



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**KAN KÜLTÜRÜ VE KATETER KAN KÜLTÜRLERİNDEN
İZOLE EDİLEN *CANDIDA ALBICANS* İZOLATLARINDA EFG-1
GENİ VARLIĞININ BİYOFİLM ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ VE
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN REAL-TIME PCR İLE
ARAŞTIRILMASI**

Dr. MUHAMMET SAMET EMRE DAŞTAN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

SAMSUN-2024



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**KAN KÜLTÜRÜ VE KATETER KAN KÜLTÜRLERİNDEN
İZOLE EDİLEN *CANDIDA ALBICANS* İZOLATLARINDA EFG-1
GENİ VARLIĞININ BİYOFİLM ÜRETİMİ ÜZERİNE ETKİSİ VE
EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN REAL-TIME PCR İLE
ARAŞTIRILMASI**

Dr. Muhammet Samet Emre DAŞTAN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ

Bu tez, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından
PYO. TIP.1904.23.007 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN – 2024

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimi hazırlama sürecinde desteğini esirgemeyen, bilgi ve hoşgörüsü ile yanımda çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam, tez danışmanım ve anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ' ye;

Asistanlık süresince bilgilerinden ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım, Doç. Dr. Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI, Doç. Dr. Kemal BİLGİN ve Dr. Öğr. Üyesi Demet GÜR VURAL'a;

Tez çalışma sürecimde bana destek vermekten ve vakitlerini harcamaktan hiçbir şekilde geri durmayan çok değerli abim Dr. Hamza KADI ve çok değerli çalışma arkadaşım Bio. Gülşen ÇETİN'e;

Asistanlığım süresince çok şey paylaştığım ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli asistan arkadaşlarıma, tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına, desteklerinden dolayı değerli arkadaşlarım Arş. Grv. İlknur BIYIK'a, Arş. Grv. Kübra HACIEMİNOĞLU ÜLKER'e;

Birlikte çalışmaktan ve tanışmaktan çok keyif aldığım abilerim ve aynı zamanda çalışma arkadaşlarım olan Uzm. Dr. Canberk ÇINAR, Uzm. Dr. Çağrı ÇOBAN ve Ceyhun ŞENCAN'a;

Bu süreçte yanımda olmasalar da varlıkları ile her zaman hayatımın en önemli insanlarından olan değerleri dostlarım Dr. Hüseyin AYDEMİR ve Dr. Muhammet Yusuf BOZCAN'a;

Mesafelere rağmen her anımda yanımda olan sevgi ve desteklerini benden esirgemeyen canım ailem, annem Gülname DAŞTAN, babam Adem DAŞTAN, kardeşlerim Haktan İslam Daştan ve Ata Ekber DAŞTAN'a,

Her koşulda yanımda olan, hayatın yükünü birlikte omuzladığım zorluklara birlikte göğüs gerdiğim, canım eşim, meslektaşım, en değerlim Dr. Sare KAYA DAŞTAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Muhammet Samet Emre DAŞTAN

BEYAN

”Kan kültürü ve kateter kan kültürlerinden izole edilen *Candida albicans* izolatlarında EFG-1 geni varlığının biyofilm üretimi üzerine etkisi ve ekspresyon düzeylerinin Real-Time PCR ile araştırılması” başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, başka bir çalışmadan kopya edilmediğini, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Muhammet Samet Emre DAŞTAN

ÖZET

Giriş ve Amaç: *Candida* türlerinin çapları 3-5 µm, tomurcuklanarak üreyen maya mantarlarıdır. *Candida*'lar mukoza, deri ve gastrointestinal sistemin normal florasında bulunurlar. Doğumun hemen sonrasında mukozalarda kolonize olurlar, endojen enfeksiyonlar için risk yaratırlar. Çalışmamızda kan kültürü ve kateter kan kültürlerinden izole edilen *Candida albicans* suşlarının biyofilm oluşturma özellikleri ve bu suşlarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile EFG-1(Enhanced Filamentous Growth-1) geninin ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına 01.01.2019-31.12.2022 tarihleri arasında gönderilen örneklerden izole edilen *Candida albicans* izolatları (n=60) kullanılmıştır. Kanlı agar ve Sabouraud Dextrose Agar (SDA)'a pasajlanarak elde edilen saf *Candida albicans* izolatlarında biyofilm oluşumunun tespiti mikrotitrasyon plak yöntemiyle yapılmıştır. EFG-1 geninin varlığının tespiti için real-time PCR yapılmıştır.

Bulgular: Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* izolatlarının (n=60) biyofilm oluşturma oranları %16,7 (n=10) bulunmuştur. Kateter kan kültüründen izole edilen suşların biyofilm oluşturma oranlarının (%20) kan kültüründen izole edilen suşların biyofilm oluşturma oranlarından (%13,4) yüksek olduğu bulunmuştur. Tüm izolatların (n=60) EFG-1 genine sahip olma oranları % 46,7 bulunmuştur. EFG-1 geniyle biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiye bakıldığında çalışmamızda saptadığımız sonuçların istatistiksel olarak aradaki bu ilişkiyi açıklamadığı görülmektedir (p=1,00).

Tartışma ve Sonuç: EFG-1 geni biyofilm oluşturan ve oluşturmayan türlerde yüksek oranlarda tespit edilmiş olup; biyofilm oluşumu ile EFG-1 geni arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Bu ilişkiyi değerlendirmek için başka çalışmaların yapılması gerekmektedir. Biyofilm oluşturan suşların tespiti ve bu mekanizmayı indükleyen genlerle transkripsiyon faktörlerini anlamak uygun antimikrobiyal tedavi gibi stratejik tedavi seçeneklerinin geliştirilebilmesine yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler, *C. albicans*, biyofilm, EFG-1, real-time PCR

ABSTRACT

Objective: *Candida* species are fungal microorganisms that are 3-5 µm in size, and reproduce through budding. *Candida* organisms are found in the normal flora of mucous membranes, skin, and the gastrointestinal system. They colonize mucosal surfaces shortly after birth, posing a risk for endogenous infections. Our study aims to investigate the biofilm-forming abilities of *Candida albicans* strains isolated from blood cultures and catheter blood cultures and to uncover the relationship between these strains' expression levels of the EFG-1 gene using polymerase chain reaction (PCR).

Materials and Methods: *Candida albicans* isolates (n=60) obtained from samples sent to the Ondokuz Mayıs University Hospital Medical Microbiology Laboratory between 01.01.2019 and 31.12.2022 were utilized. The detection of biofilm formation in pure *Candida albicans* isolates, which were subcultured on blood agar and Sabouraud Dextrose agar (SDA), was carried out using the microtiter plate method. Real-time PCR was performed to determine the presence of the EFG-1 gene.

Results: The biofilm formation rate of *Candida albicans* isolates (n=60) obtained from clinical samples was found to be 16,7% (n=10). It was observed that the biofilm formation rate of isolates obtained from catheter blood cultures (20%) was higher than that of isolates from regular blood cultures (13,4%). The presence of the EFG-1 gene in all isolates (n=60) was determined to be 46,7%. When examining the relationship between the EFG-1 gene and biofilm formation, our study's results indicate that there is no statistically significant association between them (p=1.00).

Conclusion: The EFG-1 gene was detected at high rates in both biofilm-forming and non-biofilm-forming *Candida* species. However, a significant relationship between biofilm formation and the EFG-1 gene could not be established. To evaluate this relationship, further studies are required. Identifying biofilm-forming strains and understanding the transcription factors and genes that induce this mechanism will help in the development of strategic treatment options.

Key Words: *C. albicans*, biofilm, EFG-1, real-time PCR

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
BEYAN	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mantarların Genel Özellikleri ve Tanı Yöntemleri	3
2.1.1. Genel özellikler	3
2.1.2. Mantar hücre yapısı	3
2.1.3. Mantar sporları	4
2.1.4. Mantarların morfolojik olarak sınıflandırılması.....	4
2.1.4.1. Mayalar	5
2.1.4.2. Küfler	5
2.1.4.3. Dimorfik mantarlar.....	6
2.1.5. Mantar enfeksiyonlarının tanı yöntemleri	7
2.1.5.1. Direkt mikroskopik inceleme	7
2.1.5.2. Kültür	8
2.1.5.3. Antijen tayini.....	9
2.1.5.4. Nükleik asit yöntemleri	9
2.2. <i>Candida</i> Türleri	9
2.2.1. <i>Candida</i> türlerinin mikrobiyolojik özellikleri	10
2.2.1.1. <i>Candida</i> 'ların üreme koşulları	11
2.2.1.2. Hücre yapısı	11
2.2.1.3. Biyokimyasal özellikler	12
2.2.1.4. Virülans faktörleri	13
2.2.1.4.1. Konak hücre yüzeyine tutunma (Adezyon).....	13
2.2.1.4.2. Maya-hif dimorfizmi.....	14
2.2.1.4.3. Fenotipik değişim.....	15

2.2.1.4.4. Salgısal aspartil proteinazlar (SAP)	15
2.2.1.4.5. Fosfolipazlar	16
2.2.1.4.6. Biyofilm	16
2.2.2. <i>C. albicans</i> 'ın patogenezi	19
2.2.3. <i>Candida</i> enfeksiyonları	19
2.2.3.1. Yüzeysel <i>Candida</i> enfeksiyonları	20
2.2.3.2. Derin <i>Candida</i> enfeksiyonları	20
2.2.4. Laboratuvar tanısı	20
2.2.4.1. Kültür	20
2.2.4.2. İdentifikasyon	21
2.2.4.3. Serolojik yöntemler	21
2.2.4.4. Moleküler yöntemler	22
2.2.5. Tedavide kullanılan antifungal ilaçlar	23
2.2.5.1. Polyenler	23
2.2.5.2. Azoller	24
2.2.5.3. Antimetabolitler	25
2.2.5.4. Alilaminler	26
2.2.5.5. Ekinokandinler	26
2.2.5.6. Fungal mitozu etkili ajanlar	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Çalışmaya Dâhil Edilen Hazır Besiyerleri	28
3.2. Çalışmaya Dâhil Edilen Kimyasallar	28
3.3. Çalışmaya Dâhil Edilen Gereçler	28
3.4. Çalışmaya Dahil Edilen Kitler ve Primerler	30
3.5. İzolasyon ve İdentifikasyon	30
3.5.1. Primer izolasyon	30
3.5.2. İdentifikasyon	30
3.5.2.1. Germ tüp testi	30
3.5.2.2. Pirinç-Tween 80 besiyerinde mikroskopik inceleme	31
3.5.2.3. Kromojenik besiyeri	32
3.5.2.4. Otomatize sistem	32
3.6. Biyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi	32
3.6.1. Mikrotitrasyon plak yöntemi	32
3.7. Real-Time PCR ile EFG-1 Geninin Araştırılması	33

3.7.1. RNA ekstraksiyonu	33
3.7.2. Total RNA miktarının ve saflığının ölçülmesi	35
3.7.3. RNA'dan komplementer DNA (cDNA) sentezi	35
3.7.4. Primer dizileri.....	36
3.7.5. Real-time PCR aşaması.....	36
3.8. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1. <i>C. albicans</i> İzolatların Özellikleri	38
4.2. <i>C. albicans</i> Suşlarının Biyofilm Aktiviteleri.....	38
4.3. <i>C. albicans</i> Suşlarının EFG-1 Geni Varlığı.....	43
4.4. Real-Time PCR Amplifikasyon Eğrileri	45
4.5. Gen Ekspresyon Düzeyleri	46
4.6. Erime Eğrisi Analizi Sonuçları.....	48
4.7. Erime eğrisi analizi görüntüleri	48
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇLAR	58
7. KAYNAKLAR	60
8. EKLER.....	65
8.1. Etik Kurul Onay Belgesi	65
8.2. Turnitin Orjinallik Raporu.....	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
ATCC	: American Type Culture Collection
BAL	: Brokoalveolar lavaj
cDNA	: Komplementer DNA
Ct	: Cycle threshold
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DTT	: Dithiothreitol
dNTP	: Deoksiribonükleotit trifosfat
EFG	: Enhanced Filamentous Growth
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GİS	: Gastrointestinal sistem
KDE	: Kan dolaşımı enfeksiyonu
KOH	: Potasyum hidroksit
MALDI-TOF MS	: Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi)
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribo Nükleik Asit
SAP	: Salgısal asit proteinaz
SB	: Sabouraud Broth
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
SDB	: Sabouraud Dextrose Broth
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TE	: Tris-EDTA
OD	: Optik dansitometre
XTT	: 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Mantar hücre duvarında yer alan polisakkaritler	3
Tablo 2. <i>Candida</i> cinsinin taksonomisi	10
Tablo 3. Tıbbi öneme sahip bazı <i>Candida</i> türleri.....	11
Tablo 4. Bazı <i>Candida</i> türlerinin biyokimyasal özellikleri	13
Tablo 5. Yüzeysel ve derin kandidozları kolaylaştıran faktörler	19
Tablo 6. Biyofilm formasyon aktivitelerinin belirlenmesi	33
Tablo 7. cDNA sentez karışımı için kullanılan malzemeler.....	35
Tablo 8. cDNA sentez karışımı için kullanılan PCR koşulları.....	36
Tablo 9. Primer dizileri ve amplicon uzunlukları	36
Tablo 10. Real-time PCR karışımı için kullanılan malzemeler.....	36
Tablo 11. Real-time PCR amplifikasyon döngüleri	37
Tablo 12. <i>C. albicans</i> izolatlarının örnek türü ve gönderildikleri kliniklere göre dağılımı	38
Tablo 13. Kateter kan kültüründen izole edilen <i>C. albicans</i> izolatlarının biyofilm oluşturma dereceleri	41
Tablo 14. Kan kültüründen izole edilen <i>C. albicans</i> izolatlarının biyofilm oluşturma dereceleri	42
Tablo 15. Nükleik asit kantitasyon değerleri.....	43
Tablo 16. İzolatların EFG-1 geni varlıkları ve biyofilm oluşturma durumları.....	44
Tablo 17. Referans suş ve izolatlara ait Ct değerleri.....	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Maya mantarı	6
Şekil 2. Küf mantarı	6
Şekil 3. <i>C. albicans</i> 'ta hif oluşumunu düzenleyen sinyal yolları.....	17
Şekil 4. Polyenlerin etki mekanizmaları	24
Şekil 5. Azollerin etki mekanizmaları	25
Şekil 6. Antimetabolitlerin etki mekanizmaları	26
Şekil 7. Ekinokandinlerin etki mekanizmaları.....	27
Şekil 8. Antifungallerin etki mekanizmaları	27
Şekil 9. <i>C. albicans</i> 'ta germ tüp oluşumu.....	31
Şekil 10. Pirinç-Tween 80 agar'da <i>Candida albicans</i> türlerinin morfolojik görüntüsü	32
Şekil 11. IMPLEN NanoPhotometer NP80 cihazı.....	35
Şekil 12. 24 saatlik inkübasyon sonrası kateter kan kültüründen izole edilen suşların mikrotitrasyon plak görüntüsü	39
Şekil 13. 48 saatlik inkübasyon sonrası kateter kan kültüründen izole edilen suşların mikrotitrasyon plak görüntüsü	40
Şekil 14. 24 saatlik inkübasyon sonrası kan kültüründen izole edilen suşların mikrotitrasyon plak görüntüsü	40
Şekil 15. 48 saatlik inkübasyon sonrası kan kültüründen izole edilen suşların mikrotitrasyon plak görüntüsü	41
Şekil 16. EFG-1 genine ait amplifikasyon eğrileri (tüm örnekler)	46
Şekil 17. EFG-1 genine ait amplifikasyon eğrileri (pozitif örnekler)	46
Şekil 18. EFG-1 gen bölgesine ait erime eğrisi analizleri (tüm örnekler)	49
Şekil 19. EFG-1 gen bölgesine ait erime eğrisi analizleri (pozitif örnekler)	50
Şekil 20. Sekans işlemi sonuç görüntüsü (0-220 bp).....	51
Şekil 21. Sekans işlemi sonuç görüntüsü (220-440 bp).....	51
Şekil 22. Sekans işlemi sonuç görüntüsü (440-580 bp).....	51

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm *Candida* türleri tomurcuklar veya blastokonidyumlar oluşturan, oval maya benzeri hücreler şeklinde bulunurlar. *Candida albicans* yalancı ve gerçek hif oluşturabilirken; *Candida glabrata* dışındaki diğer *Candida* türleri, yalancı hif oluşturabilmektedirler. Ayrıca *Candida albicans*, germ tüp ve terminal yerleşimli, kalın duvarlı klamidokonidyumlar oluşturur (1). Fırsatçı patojen mantarlar arasındaki en önemli grup şüphesiz ki *Candida* türleridir. *Candida* türleri, en sık rastlanan santral venöz kateter ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu (KDE) etkenleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır (2). 1980 yılından günümüze kadar, *Candida*'ya bağlı KDE sıklığı her büyüklükteki hastanede ve tüm yaş gruplarında sürekli bir artış göstermektedir (3). *Candida* türleri, sağlıklı bireylerin bağırsaklarında yaşayan kommensal organizmalardır (4). Çevresel değişikliklere hızla yanıt verebilir ve konakçının zayıflamış bağışıklık sisteminden yararlanarak hastalık oluşumunu kolaylaştırabilirler (5). Konakçı dokuyu tanıma, ona bağlanma, dış ortamdaki değişikliklere hızla yanıt verme, enzim salgılama ve biyofilm oluşturma yeteneklerinin virülansta önemli olduğu düşünülmektedir (6). Biyofilm, mikroorganizmaların canlı veya cansız yüzeylere tutunarak oluşturduğu matriks yapısıdır. Biyofilm oluşum sürecinde mikroorganizma hücre zarı proteinlerinin uyarılmasıyla ekzopolisakkarid materyal sentezlenerek yüzeye tutunma gerçekleşir. Biyofilm oluşturmuş mikroorganizmalar, antimikrobik ilaçlara ve fagositoza karşı direnç gösterebilir (7). Biyofilm oluşumuna, hücre morfolojisi, hücre dışı enzim aktivitesi, fenotipik değişim ve yapışma gibi birçok virülans faktörü neden olmaktadır. Abiyotik ve biyotik bölgelerde *Candida* biyofilmlerinin oluşumuyla, enfeksiyonlarda antimikrobiyallere direnç gelişmekte ve geleneksel tedaviye daha dirençli türlerin geliştiği görülmektedir (4). *Candida spp.*'nin oluşturduğu biyofilm ve enzimler enfeksiyonun temelini oluşturmaktadır (8). *Candida*'nın konak dokuya veya tıbbi cihazlara tutunmasıyla hücre bölünmesi, proliferasyon ve sonrasında biyofilm gelişimi gözlenir (9). Biyofilmler, hücre dışı polimerik maddelerden (EPS) oluşan bir matris içinde yer alan ve planktonik veya serbest yüzen benzerlerinden farklı fenotipik özellik sergileyen mikrobiyal topluluklardır. Biyofilm oluşumu, biyofilm matriksi yoluyla enfeksiyon tedavilerinde antimikrobiyallere direnç gösterdiğinden *Candida* türü için önemli bir

virülans faktörüdür. Biyofilmlerin çok yüksek antifungal dirençleri nedeniyle ortadan kaldırılması zordur ve enfekte implantın çıkarılmasıyla sonuçlanabilir (10).

Candida türleri, dünya genelinde hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli nedenleri arasında yer almaktadır. En sık görülen kandidoz etkeni tür *Candida albicans*'tır (11). Başlıca virülans faktörleri yukarıda da bahsedildiği gibi biyofilm oluşumu, esteraz, fosfolipaz ve asit proteaz üretimidir. Biyofilm üretimi *Candida* türleri için önem taşımaktadır ve antifungal direnç gelişimi ile de ilişkilidir (12). Biyofilm oluşturma kabiliyeti; önemli virülans faktörlerinden biridir. Bu sebeple biyofilm oluşturan *Candida* türleri karşımıza; antifungal direnç, kronik enfeksiyon, yabancı cisim enfeksiyonları gibi tablolarla çıkabilir. EFG-1 ise *Candida albicans*'ta morfogenez ve metabolizmanın merkezi bir transkripsiyonel düzenleyicisidir (13). Bazı çalışmalarda; EFG-1 geninde single ya da double mutasyon görülen *Candida albicans* suşlarında biyofilm oluşturma kusurları tespit edilmiştir (14). Bu tez çalışmamızda; kan kültürü ve kateter kan kültürlerinden izole edilen *Candida albicans* suşlarında biyofilm oluşturma kapasiteleri ve PCR ile tespit edilen EFG-1 geninin ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiyi tespit etmek amaçlanmıştır. *Candida* türlerinin enfeksiyon sırasında kullandığı biyofilm mekanizmalarını ve genlerle olan ilişkilerini anlamak, yeni antifungal tedavilerin ve tanı metotlarının geliştirilmesi için önem arz etmektedir. Yukarıda belirtilen virülans faktörlerini hedeflemek yeni antifungalleri geliştirirken bizler için önemli birer stratejik odak olabilir. Fungal patojenite mekanizmaları iyi anlamının tanı ve antimikrobiyal tedavide yeni stratejiler geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mantarların Genel Özellikleri ve Tanı Yöntemleri

Mantarlar (funguslar), doğada çokça bulunan mikroorganizmalardır. Günümüze kadar yaklaşık 400.000 tür tanımlanmış olup bunların yalnızca 100-150 tanesinin insanlarda enfeksiyona sebebiyet verdiği bilinmektedir. Ancak günümüzde organ transplantasyonu yapılan hastaların sayısındaki artış ve tedavide kullanılan kemoterapötiklerin giderek daha agresif hale gelmesi gibi sebeplerden ötürü enfeksiyona neden olan mantarların cins ve tür sayısında giderek artış gözlenmektedir. Mantarlar ile oluşan hastalıklar mikoz olarak adlandırılmaktadır. Mantarları ve mantar enfeksiyonlarını araştıran bilim dalına ise mikoloji ismi verilmektedir (15).

