



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

**YOĞUN BAKIM HASTALARININ İDRAR ÖRNEKLERİNDEN
İZOLE EDİLEN *CANDIDA* TÜRLERİNDE BİYOFİLM
OLUŞUMUNUN VE HWP1, ALS1, SAP1 GENLERİNİN
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ
Dr. ELİF ATEŞ

SAMSUN-2025



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

**YOĞUN BAKIM HASTALARININ İDRAR ÖRNEKLERİNDEN
İZOLE EDİLEN *CANDIDA* TÜRLERİNDE BİYOFİLM
OLUŞUMUNUN VE HWP1, ALS1, SAP1 GENLERİNİN
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Elif ATEŞ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ

Bu tez, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi tarafından
BAP04-B-2024-5528 proje numarası ile desteklenmiştir

SAMSUN-2025

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, tecrübe, desteğini esirgemeyen, hoşgörüsü ile yanında çalışmaktan mutluluk duyduğum Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım saygıdeğer hocam Sn. Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ' ye en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Tez çalışmamı yaparken ve yazarken her aşamada benden bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen, benimle araştıran saygıdeğer hocam Doç. Dr. Kemal BİLGİN' e ayrıca çok teşekkür ederim.

Araştırmalarım boyunca her zaman bilgi, ilgi ve yardımseverliğiyle desteklerini gördüğüm ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım, Prof. Dr. Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI, Doç. Dr. Kemal BİLGİN, Doç. Dr. Demet GÜR VURAL ve Dr. Öğr. Üyesi Canberk ÇINAR' a çok teşekkür ederim.

Tez çalışma sürecinde her zaman yanımda olan, bana destek veren ve beni motive eden çok değerli arkadaşlarım olan Arş. Gör. Kübra HACİEMİNOĞLU ÜLKER, Bio. Gülşen ÇETİN ve Arş. Gör. İlknur BIYIK' a çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından BAP04-B-2024-5528 proje numarası ile desteklenmiştir.

Dr. Elif ATEŞ

BEYAN

“Yoğun Bakım Hastalarının İdrar Örneklerinden İzole Edilen *Candida* Türlerinde Biyofilm Oluşumunun ve Hwp1, Als1, Sap1 Genlerinin Varlığının 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.

Elif ATEŞ

ÖZET

Amaç: *Candida* türleri belirli şartlarda fırsatçı patojen olarak çoğalıp hastalığa neden olan mantarlardır. Belirli yüzeye tutunarak oluşturdukları biyofilm patojenite faktörlerinden biridir. Çalışmamızda pediatrik ve erişkin yaş grubu yoğun bakım hastalarının idrar kültürlerinden elde edilen *Candida* izolatlarında biyofilm oluşumunun gösterilmesi, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile HWP1, ALS1, SAP1 genlerinin varlığının tespiti ve biyofilm ile aralarındaki ilişkinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 2019-2024 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na erişkin ve pediatrik yoğun bakım ünitelerinden gönderilen idrar örneklerden izole edilen *Candida* izolatları (n=70) kullanıldı. *Candida* izolatlarında biyofilm oluşumu modifiye XTT redüksiyon yöntemi ile araştırıldı. HWP1, ALS1, SAP1 genlerinin varlığının tespiti için PZR yapıldı.

Bulgular: Üriner örneklerden elde edilen *Candida* izolatlarında (n=70) biyofilm oluşturma oranları %90 (n=63) bulundu. Erişkin ve pediatrik gruptan elde edilen izolatların biyofilm oluşturma oranları sırasıyla %97,1 ve %82,8 bulundu. ALS1, HWP1, SAP1 pozitifliği *C. albicans*' ta sırasıyla %69,6; %52,2; %69,6 bulunurken non-*albicans Candida*' da sırasıyla %8,5; %6,4; %6,4 bulundu. Bu üç genin varlığı *C. albicans*' ta non-*albicans Candida*' ya oranla daha yüksek tespit edilmiş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$).

Tartışma ve Sonuç: ALS1, HWP1, SAP1 genlerinden en az birine sahip olan toplam 27 *Candida* izolatının 26' sında (%96,3) biyofilm üretimi mevcut olup bu üç genden bir veya birden fazlasının varlığında biyofilm oluşturan ve oluşturmayanlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu ($p<0,001$). Bu ilişkiyi değerlendirmek için daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Biyofilm oluşturan suşların tespiti ve biyofilm oluşumunu indükleyen genlerle ilişkisini anlamak uygun antifungal tedavide stratejik noktalardan biri olacaktır.

Anahtar Sözcükler: *Candida*, biyofilm, PZR

ABSTRACT

Objective: *Candida* species are fungi that multiply as opportunistic pathogens under certain conditions and cause disease. The biofilm they form by adhering to certain surfaces is one of the pathogenicity factors. Our study aimed to demonstrate biofilm formation in *Candida* strains isolated from urine cultures of pediatric and adult intensive care patients, to detect the presence of HWP1, ALS1, SAP1 genes by polymerase chain reaction (PCR), and to reveal the relationship between them and biofilm.

Materials and Methods: In our study, *Candida* isolates (n=70) isolated from urine samples sent from adult and pediatric intensive care units to the Medical Microbiology Laboratory of Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine Hospital between 2019-2024 were used. Biofilm formation in *Candida* isolates was investigated by modified XTT reduction method. PCR was performed to detect the presence of HWP1, ALS1, SAP1 genes.

Results: Biofilm formation rates in *Candida* isolates obtained from urinary samples (n=70) were found to be 90% (n=63). Biofilm formation rates of isolates obtained from adult and pediatric groups were found to be 97.1% and 82.8%, respectively. ALS1, HWP1, SAP1 positivity were found to be 69.6%, 52.2%, 69.6% in *C. albicans*, while they were found to be 8.5%, 6.4%, 6.4% in non-*albicans Candida*, respectively. The presence of three genes was found to be higher in *C. albicans* than in non-*albicans Candida*, and the difference was found to be statistically significant ($p<0.001$).

