation of DNA from clinical specimens. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology* II, 61–64.

De Repentigny L, Kaufman L, Cole GT, Kruse D, Latge J-P, Matthews RC (1994). Immunodiagnosis of invasive Mantar infections. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 32 (Suppl. 1), 239–252.

Denning DW (1998). Invazive aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases.*; 26: 781-805.

Deragon J-M, Sinnett D, Mitchell G, Potier M, Labuda D (1990). Use of g irradiation to eliminate DNA contamination for PCR. *Nucleic Acids Research* 18, 6149.

Dieffenbach CW, Lowe TMJ, Dveksler GS (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications* 3, S30–S37.

Di Bonito R, Elliott ML, Desjardin EA (1995) Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2809–2810.

Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K. and Mattick J.S. (1991). ‘Touchdown’ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research* 19, 4008.

Doss RP, Welty RE (1995) A polymerase chain reaction-based procedure for detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. *Phytopathology* 85, 913–917.

Dupont B (1990). Clinical manifestations and management of candidosis in the compromised patient. In: Warnock, D.W. and Richardson M.D. (eds) *Fungal Infection in the Compromised Patient*, 2nd edn. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 55–84.

Edel V, Steinberg C, Avelange I, Laguerre G, Alabouvette C (1995). Comparison of three molecular methods for the characterization of *Fusarium oxysporum* strains. *Phytopathology* 85, 579–585.

Edel V, Steinberg C, Gautheron N, Alabouvette C (1997). Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. *Mycological Research* 101, 179–187.

Edel V., (1998). Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview. © CAB INTERNATIONAL . *Applications of PCR in Mycology* (eds P.D. Bridge, D.K. Arora, C.A. Reddy and R.P. Elander).

Ener B (2006). Fungal İnfeksiyonların Tanı Ve İzlemindeki Yenilikler . ANKEM Derg;20(Ek 2):28-32.

Ersek T, Schoelz JE, English JT (1994) PCR amplification of species-specific DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2616–2621.

Fell JW (1995) rDNA targeted oligonucleotide primers for the identification of pathogenic yeasts in a polymerase chain reaction. *Journal of Industrial Microbiology* 14, 475–477.

Fenn JP, Segal H, Barland B, Denton D, Whisenant J, Chun H, Christofferson K, Hamilton L, Carroll K (1994). Comparison of the updated Vitek Yeast Biochemical Card and API 20C yeast identification systems. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 1184–1187.

Filichkin SA, Gelvin SB (1992). Effect of dimethyl sulfoxide concentration on specificity of primer matching in PCR. *BioTechniques* 12, 828–830.

Fisher SG, Lerman LS (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80, 1579–1583.

Fromtling RA, Rhodes JC, Dixon DM (2003). Taxonomy, classification, and morphology of the fungi, “Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller M, Tenover FC, Tenover BC(eds): “Manual of Clinical Microbiology, 8.baskı” kitabında s.1653-8, ASM Press, Washington.

Frutos R L, Fernández-Espinar M T and Querol A (2004). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85: 175–185.

Fujita K, Silver J (1994). Single-strand conformational polymorphism. *PCR Methods and Applications* 4, S137–S140.

Fujita S, Lasker BA, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ (1995). Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 962–967.

Goodwin PH, Hsiang T, Xue BG, Liu HW (1995) Differentiation of *Gaeumannomyces graminis* from other turf-grass fungi by amplification with primers from ribosomal internal transcribed spacers. *Plant Pathology* 44, 384–391.

Haynes KA, Westerneng TJ (1996). Rapid identification of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* by species-specific PCR of large subunit ribosomal RNA. *Journal of Medical Microbiology* 44, 390–396.

Haynes KA, Westerneng TJ, Fell JW, Moens W (1995). Rapid detection and identification of pathogenic fungi by PCR amplification of large subunit ribosomal RNA. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 33, 319–325.

He Q, Marjam aki M, Soini H, Mertsola J, Viljanen MK (1994). Primers are decisive for sensitivity of PCR. *BioTechniques* 17, 82–86.

Henrion B, Le Tacon F, Martin F (1992). Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytologist* 122, 289–298.

Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, Jenkinson HF (1994). Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 228–231.

Hoog GS, Gene GJ, Figueras MJ (2000). Atlas of Clinical Fungi, 2. baskı s.1-21, Centraalbueraue voor Schimmelcultures, Utrecht.

Hopfer RL, Walden P, Setterquist S, Highsmith WE (1993). Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using PCR amplification and restriction enzyme analysis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 31, 65–75.

Höltke HJ, Ankenbauer W, Mühlegger K, Rein R, Sagner G, Seibl R, Walter T (1995). The digoxigenin (Dig) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids – an overview. *Cellular and Molecular Biology* 41, 883–905.

Huang WM (1996). Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annu. Rev. Genet.* 30, 79-107.

Inazuka M, Tahira T, Hayashi K (1996). One-tube post-PCR fluorescent labelling of DNA fragments. *Genome Research* 6, 551–557.

Innis MA, Gelfand DH (1990). Optimization of PCR. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 3–12.

Ishida R, Hamatake M, Wasserman RA, Nitiss JL, Wang JC, Andoh T (1995). DNA topoisomerase II is the molecular target of bisdioxopiperidine derivatives ICRF-159 and ICRF-193 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res.* 55, 2299-2303.

Kainz P, Schmiedlechner A, Strack HB (1992). *In vitro* amplification of DNA fragments > 10 kb. *Analytical Biochemistry* 202, 46–49.

Kan VL (1993). PCR for the diagnosis of candidaemia. *Journal of Infectious Diseases* 168, 779–783.

Kanbe T, Arishima T, Horii T, Kikuchi A (2003). Improvements of PCR-Based Identification Targeting the DNA Topoisomerase II Gene to Determine Major Species of the Opportunistic Fungi *Candida* and *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology Immunology*, 47(9), 631–638.

Kanbe T, Horii T, Arishima T, Ozeki M, Kikuchi A (2002). PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. *Yeast* 2002; 19: 973–989.

Kanbe T, Yamaki K, Kikuchi A (2002). Identification of the Pathogenic *Aspergillus* Species by Nested PCR Using a Mixture of Specific Primers to DNA Topoisomerase II Gene. *Microbiology Immunology*, 46(12), 841-848.

Kano R, Hattori Y, Okuzumi K, Miyazaki Y, Yamauchi R, Koie H, Watari T, Hasegawa A (2002). Detection and Identification of the *Candida* species by 25S Ribosomal DNA Analysis in the Urine of Candidal Cystitis. *Journal of Veterinary Medicine Science* 64(2): 115.117.

Kantarcioğlu AS ve Yücel A (2003). *Aspergillus* species and invasive aspergillosis: Mycology, pathogenesis, laboratory diagnosis, resistance of antifungal agents and susceptibility tests. *Cerrahpaşa Journal of Medicine*; 34 (3): 140-157.

Kato M, Ozeki M, Kikuchi A, Kanbe T (2001). Phylogenetic relationship and mode of evolution of yeast DNA topoisomerase II gene in the pathogenic *Candida* species. *Gene* 272: 275–281.

Keller BA, Patel S, Fisher LM (1997). Molecular cloning and expression of the *Candida albicans* TOP2 gene allows study of fungal DNA topoisomerase II inhibitors in yeast. *Biochemistry Journal*; 324, 329-339.

Khosravi A R, Mardjanmehr H, Shokri H, Naghshineh R, Rostamibashman M, Naseri A (2009). Mycological and histopathological findings of experimental disseminated candidiasis in dogs. *Iranian Journal of Veterinary Research*, Shiraz University, Vol. 10, No. 3, Ser. No. 28.

Klassen GR, Balcerzak M, de Cock AWAM (1996) 5S ribosomal RNA gene spacers as species-specific probes for eight species of *Pythium*. *Phytopathology* 86, 581–587.

Kwon Chung KJ, Bennett JE (1992). *Medical Mycology*. Philadelphia; Lea and Fabinger,.

Latgé JP (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Rev.*; 2: 310-350.

Lee SB, Taylor JW (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. and White T.J. (eds) *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 282–287.

Lee SB, Taylor JW (1992). Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* 9, 636–653.