2.1.1. Genel özellikler

Mantarlar ökaryot hücre morfolojisine sahip olan mikroorganizmalardır. Yapılarında klorofil barındırmadıkları için fotosentez yapamazlar ve bu yönleri ile bitkilerden ayrılırlar. Fakültatif anaerob veya zorunlu aerob mikroorganizmalardır. Mantarlar heterotrofik mikroorganizmalardır yani organik bileşikleri ve karbonu enerji kaynağı olarak kullanırlar. Dış ortama hidrolitik enzimlerini salarak besinleri sindirirler ve sindirdikleri besin maddelerini absorpsiyonla hücre içirişine alıp kullanırlar (absorbtif beslenme) (16).

2.1.2. Mantar hücre yapısı

Mantarların bazılarında polisakkarit yapıda kapsül bulunur. Kapsül yapısı antifagositik özellik gösterdiği için önemli bir virulans faktörü olarak rol alır. Çini mürekkebi ile ıslak preperat hazırlanarak kapsül mevcudiyeti incelenebilir (17). *Cryptococcus neoformans* kapsülü olan en önemli mantardır. *Cryptococcus neoformans*'in yapısında bulunan kapsül polisakkaridi glukuronoksilomannan, galaktoksilomannan ve mannoprotein olmak üzere minimum üç farklı polimerden oluşmaktadır (15).

Tablo 1. Mantar hücre duvarında yer alan polisakkaritler (18)

Polimer	Monomer
Kitin	N-asetil D-glukozamin
Kitosan	D-glukozamin
Selüloz	D-glukoz
α -glukan	D-glukoz
β -glukan	D-glukoz
Mannan	D-mannoz

Hücre duvarı bileşenlerinin %90'ını kitin, glukan, mannan, kitosan gibi polisakkarit polimerler, %10'unu proteinler, glikoproteinler ve lipidler oluşturur. Polisakkaritlerin oranları ve çeşitleri, mantarın türüne göre farklılık gösterir (Tablo 1). Hücre duvarı hücreye şeklini verir, mantar hücresini osmotik değişikliklere karşı korur ve antijenik özellik gösterir.

Mayalar başta olmak üzere birçok mantar hücre duvarı yapısında peptidomannanlar bulunmaktadır. Galaktomannan, mannan ve daha düşük oranda ramnomannanlar mantarlara karşı meydana gelen bağışıklıktan sorumlu bileşenlerdir. Dissemine kandidozlu hastalarda serumda mannan konsantrasyonunun saptanması önemli bir tanı yöntemidir. Mantar hücre membranı, memeli hücre membranına benzer olarak fosfolipidler, proteinler ve sterollerden oluşan iki tabakalı bir yapıya sahiptir. Memeli hücre membranından farklı olarak mantar hücre hücre membranında kolesterol bulunmaz bunun yerine ergosterol ve zimosterol bulunur. Hücre membranının fonksiyonlarını; madde alışverişini düzenlemek, sitoplazmayı korumak, kapsül sentezi ve duvar sentezine yardım etmek şeklinde sıralamak mümkündür. Günümüzde tedavide kullanılan antifungal ilaçların büyük bir kısmının hedefi membranda bulunan ergosteroldür (15).

2.1.3. Mantar sporları

Mantar sporları üremeden sorumlu yapılardır. Üreme; eşeyli ya da eşeysiz yolla olabilir.

- Eşeyli (seksüel): Eşeyli sporlar ile olur. Hücre çekirdeği bir köprü aracılığıyla birleşir ve bunu takiben mayoz gerçekleşir. Doğada meydana gelir.
- Eşeysiz üreme (aseksüel): Eşeysiz sporlar ile olur. Çekirdekler arası füzyon olmaz. Laboratuvar koşullarında meydana gelir.
- Paraseksüel: Eşeyli sporları olmayan mantarlarda, genetik alışverişin rekombinasyon yolu ile olmasıdır (19).

2.1.4. Mantarların morfolojik olarak sınıflandırılması

Mantarlar morfolojik yapılarına göre; maya mantarları ve küf mantarları olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Diğer bir grup mantar ise buldukları ortamın şartlarına göre hem

küf hem de maya morfolojisine sahip olabilirler. Bu mantarlar dimorfik mantarlar olarak adlandırılmaktadır (1).

2.1.4.1. Mayalar

Mayalar, tek hücreli oval şekilde bulunan ve tomucuklanarak çoğalan mantarlardır. Maya hücreleri bazen tomucuklanmalarına rağmen ana hücrelerinden ayrılmadan uzamaya devam ederler. Oluşan bu yapı küflerin oluşturduğu hif yapısına benzediğinden dolayı yalancı hif (psödohif) olarak adlandırılmaktadır (1). Hif yapısında boğumlar bulunmazken yalancı hifte boğumlar bulunmaktadır. Mayaların çoğu yalancı hif oluştururken, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula*'da yalancı hiflere rastlanmamaktadır. Yalancı hifler, epitelde kolonizasyona sebebiyet verir ve mayanın derin dokulara invazyonunu kolaylaştırır. Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besiyeri mayaları üretirken en sık kullanılan besiyeridir. Bu besiyerinin pH'sı asidik (pH:5,5) olduğu için bakterilerin üremesini engellemektedir.

Maya kolonilerinin makroskopik görüntüleri bakteri kolonilerine benzer şekildedir. Bunlar, beyaz renkte veya krem renkte koloniler meydana getirirler. Mayalar mikroskopik olarak Gram pozitif özellik gösterirler ve mikroskopta oval veya yuvarlak hücreler şeklinde görülürler (19).

2.1.4.2. Küfler

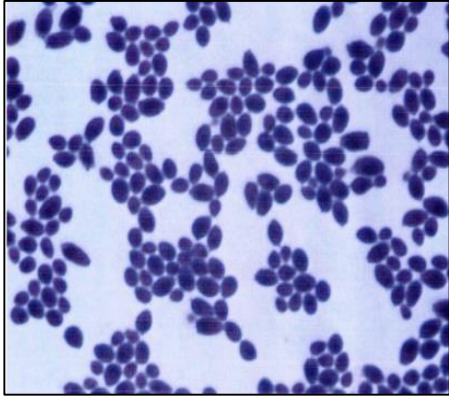
Küfler çok hücreli mantarlardır. Bu mikroorganizmalar, hif olarak adlandırılan 2-10 µm çapında silindirik, uzun, dallanan iplikli yapılardan ve spordardan meydana gelirler. Hiflerin uzamaları ve dallanmaları sonucu ağ veya örgü biçiminde bir yapı meydana gelir ki bu yapıya da miçelyum adı verilir (1). Besiyerinin içine doğru uzanan ve beslenmeyi sağlayan hiflere vejetatif hif, besiyerinden dışarı doğru uzanan, spor yapılarını taşıyan ve üremeden sorumlu olan hiflere ise aerial hif adı verilir (17). Küfleri üretmek için SDA besiyeri kullanılır. Küflerin en iyi üredikleri sıcaklık 20-26°C'dir ancak bazı türler 37°C ve üzerindeki sıcaklıklarda da üreyebilirler. Makroskopik olarak küf kolonileri pamuksu, tüysü, kadifemsi ya da tozlu görünümde olabilirler. Kültürün ön yüzünden spor rengi, arka yüzünden ise varsa pigment rengi gözlemlenebilir. Küflerin mikroskopik incelemesinde hifler ve spollar görülürler. Boya

olarak laktofenol pamuk mavisi ya da %10-20 potasyum hidroksit (KOH) kullanılabilir (20).

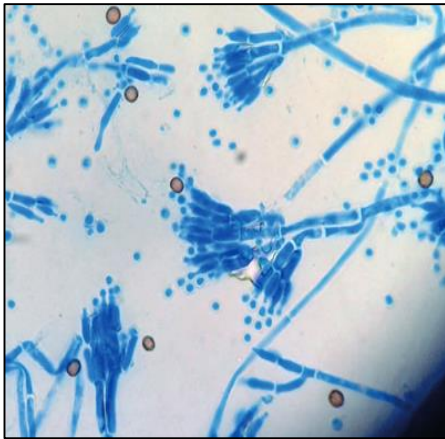
Hifler septali ve septasız hifler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Septa, hifleri bölmelere ayıran, hif duvarına dikey olarak uzanan yapılara verilen isimdir. Septumlar üzerinde porlar bulunur. Bu porlardan sitoplazma akışı sağlanır. İki septum arasında bir ya da birkaç çekirdek ve organel bulunabilir (21).

2.1.4.3. Dimorfik mantarlar

Bazı mantarlar, ortamdaki CO₂, ısı, pH, sistein gibi fiziksel ve kimyasal koşulların değişmesinden etkilenerek maya ya da küf formunda üreyebilirler. Bu mantarlara dimorfik mantarlar adı verilmektedir. Termal dimorfik olan mantarlar doğada ve 25°C'de küf, 37°C'de ve dokuda maya (*Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium marneffeii*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii*) ya da sferül (*Coccidioides immitis*) formunda ürerler.



Şekil 1. Maya mantarı (1)



Şekil 2. Küf mantarı (1)

2.1.5. Mantar enfeksiyonlarının tanı yöntemleri

Son yıllarda, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda daha fazla olmak üzere mantar enfeksiyonlarının görülme sıklığı artmıştır (3). Mantar enfeksiyonlarının yaklaşık %80'inden *Candida* ve *Aspergillus* türleri sorumludur. Mantar enfeksiyonlarının tanısı; direk mikroskopi, kültür, etkene özgül testler (antijen veya antikor tespiti) ve histolojik değerlendirme ile konulmaktadır. Günümüzde; antijen tayini, mantarlara özgül immunglobulinlerin tespiti ve moleküler yöntemlerle en kısa sürede doğru tanıyı koymak hedeflenen noktadır (22).

2.1.5.1. Direkt mikroskobik inceleme

Kültürlerin sonuçlanma sürelerinin uzun olması sebebiyle direkt mikroskopik inceleme çok büyük önem arz etmektedir. *Pneumocystis jiroveci* ve *Rhinosporidium seberi* gibi kültürde üretilmeyen mantarlar için tanı tek başına direkt mikroskopik inceleme ile koyulabilmektedir.

Mikroskobik inceleme ile genellikle maya ya da küf varlığı açısından ilk bilgilere ulaşılır. Çoğu *Candida* türü ve *Trichosporon* türleri için karakteristik olan tomurcuklanan maya hücreleri (blastospor) veya yalancı hif gibi mantarlara ait yapıların görülmesidir. Psödohif görülmeden; yalnızca blastospor görülmesi ise *Cryptococcus* türleri, *C. glabrata*, *H. capsulatum* ve *Rhodotorula* türleri için ipucu olabilmektedir. Ana hücreden birden fazla tomurcuğun meydana gelerek oluşturduğu gemi dümeni şeklindeki görüntü ise *Paracoccidioides brasiliensis* için karakteristiktir. *Coccidioides immitis* ve *R. seberi* gibi mantarlarla meydana gelen enfeksiyonlarda ise dokuda sferüller görülebilmektedir (1, 23).

Septalı ya da septasız, dikotom ya da dik açılı dallanan hifal yapıların görülmesi küf enfeksiyonu lehine bilgi vermektedir. Dikotom dallanma gösteren ve septalı hiflerin görülmesi durumunda ilk değerlendirmede akla *Aspergillus* türleri gelmelidir. Fakat bu görüntüye sadece *Aspergillus* türlerinde değil; *Fusarium*, *Scedosporium*, *Paecilomyces* ve *Penicillium* gibi küf mantarlarında da rastlanabilmektedir. Septasız, kurdele benzeri ve dik açılı dallanma gösteren hifler görülmesi durumunda ise *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor* gibi mantarlar düşünülmelidir (24-26).

Dermatofitlere bağlı enfeksiyonlarda ise sa, tırnak ya da deri örneklerinin mikroskopik incelemelerinde septalı hifler ve artrokonidyumlar görülebilmektedir (27).

Klinik örneklerde mantarlara ait herhangi bir yapının görülmemesi mantar enfeksiyonunu dışlamaz. Bu sebeple direk mikroskopik inceleme sonuçları mümkünse mutlaka kültür ile doğrulanmalıdır.

Direk mikroskopik inceleme için Gram boyama, %10-20'lik KOH, kalkoflor beyazı, çini mürekkebi, laktofenol pamuk mavisi, Grocott-Gomori metanamin gümüşleme, periyodik asid-Schiff (PAS), Giemsa, Wright ve Masson-Fontana gibi boyalar kullanılabilir (28).

2.1.5.2. Kültür

Mantarların kültürünü yapmak için kullanılan besiyerleri, alınan klinik ömeğe göre değişmektedir. Steril ortamlardan alınan örnekler SDA veya beyin-kalp infüzyon agarı gibi içerisinde antibiyotik bulunmayan besiyerlerine ekilirken; steril olmayan bölgelerden elde edilen örnekler ise antibiyotikli SDA ve beyin-kalp infüzyon agarı gibi besiyerlerine ekilmelidir. Saprofit küflerin üremesinin engellenmesi amacıyla sikloheksimid içeren besiyerine ekim yapılmalıdır. Ancak, üremesi beklenen bazı mantarlar (örneğin *C. neoformans*) sikloheksimide duyarlı oldukları için, bu inhibitör maddeyi içeren ve içermeyen iki besiyeri kullanılmalıdır. *Malassezia* türleri ise üremek için yağ asitlerine ihtiyaç duydukları için besiyerine zeytinyağı eklenmelidir (1).

Mayaların tanımlanmasında koloni morfolojisi, mikroskopik morfoloji (germ tüp testi, yalancı hif, gerçek hif, klamidospore gibi), karbonhidrat asimilasyon testleri, fenol oksidaz veya üreaz gibi özgül enzimlerin varlığının araştırılması gibi konvansiyonel yöntemler kullanılmaktadır (28).

Küflerin tanımlanmasında özellikle koloni morfolojisinin değerlendirilmesi çok önemlidir. Kültür plaklarının ters yüzünden eğer varsa küfün pigmenti incelenir. Mikroskopik değerlendirme için ıslak preparatlar hazırlanması veya lam kültürü oluşturmak gibi farklı metodlar kullanılabilir. Tercih edilen boya, küfleri öldürerek

güvenli olarak incelenmelerini sağlayan laktofenol pamuk mavisidir. Bu boya ile hiyalen küfler mavi, dermatofitoz etkeni olan küfler ise kahverengi gözüktür (15).

2.1.5.3. Antijen tayini

Özellikle invaziv mantar enfeksiyonları başta olmak üzere mantar enfeksiyonlarında tanıyı doğru ve erken koymak; antifungal tedaviye olabildiğince kısa zaman zarfında başlayabilmek açısından büyük önem arz etmektedir. Bu sebeple son yıllarda bu amaç için kullanılan antijen ve fungal DNA'nın tespiti gibi yöntemler giderek daha önemli bir hal almıştır (29). Günümüzde fungal antijenlerin tespiti için kullanılan birçok test mevcuttur. Bu testlerle kriptokokkoz, invaziv aspergilloz ve invaziv kandidoz gibi mantar enfeksiyonlarının tanısı koyulabilmektedir.

2.1.5.4. Nükleik asit yöntemleri

Özellikle invaziv mikoz tanısı başta olmak üzere nükleik asit tespitine dayanan birçok yöntem kullanılmaktadır. Örnek olarak kan, serum ya da plazma kullanılabilir. Bunun dışında BAL ya da doku örnekleri de kullanılabilir. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bugün için en sık başvuru yöntemidir (30).

2.2. *Candida* Türleri

Mantarlara ait ilk kayıtlar M.Ö.4. yüzyılda Hippocrates ve Gallen'e kadar uzanmaktadır. Bu dönemde ağızdaki pamukçuk lezyonlarının *Candida* türlerine bağlı geliştiği Hippocrates ve Gallen tarafından bilinmemektedir. 1839'da Bernhard Rudolph Conrad von Langenbeck tifo sebebiyle ölen bir hastanın ağız lezyonlarından izole edilen mantar hücrelerini parazit olarak tanımlayarak tifüs etkeni olduğunu düşünmüştür. 1841'de Emil Berg tarafından ağızdaki pamukçuk lezyonlarının mantar sebebiyle geliştiği tespit edilmiştir. Maya taksonomisi 'Algler, Mantarlar ve Bitkiler için Uluslararası Adlandırma Kodu (International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants-ICN)' kurallarına göre düzenlenmektedir. *Candida* cinsinin taksonomisi Tablo 2'de gösterilmektedir.

Tablo 2. *Candida* cinsinin taksonomisi (19)

Alem: Fungi
Şube: <i>Ascomycota</i>
Sınıf: <i>Hemiascomycetes</i>
Takım: <i>Saccharomycetales</i>
Aile: <i>Saccharomycetaceae</i>
Cins: <i>Candida</i>

Fırsatçı patojen mantarlar arasındaki en önemli grup *Candida* türleridir. *Candida* türleri, en sık rastlanan santral venöz kateter ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu (KDE) etkenleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır (31, 32). 1980 yılından günümüze kadar, *Candida*'ya bağlı KDE sıklığı tüm yaş gruplarında farklı büyüklükteki hastanelerde devamlı bir artış göstermiştir. Yüzden fazla *Candida* türü tanımlanmış olmakla birlikte, az sayıdaki tür klinik enfeksiyonlara neden olur. Klinik örneklerden en sık izole edilen mantar türü *Candida albicans* olup mukozaya ait etkenlerin %90-100'ünü ve KDE etkenlerinin ise %40-70'ini oluşturur (11). *Candida*'ya bağlı tüm KDE'lerin yaklaşık %95'inden dört etken sorumlu olup, bunlar; *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*'dir (1).

Candida türlerinin çapları 3-5 µm boyutunda olup, oval ya da yuvarlak, tomurcuklanarak (blastosporla) üreyen maya şeklinde funguslardır. *Candida*'lar mukoza, deri ve gastrointestinal sistemin (GİS) normal florasında bulunurlar. Doğumun hemen sonrasında mukozalarda kolonize olurlar ve endojen enfeksiyonlar için risk yaratırlar. En sık görülen sistemik mikoz türü kandidiyazdır (15).

2.2.1. *Candida* türlerinin mikrobiyolojik özellikleri

Birkaç tür dışında, *Candida* cinsi içindeki mayaların mikroskopik ve makroskopik özellikleri arasında farklılıklar bulunmamaktadır. Tamamı 25°C veya 37°C'de 2-3 günde Sabouraud Dekstroz Agar (SDA pH. 5,5) besiyerinde, 2-3 mm çapında, beyaz renkte ya da krem renğinde, düzgün yüzeyli veya göbekli ve uzayan inkübasyonla birlikte daha kıvrımlı hale gelen, mat veya parlak koloniler oluştururlar. Türler arası morfolojik farklılıklar mısır unlu agar gibi özel besiyerlerinde tespit edilebilir (15).

Candida cinsinde yer alan mayalar (blastosporlar), çoğunlukla anamorf (eşeysiz) organizmalardır. Fakat bazıları teleomorf (eşeyli) evreye de sahiptir. *Candida*'lar tomurcuklanarak çoğalırlar. Türlerin çoğu 'yalancı hif' oluşturur. *Candida albicans* ve

çok daha seyrek izole edilen *C. dubliniensis* türleri çimlenme borusu (germ tüp) ve gerçek hif oluşturma özelliğine sahipken; *C. tropicalis*'in bazı kökenlerinde yalancı germ tüp oluşumu gözlenebilmektedir (15).

Tablo 3. Tıbbi öneme sahip bazı *Candida* türleri (1)

<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>
<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. norvegensis</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. pelliculosa</i>
<i>C. kefyr</i>	<i>C. tropicalis</i>

2.2.1.1. *Candida*'ların üreme koşulları

Candida'lar, zenginleştirilmiş veya minimal ortamda, aerop koşullarda, 2-8 aralığındaki pH değerlerinde ve 20-40°C arasındaki sıcaklıklarda üreyebilirler. *Candida* türlerinin hiçbirisi nitratı asimile edemezken; tamamı glukoz fermantasyonu yapabilmektedir. Kültürlerinde asetoin ve asetik asit, etanol, laktik asit, formik asit, piruvik asit, suksinik asit, propionik asit gibi organik asitlerden zengin metabolik son ürünler oluşturan *Candida* türlerinin aerobik ortamlarda daha iyi üreme performansı gösterdikleri bilinmektedir. Yüksek CO₂'li ortamda daha zayıf da olsa üreme gösterebilmektedirler. Bütün patojen *Candida* türleri 37°C'de iyi ürerler ve bu sıcaklık özellikle *C. albicans* ve *C. tropicalis* gibi iki virülan tür için ideal sıcaklıktır. Üreme hızları ortam koşullarına göre farklılık göstermektedir. *C. albicans* ve *C. tropicalis* için bu süre 1 saatten daha kısadır (15)

2.2.1.2. Hücre yapısı

Hücre iskeleti: Hücre iskeleti, turgor basıncına karşılık veren hareketli bir sistemdir. Hücre iskeleti yapısındaki aktin, sitoplazmik akışkanlığı; miyozin ise organellerin hareketini sağlamaktadır. Hücre yapısındaki Ca, Mg ve H iyonlarının yoğunluğu ve hücre içine giriş çıkışları, organel hareketinde ve hif uzamasında çok önemli bir yere sahiptir. Ayrıca iyonlar mayoz ve mitoz bölünmede, tomurcuklanmada, septum oluşumunda, bazı enzimlerin düzenlenmesinde de önemlidir (15).