Conclusion: Biofilm production was present in 26 (96.3%) of the 27 *Candida* isolates that had at least one of the ALS1, HWP1, SAP1 genes, and a statistically significant difference was found between those that formed biofilm and those that did not in the presence of one or more of these three genes ($p<0.001$). More comprehensive studies are needed to evaluate this relationship. Detection of biofilm-forming strains and understanding their relationship with genes that induce biofilm formation will be one of the strategic points in appropriate antifungal therapy.

Keywords: *Candida*, Biofilm, PCR

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
BEYAN.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Mantarların Genel Özellikleri	4
2.2.1. Mayalar	4
2.2.2. Küfler	5
2.2.3. Dimorfik mantarlar	6
2.3. <i>Candida</i> Türlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri	6
2.4. Mantar İnfeksiyonlarının Tanısı.....	7
2.4.1. Direkt mikroskopik inceleme	8
2.4.2. Kültür	9
2.4.3. Diğer yöntemler	9
2.5. Klinik Önemi.....	10
2.6. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarında İmmünoloji.....	11
2.7. Patogenez ve Virülans Faktörleri	12
2.7.1. Adezyon ve adezinler.....	13
2.7.2. Hidrolazlar	14
2.7.3. Morfogenez	15
2.7.4. Fenotipik değişim	16
2.7.5. Biyofilmler	16
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	26
3.1. Çalışmaya Dâhil Edilen Ticari Hazır Besiyerleri.....	26
3.2. Çalışmaya Dâhil Edilen Kimyasal Maddeler	26
3.3. Çalışmaya Dâhil Edilen Gereçler	27

3.4. Çalışmaya Dahil Edilen PZR Malzemeleri ve Primerler	28
3.5. İzolasyon ve İdentifikasyon	29
3.6. Biyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi	29
3.6.1. YPD besiyeri hazırlama	29
3.6.2. RPMI 1640 sıvı besiyeri.....	30
3.6.3. XTT / Menadion çözeltisi	30
3.6.4. XTT redüksiyon yöntemi (66).....	30
3.6.5. Test sonuçlarının değerlendirilmesi.....	31
3.7. <i>Candida</i> İzolatlarında Virülans Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Tespit Edilmesi	32
3.7.1. Kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar.....	32
3.7.2 Genomik DNA ekstraksiyonu (18).....	32
3.7.3. PZR amplifikasyonu	33
3.7.4. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi	34
3.8. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntüleme.....	34
3.9. İstatistiksel Analiz	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. <i>Candida</i> İzolatları ve Tür Dağılımı	36
4.2. Mikroplakta XTT İndirgenmesi ile Biyofilm Oluşumunun Test Edilmesi - Sonuçlar	36
4.3. Virulans Genlerinin Tespiti İçin Yapılan PZR Sonuçları	40
4.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntüleme.....	45
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇLAR.....	55
7. KAYNAKLAR	57
8. EKLER.....	64
Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi	64
Ek 2. Turnitin Orjinallik Raporu.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat derece
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
ALS	: Agglutinin-Like Sequence
ATCC	: American Type Culture Collection
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CO ₂	: Karbondioksit
CLR	: C-Type Lectin Receptor
CLSM	: Confocal Laser Scanning Microscopy
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotit trifosfat
EPS	: Extracellular polymeric substances
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GMS	: Gomori metenamin gümüş
GPI	: Glikozilfosfatidilinositol
HWP	: Hyphal Wall Protein
ITS	: Internal Transcribed Spacer
İYE	: İdrar yolu enfeksiyonu
KOH	: Potasyum hidroksit
KAÜSİ	: Kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonu
MALDI-TOF MS	: Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi)
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür
MOPS	: Morpholinepropanesulfonic acid
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	: Potato Dextrose Agar
PMNL	: Polimorfonükleer lökos

RNA	: Ribonükleik Asit
SAP	: Secreted aspartyl proteases
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
SDB	: Sabouraud Dextrose Broth
SEM	: Scanning Electron Microscope
TEM	: Transmission Electron Microscope
TLR	: Toll-like receptor
TBE	: Trisma-Borik Asit-EDTA
OD	: Optik dansitometre
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi
YPD	: Yeast Pepton Dekstroz
XTT	: 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide
QS	: Quorum sensing

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Primer dizileri ve amplikon uzunlukları ve PZR koşulları	34
Tablo 2. <i>Candida</i> tür dağılımı	36
Tablo 3: Pediatrik yoğun bakım <i>Candida</i> izolatları biyofilm yapma özelliği	37
Tablo 4: Erişkin yoğun bakım <i>Candida</i> izolatları biyofilm yapma özelliği	38
Tablo 5: Mikroplakta XTT indirgenmesi yöntemine pediatrik ve erişkin yoğun bakım hastalarından elde edilen suşların biyofilm yapma özelliği	39
Tablo 6: <i>Candida</i> türlerinde mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi ile saptanan biyofilm sonuçları	39
Tablo 7. İdrar örneklerinden izole edilen <i>Candida</i> türlerinde virülans faktörlerin dağılımı ..	43
Tablo 8. <i>Candida</i> türlerinde virülans genlerinin dağılımı ve biyofilm oluşumu	44
Tablo 9. ALS1, HWP1, SAP1 genlerinin fenotipik testle karşılaştırılması	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Maya mantarı	5
Şekil 2. Küf mantarı	5
Şekil 3. <i>C. albicans</i> için karakteristik olan germ tüp	7
Şekil 4. <i>Candida spp.</i> 'de biyofilm gelişiminin aşamaları	19
Şekil 5. <i>Candida</i> türlerinde biyofilm oluşumunun farklı aşamalarındaki düzenleyici genleri gösteren şema	22
Şekil 6. Yıkama işleminden sonra plak görüntüsü	31
Şekil 7. Biyofilm oluşumunun modifiye XTT yöntemiyle değerlendirilmesi	36
Şekil 8. ALS1 geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü	40
Şekil 9. ALS1 geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü	40
Şekil 10. HWP1 geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü	41
Şekil 11. HWP1 geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü	41
Şekil 12. HWP1 geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü	42
Şekil 13. SAP1 geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü	42
Şekil 14. SAP1 geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü	43
Şekil 15. Biyofilm üreten 2 numaralı izolat ve biyofilm üretmeyen 32 numaralı <i>Candida</i> izolatının SEM görüntüsü	46

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Candida türleri tomurcuklar veya blastokonidyumlar oluşturan oval maya hücreleridir (1). Dünya genelinde hastane kaynaklı fungal enfeksiyonların büyük bir kısmında etken *Candida* türleridir. En sık görülen kandidoz etkeni tür *Candida albicans*' tır (2). Başlıca virülans faktörleri arasında biyofilm oluşturmaları, dimorfizm göstermeleri, adezinler ve fosfolipaz, proteinaz gibi bazı hidrolitik enzimlerin üretimi sayılabilir (3). *Candida* türleri için biyofilm oluşumu antifungallere direnç gelişimi ile ilgili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir.