Lehman PF, Lin D, Lasker BA (1992). Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 3249–3254.

Levy H, Horak DA, Tegtmeier BR, Yokota SB, Forman SJ (1992). Value of bronchoalveolar lavage and bronchial washing in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Respiratory Medicine* 86, 243–248.

Li KN, Rouse DI, German TL (1994) PCR primers that allow intergeneric differentiation of ascomycetes and their application to *Verticillium* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 4324–4331.

Lobuglio KF, Pitt JI, Taylor JW (1993). Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual *Penicillium* species in subgenus *Biverticillium*. *Mycologia* 85, 592–604.

Longo MC, Berninger MS, Hartley JL (1990). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93, 125–128.

Majer D, Mithen R, Lewis BG, Vos P, Oliver RP (1996). The use of AFLP PCR in Mycology: an Overview 17 fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycological Research* 100, 1107–1111.

Martin F, Vairelles D, Henrion B (1993). Automated ribosomal DNA fingerprinting by capillary electrophoresis of PCR products. *Analytical Biochemistry* 213, 30–37.

McGinnis MR, Tilton CR (1994). General approaches to isolation and identification of clinically significant fungi, “Howard BJ, Keiser JF, Weisfeld AS, Smith TF, Tilton RC (eds): Clinical and Pathogenic Microbiology, 2. baskı” kitabında s.561-76, Mosby Co., St Louis.

Merz WG, Roberts GD (2003). Algorithms for detection and identification of fungi, “Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC (eds): Manual of Clinical Microbiology, 8. baskı” kitabında s.1668-85, ASM Press, Washington.

Meunier F, Aoun M, Bitar N (1992). Candidaemia in immunocompromised patients. *Clinical Infectious Diseases* 14 (Suppl. 1), S120–S125.

Mitchell TG, Sandin RL, Bowman BH, Meyer W, Merz WG (1994b). Molecular mycology: DNA probes and applications of PCR technology. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 32 (Suppl. 1), S351–S366.

Miyakawa Y, Mabuchi T, Kagaya K, Fukazawa Y (1992). Isolation and characterisation of a species-specific DNA fragment for detection of *Candida albicans* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 894–900.

Morace G, Sanguinetti M, Posteraro B, Lo Cascio G, Fadda G (1997). Identification of various medically important *Candida* species in clinical specimens by PCR and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 667–672.

Mori T, Matsumura M (1999). Clinical evaluation of diagnostic methods using plasma and/or serum for three mycoses: aspergillosis, candidosis, and pneumocystosis. *Jpn. J. Med. Mycology*;40(4): 223-30.

Mueller UG, Lipari SE, Milgroom MG (1996). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprinting of symbiotic fungi cultured by the fungus-growing ant *Cyphomyrmex minutus*. *Molecular Ecology* 5, 119–122.

Mullis KB, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155, 335–350.

Mullis KB, Faloona FA, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263–273.

Nalesnik MA, Myerowitz RL, Jenkins R, Lenley J, Herbert D (1980). Significance of *Aspergillus* species isolated from respiratory secretions in diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* 11, 370–376.

Nicholson P, Rezanoor HN (1994). The use of random amplified polymorphic DNA to identify pathotype and detect variation in *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Mycological Research* 98, 13–21.

Niesters HG, Goessens WH, Meis JF, Quint WG (1993). Rapid, PCR-based identification assays for *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 904–910.

Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, Teshima H, Kohno S, Horiuchi A (1995). Plasma (1-3) beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and Mantar febrile episodes. *Lancet*;345(8941):17-20.

Or E, Kaymaz AA, Dodurka T, Özgür NY, Tan H (1999). Zoonotik *Microsporium canis* Infeksiyonu Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences 23 (1999) 293-296.

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, 2766–2770.

Parry DW, Nicholson P (1996) Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology* 45, 383–391.

Perfect JR, Rude TH, Wong B, Flynn T, Chaturvedi V, Niehaus W (1996). Identification of a *Cryptococcus neoformans* gene that directs expression of the cryptic *Saccharomyces cerevisiae* mannitol dehydrogenase gene. *J. Bacteriol.*;178(17):5257-62.