Hücre duvarı ve antijenik yapı: Hücre duvarı yapıcı sert bir bariyerdir ve mantar hücresine şeklini veren bir yapıdır. Osmotik basınca bağlı hücre patlamasına karşı

hücreyi korur. İç ve dış ortamlar arası çeşitli moleküllerin transferlerinde rol alır. Hücre duvarı, maya hücresinin farklı yüzeylere adezyonunda doğrudan görev alan bir yapıdır. Duvar yapısını oluşturan bazı bileşenler antifungal ilaçların hedefi olmaktadır ve diğer bazı bileşenler ise aynı zamanda immunolojik determinantları yapılarında barındırırlar. Hücre duvarı yapısının %80-90'ını karbonhidratlar, %5-15'ini proteinler ve %2-5'ini lipidler oluşturmaktadır. Karbonhidratların ise %20-30'u mannoprotein, %50-60'ı beta-glukanlar ve %0,6-9'u kitin yapısındadır. *Candida albicans*'ın maya formu ve hifal formlarında glukan ve mannan içeriği birbirine benzemektedir ancak hifal hücrelerde bulunan kitin miktarı maya hücresine göre üç kat daha fazladır (15).

Elektron mikroskopik çalışmalara göre, *Candida*'ların hücre duvarı minimum 5 katmana sahiptir. Maya-hif dönüşümü sürecinde bu sayı ve hücre duvar kalınlığı değişiklik göstermektedir. Buna ek olarak ortamda şeker yoğunluğunun yüksek olması durumunda en dışta bulunan mannoprotein katman kalınlaşır ve fibriller oluşumlar çoğalır (33).

Hücre membranı: Hücre membranı yapısında bulundurduğu ozmoenzimler aracılığıyla iç ve dış ortamlar arasında moleküllerin kontrollü bir şekilde geçişini sağlayan bir yapıdır. Hücre membranı yapısında bulundurduğu enzimler aracılığıyla da hücre duvarı komponentlerinin sentezinde rol almaktadır. Ayrıca *C. albicans*'ın maya-hif dimorfizmi ve hif oluşturma gibi morfolojik değişikliklerinde görev alan fosfolipaz C, adenilat siklaz, proteinaz gibi enzimler hücre membranında bulunmaktadır. Diğer mantarlarda olduğu gibi, *Candida* türlerinin hücre membranı yapısında da bulunan sterol, membran lipidlerinin %20'sini oluşturmaktadır. Sterol yapısının %95'ini oluşturan ergosterol ise antifungal ilaçlar için önemli bir hedef konumundadır. Membran yarısında bulunan fosfolipidler ise fosfatidil etanolamin, fosfatidil kolin, fosfatidil inozitol, fosfatidil serin'dir (15, 34).

2.2.1.3. Biyokimyasal özellikler

Bazı *Candida* türlerinin biyokimyasal özellikleri Tablo 4'te gösterilmektedir.

Tablo 4. Bazı *Candida* türlerinin biyokimyasal özellikleri (35)

	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>
Glukoz	+	+	+	+	+
Maltoz	+	+	-	-	+
Sukroz	+	+	-	-	+
Trehaloz	+	+	+	-	+
Galaktoz	+	+	-	-	+
Sellobiyoz	-	-	-	-	+

Tablo 4 (Devam). Bazı *Candida* türlerinin biyokimyasal özellikleri (35)

Ksiloz	+	+	-	-	+
Rafinoz	-	-	-	-	-
Laktoz	-	-	-	+	-
Dulsitol	-	-	-	-	-
Melibiyoz	-	-	-	-	-
Üreaz	-	-	-	+	-
NO3-NO2	-	-	-	-	-

2.2.1.4. Virülans faktörleri

Candida türlerinin patojenitesi, konak hücre yüzeyine tutunma, proteazlar, fosfolipazlar, esterazlar, hemolizin gibi dokuya zarar veren enzimlerin üretimi ve biyofilm oluşumu gibi virülans faktörlerine bağlıdır (36).

2.2.1.4.1. Konak hücre yüzeyine tutunma (Adezyon)

Mikroorganizma ile konak ilişkisinde ilk adım mikroorganizmanın adeziv özelliğiyle meydana gelmektedir. Adeziv özelliği en yüksek tür *C. albicans* olup, aynı tür içinde adezyon yeteneği farklı olan türler de bulunmaktadır. Maya hücresinin konak hücre yüzeyine tutunmasında konağa ait olan immünolojik faktörler ve hormonal durumların yanı sıra, mantar hücresinin morfolojik yapısı, yüzey özellikleri, ortam pH ve ısı da önemlidir (15).

Hücre yüzeyinin hidrofobik özelliği: Mikroorganizmalar insan hücreleri gibi negatif yüzey potansiyeline sahiptir. Aynı yüzey potansiyeline sahip olan iki hücrenin birbirini çekmeleri, hidrofobik moleküllerin etkileşimleri ile olasıdır. Böylelikle mikroorganizmanın yüzeyinde bulunan ligandlar, konak mukoza hücresinin yüzeyinde bulunan reseptörlere irreversible şekilde bağlanmaktadır. Örneğin, hidrofobik moleküller olan hidrokarbonlar ve polar olmayan fenilalanin, metiyonin gibi organik

maddeler, adezinlerle hücre yüzeyine tutunmayı desteklemektedir. Ayrıca yüksek galaktoz konsantrasyonunda üreyen maya ve hifal formların, 25°C'de üreyenlere kıyasla hidrofobik özellikleri daha fazladır.

Yüzey adezinleri: Yüzey adezinleri, mantarların hücre duvarı ile bağlantılı olup, konağın endotel ve epitel hücrelerine tutunmasında görev alan moleküllerdir.

iC3b reseptörü: Maya hücre yüzeyinde bulunarak ve mayanın nötrofiller tarafından fagositozunu engellemektedir.

C3d reseptörü: Plastik yüzeylere tutunmada görevlidir.

Östrojen reseptörü: Vajinal kolonizasyonu kolaylaştırmakta rol alır.

Mannoprotein reseptörleri: Yüksek galaktoz konsantrasyonunda artış göstermekte olup, konak epitel hücre yüzeyindeki fukozil veya glukozamil glikozidler ile bağlantı kurmaktadır. Konak ağız ve vajen epiteline tutunarak sonraki evrelerde oral ve vajinal kandidiyazise sebep olmaktadır.

Laminin reseptörü: *C. albicans*'ın germ tüp ve hif yapısında saptanmıştır. Aortik ve mikrovasküler endotel hücre ligandlarına tutunmaktadır.

Fibrinojen bağlayan proteinler: *C. albicans*'ın oluşturduğu germ tüp yapısı ve hif yapısında saptanmıştır. Renal ve üretral epitellere tutunmaktadır.

ALS, HWP1 ve INT-1 proteinleri: Maya hücresinin ağız mukozasına tutunmasında rol almaktadırlar (15).

2.2.1.4.2. Maya-hif dimorfizmi

Özellikle *C. albicans* suşlarında kromozomal düzeyde önemli değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bu değişikliklerin yansımaları arasında bulunan dimorfizm, maya germ tüp (hif) dönüşümünü belirleyen bir süreç olup, önemli virülans faktörlerinden birisidir. Bu süreci etkileyen dış faktörlerden CO₂, pH (7,5-8,0), ısı (37°C); N-asetil glukoz, prolin ve amino asitler maya hücresinin membranındaki reseptörler tarafından algılanan sinyaller olup, hücre içine iletilirler. Hücre içinde CAMP, cGMP ve bazı iyonların miktarlarında değişiklikler meydana gelir. Oluşan iyon akımı sonucunda hifal uzama gerçekleşir. Hifal forma dönüşümün ilk basamağı germ tüp oluşumudur. Sinyalizasyon zayıf, pH ve ısı düşük ise septum yapımı yavaşlar ve gecikir, iyon akımı

olmaz ve daha plastik bir duvar oluşur ve buradan dışarı doğru balonlaşma sonucu küresel hücre (tomurcuk) şekillenir. Hif formu, maya formuna kıyasla dokuya ve plastik yüzeylere daha fazla yapışma eğilimindedir ve fagosite edilemez (37). *Candida albicans* suşlarında CPH1 ve EFG 1 genleri dimorfizmde rol alan önemli genlerdir (38).

2.2.1.4.3. Fenotipik değişim

C. albicans suşlarında yüksek oranda spontan fenotipik değişimler tespit edilmiş olup bu değişimler aşağıda belirtildiği gibi başlıca iki kategoride meydana gelmektedir:

a) White-Opaque (w-o) (beyaz-opak) değişimi, 10^4 sıklıkta meydana gelir ve koloni düzeyinde olduğu gibi, mikroskopik olarak da hücrelerin uzamış şekilde veya küresel olmak üzere farklı görüntülerine sebebiyet verir.

b) Koloni morfolojisinde 10^2 - 10^3 sıklıkta oluşan değişim sonucunda "Smooth" (s) (düzgün yüzeyli) tipinden, miçelyal forma, halka tipi, yıldız tipi gibi değişik formlara dönüşüm görülebilir. In vivo koşullarda da meydana gelebilen bu fenomenin, antifungalere karşı gelişen dirençte etkili olduğu belirtilmektedir. Beyaz hücrelerde SAP 2 (salgısal aspartil proteinaz) ve EFG-1 ifadesi daha fazladır. Opak hücrelerde ise SAP 1 ve SAP 3 baskındır ve bu kökenler beyazlara göre daha fazla eşeyli çoğalmaya eğilimli olup; virülansları daha düşüktür ve deride kolonize olma yetenekleri daha yüksektir (39).

2.2.1.4.4. Salgısal aspartil proteinazlar (SAP)

Virülansta önemli olduğu düşünülen ekstrasellüler enzimlerden biri olan asit proteinazların asit pH (2,5-4)'da aktive olmasıyla SAP yapısındaki aspartik asit rezidüleri dolayısıyla aspartil proteinaz, pepstatin A varlığında inhibe olmasıyla karboksil proteinaz gibi farklı isimlendirmeleri mevcuttur.

Patojen *Candida* türlerinin salgıladığı asit proteinazlar, konak dokunun immünoglobulinler, kompleman, laktoferrin, fibronektin, hemoglobin, albümin, kollajen, epidermal keratin gibi proteinlerini hidrolize ederler. Böylelikle doku harabiyetine sebebiyet vererek konak doku invazyonunu arttırmaktadırlar.

Yapılan çalışmalarda farklı pH değerlerinde SAP 1-10 genleri tarafından kodlanan, farklı molekül ağırlıklı asit proteinaz izoenzimlerinin eksprese edildiği saptanmıştır.

SAP 1-8 genleri tarafından eksprese edilenler hücre dışına salgılanırken, SAP 9-10 genleri tarafından ise salgısal olmayan ve hücre yüzeyine bağlı olarak bulunan serin proteazlar olduğu gösterilmiştir. SAP enzim kontrolü maya formlarında SAP 1,2,3; hifal formlarında SAP 4,5,6 genleri tarafından yapılmaktadır. Mayadan hifal forma geçiş ve fenotipik değişim SAP gen ekspresyonu ile ilişkilidir. Hifal hücreler tarafından eksprese edilen SAP 4-6, kolonizasyon ve doku invazyonunda rol alırken; SAP 8 ekspresyonu ise penetrasyonda görev almaktadır. SAP 9-10 genleri hem maya hem hif formundaki hücrelerde bulunmaktadır. Serin proteazların görevleri ise hücre duvarı bütünlüğünü korumak ve tomurcuklanma ile oluşan hücrelerin ana hücreden ayrılmasını sağlamaktır. Serin proteazların ekspresyonunda görevli genler oral kandidiyazis olgularında tespit edilmiş ve oral mukoza kolonizasyonunda görevli olabilecekleri tahmin edilmiştir. (15, 39).

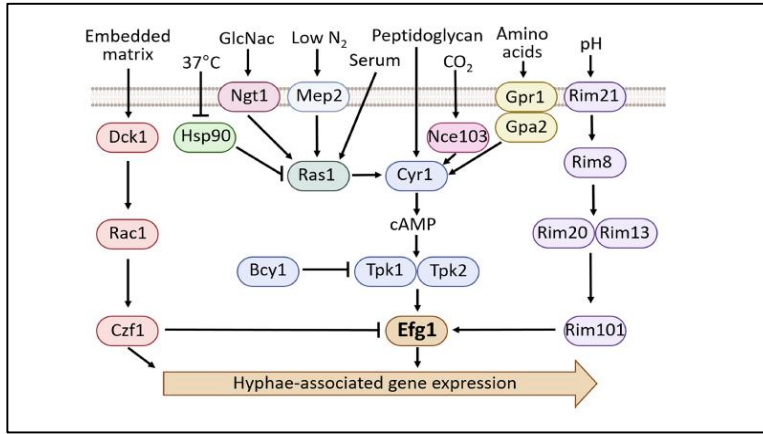
2.2.1.4.5. Fosfolipazlar

C. albicans kökenlerinin maya ve hifal formlarının %79'unda fosfolipaz aktivitesi tespit edilmiştir. Özellikle membranda bulunan fosfolipidleri parçalarlar. Epitelyal hücrelere tutunmada bu enzimlerin rol aldığı ve virülansa da bu sayede katkıda buldukları düşünülmektedir (40). Bu enzimler, spesifik bir şekilde kopardıkları ester bağlarına göre olarak gruplandırılmaktadırlar (A,B,C ve D sınıfı). B sınıfı en fazla tespit edilen sınıftır ve hem lizofosfolipaz transaçilaz hem de hidrolaz etkinliklerine sahiptir. *Candida albicans* türünde fosfolipaz aktivitesi kandan izole edilen kökenlerde kommensal kökenlere kıyasla daha yüksek tespit edilmiştir. *Albicans* dışındaki *Candida* türlerinde de fosfolipaz varlığı tanımlanmıştır (41).

2.2.1.4.6. Biyofilm

Biyofilmler, dış polimerik matriks içinde gömülü olarak bulunan ve bir yüzeye tutunan mikrobiyal topluluklardır. İnsanlardaki mikrobiyal enfeksiyonların çoğunda biyofilmlerin rolünün olduğu düşünülmektedir. *C. albicans* biyofilmi elektron mikroskopisinde, ilk yapışmayı ve germ tüp oluşumunu barındıran 3-6 saatin akabinde, 24-48. saatlerde maya, hif ve yalancı hiflerin yer aldığı ve kalınlığı 25-450 µm arasında değişmekte olan hücre dışı polimerik materyal oluşumu şeklinde gözlenmektedir.

Mikrokoloniler arasında dallanan su kanalları bulunmaktadır. Hifal yapıların, çok katmanlılık ve yapısal bütünlük açısından biyofilm oluşumunda temel elemanlar olduğu bildirilmiştir. EFG-1 düzenleyici proteini biyofilm oluşum sürecinde anahtar bir rol oynamaktadır. EFG-1, APSES (Asm1, Phd1, Sok2, Efg1 ve StuA) familyası transkripsiyon düzenleyicileri olarak adlandırılan; mantarlardaki heliks-loop-helix (bHLH) (sarmal-döngü-sarmal) transkripsiyon faktörlerinin bir alt kategorisine aittir. APSES proteinleri, transkripsiyonel aktivatörler veya inhibitörler olarak işlev görebilir ve bu proteinlerin; spor oluşumu, metabolizma özellikleri, morfoloji dahil olmak üzere çeşitli mantar hücresel işlemlerini düzenlediği gösterilmiştir. Hücre morfolojisinin önemli bir düzenleyicisi olmasının yanı sıra EFG-1, *C. albicans*'ta biyofilm oluşumunu düzenleyen altı çekirdek transkripsiyon faktöründen biridir (BRG1, NDT80, ROB1, TEC1, BCR1 ve EFG-1). Bu düzenleyici ağ içindeki transkripsiyon faktörleri (doğrudan veya dolaylı olarak), adezyon proteinlerinin ve hücre dışı matriks malzemesinin üretimi gibi biyofilm mimarisinin önemli yönlerini ve ayrıca hif oluşumu, dağılan hücreler ve kalıcı hücreler dahil olmak üzere hücre tipleri arasındaki morfolojik geçişleri kontrol eder. EFG-1 ise *Candida albicans*'ta morfogenez ve metabolizmanın merkezi bir transkripsiyonel düzenleyicisidir (13).



Şekil 3. *C. albicans*'ta hif oluşumunu düzenleyen sinyal yolları (42)

EFG-1 üretmediği tespit edilen mutant hücrelerin, tek katmanlı ve blastosporlardan oluşan ince biyofilmler oluşturdukları tespit edilmiştir. *C. albicans*'ın büyümesi üzerinde etkili olan transkripsiyon faktörleri ile ilgili yapılan bir çalışmada; EFG-1 geninde single ya da double mutasyon görülen *Candida albicans* suşlarında biyofilm oluşturma kusurları tespit edilmiştir (43). *C. albicans*'ın büyümesi üzerinde etkili olan

transkripsiyon faktörleri ile ilgili yapılan başka bir çalışmada; Efg-1 ,Tec1, Ndt80 ve Rob1 gibi transkripsiyon düzenleyicilerinin biyofilmlerdeki hifler, maya hücreleri ve diğer hifler için bir destek iskeleti görevi görerek biyofilmin genel mimari stabilitesine katkıda bulunduğunu tespit etmişlerdir (44). Mikrobiyal hücreler arasındaki sinyal iletişimi biyofilm oluşumunda çok önemlidir. *Candida*'larda bu iletişimi sağlayan moleküller farnesol ve tirosol molekülleridir. Farnesol filamentöz yapılaşmayı ve sonuç itibarıyla biyofilm oluşmasını bloke ederken; tirosol uygun şartlarda germ tüp ve filament oluşumunu uyarmaktadır. Bu iki ürünü kodlayan genler, biyofilm oluşumunda morfogenetik otoregülatör işlev görmektedirler. Biyofilm oluşumunda ifade edilebilen diğer genler; hidrofobluk düzeyini, ilaçlara karşı direnci, kitinaz sentezini, demir transportunu ve ısı-şok yanıtını denetleyen genlerdir (45). *Pseudomonas aeruginosa* hücreleri, yoğun bir biyofilm oluşturmakta ve *C. albicans*'in hifal formlarını öldürmektedir. *Pseudomonas aeruginosa*'nın bu iletişim molekülüne yanıt olarak *C. albicans*, filamentasyonu engelleyen ve sadece maya hücrelerinin üretimini güçlendiren bileşikler ürettiği tespit edilmiştir. Bu gözlemlere dayanarak, *C. albicans*'ın morfogenezinde çevresel koşulların denetiminin önemli olduğu vurgulanmaktadır. *Candida*'ların oluşturdukları biyofilmler antifungaller ajanlara karşı gelişen dirençle yakından ilintilidir fakat; lipozomal amfoterisin B ve ekinokandinlerin *Candida* biyofilmlerine karşı yüksek düzeyde etkili oldukları tespit edilmiştir.

Candida biyofilmlerindeki intrensek dirençten biyofilm içindeki hücrelerin yüksek yoğunlukta olması, biyofilm matriksinin etkisi, biyofilmdeki hücrelerin çoğalma hızının ve besin kaynaklarının azlığı, dışa atım pompalarının ifade bulması ve "ıs-rarcı" hücrelerin varlığı gibi etmenlerin sorumlu olabileceği bildirilmektedir. Bir çalışmada, biyofilm oluşumu sürecinin başlangıcında yeterli seviyede olan ergosterol düzeyinin, ilerleyen zamanlarda giderek azaldığı tespit edilmiş ve bunun da dirençte rolü olabileceği vurgulanmıştır. *Candida*'ların oluşturdukları biyofilmlerin antifungallere olduğu gibi, konağın savunma mekanizmalarına karşı gelişen dirençte de rolü olduğu ve dolayısıyla klinik olarak çok önemli bir virülans faktörü olduğu kabul edilmektedir (45).

2.2.2. *C. albicans*'ın patogenezi

Candida'lar deri yüzeyi, ağız mukozası, bağırsak lümeni ve vajina mukozası gibi vücudun farklı bölgelerinde yaygınca bulunan fırsatçı mikroorganizmalardır (46).

Normal florada yaygın olarak bulunan *Candida* türleri, herhangi bir hastalık durumu ya da girişimsel tedaviler sebebiyle immün sistemi bozuk hastalarda, dokulara invaze olarak mortal olabilen patolojilere sebebiyet verebilirler (19).

Kandidozun gelişmesine bazı predispozan faktörler neden olur. Enfeksiyonun gelişimine yol açan predispozan faktörler Tablo 5'te görülmektedir.