Candida türleri doğada yaygın olarak bulunan memeli mikrobiyotasının da bir parçası olan mantarlardır ve belirli koşullarda (mikrobiyotada dengesizlikler veya konağın immün sisteminin baskılanması gibi) fırsatçı patojen olarak çoğalabilir ve hastalığa neden olabilirler (4). Biyofilm oluşturan *Candida* türleri ise klinikte; antifungal direnç, kronik enfeksiyon, yabancı cisim enfeksiyonları gibi tablolara neden olabilir (5, 6). Biyofilm, geri dönüşümü olmayan bir şekilde belirli bir yüzeye veya canlı dokuya tutunan ve yapısal bir matriks sağlayan hücre dışı polimerler üreten mikroorganizma topluluğundan oluşur (7). Biyofilm süreci maya hücrelerinin yüzeye adezyonu ile başlar ardından bu hücreler çoğalarak psöдохif-hif oluşur ve biyofilm oluşumunun tamamlanması boyunca uzamaya ve çoğalmaya devam ederler. Olgunlaşma aşamasını tamamlamış biyofilmde hücre dışı matrisle çevrili, maya formunda hücreler, psöдохif ve hifleri kapsayan belirgin katmanlara sahip yapılandırılmış bir görünüm vardır. Olgunlaşma aşamasından sonra biyofilmin çevreye yayıldığı ve diğer yüzeylere yerleştiği dağılma aşaması gelir (8, 9). Adezyon, matriks üretimi, çoğalma, olgunlaşma ve dağılmayı sağlayan çok sayıda gen biyofilm oluşumunu düzenler. Ayrıca belirli genlerin varlığı *Candida* türüne ve belirli suşa, biyofilm oluşumunun mevcut aşaması için gerekli olan belirli genlerin ifadesi de büyük ölçüde etkileşimde bulunduğu çevreye bağlıdır (9).

Özellikle insan kandidozunun tüm formlarından en çok izole edilen *C. albicans*' ta başta olmak üzere diğer *Candida* türlerinde de bulunan ALS1, Aglütinin benzeri sekans (ALS) ailesinden olup adezyon ve hif oluşumu için önemli olan hücre yüzeyi glikoproteinlerini kodlar. Hücre duvarı proteini 1 (HWP1) ise *Candida* türlerinde germ tüplerin ve hifal hücrelerin hücre duvarının bulunan ve konak epitel hücre yüzeylerine

bağlanma, hifal gelişim gibi biyofilm oluşumunun birden fazla aşamasında rol oynayan bir mannoproteinidir. Başta *C. albicans* olmak üzere diğer *Candida* türlerinde de bulunabilen Sekretuvar aspartil proteazlar (SAP), SAP gen ailesi tarafından kodlanan hif oluşumu, artan adezyon ve fenotipik değişkenlik ile ilişkili hidrolitik enzim grubudur (9-13).

Birçok çalışma, hastane kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarının en az %10-15' inin çoğunluğu *C. albicans* olmak üzere çeşitli *Candida* türleri tarafından oluşturulduğunu ve kandidürinin özellikle yoğun bakım ünitelerinde yaygın olduğunu göstermiştir. Kandidüri vakalarının çoğunda hastanın idrar kateteri olduğunu belirtmişlerdir (14, 15).

Biyofilm oluşum mekanizmalarını iyi anlamak, genlerle olan ilişkisini tespit etmek tanı ve antimikrobiyal tedavide yeni stratejiler geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Biyofilm gibi virülans faktörlerini hedef almak yeni antifungalleri geliştirmek için önemli stratejik noktalardan olabilir.

Bu çalışmada üriner *Candida* izolatlarında biyofilm oluşumu, biyofilm oluşumunda etkili olan genlerin varlığının araştırılması ve bu genlerle biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Candida'nın keşfi ve isimlendirilmesinin tarihi antik Yunanlılardan modern araştırmacılara kadar uzanır. *Candida* enfeksiyonlarıyla ilgili bilinen ilk tanımlama 'Pamukçuk' olup Hipokrat, "Epidemics" adlı eserinde oral kandidiazisi (M.Ö. IV.) "aftöz ülserasyonlardan etkilenen ağız" olarak tanımlamıştır. 1771'de Rosen von Rosenstein, pamukçuk hastalığının invaziv bir formunu tanımlamıştır. Almanya'da 1839'da Bernhard (von) Langenbeck, tifo nedeniyle ölen bir hastanın otopsisinde, psödomembranlı orofaringeal ve özofageal pamukçuğu görüp ilk kez bir mantarı etiyolojik ajan olarak tanımlamıştır. Emil Berg 1841'de, pamukçuk hastalığının bir mantardan kaynaklandığı sonucuna açıkça varmıştır. 1847'de, Fransız mikolog Charles Philippe Robin, mantarı *Oidium albicans* olarak sınıflandırmış ve pamukçuk yapan mantarı adlandırmak için albicans ("beyazlatmak") kelimesini kullanmıştır. Martin ve Jones, *Candida*'yı bitkilerde yaygın olarak yetişen mantarları içeren bir cins olan *Monilia* cinsinde yanlış sınıflandırmıştır. Berkhout, mantarı mevcut cins *Candida* (1923) altında yeniden sınıflandırmıştır (16-18).