Raeder U, Broda P (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1, 17–20.

Rao VB (1994). Direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Analytical Biochemistry* 216, 1–14.

Reddy LV, Kumar A, Kurup VP (1993). Specific amplification of *Aspergillus fumigatus* DNA by PCR. *Molecular and Cellular Probes* 7, 121–126.

Richardson MD, Warnock DW (1993). *Mantar Infection*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Rinaldi MG (1983). Invasive aspergillosis. *Reviews in Infectious Diseases* 5, 1061–1077.

Rogers SO, Bendich AJ (1988). Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual* A6, 1–10.

Rychlik W (1995). Priming efficiency in PCR. *BioTechniques* 18, 84–90.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*; 230, 1350–1354.

Saito H, Anassie EJ, Morice RC, Dekmezian R, Bodey GP (1988). Bronchoalveolar lavage in the diagnosis of pulmonary infiltrates in patients with acute leukaemia. *Chest* 94, 745–749.

Salonen JH, Rimpilainen M, Lehtonen L, Lehtonen OP, Nikoskelainen J (2001). Measurement of the D-arabinitol /L-arabinitol ratio in urine of neutropenic patients treated empirically with amphotericin B, *Eur. Journal of Clinical Microbiology Infect. Dis.*; 20(3):179-84.

Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD (1995). Molecular probes for diagnosis of Mucor infections. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 2913–2919.

Schilling AG, Möller EM, Hartwig HG (1996) Polymerase chain reaction based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Phytopathology* 86, 515–522.

Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM (1989). Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, 232–236.

Sigmundsdottir G, Christensson B, Bjorklund LJ, Hakansson K, Pehrson C, Larsson L (2000). Urine D-arabinitol / L-arabinitol ratio in diagnosis of invasive candidiasis in newborn infants, *J. Clin. Microbiol.*;38 (8): 3039-42.

Spreadbury C, Holden D, Aufauvre-Brown A, Bainbridge B, Cohen J (1993). Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 615–621.

Sreenivasaprasad S, Mills PR, Meehan BM, Brown AE (1996a). Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome* 39, 499–512.

Sreenivasaprasad S, Sharada K, Brown AE, Mills PR (1996b). PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant Pathology* 45, 650–655.

Steiner JJ, Poklemba CJ, Fjellstrom RG, Elliott LF (1995). A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Research* 23, 2569–2570.

Sulahian A, Boutboul F, Ribaud P, Leblanc T, Lacroix T, Derouin F (2001). Value of antigen detection using an enzyme immunoassay in the diagnosis and prediction of invasive aspergillosis in two adult pediatric hematology units during a 4-year prospective study. *Cancer*; 2: 311-318.

Tanaka KI, Miyazaki T, Maesaki S, Mitsutake K, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Hossain MA, Tashiro T, Kohno S (1996). Detection of *Cryptococcus neoformans* gene in patients with pulmonary cryptococcosis. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 2826–2828.

Tang CM, Cohen J (1992). Diagnosing Mantar infections in immunocompromised hosts. *Journal of Clinical Pathology* 45, 1–5.

Tang CM, Holden DW, Aufauvre-Brown A, Cohen J (1993). Detection of *Aspergillus* species by PCR and its evaluation in BAL fluid. *American Reviews in Respiratory Diseases* 148, 1313–1317.

Tel Y, Akan M (2008). Kedi ve köpeklerden dermatofitlerin izolasyonu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 55, 167-171.

Van Belkum A, Quint WGV, De Pauw BE, Melchers WJG, Meis JF (1993). Typing of *Aspergillus* species and *Aspergillus fumigatus* isolates by interrepeat polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2502–2505.

Van Deventer AJ, Goessens WH, van Belkum A, van Vliet HJ, van Etten EW, Verbrugh HA (1995). Improved detection of *Candida albicans* by PCR in blood of neutropenic mice with systemic candidiasis. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 625–628.

Vanechoutte M, van Eldere J (1997). The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *Journal of Medical Microbiology* 46, 188–194.