Tablo 5. Yüzeysel ve derin kandidozları kolaylaştıran faktörler (35)

- Hücresel immün yetmezlikler
- Diabetes mellitus
- Geniş etki spektrumlu antibiyotikler
- Derinin maserasyonu
- AIDS
- Kortikosteroidler ve başka immunosupresif ilaçlar
- Malignite veya malignitenin tedavisi nedeniyle meydana gelen nötropeni
- Organ transplantasyonları, kalp veya gastrointestinal sistem ameliyatları
- Ciddi yanıklar
- İV kateterler
- Kronik hastalıklar
- Damardan narkotik kullanımı

C. albicans insanda enfeksiyona neden olabilen çeşitli *Candida* türleri arasında, birçok enfeksiyon türünde en önemli etken olarak karşımıza çıkmaktadır (19). Hastalığa sebebiyet veren bir etken olarak bu kadar sık görülmesinin nedeni, normal florada yaygın olarak bulunmasına ek olarak bazı önemli virülans faktörlerine de sahip olmasıdır. Bu virülans faktörlerini; proteaz oluşturması, kan dolaşımından dokuya geçtiğinde oldukça hızlı bir şekilde çoğalması, kompleman proteinini bağlayıcı bir reseptör, hücre dışı matriks proteinlerine yapışmayı sağlayan yüzey integrin-benzeri moleküller, yüzey varyasyonu, fenotipik değişiklik ve fosfolipaz aktivitesine sahip hidrolitik enzimlerin üretilmesi şeklinde sıralamak mümkündür (15).

2.2.3. *Candida* enfeksiyonları

Candida'lar, mukozal kolonizasyondan multiple organ tutulumuna kadar değişen çok geniş enfeksiyon yelpazesine sahiptir. Kandidozları, yüzeysel ve derin kandidozlar olmak üzere iki grupta ele almak mümkündür. Yüzeysel kandidozlar, deri ve

mukozaaların tutulduğu enfeksiyonlar iken; derin kandidozlar ise iç organ ve sistemlerin tutulduğu enfeksiyonlardır (15).

2.2.3.1. Yüzeysel *Candida* enfeksiyonları

- *Candida* özofajiti
- Oral kandidiyazis
- Mukokutanöz kandidiyazis
- Onikomikoz ve paronişi
- *Candida* vulvovajiniti ve balaniti

2.2.3.2. Derin *Candida* enfeksiyonları

- Kandidemi
- Pulmoner kandidiyazis
- Yaygın kandidiyazis (akut, kronik)
- Menenjit, beyin apsesi, metastatik ensefalit gibi Merkezi Sinir Sistemi enfeksiyonları
- Gastrointestinal kandidiyazis
- Osteomyelit
- Üriner sistem enfeksiyonları (renal kandidiyazis, alt üriner enfeksiyonları)
- Peritonit, intraabdominal apse
- Tromboflebit
- Kalp tutulumu (endokardit, perikardit)
- Göz tutulumu (endoftalmit, korioretinit)

2.2.4. Laboratuvar tanısı

2.2.4.1. Kültür

SDA, Mycosel veya Mycobiotic agar gibi besiyerleri *Candida* türlerini izole etmek için kullanılan besiyerleridir (23).

BACTEC sistem ve BacT/Alert gibi kan kültürü sistemleri ise sistemik kandidozların saptanabilmesi için kullanılan sistemlerdir (47).

2.2.4.2. İdentifikasyon

Germ tüp testi: Hızlı ve kolayca yapılabilen, ucuz ve basit bir testtir. *Candida* suşları insan veya tavşan serumu ihtiva eden tüplerde 37 °C’de 2 saat bekletilerek germ tüp oluşumu açısından incelemeye alınabilir. Maya hücresinden direkt olarak çıkan ve kısa bir hif başlangıcı şeklinde, septumlarında boğumlanmanın görülmediğı germ tüpler oluştururlar. Diğ r *Candida* türlerinden farklı olarak *C. albicans*’ın germ tüp testi pozitifdir (23).

Mikroskopik morfoloji: *Candida*’ların blastospor, klamidospor ve pseudohif üretme kabiliyetlerinin mikroskopta incelenmesi amacıyla mısır unlu (cornmeal)-Tween 80 agara çizgi ekimi yapılarak üzeri lamelle kapatılır. 26-27°C’de 24-72 saat inkübasyona bırakılır. Kapatılan lamel ortamdaki O₂’yi azaltırken; Tween 80 ise yüzey gerilimini azaltarak pseudohif ve klamidospor oluşumunu arttırmaktadır. *C. albicans* türlerinin büyük bir kısmı (>%90) kendilerine has klamidosporlar oluştururlar (48).

Karbonhidrat asimilasyon testi: Mayaların tür düzeyine kadar olan tanımlanmasındaki asıl önemli aşama, karbonhidrat asimilasyon testidir. Bu test ile, bir mayanın O₂ varlığında belirli bir karbohidratı tek karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini tespit edilir. Klasik olarak mayaların karbonhidratları kullanma  zellikleri Wickerham’ın asimilasyon ve fermentasyon metotlarıyla incelenmektedir (48).

Kromojenik besiyerleri: Kolonilerin tanımlanmasının temelinde, ekzoenzim aktivitesiyle parçalanan çeşitli substratlardan, farklı kromojenik yıkım ürünlerinin ortama salınması yatmaktadır. CHROM agar *Candida* türlerinin, başta *C. albicans* olmak üzere birkaç farklı *Candida* türünün izolasyonu ve tanımlanması amacıyla birçok laboratuvarında yaygın ve aktif olarak kullanılmaktadır. Günümüzde ticari olarak farklı kromojenik besiyerleri de bulunmaktadır (49).

2.2.4.3. Serolojik yöntemler

Mantar tanısında serolojik testler genellikle fikir verici bir roledirler. Bu yöntemler kültür ve histopatolojik bulguları destekleyici özellik gösterirler. Serolojik testlerin mantar enfeksiyonlarının tanısında kullanımı özellikle *Candida* enfeksiyonlarının tespitine yönelik olarak yoğunlaşmıştır. Derin *Candida* enfeksiyonu şüphesinde *Candida* antijenlerini ve bu antijenlere karşı meydana gelen antikorları aramaya

yönelik olarak serolojik testler kullanılmaktadır. Fakat bu testlerin, duyarlılıkları ve özgüllükleri düşük olduğundan çok dikkatli bir şekilde yorumlanmalıdırlar. Mannan ve somatik antijenlerin kullanıldığı presipitin testi ile antikorlar araştırılır. Fakat sadece bir testle mukozal kolonizasyon veya yüzeysel enfeksiyona bağlı gelişen antikorların, derin kandidozdan dolayı oluşan antikorlardan ayırt edilmesi mümkün değildir. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda presipitin testleri güvenilir sonuç vermediği için bu hastalarda kanda dolaşan *C. albicans*'a ait mannan antijeni araştırılabilir. Hücre duvarında bulunan mannan derin kandidozlu hastaların serumunda lateks partikül aglütinasyon testi ile düşük düzeylerde saptanabilmektedir. Fakat mannan dolaşımından hızlı bir şekilde uzaklaştırıldığından, hastadan art arda alınan çok sayıda kan örneğiyle testin tekrarlanması gerekebilir (19, 50).

2.2.4.4. Moleküler yöntemler

Moleküler yöntemlerin mikoloji laboratuvarlarında kullanılmasındaki temel amaç; enfeksiyona neden olan mantarın kan, doku, bronkoalveolar lavaj sıvısı ve diğer vücut sıvıları gibi klinik örneklerde kültürü yapılmadan hızlıca tespit edilmesi veya geleneksel metotlarla kültürde üretilmiş olan mantarın hızlıca tanımlanmasıdır. Günümüzde klinik örneklerde mantara özgü nükleik asitlerin direkt tespit edilmesi amacıyla PCR uygulamaları, mantar enfeksiyonlarına hızlı tanı koymak açısından büyük ümitler vadetmektedir (19). Dolaşımdaki *Candida* genomunun PCR ile tespit edilmesine ek olarak tür düzeyinde de tanımlama yapılabilmektedir. Bunların yanı sıra özellikle real-time PCR teknolojisindeki son gelişmelerin ümit vadeden gelişmeler olduğunu söylemek gerekir.

Polimeraz zincir reaksiyonu: PCR, DNA içindeki özgün bir bölgeyi enzimatik olarak çoğaltmak için uygulanan tepkimelere verilen genel bir isimdir. Klinik materyallerden PCR ile çok kısa zaman zarflarında *C. albicans*'ı tespit eden yöntemler de geliştirilmiştir. PCR'nin temel bileşenleri: DNA polimeraz enzimi, hedef DNA molekülü, primerler, tampon, dNTP karışımı, ve MgCl₂'dür (51).

PCR temel olarak tekrarlayan üç aşamalı döngüden oluşmaktadır: bunlar; i) denatürasyon, ii) primer bağlanması (annealing), iii) uzama (extension) (1). Gerçekleşen her döngünün sonunda PCR ürünleri teorik olarak iki katına çıkmaktadır. Bu sayede hedef dizi, reaksiyon sonunda 2ⁿ (n=PCR siklus sayısı) sayıda amplifiye

edilmiş olacaktır. Temel PCR çeşitlerini şu şekilde sıralamak mümkündür: Multipleks PCR, Hot-Start PCR, Revers Transkripsiyon PCR (RT-PCR), Broad-Range PCR, Nested PCR, Niceliksel (Kantitatif) PCR, Real-time PCR (52).

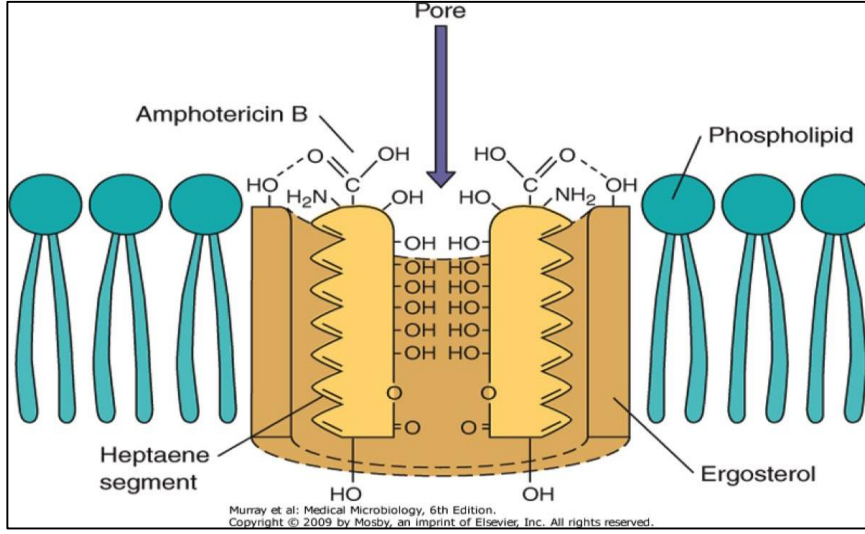
2.2.5. Tedavide kullanılan antifungal ilaçlar

Mantarlar insan hücreleri gibi ökaryot hücre yapısına sahip oldukları için fungal hücrelere uygun toksik etkili hedef bulmak maalesef zor olmaktadır. Konak hücrelerine zarar vermeden mantar hücrelerine selektif etki gösterecek antifungal ilaçlar geliştirilmiştir ve günümüzde tedavilerde aktif olarak kullanılmaktadır (19).

Antifungal ilaçları altı başlık altında incelenmek mümkündür. Bunlar; poliyenler, azoller, antimetabolitler, alilaminler, ekinokandinler ve fungal mitozu inhibe eden ajanlar şeklinde sıralanabilir (1).

2.2.5.1. Polyenler

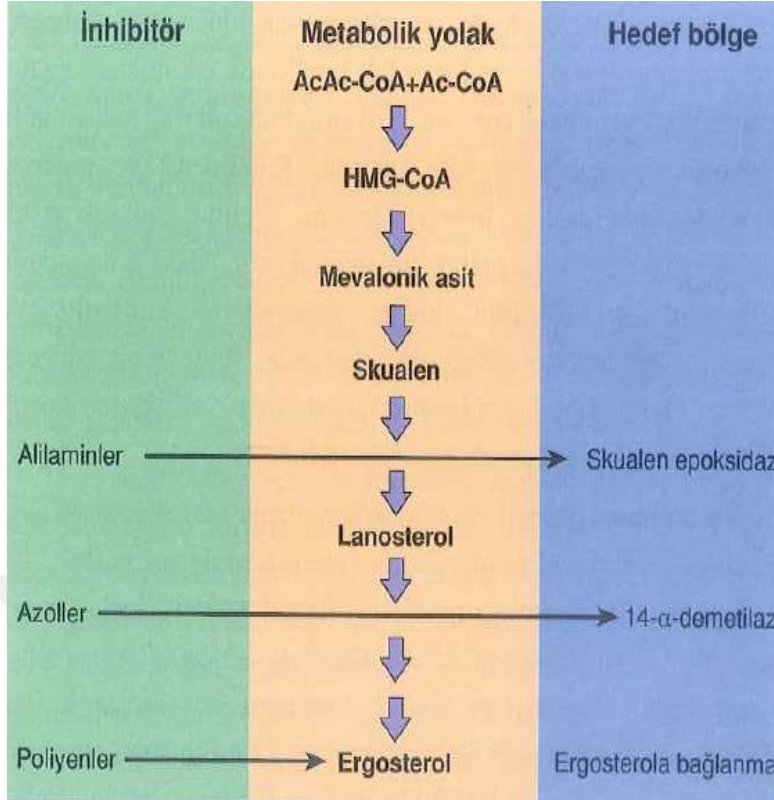
Polyenlere örnek olarak amfoterisin B ve nistatin verilebilir. Amfoterisin B ve lipid amfoterisin B bileşikleri, sistemik mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılırken, nistatin topikal olarak kullanılan bir polyendir. Mantar hücre membranında bulunan ergosterole bağlanarak fungisidal etki gösterirler. Bu bağlanma sonucunda membranın ozmotik bütünlüğünü bozular ve ardından intrasellüler K, Mg, glukoz ve metabolitlerin hücre dışına kaçışı görülür ve bu durum mantar hücrelerinin ölümüyle sonuçlanır. Diğer etki mekanizması ise oksidatif reaksiyonlarına bağlı direkt membran hasarıdır. Amfoterisin B, memeli hücrelerinin temel membran sterolu olan kolesterole de bağlanır; ancak bu bağlanmanın gücü ergosterole olandan çok daha zayıftır. İnsanlara amfoterisin B verildiğinde gözlenen toksisitenin çoğundan, bu bağlanma sorumludur. *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* türleri, *Mucor* türleri ve endemik dimorfik patojen türleri etki spektrumunu oluşturur (1).



Şekil 4. Polyenlerin etki mekanizmaları (1)

2.2.5.2. Azoller

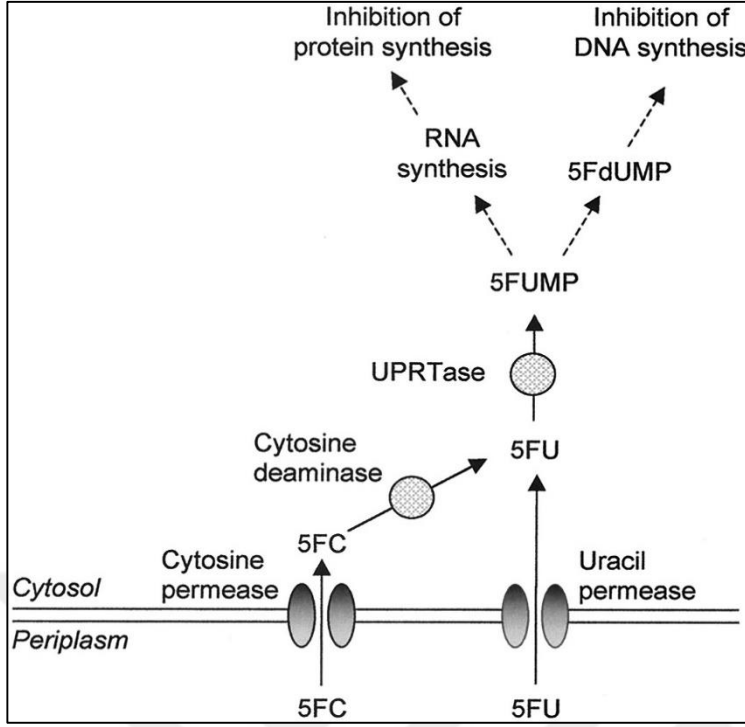
Azol grubu antifungaller içinde imidazoller ve triazoller olmak üzere iki grup bulunur. Bu iki grubun kimyasal yapıları birbirinden farklıdır. Tüm azol bileşikleri, sitokrom P450'ye bağımlı lanosterol 14 α -demetilaz enzimini inhibe ederek antifungal etkinliklerini göstermektedirler. Bu enzim, lanosterolden ergosterol sentezinde görev alan bir enzimdir. Ergosterol sentezinin inhibisyonuyla, mantar hücre membranının sentezi bloke olur. Geniş etki spektrumuna sahiptirler. İmidazoller; bu bileşikler iki nitrojenli bir azol halkası içerir. Topikal tedavide kullanılan birçok imidazol mevcuttur. Sistemik mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan tek imidazol türevi ketokonazoldür. Triazoller; bu bileşikler üç nitrojenli azol halkası içerir. Triazollerin tümü sistemik etkiye sahiptir. Flukonazol, itrakonazol, posakonazol ve vorikonazol sistemik mantar enfeksiyonların tedavisinde kullanılırlar. Albakonazol ravukonazol ve isavukonazol ise henüz araştırma aşamasında olan geniş spektrumlu triazol grubu diğer antifungal ilaçlara örnek olarak verilebilir (1).



Şekil 5. Azollerin etki mekanizmaları (1)

2.2.5.3. Antimetabolitler

Antimetabolitlere verilebilecek tek örnek flusitozindir. Flusitozin, florlanmış bir pirimidin olup antimetabolit olarak etki gösteren tek antifungaldir. Pirimidin metabolizmasını bozup; mantar hücresindeki DNA, RNA ve protein sentezi gibi hayati öneme sahip moleküllerin sentezini engelleyerek antifungal etkinlik gösterir. Permeaz enzimi yardımıyla mantar hücresine girdikten sonra, 5-florourasile (5FU) dönüştürülür. 5FU'nun fosforlanması ile 5-floroüridilik asit meydana gelir. FUMP, tekrar fosforlanır ve RNA'nın yapısına girer. Bu da protein sentezinin durmasına neden olur. Öte yandan 5FU'nun 5-florodeoksiüridin monofosfata dönüşmesi de, çekirdek bölünmesinde ve mantar DNA'sının sentezinde rol alan timidilat sentaz enzimini inhibe eder. Etki spektrumu dar olup *Candida* türleri, *Rhodotorula*, *C. neoformans* ve esmer mantarları kapsar (1).



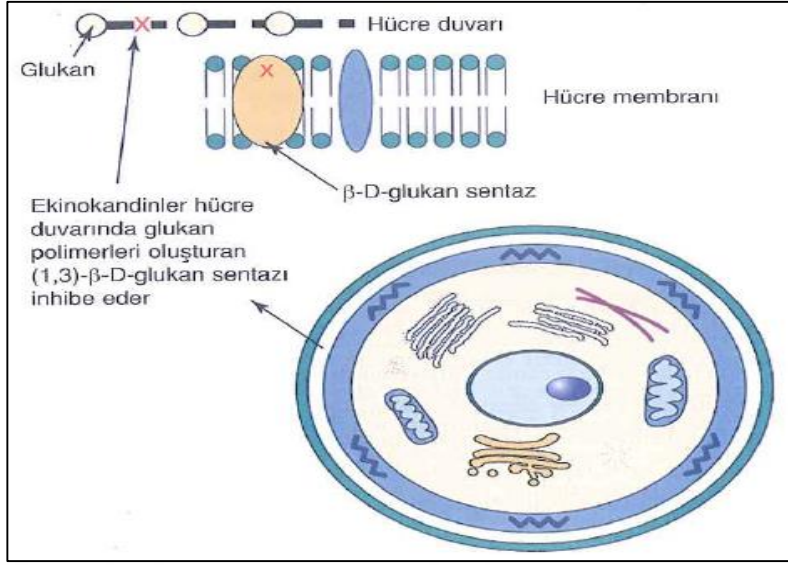
Şekil 6. Antimetabolitlerin etki mekanizmaları (1)

2.2.5.4. Alilaminler

Alilaminlere örnek olarak terbinafin ve naftifin verilebilir. Terbinafinin oral ve topikal formları mevcuttur. Naftifinin ise sadece topikal formu mevcuttur. Alilaminler skualen epoksidaz enzimini inhibe ederek ergosterol sentezini durdururlar. Bunun sonucunda, ergosterol eksikliğiyle birlikte, skualenin yüksek konsantrasyonlarda birikmesine bağlı olarak membran geçirgenliğindeki artış meydana gelir ve bu durum mantar hücresinin ölümüyle sonuçlanır. Terbinafin, geniş etki spektrumu olan lipofilik bir antifungal ilaçtır (1).