Şu anda, *Candida* cinsinde yaklaşık 200 organizma türü bulunmaktadır. Bu maya benzeri hücreler, *Blastomyces* form sınıfına ait anamorfik mantarlardır. Polimorfik yapıları ve tomurcuklanan maya hücreleri (blastokonodia), hif, pseudohif ve blastospor üretme yetenekleri ile karakterize edilirler. Yaklaşık 200 türden altı tür, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. lusitaniae*, insan enfeksiyonu ile en sık ilişkilendirilen türlerdir (19).

İnsan enfeksiyonlarında bildirilen yeni mantar sayısı hızla artarken tıbbi öneme sahip çok sayıda mantar türü yakın zamanda yeniden tanımlama sınıflandırma amacıyla moleküler yaklaşımların uygulanması sonucunda isimlendirme değişikliğine maruz kalmıştır. En sık karşımıza çıkan mantarlardan olan *C. krusei*, *Pichia kudriavzevii*; *C. kefyr*, *Kluyveromyces marxianus*; *C. glabrata*, *Nakaseomyces kefir*; *C. lusitaniae*, *Clavispora lusitaniae* olarak yeniden isimlendirilmiştir (20).

2.2. Mantarların Genel Özellikleri

Mantarlar ökaryot yapıda canlılardır. Bitkilerden farkı klorofil içermedikleri için fotosentez yapmamalarıdır. Fakültatif anaerop ya da zorunlu aereoplardır. Enerji kaynağı olarak organik bileşikleri kullanırlar (21).

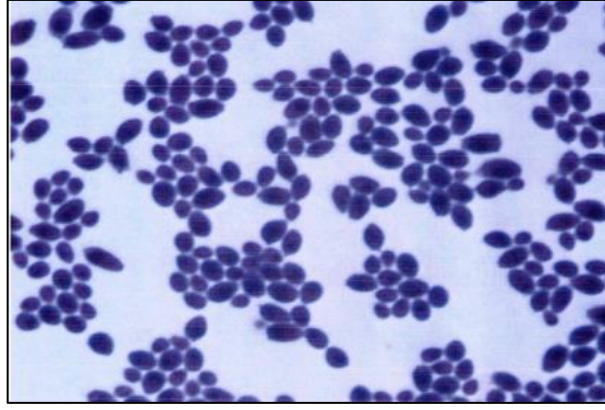
Mantar hücre duvarının %80-%90 ı kitin, glukon, mannan gibi polisakkaritten, yaklaşık %10 u protein, glikoprotein ve lipitten oluşur. Mannan ve galaktomannan mantarlara karşı oluşan bağışıklık yanıtından sorumludur. Bazı mantarların hücre duvarında melanin pigmenti bulunur. Hücre zarı ise 2 tabakalı bir yapı olup protein, fosfolipit ve sterolden oluşur. Memeli hücre zarında bulunan kolesterol yerine ergosterol ve zimosterol bulunur. Günümüzde kullanılan antifungal ilaçların büyük kısmında hedef memranda bulunan ergosteroldür (19, 21).

Mantarda üremeden sorumlu spor eşeyli ve eşeysiz sporlar vardır. Blastospor, artrospor, klamidospore, sporangiospor, makrokonidyum, mikrokonidyum eşeysiz sporlardır. Zigospor, askospor, bazidyospor ve oospor eşeyli sporlardır. Eşeysiz yapılara anamorf, eşeyli yapılar teleomorf, ikisi birden holomorf olarak isimlendirilir (19, 21).

Mantarlar morfolojik görünümlerine göre maya, küf ve ortam koşullarına göre maya ya da küf olabilen dimorfik mantarlar olmak üzere üçe ayrılır.

2.2.1. Mayalar

Mayalar tek hücreli 1-5 µm eninde, 5-30 µm boyunda sferik ya da oval hücrelerdir (Şekil 1). Tomurcuklanarak veya enine bölünme ile çoğalırlar. Bazen tomurcuklanan maya hücresi ana hücreden ayrılmadan uzamaya devam eder ve küflerin hif yapısına benzediği için yalancı hif (psödohif) olarak adlandırılan yapılar oluştururlar. Psödohifin hiften farkı boğumlarının olmasıdır. *C. glabrata*, *C. neoformans* ve *Rhodotorula* da psödo hif bulunmaz. Psödohif mayanın derin dokulara invazyonunda rol oynayarak virülansa katkıda bulunur. *C. albicans* hem gerçek hif hem de psödohif yapan bir mantardır. Mayalardaki gerçek hif oluşumunda hücrenin boğum oluşturmada n uçtan uzamasına germ tüp denir (1, 19, 21).



Şekil 1. Maya mantarı (1)

2.2.2. Küfler

Küfler hif olarak isimlendirilen 2-10 μm çapında tüp şeklinde uzun, ipliksi yapılardan ve sporlardan oluşan çok hücreli mantarlardır (Şekil 2). Hiflerin uzaması ve dallanması ile meydana gelen ipliksi yapıya miçelyum denir. Besiyerinin içine doğru uzanan ve beslenmede görevli olan hifler vejetatif hif, besiyerinden dışarı uzayan spor yapılarını taşıyan ve üremede görevli hifler aerial hif olarak isimlendirilir (22).

Küflerin optimal üreme ısısı genellikle 20-26°C'dir. Makroskobik olarak küf kolonileri pamuksu, kadifemsi, tozlu ve pigmentli görünümde olabilir. Küfler laktofenol pamuk mavisi ya da %10-20 potasyum hidroksit (KOH) ile mikroskobik olarak incelendiğinde hif ve sporlar görülür (22).

Hifler, hif duvarını bölen dikey yapı olan septum taşıyıp taşıyamalarına göre septalı ve septasız hifler olmak üzere ikiye ayrılır. Küflerin tanımlanmasında septum varlığı önemli bir kriterdir (23).



Şekil 2. Küf mantarı (23)

2.2.3. Dimorfik mantarlar

Bazı mantarlar ısı, CO₂ basıncı, besin varlığı gibi farklı çevresel koşullarda farklı morfolojide bulunabilirler. Bunlara dimorfik mantarlar adı verilir. Bu mantarlar belli coğrafi bölgelerde bulunurlar. Termal dimorfik olan mantarlar doğada ve 25°C’de küf, insan vücudunda ve 37°C’de maya formunda ürerler. *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium marneffe*, *Sporothrix schenckii* dimorfik mantarlardandır (22, 23).