Verschraegen CF, van Besien KW, Dignani C, Hester JP, Andersson BS, Anaissie E (1997). Invasive *Aspergillus* sinusitis during bone marrow transplantation. *Scand. J. Infect. Dis.*; 4: 436-438.

Verweij PE, Donnelly JP, de Pauw BE, Meis JF (1996) Prospects for the early diagnosis of invasive aspergillosis in the immunocompromised patient. *Reviews in Medical Microbiology* 7, 105–113.

Verweij PE, Meis JF, van den Hurk P, de Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JA, Melchers WJ (1994) Polymerase chain reaction as a diagnostic tool for invasive aspergillosis: evaluation in bronchoalveolar lavage fluid from low risk patients. *Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease* 6, 203–208.

Walsh TJ, Merz WG, Lee JW, Schaufele R, Sein T, Whitcomb PO, Ruddel M, Wingard J, Burns W, Switchhenco A, Goodman Ti, Pizzo PA (1995). Diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis by rapid enzymatic detection of D-arabinitol, *Am. J. Med.*;99(2):164-72.

Wang JC (1996). DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 635-692.

Watt PM, Hickson ID (1994). Structure and function of type II DNA topoisomerases. *Biochem. J.* 303, 681-695.

White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of Mantar ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.M., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.

Wong B, Perfect JR, Beggs S, Wright KA (1990). Production of the hexitol D-mannitol by *Cryptococcus neoformans* in vitro and in rabbits with experimental meningitis. *Infect. Immun.*;58(6):1664-70.

Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M (1996). PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 2464–2468.

Yücel A, Kantarcioğlu S (1999). Some important changes in taxonomy of *Candida albicans*. *Cerrahpaşa J. Med.*; 30 (3): 236-246.

Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 316–322.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi KKTC'de tamamladım. 1998 yılında Gazi Mağusa Türk Maarif Koleji'nden mezun oldum. Aynı yıl Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandım. 2003 yılında Veteriner Fakültesi'nden mezun olduktan sonra Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Ab. Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime aynı yıl içinde başladım. 2005 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Ab. Dalı Yüksek Lisans programını tamamladım. 2005 yılının güz yarısında Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Ab. Dalı Doktora programına başladım. Yabancı dil olarak "İngilizce" bilmekteyim.

TEŐEKKÖR

Tez çalıŐmalarım boyunca ilgi ve yardımlarını gÖrdüğüm danışmanım Prof. Dr. Osman KAYA'ya, 2003 yılından bugüne kadarki akademik gelişimimde desteğini hissettiğim Doç. Dr. Őükrü KIRKAN'a, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Yrd. Doç. Dr. Süheyla TÖRKYILMAZ ve Yrd. Doç. Dr. Serap SAVAŐAN'a, araŐtırmamın bazı aşamalarında desteklerini esirgemeyen ve laboratuvarlarında çalıŐmama izin veren ADÜ Tıp Fakóltesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı BaŐkanı Prof. Dr. Neriman AYDIN'a, standart suŐların temininde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Berna Gültekin'e, araŐtırmamın bazı basamaklarında katkıda bulunan Yrd. Doç. Dr. Mete EYİGÖR ve Yrd. Doç. Dr. Murat TELLİ'ye, kanların toplanmasında destek sağlayan Uzm. Vet. Hek. Hakan SARALI ve Vet. Hek. Armaėan KİRDECİ'ye, laboratuvar çalışmaları ve tez yazım aşamasında hep yanımda olan mesai arkadaŐım AraŐ. Gör. Uėur PARIN'a, bilgi ve görgüsüyle Őahsıma desteklerini esirgemeyen değerli arkadaŐım Yrd. Doç. Dr. Hakkı Bülent BECERİKLİSOY'a, Kod DASH'in Japonya'dan Ölkemize getirilmesini sağlayan NOVAGEN Hayvan Sağlığı İlaç San. ve Tic. Ltd. Őti 'ne ve Veteriner Hekim Selçuk TÖRKER'e sonsuz teŐekür ederim.

Ayrıca doktora tezi alıŐmalarımında destek veren ve sonsuz özverisi ile kahrımı çeken sevgili eŐım Őahika TEKBIYIK'a, ve tüm aileme de teŐekürlerimi iletirim.