2.2.5.5. Ekinokandinler

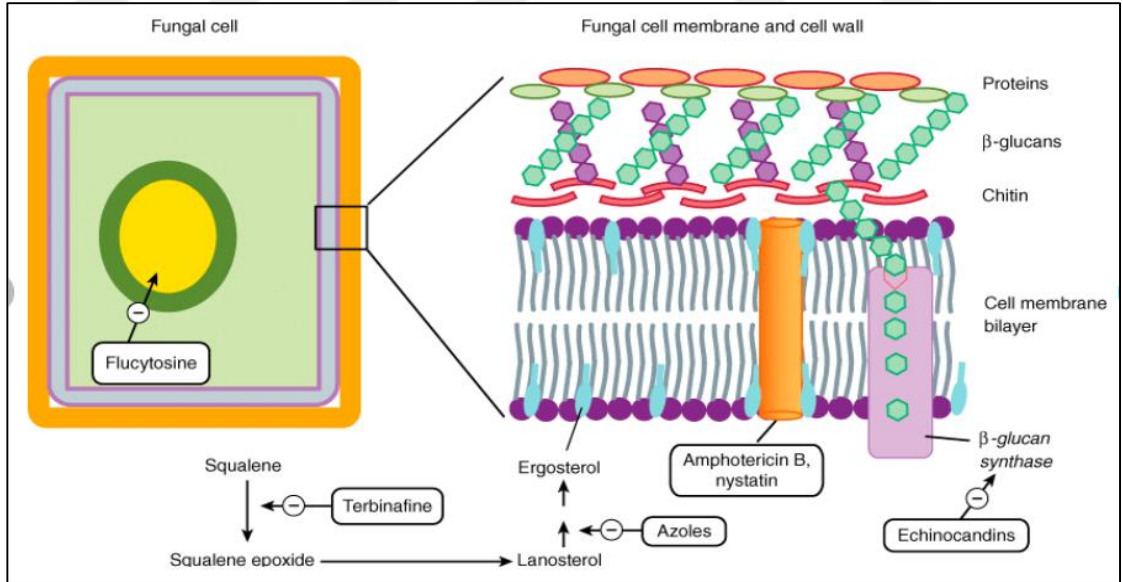
Geniş bir antifungal etki spektrumuna sahip lipopeptit yapısındaki bileşiklerdir. Grupta anidulafungin, kaspofungin ve mikafungin yer alır. Glukan sentezini inhibe edip mantarın hücre duvarı sentezini durdurarak antifungal etkinlik gösterirler. Genel olarak *Candida* ve *Aspergillus* türlerine karşı etkilidirler (1).



Şekil 7. Ekinokandinlerin etki mekanizmaları (1)

2.2.5.6. Fungal mitozu etkili ajanlar

Antifungal etkilerini fungal mitozu inhibe ederek gösterirler. Polimerize mikrotübüller ile etkileşerek mitotik iğ ipliklerini bozar. Dermotofitlere karşı antifungal etki gösterir. Oral olarak kullanılır. Bu gruba örnek olarak verilebilecek ilaç griseofulvindir (1).



Şekil 8. Antifungallerin etki mekanizmaları (1)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmasına dair etik kurul onayı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 26.10.2022 tarihli 2022/473 karar nolu mikrobiyoloji çalışması olarak verilmiştir. Etik kurul onayı EK-1’de verilmiştir.

Çalışmaya 2019-2022 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı’na çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden izole edilen *Candida albicans* izolatları (n=60) dahil edilmiştir. Bu izolatların yarısı (n=30) kateter kan kültürü, diğer yarısı (n=30) ise normal kan kültürü olacak şekilde toplanmıştır. Her hastanın tek örneği çalışmaya alınmıştır. Biyofilm aktivite testi için kontrol suşu olarak *Candida albicans* ATCC 90028 kullanılmıştır. Suşlar çalışılincaya kadar saklama besiyerinde -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1. Çalışmaya Dâhil Edilen Hazır Besiyerleri

- Pepton (TitanMedia)
- Yeast Extract (Merck)
- Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (Neogen)
- Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) (Neogen)
- Sabouraud Broth (SB) (Biolife)
- Kromojenik Agar (BES LAB)
- Brain Heart Infusion Broth (Condalab)
- Blood Agar Base (HiMedia)

3.2. Çalışmaya Dâhil Edilen Kimyasallar

- Glikoz (Isolab)
- Kristal viyole (Sigma-Aldrich)
- Etanol (Merck)
- Aseton (Kimyalab)
- Tween 80 (Merck)

3.3. Çalışmaya Dâhil Edilen Gereçler

- Buzdolabı
- Hassas Terazî

- Etüv
- Dondurucu
- Otoklav
- Pastör fırını
- ELISA reader optik okuyucu (Chromate Awareness Technology, ABD)
- VITEK-MS kütle spektrometrisi (bioMérieux, Fransa)
- Santrifüj
- McFarland Densitometre (Biosan)
- Vorteks karıştırıcı
- Işık Mikroskobu
- Tek kanallı otomatik pipetler
- Çok kanallı otomatik pipet
- Cam tüpler
- Plastik petri
- Mezür
- Beher
- Cam balon
- Enjektör
- Steril plastik öze
- Steril eküvyon
- 0,2 ml PCR tüpü (DNase ve RNase free)
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü (DNase ve RNase free)
- 1,5 ml eppendorf tüpü
- 96 kuyucuklu düz tabanlı polistren mikrotitrasyon plağı (steril ve kapaklı)
- Falcon tüpü(50 ml)
- 10 mikrolitrelik steril filtreli pipet ucu (DNase Ve RNase Free)
- 100 mikrolitrelik steril filtreli pipet ucu (DNase ve RNase free)
- 10 - 100 mikrolitrelik pipet ucu
- 0,5 - 10 mikrolitrelik pipet ucu
- Steril 90x17 mm petri
- PCR strip ve kapağı(0,2 ML 8'li strip+kapak)

3.4. Çalışmaya Dahil Edilen Kitler ve Primerler

- cDNA sentez kiti (Bio-Rad)
- Syber Green PCR kiti (Thermo Scientific)
- Total RNA ekstraksiyon kiti (Thermo Scientific)
- Primer EFG-1 çift (21*2bp) (Oligomer)

3.5. İzolasyon ve İdentifikasyon

3.5.1. Primer izolasyon

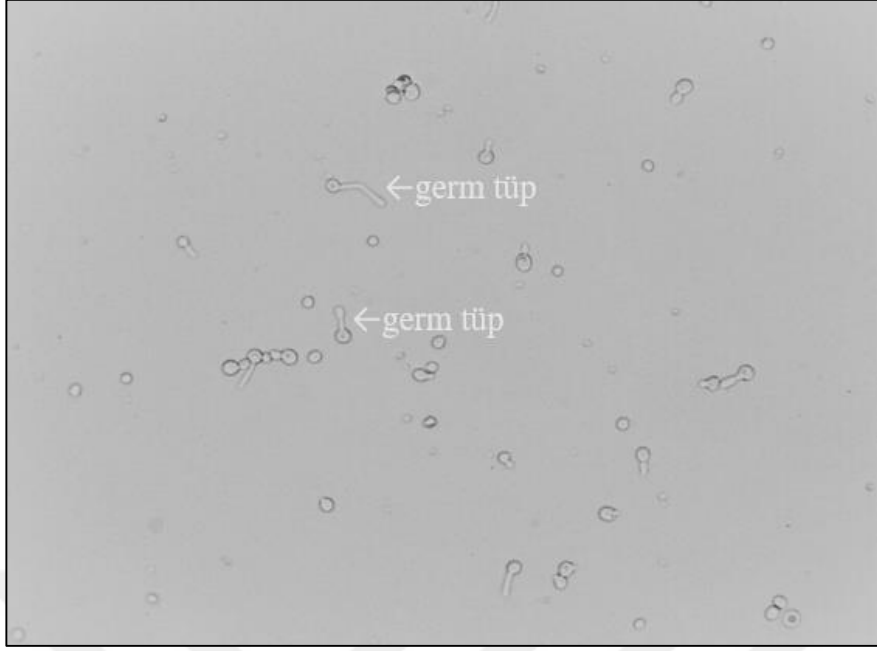
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2019-2022 yılları arasında çeşitli servislerden gönderilen ve üreme tespit edilen kan/kateter kan kültürü şişelerinden gram boyalı preparatlar hazırlanmıştır. Gram boyalı preparatlarda maya olduğu belirlenen örnekler, saflaştırılmak üzere SDA besiyerine pasajı yapılarak 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Saf olduğu anlaşılan kültürlerin tür tanımlaması, makroskopik ve mikroskopik morfoloji incelemesi için germ tüp testi, kromojenik agar (BES LAB), Pirinç-Tween 80 agar ve VITEK-MS MALDI-TOF (bioMérieux, Fransa) sistemi kullanılarak yapılmıştır. *C. albicans* olduğu belirlenen 60 izolat çalışmaya dahil edilmiştir.

3.5.2. İdentifikasyon

3.5.2.1. Germ tüp testi

SDA besiyerinde üreyen her bir izolattan öze ile bir miktar maya kolonisi alınarak ayrı ayrı 0,5 ml insan serumu bulunan cam tüplerin içerisine süspanse edilmiştir. Maya kolonileri ile süspanse edilen serumlar 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra süspanسیونlardan birer damla alınarak lam-lamel arasında ışık mikroskobu ile 40x objektifte incelenmiştir. Maya hücresinin eninin yarısı büyüklüğünde, boyunun 3-4 katı uzunluğunda, çıktığı noktada boğumlanma olmayan, septasız dallar germ tüp olarak değerlendirilmiştir. Germ tüp gözlemlenen maya hücrelerinin olduğu izolatlar *C. albicans* olarak, germ tüp gözlemlenmeyen maya hücrelerinin olduğu izolatlar ise non-*albicans* türler olarak tanımlanmıştır (35).

Şekil 9'da çalışmamızda ışık mikroskobu altında görüntülediğimiz *C. albicans* türünün oluşturduğu germ tüp görüntüsü verilmektedir.



Şekil 9. *C. albicans* 'ta germ tüp oluşumu

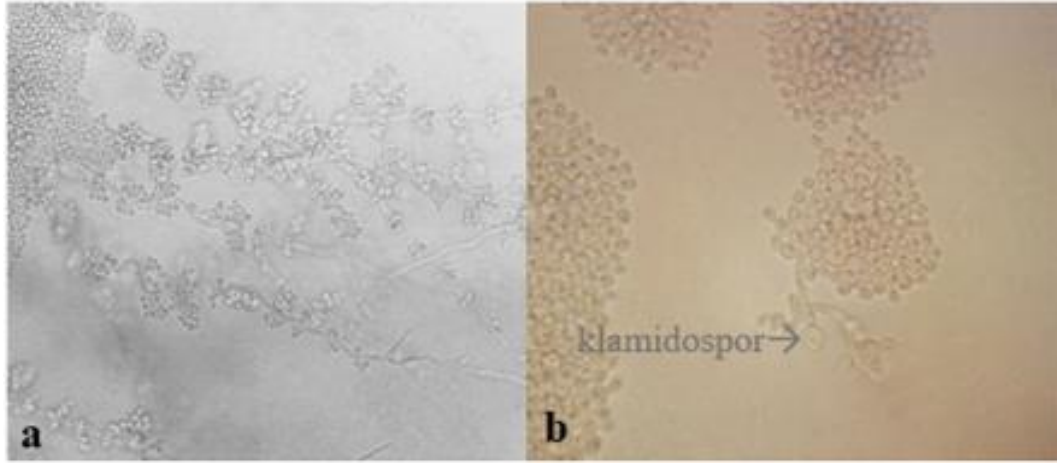
3.5.2.2. Pirinç-Tween 80 besiyerinde mikroskopik inceleme

Pirinç-Tween 80 besiyerinin hazırlanışı:

- Pirinç 25 gr
- Glikoz 10 gr
- Agar 10 gr
- Tween 80 5 ml
- Distile su 300 ml

Erlen içerisine koyulan pirinç ve distile su karışımı kaynamaya bırakılmıştır. Kaynamanın başladığı andan itibaren pirincin distile suyu bulanıklaştırması gözleninceye kadar en az 2 dk kaynatılmaya devam edilmiştir. Kaynama işlemi biten pirinçler steril gazlı bez yardımıyla süzölmüştür. Mezürde bulunan pirinç suyu, distile su ile 500 ml'ye tamamlanıp cam balona alınmıştır. Cam balon içerisine agar, glikoz, tween 80 eklenip 121°C'de 15 dakika sterilizasyonun ardından, hazırlanan Pirinç-Tween 80 besiyeri 9 mm petrilere 20 ml dökölmüştür (1, 19).

Şekil 10'da çalışmamıza dahil ettiğimiz *C. albicans*, suşlarının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü verilmiştir.



Şekil 10. Pirinç-Tween 80 agar'da *Candida albicans* türlerinin morfolojik görüntüsü (a: *C. albicans*, b: *C. albicans* klamidospor)

3.5.2.3. Kromojenik besiyeri

Çalışmaya dâhil ettiğimiz izolatların tür tanımlanmasında başka bir yöntem olarak farklı renkte pigment oluşumlarının gözlemlendiği kromojenik besiyerleri kullanılmıştır. SDA'da üreyen maya kolonilerinden kromojenik agar besiyerine ekim yapılarak; 37°C'de 48-72 saat inkübasyonda sonra üreyen izolatların kromojenik agardaki renk değişimi, üretici firmanın direktifleri doğrultusunda tür tanımlama kriterlerine göre gözlemlenmiştir. Açık yeşil pigment veren koloniler *C. albicans*, olarak tanımlanmıştır (1).

3.5.2.4. Otomatize sistem

SDA besiyerinde üremiş olan saf maya kolonilerinden tür düzeyinde tanımlama işlemi Vitek MS (Biomeriux, Fransa) otomatik sistem kullanılarak yapılmıştır.

3.6. Biyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi

Suşların biyofilm aktivitelerinin tespiti için mikrotitrasyon plak yöntemi kullanılmıştır.

3.6.1. Mikrotitrasyon plak yöntemi

SDA'da 37°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra üreyen *Candida albicans* suşları %8 glukoz içeren Sabouraud Broth (SB) besiyerinde 37°C'de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon işleminin sonunda %8 glukoz içeren SB ile 1/20 oranında dilüe edilerek hazırlanan süspansiyonlar 5 sn vortekslenip 200 µl'si mikrotitrasyon plaklarına aktarıldıktan sonra 37°C'de 24 ve 48 saat inkübe edildi (6). Tüm plaklara negatif

kontrol olarak 6 kuyucuğa steril SB ve pozitif kontrol olarak 6 kuyucuğa *C. albicans* ATCC 90028 suşu konuldu. Plaklarda buharlaşmayı engellemek amacıyla kapak kullanıldı. İşlem sonunda sıvı besiyeri aspire edildi; kuyucuklar steril salin ile 3 kez yıkandı ve ters çevrilerek kurutuldu. Kuyucuklara %1'lik kristal viyole solüsyonundan 100 µl eklendi ve 15 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 3 kez steril salin ile yıkanıp ve ters çevrilerek kurutuldu. Bu işlemde sonra kuyucuklara 200 µl etanol/aseton (160/40) ilave edilip; 10 dakika bekletilerek boya çözdürüldü. Ardından optik dansiteler ELISA reader optik okuyucu cihazında 492 nm dalga boyunda okutuldu (6). Elde edilen her bir optik dansite (OD) değeri Tablo 6'ya göre yorumlanmak üzere kaydedildi.

Tablo 6. Biyofilm formasyon aktivitelerinin belirlenmesi (53)

Optik Dansite	Yapışma	Skor
KOD* > MBOD**	Yapışma olmayan	0
KOD < MBOD < 2 KOD	Zayıf yapışma	1
2 KOD < MBOD < 4 KOD	Orta derece yapışma	2
4 KOD < MBOD	Güçlü derecede yapışma	3

*KOD: Kontrol optik dansitesi **MBOD: Mikroorganizma biyofilmi optik dansitesi

3.7. Real-Time PCR ile EFG-1 Geninin Araştırılması

3.7.1. RNA ekstraksiyonu

Total RNA izolasyonu için -20°C'de stok halde bulunan suşların SDA besiyerine ekimi yapıldı ve 35°C'de 24 saat inkübe edildi. Suşlar daha sonra 10 ml'lik SDB besiyerine inoküle edilerek 37°C'de logaritmik faza (OD₆₀₀:0,5-1) ulaşmaları sağlandı ve izole edildi. Total RNA izolasyonu Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kiti protokolüne uygun olarak aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

- SDA'ya pasajlanan *C. albicans* izolatları 35°C'de 24 saat inkübe edilerek üretildi.
- Üreyen kolonilerden hazırlanan süspansiyon (en fazla 4×10^8 maya hücresi içerecek şekilde) 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. $\geq 12000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.
- Hücre pelleti 100 µL maya lizis tamponunda (1 M sorbitol, 0.1 M EDTA, pH 7,4, %0,1 β-merkaptoetanol, 50 ünite litikaz) yeniden süspanse edildi.

- 30°C’de 30 dakika inkübe edildi.
- β -merkптоetanol ile desteklenmiş 300 μ L lizis tamponu eklendi. Vortekslenerek iyice karıştırıldı.
- 600 μ L seyreltilmiş Proteinaz K [590 μ L TE tamponunda (10 mM Tris HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) seyreltilmiş 10 μ L Proteinaz K] eklendi. Vortekslendi ve 15-25°C’de 10 dakika inkübe edildi.
- $\geq 12000 \times g$ ’de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant yeni bir RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
- 450 μ L etanol (%96-100) eklendi ve pipetleme yapılarak karıştırıldı.
- Lizatın 700 μ L’si, bir toplama tüpüne yerleştirilmiş olan GeneJET RNA pürifikasyon kolonuna aktarıldı. Kolon $\geq 12000 \times g$ ’de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Akan sıvı boşaltıldı ve pürifikasyon kolonu toplama tüpüne geri yerleştirildi. Bütün lizat kolona aktarılıp santrifüjlenene kadar bu adım tekrarlandı. Akan sıvıyı içeren toplama tüpü atıldı. GeneJET RNA pürifikasyon kolonu yeni bir 2 mL’lik toplama tüpüne yerleştirildi.
- GeneJET RNA pürifikasyon kolonuna 700 μ L Wash Buffer 1 (etanol ile desteklenmiş) eklendi. Daha sonra kolon $\geq 12000 \times g$ ’de 1 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Akan sıvı boşaltıldı ve pürifikasyon kolonu toplama tüpüne geri yerleştirildi.
- GeneJET RNA pürifikasyon kolonuna 600 μ L Wash Buffer 2 (etanol ile desteklenmiş) eklendi. Daha sonra kolon $\geq 12000 \times g$ ’de 1 dakika boyunca santrifüj yapıldı. Akan sıvı boşaltıldı ve pürifikasyon kolonu toplama tüpüne geri yerleştirildi.
- GeneJET RNA 250 μ L pürifikasyon kolonuna Wash Buffer 2 eklendi ve $\geq 12000 \times g$ ’de 2 dakika boyunca santrifüj yapıldı.
- GeneJET RNA pürifikasyon kolonunun merkezinde bulunan nükleaz içermeyen suyun (100 μ L) tam ortasına eklendi. RNA'nın elüsyonu için $\geq 12000 \times g$ ’de 1 dakika boyunca santrifüj yapıldı.

- Pürifikasyon kolonu atıldı. Elde edilen RNA ekstraktları ileri aşamalarda kullanılabilme üzere -20°C’de muhafaza edildi.

3.7.2. Total RNA miktarının ve saflığının ölçülmesi

RNA miktarı ve saflığı IMPLLEN NanoPhotometer NP80 cihazı kullanılarak 260/280 nm dalga boyunda izolasyon kitininde bulunan water nuclease free blank (kör) okutularak ölçüldü.



Şekil 11. IMPLLEN NanoPhotometer NP80 cihazı

3.7.3. RNA’dan komplementer DNA (cDNA) sentezi

RNA ekstaksiyonu gerçekleştirilen tüm örneklerin Reverse Transkriptaz enzimi yardımıyla cDNA sentezi gerçekleştirildi. RNA, üreticinin tavsiyelerine göre iScript cDNA sentez kitine (Biorad) göre her örnek için cDNA sentez karışımı total volümü 20 µl olacak şekilde aşağıdaki Tablo 7’de belirtildiği gibi hazırlandı.

Tablo 7. cDNA sentez karışımı için kullanılan malzemeler

Bileşenler	Her reaksiyon için miktar, µL
5x iScript Reaksiyon Mix	4
iScript Revers Transkriptaz	1
Nükleaz içermeyen su	10
RNA	5
Toplam hacim	20

PCR karışımı hazırlanan örneklerin ardından tüpler hemen bir termal döngüleyiciye yerleştirildi. Amplifikasyon döngüleri Tablo 8’de belirtilen şartlarda termal bir döngüleyicide çoğaltıldı. cDNA’lar kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

Tablo 8. cDNA sentez karışımı için kullanılan PCR koşulları

Başlangıç	25°C, 5 dk
Revers transkripsiyon	46°C, 20 dk
RT inaktivasyon	95°C, 1 dk
Opsiyonel adım	4°C , ∞

3.7.4. Primer dizileri

Üretici firmanın önerisi doğrultusunda primerler sulandırıldı. Hazırlanan 10 µM’lik stoklardan kullanıldı. Kullanılan primerler ve büyüklükleri Tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. Primer dizileri ve ampikon uzunlukları

Gen	Primer İsmi	Sekans(5’-3’)	bp	Genbank
EFG1	EFG-S	CCA GGG TGG TGC TGC TAA TAG	241	Z32687
	EFG-A	GGG TGA AGG GTG AAC TGA ACC		

3.7.5. Real-time PCR aşaması

İncelenecek EFG-1 gen bölgesini hedef alan primerler için ayrı ayrı mikrosantrifüj tüpleri alındı. Tüpler her bir primere göre barkodlandı. Daha sonra Syber green master mix’den ve nükleaz free sudan oluşan total bir karışım hazırlandı. Syber green master mix’den her kuyucuk için 12,5 µl ve nükleaz free sudan 9 µl olacak şekilde Tablo 10’da belirtilen miktarlarda diğer malzemeler eklenerek tüm örnekler için homojen bir karışım hazırlanarak tüplere dağıtıldı. Ardından amplifiye edilen cDNA’lardan daha önceden barkotlanmış tüplere 2,5 µl eklendi. Kabarcık oluşmaması için tüpler nazikçe karıştırıldı.