2.3. *Candida* Türlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri

Candida türleri, *Ascomycota* şubesinde *Saccharomycotina* alt şubesi *Saccharomycetes* sınıfı içerisinde yer alırlar. Tüm *Candida* türleri yaklaşık 3-5 µm boyutunda tomurcuklanarak (blastosporlar) çoğalan, oval, maya şeklinde bulunan hücrelerdir (1, 21).

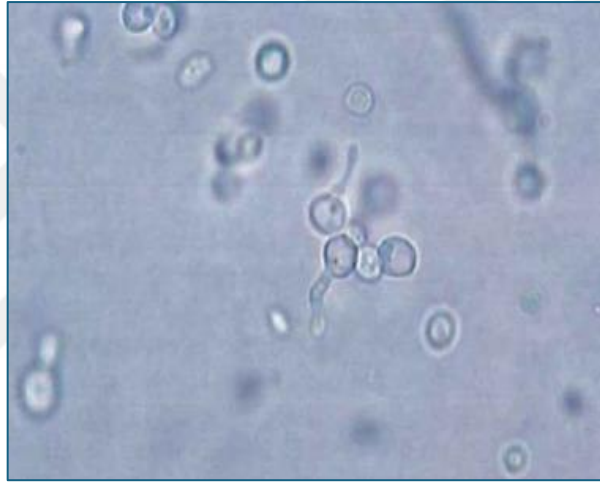
Günümüzde en az 17 *Candida* türü insanlarda enfeksiyon oluşturabilmektedir. *Candida* türleri fırsatçı mantar patojenlerinin en yaygın olanıdır. *C. albicans* kandidoz formlarından en sık izole edilen türdür. Diğer *Candida* türleri non-*albicans Candida* olarak isimlendirilir. En sık karşılaşılan non-*albicans Candida* türleri *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* ve *C. kefyr*’ dir (19).

Birçok maya koyun kanlı agar, Sabouraud Dekstroz Agar (SDA), Patetes Dekstroz Agar (PDA) gibi seçici olmayan besiyerlerinde 36-72 saatte beyaz, sarı-beyaz görünümünde macun kıvamında koloniler yapar. Türler arası morfolojik farklılıklar mısır unlu agar gibi özel besiyerinde saptanır (23).

C. glabrata dışındaki *Candida* türleri yalancı ve gerçek hif oluştururlar. *C. albicans* terminal yerleşimli, kalın duvarlı klamidokonidyumlar ve germ tüp oluşturur (Şekil 3). *C. albicans* dimorfizm göstermesi ve bazı hidrolitik enzimlere sahip olması nedeniyle virülansı en fazla olan türdür. *C. albicans* mısır unlu agarda 2-3 günlük inkübasyon sonucu blastospor, psödo hif ve klamidospor oluşturur. Serumda 37 °C de 2 -3 saat inkübasyon sonucu germ tüp oluşturur. *Candida* türleri Gram boyama ile gram pozitif boyanırlar; hematoxilen ve eozin ile zayıf boyanırken periyodik asit- Schiff (PAS), Gomori metenamin gümüş (GMS) ve Gridley gibi mantar boyaları ile iyi boyanır (22, 23).

Candida türleri aerop koşulda, pH 2-8 de ve 20-40°C sıcaklık aralığında ürerler. Bütün türler glikozu fermente eder, hiçbirini nitrati asimile etmez. Kültürlerinde etanol, asetik asit, formik asit, laktik asit, pirüvik asit gibi organik asitlerden oluşan metabolitler yaparlar (22).

Candida'nın hücre duvarı sert bir yapıdır ve hücreye şekil verir. Hücre duvarı hem farklı yüzeylere adezyonda görevlidir hem de immünolojik determinatlar taşır. Kitinden (β 1-4 glikozid bağları ile bağlanmış N-asetil-D-glukozamin) ve mannandan (α veya β glikozid bağları içindeki glukoz polimerleri) oluşan sert bir hücre duvarı vardır. *C. albicans*'ta maya hif formunda glukoz ve mannan içeriği benzerdir ancak hifal hücrelerde kitin miktarı maya hücresine göre oldukça fazladır (19).



Şekil 3. *C. albicans* için karakteristik olan germ tüp (23)

2.4. Mantar Enfeksiyonlarının Tanısı

Diğer mikrobiyal enfeksiyonlarda olduğu gibi mantar enfeksiyonlarının tanısı da klinik gözlem ve laboratuvar araştırmasının kombinasyonuna bağlıdır. Laboratuvar testleri mantar enfeksiyonunun tanısını koymada ve doğrulamada, tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde yardımcıdır. Mantar enfeksiyonlarının tanısı; direk mikroskopi, kültür, etken spesifik testler (antijen veya antikor tespiti) ve histolojik inceleme ile konulmaktadır. Bunun dışında antijen veya mantarlara spesifik immunglobulinlerin tespiti ve moleküler yöntemler de kısa sürede doğru tanıyı koymak için kullanılan testlerdendir (24).

2.4.1. Direkt mikroskopik inceleme

Klinik materyalin doğrudan mikroskopik incelemesi mantar enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı için basit ve yararlı yöntemlerden birisidir. *Pneumocystis jiroveci* ve *Rhinosporidium seeberi* gibi kültürde üretilemeyen mantarların tanısı için tek başına direkt mikroskopik inceleme yapılır.

Direk mikroskopik inceleme için, %10-20'lik KOH, kalkoflor beyazı, çini mürekkebi, laktofenol pamuk mavisi, Gram boyama, GMS, periyodik asid-Schiff (PAS), Giemsa gibi boyalar kullanılabilir. Askospor yapılarını görmek için modifiye Kinyoun boyası kullanılabilir (22).

Mikroskopik inceleme ile tomurcuklanan maya hücreleri (blastospor) veya psöдохif gibi yapıların görülmesi *Candida* ve *Trichosporon* türleri için ipucu olabilir. Psöдохif olmadan blastospor yapılarının görülmesi *Cryptococcus* türleri, *C. glabrata*, *H. capsulatum* ve *Rhodotorula* türleri için ipucu olabilmektedir. Birçok tomurcuğun anne hücreden ayrılmadan oluşturduğu gemi dümeni şeklindeki görüntü ise *Paracoccidioides brasiliensis* için karakteristiktir. *Coccidioides immitis* ve *R. sebeeri* gibi mantarlarla meydana gelen enfeksiyonlarda ise dokuda sferüller tespit edilebilir (22, 25).

Küf mantarlarını tanımlamak septa varlığı ve hiflerin dallanma açıları önemlidir. Septalı, dikotom (dallanmanın iki eşit parçaya ayrılması) ve dar açılı (45°) dallanma gösteren hiflerin görülmesi durumunda öncelikle *Aspergillus* türleri düşünülmelidir. *Fusarium*, *Scedosporium*, *Paecilomyces* ve *Penicillium* gibi küf mantarlarında da septalı ve dikotom açılı hifler görülür. Septasız, kurdele benzeri ve dik açılı dallanma gösteren hifler ise *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor* gibi mantarlarda görülür (22, 26).

Saç, tırnak, deri örneklerinin KOH ya da kalkoflor beyazı kullanılarak yapılan mikroskopik incelemelerinde septalı hifler ve artrokonidyumların görülmesi dermatofit enfeksiyonlarını düşündürür (25).

Direkt mikroskopik incelemede herhangi bir mantar yapısının görülmemesi mantar enfeksiyonunu dışlamaz, direk mikroskopik inceleme sonuçları kültür gibi ek bir yöntemle doğrulanmalıdır.

2.4.2. Kültür

Mantar izolasyonunu arttırmak için klinik örneğe göre besiyeri seçimi yapılmalıdır. Steril rnekler için SDA, beyin- kalp infüzyon agar gibi antibiyotiksiz besiyeri, steril olmayan örnekler için antibiyotikli SDA ve beyin- kalp infüzyon agar kullanılabilir. Besiyerlerine saprofit küflerin üremesini baskılamak amacıyla sikloheksimid eklenebilir, ancak *C. neoformans* sikloheksimide duyarlı olması nedeniyle *C. neoformans* remesi beklenen örnekler hem sikloheksimidli ve hem sikloheksimidsiz besiyerine ekim yapılmalıdır. *Malassezia* türleri üremek için genelde yağ asitlerine ihtiyaç duyar, bu yüzden besiyerlerine yağ asidi eklenmelidir. Mayalar için 37°C ve pH: 3.0-7.5, küfler için 20-26°C' ve pH: 2.2-9.0 optimal üreme koşuludur (22, 23).

Mayaların tanımlanmasında üreyen kolonin morfolojisi, mikroskopik olarak çimlenme borusu, gerçek-yalancı hif, klamidospor yapılarının olup olmaması, karbonhidrat asimilasyon testleri, fenol oksidaz (*C. neoformans*), üreaz gibi enzimlerinin varlığı araştıırılarak tanımlama yapılır. Ayrıca mayaların CHROMagar gibi kromojenik bir besiyerinde oluşturduğu renklere göre olası tanımlamaları yapılabilir (1, 23).

Küflerin tanımlamasında üreyen kolonin morfolojisi, pigment oluşumu, üreme süresi değerlendirilir. Örneğin, dermatofitlerden *T. rubrum* 'da ve dimorfik mantarlardan *P. marneffe* 'de kırmızı pigment oluşumu gözlenir. Mikroskopik inceleme için lam-lamel arası ıslak preparat, selofan bant, ya da lam kültürü hazırlanabilir. Küflerin incelenmesinde tercih edilen boya laktofenol pamuk mavisidir (23).

2.4.3. Diğer yöntemler

Özellikle invaziv mikozlarda erken tanı doğru antifungal seçimi için oldukça önemlidir. Bu nedenle antijen ve antikorları, metabolitleri ve mantara özgül nükleik asitleri saptayan testlerin önemi giderek artmaktadır. Kriptokokozda kapsül antijeni, invaziv Aspergillozda galaktomannan antijen tespiti, invaziv kandidozda D-arabinitol, manan antijeni ve anti-mannan antikorı saptanması, invaziv mikoz tansısı için 1,3-β-D-glukan tespiti bunlardan bazılarıdır (22, 27).

Kan, serum, plazma, BOS gibi vücut sıvılarında nükleik asit tespitine yönelik birçok yöntem kullanılmaktadır. En sık kullanılan yöntem PZR dır. Bazı mantarların moleküler tanısında ribozomal hedefler ve 'internal transcribed spacer (ITS)' bölgeleri umut vadetmektedir.

Candida ve diğer birçok mayanın hızlı tanısında kullanılan yöntemlerden biri de MALDI-TOF (matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon -uçuş süresi) MS (kütle spektrometrisi) tir. MALDI-TOF MS türe spesifik peptid ve protein kütle kalıplarını kullanarak çeşitli maya ve maya benzeri mantarları hızlı ve güvenilir tanımlamasını yapmaktadır (22).

2.5. Klinik Önemi

Candida türleri, konakta yüzeysel ve sistemik enfeksiyonlara yol açma yetenekleriyle bilinen mantar patojenleridir. *C. albicans*, *Candida* enfeksiyonlarından sorumlu en sık görülen patojendir, bunu *C. glabrata* takip eder. *C. tropicalis* özellikle idrar yolu enfeksiyonlarında önemlidir. *C. parapsilosis* sıklıkla sağlıklı konakların cildinde bulunur ve kateterle ilişkili enfeksiyonlarda öne çıkar. İnsan nüfusunun büyük bir bölümünde kommensal olarak bulunan *Candida* türleri asemptomatik olarak oral, gastrointestinal ve genital yolları kolonize eder. Bununla birlikte, bariyer bütünlüğünün veya konak bağışıklık sisteminin bozulması üzerine mantar enfeksiyon oluşturmak için epitelden derin dokulara göç edebilir (13, 28).