Tablo 10. Real-time PCR karışımı için kullanılan malzemeler

Real-time PCR karışımı için malzemeler	Miktar
Syber gren master mix	12,5 µl
Forward primer	0,5 µl
Revers primer	0,5 µl
Nucleaz free Water	9
cDNA	2,5
Toplam hacim	25 µl

Hazırlanan Real-time PCR karışımı Tablo 11’de belirtilen amplifikasyon döngüleri ile Real-time PCR cihazına yerleştirildi.

Tablo 11. Real-time PCR amplifikasyon döngüleri

Döngü	Süre	Sıcaklık (°C)
1	15 dakika	95
40	30 saniye	95
40	1 dakika	55

Real-time PCR erime eğrisi analizi sonucuna göre pozitif olduğu düşünülen izolatların iki tanesi (28 ve 30 numaralı izolatlar) EFG-1 geni varlığının doğrulanması amacıyla sekans analizine gönderilmiştir.

3.8. İstatistiksel Analiz

Verilerin analiz aşamasında SPSS 24,0 istatistik paket programı kullanılmıştır. Değerlendirme sonuçlarının tanımlayıcı istatistikleri; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde ile gösterilmiştir. Bağımsız kategorik grupların karşılaştırılmasında ki-kare testi, bağımlı kategorik grupların karşılaştırılmasında Mc-Nemar testi kullanılmıştır. İstatistiksel alfa önemlilik seviyesi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

4.1. *C. albicans* İzolatların Özellikleri

Çalışmaya 2019-2022 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden izole edilen *Candida albicans* izolatları (n=60) dahil edilmiştir. Bu izolatların yarısı (n=30) kateter kan kültürü, diğer yarısı (n=30) ise normal kan kültürü olacak şekilde toplanmıştır. Her hastanın tek örneği çalışmaya alınmıştır. İzolatlar en çok dahili kliniklerden gönderilen klinik örneklerden (%60) izole edilmiştir. Bunu sırasıyla cerrahi kliniklerden (%21,7) ve yoğun bakım ünitelerinden (%18,3) gönderilen örnekler takip etmiştir. Örnek türüne ve gönderildikleri kliniklere göre dağılımları Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 12. *C. albicans* izolatlarının örnek türü ve gönderildikleri kliniklere göre dağılımı

Örnek Türü	Gönderilen Klinikler			
	Yoğun bakım n(%)	Dahili klinikler n(%)	Cerrahi klinikler n(%)	Toplam n(%)
Kan kültürü	6(10)	19(31,6)	5(8,3)	30(50)
Kateter kan kültürü	5(8,3)	17(28,4)	8(13,4)	30(50)
Toplam	11(18,3)	36(60)	13(21,7)	60(100)

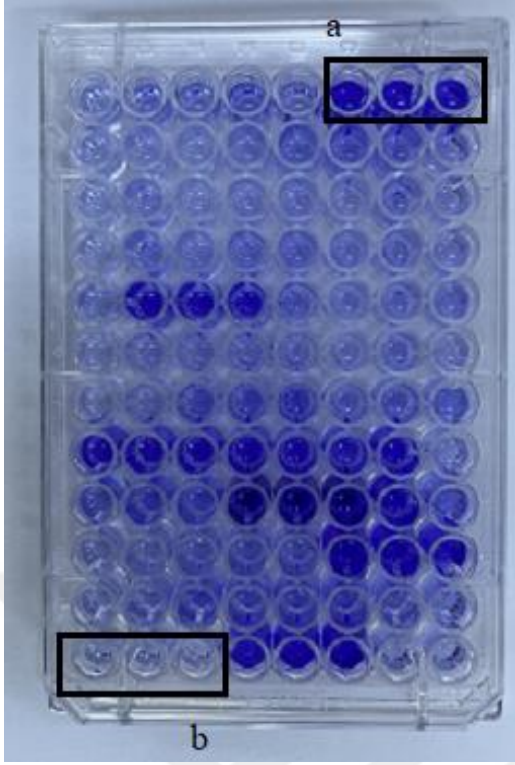
4.2. *C. albicans* Suşlarının Biyofilm Aktiviteleri

Çalışmaya dâhil edilen kan kültürü (n=30) ve kateter kan kültüründen (n=30) elde edilen izolatların (n=60) 10 (%16,7)'unun 24 veya 48 saatlik inkübasyon sonrasında biyofilm oluşturduğu görülmüştür. 24 saatlik inkübasyon sonrasında biyofilm oluşturduğu tespit edilen izolat sayısı 6 (%10) iken; 48 saatlik inkübasyon sonrasında biyofilm oluşturduğu tespit edilen izolat sayısı 10 (%16,7) olarak bulunmuştur. Ayrıca kan kültürü ve kateter kan kültürü izolatlarının biyofilm oluşturma durumlarına bakıldığında ise kan kültüründen izole edilen *C. albicans* suşlarının (n=30) 2 (%6,7)'sinin 24 saatlik inkübasyon sonunda, 4 (%13,4)'ünün ise 48 saatlik inkübasyon sonunda; kateter kan kültüründen izole edilen *C. albicans* suşlarının (n=30) 4 (%13,4)'ünün 24 saatlik inkübasyon sonunda, 6 (%20)'sının ise 48 saatlik inkübasyon sonunda biyofilm oluşturdıkları tespit edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda biyofilm oluşturduğu tespit edilen izolatların (n=6) 4 (%66,7)'ünün 1. derece, 2 (%33,3)'sinin 2. derece biyofilm aktivitesinin olduğu saptanmışken; 48 saatlik inkübasyon sonunda biyofilm oluşturduğu tespit edilen izolatların (n=10) ise 5

(%50)'inin 1. derece, 4 (%40)'ünün 2. derece, 1 (%10)'inin ise 3. derece biyofilm aktivitesinin olduğu saptanmıştır. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonundaki biyofilm aktiviteleri karşılaştırıldığında; 2'si kan kültüründen, diğer 2'si kateter kan kültüründen izole edilmiş olmak üzere toplamda 4 *C. albicans* suşunun biyofilm aktivite düzeyleri 0. dereceden 1. dereceye, 1'i kan kültüründen, diğer 2'si kateter kan kültüründen izole edilmiş olmak üzere toplamda 3 *C. albicans* suşunun biyofilm aktivite düzeyleri 1. dereceden 2. dereceye, 1 kateter kan kültüründen izole edilmiş *C. albicans* suşunun biyofilm aktivite düzeyi 2. dereceden 3. dereceye yükselmiştir. 1'i kan kültüründen, diğeri ise kateter kan kültüründen izole edilmiş olmak üzere toplamda 2 *C. albicans* suşunun biyofilm aktivite düzeylerinde 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda herhangi bir değişiklik görülmemiş olup; kateter kan kültüründen izole edilen suşta 2. derecede, kan kültüründen izole edilen suşta ise 1. derecede sabit kaldığı tespit edilmiştir. Kan kültürü ve kateter kan kültüründen izole edilen *C. albicans* izolatlarının biyofilm oluşturma düzeylerine bakıldığında; 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda biyofilm oluşumu yönünden ki-kare testi istatistiksel analizlerinde anlamlı derecede farklılık bulunamamıştır [sırasıyla ($p=0,671$), ($p=0,488$)]. 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda örnek türü ayrımı yapmaksızın oluşan biyofilm düzeylerine bakıldığında da istatistiksel olarak aralarında bir farklılık bulunamamıştır ($p=0,125$). İzolatların biyofilm aktivitesinin araştırıldığı mikrotitrasyon plaklarının görüntüleri Şekil 11,12,13 ve 14'te gösterilmiştir. Çalışılan izolatların biyofilm oluşturma dereceleri ise Tablo 12 ve 13'te verilmiştir.



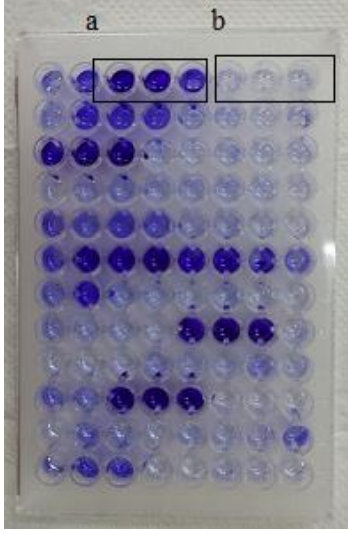
Şekil 12. 24 saatlik inkübasyon sonrası kateter kan kültüründen izole edilen suşların mikrotitrasyon plak görüntüsü (a: Pozitif kontrol b: Negatif kontrol)



Şekil 13. 48 saatlik inkübasyon sonrası kateter kan kültüründen izole edilen suşların mikrotitrasyon plak görüntüsü (a: Pozitif kontrol b: Negatif kontrol)



Şekil 14. 24 saatlik inkübasyon sonrası kan kültüründen izole edilen suşların mikrotitrasyon plak görüntüsü (a: Pozitif kontrol b: Negatif kontrol)



Şekil 15. 48 saatlik inkübasyon sonrası kan kültüründen izole edilen suşların mikrotitrasyon plak görüntüsü (a: Pozitif kontrol b: Negatif kontrol)

Tablo 13. Kateter kan kültüründen izole edilen *C. albicans* izolatlarının biyofilm oluşturma dereceleri

İzolat No	Tür Adı	Biyofilm Oluşturma Dereceleri	
		24 Saat	48 Saat
1	<i>Candida albicans</i>	0	0
2	<i>Candida albicans</i>	0	0
3	<i>Candida albicans</i>	0	0
4	<i>Candida albicans</i>	0	0
5	<i>Candida albicans</i>	0	0
6	<i>Candida albicans</i>	1	2
7	<i>Candida albicans</i>	0	0
8	<i>Candida albicans</i>	2	3
9	<i>Candida albicans</i>	0	0
10	<i>Candida albicans</i>	0	1
11	<i>Candida albicans</i>	2	2
12	<i>Candida albicans</i>	0	0
13	<i>Candida albicans</i>	0	0
14	<i>Candida albicans</i>	0	0
15	<i>Candida albicans</i>	0	0
16	<i>Candida albicans</i>	0	1
17	<i>Candida albicans</i>	0	0
18	<i>Candida albicans</i>	1	2
19	<i>Candida albicans</i>	0	0
20	<i>Candida albicans</i>	0	0
21	<i>Candida albicans</i>	0	0
22	<i>Candida albicans</i>	0	0
23	<i>Candida albicans</i>	0	0
24	<i>Candida albicans</i>	0	0
25	<i>Candida albicans</i>	0	0
26	<i>Candida albicans</i>	0	0
27	<i>Candida albicans</i>	0	0
28	<i>Candida albicans</i>	0	0
29	<i>Candida albicans</i>	0	0
30	<i>Candida albicans</i>	0	0

Tablo 14. Kan kültüründen izole edilen *C. albicans* izolatlarının biyofilm oluşturma dereceleri

İzolasyon No	Tür Adı	Biyofilm Oluşturma Dereceleri	
		24 Saat	48 Saat
31	<i>Candida albicans</i>	0	0
32	<i>Candida albicans</i>	0	0
33	<i>Candida albicans</i>	0	0
34	<i>Candida albicans</i>	0	0
35	<i>Candida albicans</i>	0	0
36	<i>Candida albicans</i>	0	1
37	<i>Candida albicans</i>	0	0
38	<i>Candida albicans</i>	0	0
39	<i>Candida albicans</i>	0	0
40	<i>Candida albicans</i>	0	0
41	<i>Candida albicans</i>	0	0
42	<i>Candida albicans</i>	0	0
43	<i>Candida albicans</i>	0	1
44	<i>Candida albicans</i>	0	0
45	<i>Candida albicans</i>	0	0
46	<i>Candida albicans</i>	0	0
47	<i>Candida albicans</i>	1	1
48	<i>Candida albicans</i>	0	0
49	<i>Candida albicans</i>	0	0
50	<i>Candida albicans</i>	0	0
51	<i>Candida albicans</i>	0	0
52	<i>Candida albicans</i>	0	0
53	<i>Candida albicans</i>	1	2
54	<i>Candida albicans</i>	0	0
55	<i>Candida albicans</i>	0	0
56	<i>Candida albicans</i>	0	0
57	<i>Candida albicans</i>	0	0
58	<i>Candida albicans</i>	0	0
59	<i>Candida albicans</i>	0	0
60	<i>Candida albicans</i>	0	0

4.3. *C. albicans* Suşlarının EFG-1 Geni Varlığı

IMPLEN NanoPhotometer NP80 cihazı kullanılarak ölçülen RNA miktarları Tablo 15'te verilmiştir.

Tablo 15. Nükleik asit kantitasyon değerleri

İzolat No	RNA(ng/µl)	İzolat No	RNA(ng/µl)
1	177.5	31	118.5
2	139.7	32	121.1
3	38.9	33	160.9
4	53.3	34	157.1
5	126.6	35	162.7
6	181.1	36	183.9
7	152.6	37	241
8	140.2	38	281.7
9	144.2	39	81.3
10	192.5	40	146.7
11	244.5	41	136.5
12	361.8	42	174.1
13	159.8	43	178.8
14	164.3	44	56.8
15	71.5	45	108.8
16	38.5	46	114.5
17	198.2	47	195.8
18	50	48	124.1
19	42.3	49	129.4
20	146.5	50	158.1
21	275.5	51	444.3
22	268.8	52	360.8
23	247.3	53	376.9
24	322.1	54	163.8
25	126.1	55	77
26	162.7	56	463.3
27	202.9	57	211.5
28	138.2	58	200.4
29	86.7	59	143.5
30	58.9	60	102
Pozitif Kontrol (ATCC 90028)	88.5		

Çalışmaya dâhil edilen kan kültürü (n=30) ve kateter kan kültüründen (n=30) elde edilen izolatların (n=60) 28 (%46,7)'inin EFG-1 genine sahip olduğu tespit edilmiştir. Kateter kan kültürlerinden izole edilen suşların 17 (%56,7)'sinde EFG-1 geni varlığı tespit edilirken; kan kültürlerinden izole edilen suşlarda EFG-1 geni 11 (%36,7) suşta

tespit edilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonundaki biyofilm oluşturma durumları dikkate alındığında kateter kan kültürlerinden izole edilen ve EFG-1 geni tespit edilen 17 suşun 2 (%11,7)'sinin biyofilm oluşturduğu; kan kültürlerinden izole edilen ve EFG-1 geni tespit edilen 11 suşun ise 3 (%27,3)'ünün biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Kateter kan kültürlerinden izole edilen ve biyofilm oluşturduğu tespit edilen 6 suşun 2 (%33,3)'sinde EFG-1geni varlığı; kan kültürlerinden izole edilen ve biyofilm oluşturduğu tespit edilen 4 suşun ise 3 (%75)'ünde EFG-1geni varlığı saptanmıştır. EFG-1 geni ile biyofilm oluşumu arasında ki-kare testi istatistiksel analizlerinde anlamlı derecede bir ilişki bulunamamıştır (p=1,00). Çalışmaya dâhil edilen izolatların EFG-1 geni varlıkları Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. İzolatların EFG-1 geni varlıkları ve biyofilm oluşturma durumları

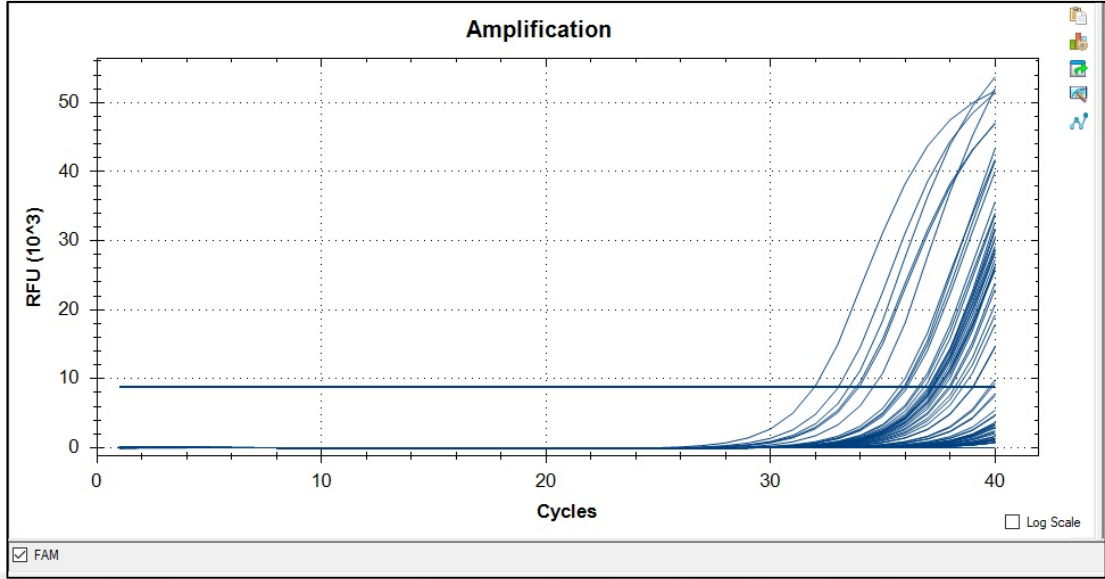
Kateter Kan Kültürü			Kan Kültürü		
İzolat No	EFG-1 Geni Varlığı	48 saat inkübasyon sonrası biyofilm oluşumu	İzolat No	EFG-1 Geni Varlığı	48 saat inkübasyon sonrası biyofilm oluşumu
1			31		
2	✓		32		
3			33		
4	✓		34		
5	✓		35		
6	✓	+	36	✓	+
7	✓		37	✓	
8		+	38		
9			39	✓	
10		+	40		
11	✓	+	41	✓	
12			42	✓	
13	✓		43	✓	+

Tablo 16 (Devam). İzolatların EFG-1 geni varlıkları ve biyofilm oluşturma durumları

14			44	✓	
15	✓		45	✓	
16		+	46	✓	
17	✓		47	✓	+
18			48	✓	
19		+	49		
20	✓		50		
21			51		
22	✓		52		
23			53		+
24	✓		54		
25	✓		55		
26	✓		56		
27			57		
28	✓		58		
29	✓		59		
30	✓		60		
Pozitif Kontrol (ATCC 90028)		+			

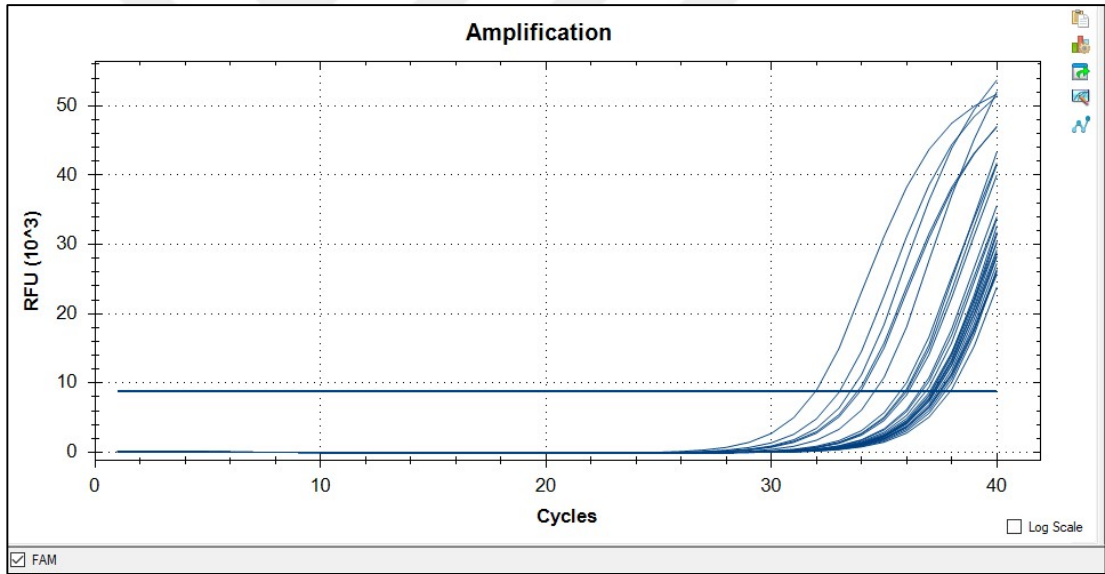
4.4. Real-Time PCR Amplifikasyon Eğrileri

C. albicans izolatlarına ait EFG-1 geni real-time PCR kullanılarak analiz edildi. Real-time PCR sonrası elde edilen eğriler Şekil 16 ve Şekil 17’de verildi. x ekseninde Ct değeri, y ekseninde ise ışınma miktarı gösterilmektedir.



n̄si

Şekil 16. EFG-1 genine ait amplifikasyon eğrileri (tüm örnekler)



Şekil 17. EFG-1 genine ait amplifikasyon eğrileri (pozitif örnekler)

4.5. Gen Ekspresyon Düzeyleri

İzolatlara ait EFG-1 genlerinin Ct düzeylerine bakıldığında; 2, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 15, 17, 20, 22, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 36, 37, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 no'lu izolatların EFG-1 genini eksprese ettiği belirlendi. İzolatlara ait Ct değerleri Tablo 17'de verildi.