Sağlıklı bireylerde de *Candida* enfeksiyonu görülse de invaziv *Candida* enfeksiyonları için risk faktörleri çok çeşitli durumlarla (hematolojik ve solid organ maligniteleri, yanıklar, büyük cerrahi) ve tedavi yöntemleriyle (kök hücre ve organ nakli, immünosüpresif ajanların kullanımı, antibiyotikler, kemoterapi, hemodiyaliz, intravenöz beslenme, uzun süreli hastanede kalış ve yoğun bakım ünitelerine yatış) ilişkilidir ve bu risk faktörleri varlığında *Candida* enfeksiyonlarına yatkınlık görülmektedir (29).

Mantar enfeksiyonları enfeksiyon oluşturdıkları bölgeye göre 5 grupta sınıflandırılır: (19)

- Yüzeysel mikozlar
- Deri mikozları
- Deri altı mikozlar
- Endemik mikozlar
- Fırsatçı mikozlar

Candida türlerinin oluşturduğu klinik belirtiler çok geniş bir yelpazededir. Yüzeysel ve sistemik enfeksiyonlara yol açabilirler. Yüzeysel tutulumda ulaşılan bölgeye bağlı olarak mukozal kandidiyazis, kutanöz kandidiyazis ve onikomikoz görülebilir. Mukoza tutulumuna örnek olarak orofarenkste sınırlı kalabilen ya da özafagusa yayılabilen pamukçuk, kadınlarda vajinal mukozanın tutulumu ile karakterize vajinit gösterilebilir. Genito-üriner sistemi tutarak idrar yolu enfeksiyonundan böbrek apselerine varan klinik tablo oluşturabilir (1).

Sistemik kandidiyazis, *Candida* enfeksiyonunun en şiddetli belirtisidir. Ekzojen kontaminasyonun (perfüzyon, cerrahi müdahale, vb.) veya sindirim ya da genitoüriner bölgelerde kolonize olmuş mayaların kana ve derin organlara geçişi ile ortaya çıkabilir. Sistemik kandidiyazis, *Candida* septisemisine (kandidemi) veya derin bir kandidal odağa (viseral lezyonlar) karşılık gelir. Mayalar kan dolaşımı yoluyla vücudun çeşitli organlarına yayılarak dokulara, filamente yapışır ve ensefalit gibi ciddi durumlara yol açabilir. En sık etkilenen organlar kalp, böbrekler, karaciğer ve gözdür. Sistemik kandidiyazis kaynaklı ölüm oranı yaklaşık %50' dir. Bu enfeksiyonların %95'i *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* türlerinden kaynaklanır (1, 30, 31).

2.6. *Candida* Enfeksiyonlarında İmmünoloji

Candida immün sistemi sağlam bireylerde kommensal olarak çeşitli bölgelerde bulunurken immün sistemi baskılanmış kişilerde ağır enfeksiyonlara neden olur. Mantar ve konak bağışıklık yanıtı arasında denge kolonizasyondan invaziv enfeksiyonlara kadar geniş bir yelpazede dengelenir (19).

Candida enfeksiyonlarına karşı konak savunmasında hem immünolojik olan ve immünolojik olmayan faktörler rol oynar. Cilt yüzeyindeki mikrobiyal flora immünolojik olmayan faktördendir. Mikrobiyal flora hem besin için *Candida* ile yarışmaya girer hem de *Candida* için toksik maddeler üretir. *Candida* fagositozu primer olarak PMNL (Polimorfonükleer lökosit) ve makrofajlar tarafından gerçekleştirilir. PMNL' ler, konak savunmasında *Candida*' ya karşı sırasında ilk koruma hattını oluştururlar. PMNL' ler kompleman kaskadını aktifleyerek kemotaktik ajanların salınmasını uyarırlar. PMNL defektinde *Candida* enfeksiyonlarına duyarlılık artar (32, 33).

Konağın immün sistemi mantar hücre duvarına ait yapıları patern tanımlama reseptörleri (PRR) tarafından tanır. Bu reseptörler Toll-benzeri reseptörler (TLR), C-tipi lektin reseptörleri (CLR) ve NOD-benzeri reseptörlerdir. Mantarların TLR-2, TLR-4 ile tanınmasından sonra kompleman ve Fc reseptörleri opsonizasyon süreçlerini yönetir. IL 6, IL-8, IL-17, TNF- α , GM-CSF PMN bölgeye toplanmasını sağlar. Monosit ve makrofajlarda mantar enfeksiyonunda konak savunmasında nötrofiller ile görev alır. Doğal öldürücü hücreler PMNL, dentritik hücre, makrofaj ve T hücre aktivasyonu ve toplanmasını sağlayarak immün yanıtı katkı sağlar. *Candida*'ya karşı koruyucu immün yanıt Th1 ve Th17 ile sağlanırken Th2 yanıtı *Candida* enfeksiyonlarına karşı duyarlılıkla ilişkilidir. *Candida* türlerine karşı savunmada hem hümmoral hem hüccresel bağışıklık önemlidir fakat hüccresel bağışıklığın rolü daha fazladır. Özellikle mukokütanöz enfeksiyonlarında T hücre yanıtı öne çıkar (19, 34).

2.7. Patogenez ve Virölans Faktörleri

İnsan vücudunun *Candida* ile kolonizasyonu genellikle bebeklik döneminde, öncelikli olarak vajinal doğum veya emzirme sırasında gelişir. *Candida* taşıyıcılığı çoğu bireyde asemptomatiktir. Hastalık tipik olarak konak homeostazının ve/veya endojen mikrobiyotanın bozulmasıyla *Candida* da bir dizi virölans belirleyicisinin ekspresyonu ile fırsatçı patojen haline gelmesi ile ortaya çıkar (28). *Candida*'nın patojenik yaşam döngüsünde önemli olan, mukozal bariyerleri aşmak ve invaziv hastalık oluşturmak için maya ve hif formlarına göre morfolojiyi değiştirebilme yeteneğidir. Kommensal form olarak düşünülen maya, cilt yüzeyini kolonize eder. Buna karşılık, hif formu tipik olarak mantarın invaziv formu olarak düşünülür ve *Candida*'nın konak bariyerlerini aşarak derin dokulara erişmesine izin verir. Fagositoz yetersizse her organ ve sisteme yerleşebilir. *Candida*'nın doku istilasındaki adımları şu şekildedir: Epitel hücrelere yapışma, kolonizasyon, epitele penetrasyonu/hiflerin istilası, vasküler yayılım ve endotel kolonizasyonu/penetrasyon. Bazı çevresel uyaran, konak sıcaklığı, pH, besin bulunabilirliği veya çoğunluk algılama mekanizmaları dahil olmak üzere *C. albicans*'ın morfolojik durumunu etkiler (28, 35).