Tablo 17. Referans suş ve izolatlara ait Ct değerleri

İzolot No	Ct	İzolot No	Ct
ATCC(90028)	N/A*		
1	N/A	31	N/A
2	37,53	32	N/A
3	N/A	33	N/A
4	37,2	34	N/A
5	37,73	35	N/A
6	37,4	36	37,13
7	37,1	37	36,68
8	N/A	38	N/A
9	N/A	39	37,5
10	N/A	40	N/A
11	37,23	41	33,83
12	N/A	42	37,28
13	36,1	43	33,96
14	N/A	44	33,04
15	36,59	45	37,96
16	N/A	46	36,87
17	37,3	47	37,47
18	N/A	48	35,94
19	N/A	49	N/A
20	36,02	50	N/A
21	N/A	51	N/A
22	34,59	52	N/A
23	N/A	53	N/A
24	37,62	54	N/A
25	37,05	55	N/A
26	37,22	56	N/A
27	N/A	57	N/A
28	33,52	58	N/A
29	35,73	59	N/A
30	31,98	60	N/A

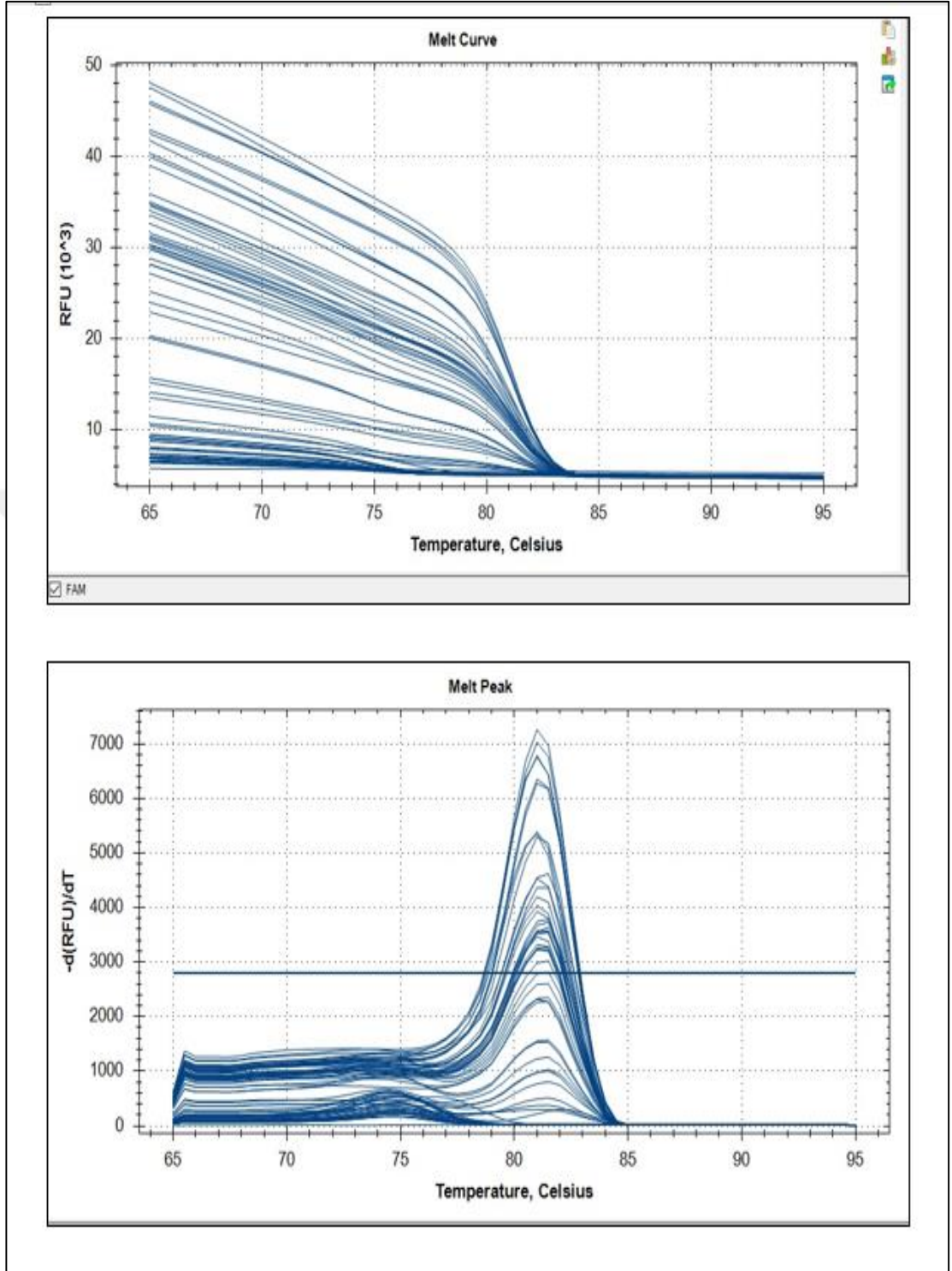
* N/A: Ekspresyon yok.

4.6. Erime Eğrisi Analizi Sonuçları

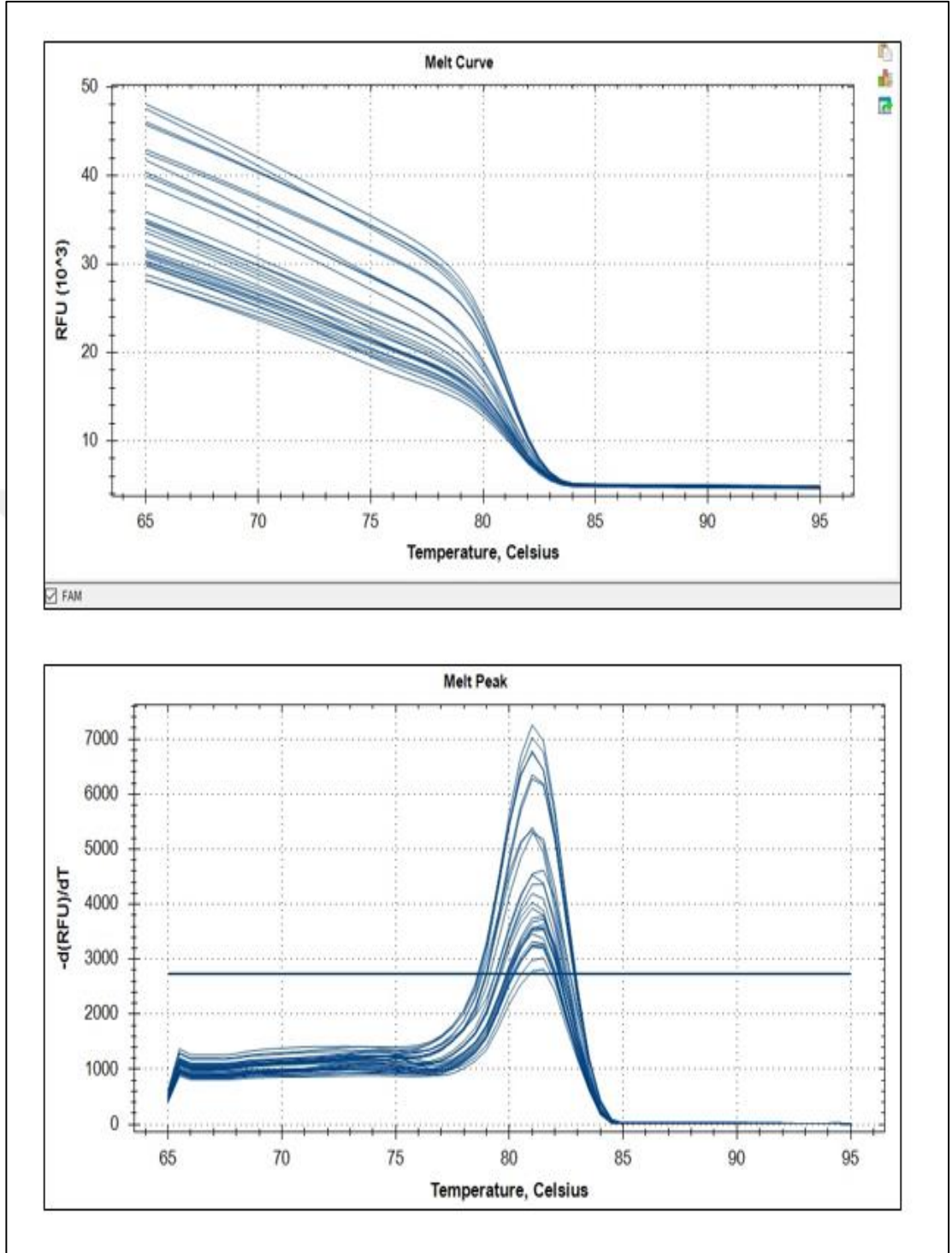
Real-time PCR reaksiyonu SYBR Green I boyasını kullanır ve ürünün amplifikasyonu sırasında çift zincirli DNA'ya bağlanır akabinde ise detektör yardımıyla ışımanın miktarı ölçülür. Erime eğrisi analizi real-time PCR reaksiyonunun önemli bir aşaması olup reaksiyonunun özgüllüğünü gösterir. Genel anlamda erime eğrisi analizi sonucunda her bir örneğe ait tek bir pik görülmesi beklenmektedir. Beklenenin aksine farklı bir pikin görülmesi nonspesifik bağlanma veya primer-dimer oluştuğunun bir göstergesidir. Bu sebeple her bir real-time PCR reaksiyonunda reaksiyonun özgüllüğü için erime eğrisi analizi yapılması gerekmektedir.

4.7. Erime eğrisi analizi görüntüleri

C. albicans izolatlarının EFG-1 gen bölgesine ait erime eğrileri Şekil 18 ve 19'da verilmiştir. Real-time PCR erime eğrisi sonuçlarına göre EFG-1 geni yönünden pozitif olduğu düşünülen 28 ve 30 numaralı iki izolata sekans analizi yapılmış ve sekans analizi sonucunda bu şüpheli izolatların EFG-1 geni varlığı yönünden pozitif olduğu doğrulanmıştır. Sekans analizi sonuçları Şekil 20, Şekil 21 ve Şekil 22'de gösterilmiştir.



Şekil 18. EFG-1 gen bölgesine ait erime eğrisi analizleri (tüm örnekler)



Şekil 19. EFG-1 gen bölgesine ait erime eğrisi analizleri (pozitif örnekler)

5. TARTIŞMA

Mantarlar, kritik hastalardaki başlıca patojenler olarak giderek daha fazla izole edilmektedir. *Candida spp.* ve *Cryptococcus spp.* klinik pratikte en sık izole edilen maya mantarlarıdır (54).

Alp ve ark. yapmış oldukları bir prevelans çalışmasında ocak 2001 ile aralık 2010 tarihleri arasındaki kandidemi epizodlarını geriye dönük olarak değerlendirmişlerdir. 381 kandidemi atağının %58,3'ünün *C. albicans*'a; ardından *C. parapsilosis* (%15,2) ve *C. tropicalis*'e (%13,4) bağlı olduğunu görmüşlerdir (55). Bizim çalışmamızda da *C. albicans*'ı tercih etmemizin sebebi kandidememi olgularının büyük bir çoğunluğunda etken olarak *C. albicans* saptanması idi.

Birçok doğal ortamda, mikroorganizmalar ağırlıklı olarak biyofilmlerde, yani bir yüzeye bağlı organizma toplulukları olarak bulunurlar. Klinik öneme sahip organizmalar için biyofilm içindeki hücrelerin en dikkate değer fenotipik özelliği, antimikrobiyal ilaçlara karşı yüksek dirençleridir. Kalıcı tıbbi cihazlar üzerinde oluşan biyofilmlerle ilişkili enfeksiyonlar, biyofilmdeki organizmaların yüksek antimikrobiyal direnci nedeniyle tedavi edilmesi zor olduğundan ve sıklıkla cihazın çıkarılmasını gerektirdiğinden önem arz ederler. Bu cihazlardan en sık izole edilen mikroorganizmalar *Candida* türleridir (56).

Biyofilmlerin oluşum basamakları; mikroorganizmaların yüzeylere dönüşümsüz olarak tutunmaları, tutundukları bölgelerde çoğalmaları ve hücre dışı polimerler üretmeleri şeklindedir. Ayrıca biyofilmin klinik açıdan belirgin önemi, biyofilm içine gömülmüş olan mikroorganizmaların, antibiyotik tedavisine serbest olanlara göre belirgin olarak dirençli olmasıdır (57).

Karabağ ve ark. yapmış oldukları çalışmada toplam 27 *C. albicans*, 28 *albicans* dışı *Candida* suşunun biyofilm üretimi araştırmışlardır. *C. albicans* ile *albicans* dışı *Candida* türleri arasında biyofilm oluşumu incelendiğinde 27 *C. albicans* suşunun üçünde (%11,1), 28 non-*albicans* suşunun ise 20'sinde (%71,4) biyofilm oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Aralarındaki istatistiksel farkı ki-kare testi ile göstermişlerdir. (p=0,0001) (58).

Kuzucu ve ark. yapmış oldukları çalışmada klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinde biyofilm oluşumunu araştırmışlardır. Toplam 104 *Candida* suşunun (%52)

biyofilm ürettiğini saptanmışlardır. *C. albicans*'ta bu oranın (%63) *albicans* dışı türlere göre (%35) daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir (59).

Demirbilek ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada, 116 *Candida* suşundan 33'ünün (%28) biyofilm oluşturduğunu saptanmıştır. *Albicans* dışı *Candida* izolatlarının biyofilm oluşturma oranının (15/37, %41), *C. albicans*'a (18/79, %23) göre daha yüksek olduğunu saptamış ve bu farkı istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır ($p<0,05$). Optik yoğunluklarına göre suşlarda biyofilm oluşumu değerlendirilmiş ve 18 *C. albicans* suşunun 4'ünde (%22) güçlü pozitif, 5'inde (%28) orta pozitif, 9'unda (%50) zayıf pozitif, 15 *albicans* dışı *Candida* suşunun ise 9'unda (%60) güçlü pozitif, 3'ünde (%20) orta pozitif, 3'ünde (%20) zayıf pozitif biyofilm oluşumu saptanmışlardır. Kan kültürlerinden izole ettikleri suşların diğer örneklerden izole edilenlere göre anlamlı olarak daha yüksek oranda biyofilm oluşturduklarını tespit etmişlerdir ($p<0,05$) (60).

Alpay ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada incelenen örneklerin; 32'si idrar, 8'i yara, 5'i boğaz, 4'ü balgam, 2'si kan, 1'i kateter ve 1'i de trakeal aspirattan izole edilen suşlar olmak üzere 53 *Candida* suşunun 34'ü (%64,1) *C. albicans*, 11'i (%20,7) *C. parapsilosis*, 4'ü (%7,5) *C. kefyr*, 3'ü (%5,6) *C. tropicalis* ve 1'i (%1,8) *C. glabrata* olarak saptamışlar ve tüm suşlar değerlendirildiğinde; biyofilm oluşum oranının %47,2 olduğunu tespit etmişlerdir. *C. albicans* türünde %38,2 oranında, non-*albicans* *Candida*'larda ise %63,1 oranında biyofilm oluşumu gözlemlemişlerdir (12). Bizim çalışmamızda *C. albicans* türlerinde biyofilm oluşum oranlarını %16,7 olarak bulunmuş olup aradaki yüzdesel farkın örnek türlerindeki farklılıktan kaynaklanacağı düşünülmüştür.

Tüzüner ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada yöntemlere göre *Candida*'ların biyofilm oluşturma özellikleri incelenmiş ve modifiye mikropalak yöntemiyle %19,4'nün (n=42), XTT redüksiyon yöntemiyle %22,7'sinin (n=49) biyofilm oluşturduğu saptanmıştır. Mikropalak yöntemiyle; *C. albicans*'ların %12,5'inin (n=16), non-*albicans* *Candida*'ların %29,5'inin (n=26) biyofilm oluşturduğu, XTT redüksiyon yöntemiyle ise; *C. albicans*'ların %15,6'sının (n=20), non-*albicans* *Candida*'ların %32,9'unun (n=30) biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Biyofilm oluşturma oranları açısından, XTT redüksiyon ve mikropalak yöntemleri arasındaki

fark, ayrıca *C. albicans* ve non-*albicans Candida*'lar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı bulunduğunu belirtmişlerdir ($\chi^2=11,246$; $p=0,024$) (11). Çalışmamızda mikrotitrasyon plak yöntemi ile biyofilm oluşumu araştırılmış ve *C. albicans* türlerinde biyofilm oluşum oranlarını bu çalışma ile benzer bulunmuştur (%16,7).

Çalı ve ark.'nın hastanede yatan hastalardan gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen mikroorganizmaların biyofilm formasyon aktivitelerini araştırdıkları başka bir çalışmada *C. albicans* türlerinde biyofilm oluşum oranını %76 olarak bulmuşlardır (61).

Agwan ve ark. çeşitli klinik örneklerden izole edilen 40 *C. albicans*, 78 non-*albicans Candida* olmak üzere 118 *Candida* izolatının biyofilm oluşumunu araştırmışlardır. Bu çalışmada *C. albicans* izolatlarının %13,5'inin, non-*albicans Candida* izolatlarının ise %33'ünün biyofilm oluşturduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda biyofilm oluşumunun en fazla idrar örneği izolatlarında, ikinci olarak da kan örneği izolatlarında gözlemlendiğini bildirmişlerdir (62).

Nouraei ve ark. kan kültürü örneklerinden izole ettikleri 50 *C. albicans*, 50 non-*albicans* olmak üzere 100 *Candida* izolatının biyofilm oluşum yeteneklerini araştırmışlardır. Bu çalışmada *C. albicans* izolatlarının %90'ında, non-*albicans Candida* izolatlarının ise %98'inde biyofilm üretiminin görüldüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca *C. albicans* ve non-*albicans Candida* izolatları arasında biyofilm oluşumu açısından istatistiksel anlamlı fark bulunduğunu bildirmişlerdir ($p<0,001$) (63).

Çetin ve ark.'nın yapmış oldukları bir başka çalışmada ise çalışmaya dâhil edilen izolatların ($n=90$) 30 (%33,3)'unun biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Biyofilm oluşturduğunu tespit ettikleri izolatların 11 (%36,7)'inin 1. derece, 3 (%10)'ünün 2. derece, 16 (%53,3)'sının 3. derece biyofilm aktivitesinin olduğu saptamışlardır. Çalışılan 35 *C. albicans* izolatının 5 (%14,3)'inin, 55 non-*albicans Candida* izolatının ise 25 (%45,4)'inin biyofilm oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Biyofilm oluşturan 5 *C. albicans* türünün 4 (%80)'ünün zayıf, 1 (%20)'inin orta derecede biyofilm oluşturduğunu tespit etmişlerdir. *C. albicans* ve non-*albicans Candida* izolatları arasında biyofilm oluşumu yönünden ki-kare testi istatistiksel analizlerinde anlamlı derecede farklılık olduğunu bulmuşlardır ($p<0,001$) (64).

Yapılan çalışmalarda, *Candida* türlerinde saptanan biyofilm oranlarının %8 ila %85 arasında değiştiği görülmektedir. Bu oranlar suşların izole edildiği bölgelere, enfeksiyon etkeni olup olmamalarına ve izole edilen *Candida* türüne göre farklılık göstermektedir. Görüldüğü gibi farklı çalışmalarda benzer sonuçlar elde edildiği kadar farklı bazı sonuçlar da bildirilmektedir. Bu durumun çalışma yapılan merkezlerin ve çalışmalarda kullanılan yöntemlerin farklılığından kaynaklanabileceği ayrıca kullanılan izolatların farklı özelliklerinden kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir.

W. Bachtar ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada *C. albicans*'ın 48 saat inkübasyon sonunda biyofilm oluşturma derecelerinin 24 saatlik inkübasyon sonrası oluşan biyofilm derecelerine kıyasla daha yüksek olduğunu gözlemlemişler ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirtmişlerdir ($P > 0,05$) (65).

Deng ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada toplam 55 suştan 29 *C. albicans* suşu in vitro biyofilm oluşturmuştur. Bir *C. albicans* suşunun gelişimi mikroskopla gözlemlenmiş ve in vitro 6 saatlik hücre kültüründen sonra tomurcuklanma gösterdiği tespit edilip; miçelyum oluşturmaya başladığı görülmüştür. *C. albicans* kolonilerinin birbirleriyle yapışma gösterdiği ve 12 saatlik kültürden sonra bir ağ halinde düzenlendiği belirtilmiştir. *C. albicans* suşlarının 24 saatlik kültürden sonra miçelyum oluşumu boyunca kümelenildiği tespit edilmiştir. Son olarak, *C. albicans*'ın oluşturduğu miçelyum, in vitro 48 saatlik kültürden sonra tüm kateterin içinde birbirine geçerek bir membran ağ yapısı oluşturduğu görülmüştür (66). Çalışmamızda da 48 saatlik inkübasyon sonucunda 24 saate kıyasla biyofilm oluşum düzeylerinin bu çalışmaya benzer şekilde bazı suşlarda arttığı gözlemlenmiştir.

Ramage ve ark. yapmış oldukları çalışmada uzaysal olarak organize edilmiş bir biyofilm oluşturmak için hiflerin gerekli olduğunu göstermek amacıyla genetik olarak tanımlanmamış iki mutant *C. albicans* suşu kullanmışlardır; bunlardan biri maya oluşumunda kusurlu bir suş iken diğer suş ise hifal oluşturmada kusurlu bir suştur. Hif oluşumunda kusurlu olan suş tarafından oluşturulan biyofilmlerin, atipik bir biyofilm mimarisi içerisinde yoğun şekilde paketlenmiş maya hücrelerinden oluştuğunu ve yıkama yoluyla substrattan kolayca ayrıldığını belirtmektedirler. Bu sonuçlar neticesinde farklı çevresel koşullar altında filamentöz forma geçme özellikleri ile

karakterize edilen, mutant *C. albicans* suşlarını araştırmışlar ve filamentöz yapıya geçiş ve biyofilm oluşumundaki kusurları gözlemlemişlerdir. Bu izojenik suş grubundaki değişikliklere, anahtar rollere sahip bazı genlerdeki bozuklukların yol açabileceğini düşünmüşlerdir. Hem XTT okuması hem de mikroskopik gözlemler, *efg-1* düzenleyici proteinin, *C. albicans* biyofilmlerinin oluşumu ve daha sonraki gelişimi için anahtar bir faktör olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sebeple daha sonra, EFG-1'i; *efg-1* mutant suşuna transformasyon yoluyla yeniden aktarıp suşların biyofilm oluşturma yeteneklerini test etmişler ve bu suşların filamentöz fenotipe yeniden döndüklerini gözlemlemişlerdir. Her ne kadar bu suşlar tarafından oluşturulan biyofilmler vahşi tip suşlar tarafından oluşturulanlar kadar yoğun olmasa ve aynı zamanda biraz daha düşük XTT okumaları sergilese de, üç boyutlu mimari sergileyen biyofilmler bu şekilde oluşturulabilmiştir. EFG-1 geninin yeniden eklenmesiyle biyofilm oluşturma yeteneğinin restorasyonu, biyofilm oluşumundaki kusurun EFG-1 mutasyonunun bir sonucu olduğunu doğrulamıştır (67).

Harriott ve ark. yapmış oldukları çalışma ile vajinal dokuda biyofilm oluşumu gerekliliklerini ve vajinal kolonizasyon için biyofilm oluşumunun gerekli olup olmadığını ayrıca morfogenezin transkripsiyonel düzenleyicilerinde (EFG-1/EFG-1) ve biyofilm oluşumunda rol alan genlerde (BCR-1/BCR-1) delesyon bulunan *C. albicans* mutant suşlarını değerlendirmeyi amaçlamışlardır. EFG-1/EFG-1 mutantı suşun yalnızca maya ve psödohipal formları ürettiğini, bu suşların epitelyuma bağlı kalamaması nedeniyle SEM(Taramalı elektron mikroskobu) tarafından tespit edilemediğini belirtmişlerdir (68).

Nobile ve ark. yapmış oldukları çalışmada *C. albicans* suşlarının biyofilm oluşturmada birden fazla genin fonksiyon aldığını belirlemiş olup bu genlerden bazılarının BCR-1, ALS-1, ALS-3, HWP-1, ECE-1 olduğunu belirtmişlerdir (14).

Nobile ve ark. yapmış oldukları başka bir çalışmada in vitro wild tip biyofilm oluşumu için BCR1, TEC1, EFG1, NDT80, ROB1 ve BRG1 gibi genlerin gerekli olduğunu ifade etmektedirler. Bizim çalışmamızda biyofilm üretimi ve EFG-1 geni ile ilgili anlamlı bir bağlantı bulunmuş olup bu durumun biyofilm oluşumunda başka genlerin de önemli fonksiyonlarının bulunmasıyla açıklanabileceği düşünülmüştür (44).

Lassak ve ark. yapmış oldukları çalışmada hem morfogenezi indükleyerek (CZF-1, EFG-1, FGR-17, TEC-1, WOR-1, WOR2) hem de morfogenezi baskılayarak (EFG-1, NRG-1, RFG-1, TCC-1) hif oluşumunu veya fenotipik değişimi düzenlediği bilinen birçok gen tanımlamışlardır. EFG-1'den burada negatif bir düzenleyici olarak da bahsedilmektedir çünkü son yapılan çalışmalara göre normoksi durumunda hifal morfogenez için pozitif fonksiyonunun yanı sıra; hipoksi durumunda negatif bir düzenleyici olduğu görülmektedir (13). Sonuçlarımızın EFG-1 ile biyofilm arasındaki ilişkiyi göstermeme sebeplerinden biri de yukarıda açıklanan EFG-1 geninin negatif düzenleyici bir rolünün olmasıyla da açıklanabileceği düşünülmektedir.

Connolly ve ark. 2013'te yaptıkları çalışmada transkripsiyon faktörü *efg-1*'in *C. parapsilosis* izolatı üzerinde morfogenez ve biyofilm formasyonu düzenleyicisi olarak görev aldığını göstermişlerdir. Çalışmada, EFG-1 delesyonu olan *C. parapsilosis* izolatında, koloni morfolojisinden bağımsız olarak biyofilm gelişiminin azaldığı bulunmuştur. Ayrıca EFG-1'in delesyonunun, sodyum dodesil sülfat (SDS) ve kaspofungine duyarlılık kazandırdığı gözlemlenmiştir. Çalışmada ayrıca *Galleria mellonella* böceği kullanılarak EFG-1'in delesyonunun *C. parapsilosis* virülansı üzerine etkisi araştırılmış ve bu olayın virülansı önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (69).

6. SONUÇLAR

- Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* izolatlarının (n=60) biyofilm oluşturma oranları %16,7 (n=10) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu oran literatürdeki diğer çalışmalarla benzerlik göstermekte olup; yüzdesel oranlarda farklılıkların görüldüğü diğer çalışmalarla aradaki farkın örnek türlerindeki farklılıktan kaynaklanacağı düşünülmüştür.
- Kan kültürü ve kateter kan kültürü izolatlarının biyofilm oluşturma yüzdelere bakıldığında ise kateter kan kültüründen izole edilen *C. albicans* suşlarının biyofilm oluşturma oranlarının (%20) kan kültüründen izole edilen *C. albicans* suşlarının biyofilm oluşturma oranlarından (%13,4) daha yüksek olduğu bulunmuş ancak aralarında istatistiksel anlamda bir farklılık bulunamamıştır (p=0,488). Literatürde bu iki örnek türünün biyofilm oluşturma oranlarının karşılaştırılması ile ilgili pek fazla çalışmaya rastlanılmamış olup; yabancı cisim enfeksiyonu gibi biyofilm oluşumunun önemli olduğu bazı durumlar için hastalık patogenezini anlayabilmek açısından yeni çalışmalarla bu karşılaştırmanın desteklenmesi gerekmektedir.
- 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası örnek türü ayırımı yapmaksızın biyofilm oluşturma oranlarına bakıldığında ise; 24 saatin sonunda örneklerin %10'unun, 48 saatlik inkübasyon sonunda ise %16,7'sinin biyofilm oluşturduğu görülmüş olup; inkübasyon süresi artırıldığında biyofilm oluşturma oranının, her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bulunamasa da (p=0,125), arttığı tespit edilmiştir. Bu durum literatürde bulunan ender bazı çalışmaları destekler niteliktedir.
- Tüm *C. albicans* izolatlarına bakıldığında (n=60) EFG-1 genine sahip olma oranları % 46,7 bulunmuştur. EFG-1 geninin *C. albicans* türlerinde merkezi bir transkripsiyonel düzenleyici olan efg-1 proteini sentezinde aktif rol aldığı düşünüldüğünde saptadığımız bu oranın hiç de abartılı olmadığı düşünülmektedir.
- EFG-1 geni ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiye bakacak olursak çalışmamızda saptadığımız sonuçların istatistiksel olarak aradaki bu ilişkiyi açıklamadığı görülmektedir (p=1,00). Ancak literatürdeki bazı çalışmalara bakıldığında EFG-1'den negatif bir düzenleyici olarak da bahsedilmektedir çünkü son yapılan çalışmalara göre normoksi durumunda hifal morfogenez için pozitif fonksiyonunun yanı sıra; hipoksi durumunda negatif bir düzenleyici olduğu

görülmektedir. Sonuçlarımızın EFG-1 ile biyofilm arasındaki ilişkiyi göstermeme sebeplerinden biri de yukarıda açıklanan EFG-1 geninin negatif düzenleyici bir rolünün olmasıyla da açıklanabileceği düşünülmektedir.

- Çalışmamızda EFG-1 ile biyofilm üretimi arasındaki ilişkiyi değerlendirmiş olduk. Yöntemin geliştirilerek ve daha farklı çalışmalar yapılarak *C. albicans* enfeksiyonlarının fizyopatogenezine hakim olunup farklı bölgelerin hedeflendiği farklı antifungaller geliştirilebileceğini düşünmekteyiz.



7. KAYNAKLAR

1. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Tıbbi Mikrobiyoloji.Çeviri Ed. Us AD, Başustaoğlu A. 7.baskı. Ankara, Pelikan Kitabevi, 2016; 605-714.
2. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, ve ark. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2008;29(11):996-1011.
3. Rees JR, Pinner RW, Hajjeh RA, Brandt ME, Reingold AL. The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco Bay area, 1992–1993: results of population-based laboratory active surveillance. *Clinical Infectious Diseases*. 1998;27(5):1138-47.
4. Rivera LEC, Ramos AP, Desgarenes CP. Factores de virulencia en *Candida* sp. *Dermatología Revista Mexicana*. 2005;49(1):12-27.
5. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia*. 2007;164:265-9.
6. Atalay M, Koc A, Demir G, Sav H. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated from blood cultures. *Nigerian journal of clinical practice*. 2015;18(1):52-5.
7. Turan D. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida Albicans* Türlerinde Virulans Faktörlerinin Fenotipik Ve Genotipik Olarak Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. İstanbul Üniversitesi, 2014.
8. Sriphanam C, Nuanmuang N, Saengsawang K, Amornthipayawong D, Kummasook A. Anti-fungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. isolated from blood cultures. *Journal De Mycologie Medicale*. 2019;29(4):325-30.
9. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and infection*. 2016;18(5):310-21.
10. Seneviratne C, Jin L, Samaranayake L. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. *Oral diseases*. 2008;14(7):582-90.
11. Tüzüner U, İnci R. *Candida* Türlerinde Biyofilm Oluşumunun Modifiye Mikroplak Ve Modifiye Xtt Redüksiyon Yöntemleri İle Saptanması. 2017.
12. Alpay Y, Ağalar C, Karabıçak N, ve ark. Klinik örneklerden elde edilen *albicans* ve non-*albicans candida* türlerinde biyofilm oluşumunun araştırılması ve türlere göre dağılımı. *Kocaeli Tıp Dergisi*. 2017;6(1):23-7.
13. Lassak T, Schneider E, Bussmann M, ve ark. Target specificity of the *Candida albicans* Efg1 regulator. *Molecular microbiology*. 2011;82(3):602-18.
14. Nobile CJ, Andes DR, Nett JE, ve ark. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS pathogens*. 2006;2(7):e63.

15. Çerikcioğlu N, Sancak B. Mantar enfeksiyonları. In: Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Ed. Topçu A, Söyletir G, Doğanay M.Çeviri. 4.baskı. 2.cilt. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2017; 2391-478.
16. Tamo S. Candida Infections: Clinical Features, Diagnosis and Treatment. *Infect Dis Clin Microbiol.* 2020;2:91-103.
17. Bilgehan H. Mantar yapıları. In: Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi.Çeviri. 11.baskı. İzmir, Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, 2006; 55-60.
18. Gow NA, Latge J-P, Munro CA. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology spectrum.* 2017;5(3):10.1128/microbiolspec. funk-0035-2016.
19. Yeğenoğlu Y. Mantarların fizyolojisi. In: Tıbbi Mikoloji. Ed. Tümbay E.Çeviri. 1.baskı. İzmir, Tıbbi Mikoloji Derneği Yayını No.2, 2021; 31-9.
20. Gupta AK, Drummond-Main C, Cooper EA, ve ark. Systematic review of nondermatophyte mold onychomycosis: diagnosis, clinical types, epidemiology, and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2012;66(3):494-502.
21. Fındık D. Konidiyum Kümeleri Oluşturan Hyalen Küfler ve İnfeksiyonları: (Fusarium, Acremonium, Gliocladium Ve Trichoderma Türleri).
22. Magalhães J, Correia MJ, Silva RM, ve ark. Molecular Techniques and Target Selection for the Identification of Candida spp. in Oral Samples. *Applied Sciences.* 2022;12(18):9204.
23. Procop GW, Church DL, Hall GS, ve ark. Koneman Renkli Atlas ve Tanısal Mikrobiyoloji Çeviri Ed. Us D, Başustaoğlu A. Ankara, Hipokrat Kitabevi, 2017; 1322-416.
24. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. *Clinical microbiology reviews.* 2000;13(2):236-301.
25. Kiwan EN, Anaissie EJ. Hyalohyphomycosis (Acremonium, Fusarium, Paecilomyces, Scedosporium and Others).
26. Bennett SEBJW. An overview of the genus Aspergillus. *The Aspergilli.* 2007:23-34.
27. Kaufman G, Horwitz BA, Duek L, Ullman Y, Berdicevsky I. Infection stages of the dermatophyte pathogen Trichophyton: microscopic characterization and proteolytic enzymes. *Medical Mycology.* 2007;45(2):149-55.
28. Mahajan M. Conventional Methods for Direct Examination of Fungi. *Systemic Fungal Infections: Principles, Pathogenesis & Practice.* 2019:19.
29. Casadevall A. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infection and immunity.* 1995;63(11):4211-8.
30. Yeğenoğlu Y. İnvaziv Mantar Hastalıklarının Mikolojik Tanisi. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine.* 2011;70(1):23-8.


31. Şahiner F, Ergünay K, Özyurt M, ve ark. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Candida* suşlarının genotipik ve fenotipik olarak tanımlanması. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45(3):478-88.
32. Seyedmousavi S, İlkit M, Durdu M, ve ark. *Candida* ve kandidoz: epidemiyoloji, tanı, tedavi, antifungal ilaç direnci ve konağın genetik yatkınlığında güncel durum. 2015.
33. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiological reviews.* 1991;55(1):1-20.
34. Liu J-F, Xia J-J, Nie K-L, Wang F, Deng L. Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2019;35:1-8.
35. Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.* Ankara, Güneş Kitabevi, 1999; 1015-169.
36. Çerikçioğlu N. Mantarlarda virulans faktörleri. *Ankem Dergisi.* 2012;26(2):261-9.
37. Jacobsen ID, Wilson D, Wächtler B, ve ark. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. *Expert review of anti-infective therapy.* 2012;10(1):85-93.
38. Alem MA, Oteef MD, Flowers TH, Douglas LJ. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic cell.* 2006;5(10):1770-9.
39. Abacı Ö, Haliki A. *Candida albicans*' in virulans faktörleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi.* 2004;2(9):1-8.
40. Kuştimur S. *Kandida* Patogenezinde Rol Oynayan Faktörler. *Mikrobiyoloji Bülteni.* 1994(28):175-81.
41. Yang Y-L. Virulence factors of *Candida* species. *Journal of Microbiology Immunology and Infection.* 2003;36(4):223-8.
42. Glazier VE. EFG1, everyone's favorite gene in *Candida albicans*: A comprehensive literature review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2022;12:302.
43. Toyoda M, Cho T, Kaminishi H, Sudoh M, Chibana H. Transcriptional profiling of the early stages of germination in *Candida albicans* by real-time RT-PCR. *FEMS yeast research.* 2004;5(3):287-96.
44. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, ve ark. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell.* 2012;148(1):126-38.
45. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic cell.* 2005;4(4):633-8.
46. Erbakan N. *Derinin Mantar Hastalıkları.* 1.baskı. Ankara, Türkiye klinikleri yayınevi, 1989.
47. Pryce TM, Palladino S, Price DM, ve ark. Rapid identification of fungal pathogens in BacT/ALERT, BACTEC, and BBL MGIT media using polymerase chain

- reaction and DNA sequencing of the internal transcribed spacer regions. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2006;54(4):289-97.
48. Arıkan S. Mantar enfeksiyonlarında tanı yöntemleri. In: *Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar Eğitim Kitabı* Ed. Günelp A, Yılmaz YA, Pınar A. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 2003; 140-64.
 49. Kinikli S, Kiliç EK, Arslan K, ve ark. Candida Suşlarının Tanımlanmasında Chromagar Candida Besiyerinin Performansının Değerlendirilmesi. *Journal Of Health Sciences And Medicine*. 2018;1(3):50-3.
 50. Birinci A, Çaycı YT. Mantar Enfeksiyonlarının Serolojik Tanısı. *Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2016;73(2):175-82.
 51. Arı Ş. DNA'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Çoğaltılması. In: *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler* Ed. Temizkan G, Arda N. 2.baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004.
 52. Joshi M, Deshpande J. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International journal of biomedical research*. 2011;2(1):81-97.
 53. Chusri S, Phatthalung PN, Voravuthikunchai S. Anti-biofilm activity of *Quercus infectoria* G. Olivier against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in applied Microbiology*. 2012;54(6):511-7.
 54. Enoch D, Ludlam H, Brown N. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *Journal of medical microbiology*. 2006;55(7):809-18.
 55. Alp S, Arıkan-Akdaglı S, Gulmez D, ve ark. Epidemiology of candidaemia in a tertiary care university hospital: 10-year experience with 381 candidaemia episodes between 2001 and 2010. *Mycoses*. 2015;58(8):498-505.
 56. Kumamoto CA. Candida biofilms. *Current opinion in microbiology*. 2002;5(6):608-11.
 57. Beğendik F. İnfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyolojide biyofilm. *Flora Dergisi*. 2003;8(4):271-7.
 58. Karadağ SS. Santral venöz kateterlerde kullanılan materyaller ile kandidaların biyofilm üretimi arasındaki ilişki. *Uzmanlık Tezi*. Dokuz Eylül Üniversitesi, 2010.
 59. Kuzucu Ç, Çizmeci Z, Durmaz B. Candida türlerinde biyofilm ve fosfolipaz aktivitesinin saptanması. 2003.
 60. Demirbilek M, Timurkaynak F, Azap Fcö, Arslan H. Hastane Kaynaklı Candida Türlerinde Biyofilm Oluşumu Ve Antifungal Duyarlılık Paternleri.
 61. Çalı A, Çelik C, Tutar U, Bakıcı MZ. Hastanede yatan hastalardan izole edilen mikroorganizmaların biyofilm formasyon aktiviteleri. *Kocaeli Tıp Dergisi*. 2018;7(3):82-8.
 62. Agwan V, Butola R, Madan M. Comparison of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species in a tertiary care center, North India. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 2015 Oct 1;58(4):475.

63. Nouraei H, Pakshir K, ZareShahrabadi Z, Zomorodian K. High detection of virulence factors by *Candida* species isolated from bloodstream of patients with candidemia. *Microbial Pathogenesis*. 2020;149:104574.
64. Çetin G. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin virülans faktörlerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 2023.
65. Bachtiar EW, Dewiyani S, Akbar SMS, Bachtiar BM. Inhibition of *Candida albicans* biofilm development by unencapsulated *Enterococcus faecalis* cps2. *Journal of dental sciences*. 2016;11(3):323-30.
66. Deng K, Jiang W, Jiang Y, ve ark. ALS3 expression as an indicator for *Candida albicans* biofilm formation and drug resistance. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:655242.
67. Ramage G, VandeWalle K, López-Ribot JL, Wickes BL. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS microbiology letters*. 2002;214(1):95-100.
68. Harriott MM, Lilly EA, Rodriguez TE, Fidel Jr P, Noverr MC. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology*. 2010;156(Pt 12):3635.
69. Connolly LA, Riccombeni A, Grózer Z, ve ark. The APSES transcription factor Efg 1 is a global regulator that controls morphogenesis and biofilm formation in *Candida parapsilosis*. *Molecular Microbiology*. 2013;90(1):36-53.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/700-252 17.05.2023

Sayın Prof.Dr.Asuman BİRİNCİ

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Kan kültürü ve kateter kan kültürlerinden izole edilen Candida albicans izolatlarında EFG-1 geni varlığının biyofilm üretimi üzerine etkisi ve ekspresyon düzeylerinin Real-Time PCR ile araştırılması** başlıklı OMÜ KAEEK 2022/473 Mikrobiyoloji çalışması Karar nolu nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekeç, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 26.10.2022 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanmadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu [16.03822]1415192782_477957 Onmuh@2023@gmail.com
Etiler Dağ 58430000000 Fakültesi 2.E Kat Samsun/58100

8.2. Turnitin Orjinallik Raporu