Candida türlerinin patogenezi, birden fazla mekanizma ve yolu içeren çok yönlü bir süreçtir. *Candida*'nın çoğalma, kommensal mantardan fırsatçı patojenik mantara dönüşme ve konakta enfeksiyon oluşturma yeteneğinin merkezinde, transkripsiyonel

genler, morfolojiyle ilişkili/virülans kodlayan genler, fenotipik değişkenlik, biyofilm oluşumu, dokuya zarar veren ekstraselüler hidrolitik enzimler yatar. Çevresel pH'taki değişiklikler, güçlü besin edinim sistemi, fagositozdan kaçış, konak bağışıklık sisteminden kaçınma, antifungal ajanlara direnç ve çoklu streslere etkili bir şekilde yanıt verme yeteneği, hayatta kalmayı ve patogenezi artıran diğer hayati özelliklerdir (35).

Candida enfeksiyonlarının patogenezinde adezyon, fenotipik değişim, maya-hif dimorfizmi, hücre yüze hidrofobisitesi, hidrolitik enzimler (fosfolipaz, lipaz, aspartik proteinazlar vb.), katalaz, süperoksit dismutaz ve ısı-şok proteinleri salgılaması gibi birçok virülans faktörü belirlenmiştir (1, 3).

2.7.1. Adezyon ve adezinler

Candida türleri, diğer mikroorganizmalara, abiyotik yüzeylere ve konak hücrelerine yapışmasını sağlayan özelleşmiş proteinlere (adezinler) sahiptir (36).

ALS proteinleri: ALS (Agglutinin-Like Sequence) genleri tarafından kodlanır ve sekiz üyeden (ALS1–7 ve ALS9) oluşur. ALS genleri, glikozilfosfatidilinositol (GPI) bağlantılı hücre yüzeyi glikoproteinlerini kodlar. ALS 1p, 3p ve 5p mayaların hifal formunda bulunur ve konakta laminin, fibronektin, kolajene, epitel ve endotellere bağlanmasında görev alır. ALS 4p, 6p kollajene, ALS 9p laminine bağlanmada, ALS 5p ise hücre-hücre agregasyonunda görevlidir. Sekiz ALS proteininden hif ilişkili adezin ALS3, adezyon için özellikle önemlidir. ALS gen ailesi başta *C. albicans* (1-7,9) olmak üzere *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* ve *C. lusitaniae* 'de tanımlanmıştır. *Candida* türlerinin adezyonunda görevli olan bu gen ailesi hif oluşumu için de oldukça önemlidir (11, 36, 37).

HWP1 (Hyphal Wall Protein): *Candida* 'larda bir diğer önemli adezini, hif ilişkili GPI bağlantılı bir protein olan HWP1 'dir. HWP1 memeli transglutaminazları için bir substrat görevi görür ve bu sayede *Candida* hifleri konak hücreye kovalent bağlanabilir. HWP1 mutasyonunda, fare modelinde bukkal epitel hücrelerine adezyonda azalma olduğu gösterilmiştir (36).

INT 1p (İntegrin benzeri yüzey proteini) yüzey reseptörü: *C. albicans* ' ın plazma membranı yüzeyinde bulunur. İnsan kompleman reseptörlerine benzer ve insanda kollajen gibi hücre dışı matriks ligandlarına bağlanır (37, 38).

Mannoproteinler: Bu proteinler özellikle insan epitel hücrelerindeki fukozil ve glikozamid molekülleriyle bağlantı kurulmasını sağlayan reseptörlerdir. Böylece insan ağız ve vajen hücrelerine tutunmada rol alarak oral ve vajinal kandidiyazise neden olurlar (37).

Bunun dışında Eap1, Ecm33 gibi proteinler mannoproteinler, hücre yüzeyi ilişkili proteazlar (SAP9 ve SAP10) ve Csh 1p de adezyona katkıda bulunabilir. Hidrokarbon gibi hidrofobik maddelerin varlığı da adezyona yardımcı olur (36, 37).

2.7.2. Hidrolazlar

2.7.2.1. SAP (Salgısal asit proteazlar)

Konak hücre yüzeylerine adezyon ve hifal büyümenin ardından, *Candida* hücreleri tarafından penetrasyonu kolaylaştırmak için hidrolazlar salgılanır. Salgılanan en önemli üç hidrolitik enzim grubu: proteazlar, fosfolipazlar ve lipazlardır. SAP ailesi, salgılanan aspartil proteinazları kodlar. Salgılanan aspartik proteazlar (SAPs) ailesi on üyeden oluşur; SAP1–10. SAP1–8 salgılanır ve ortama salınır, SAP9 ve Sap10 hücre yüzeyine GPI tarafından bağlanır. *C. albicans'* ta (SAP1–10) on gen, *C. parapsilosis'* te (SAP1–3) üç gen, *C. tropicalis'* te (SAP1–4) en az dört gen ve *C. dubliniensis'* te yedi gen tanımlanmıştır (10, 37). SAP üretmeyen türler, *Saccharomyces cerevisiae* yapsins ile yakından ilişkili aspartil proteazların aktivitesine sahip proteinler üretmektedir. YPS proteazları adı verilen bu enzimler *C. glabrata'* nın virülansında önemli bir rol oynamaktadır. SAP ailesi geniş bir substrat özgüllüğüne sahiptir; albümin, hemoglobin, keratin, kolajen, laminin, fibronektin, musin, tükürük laktoferrini ve immünoglobulin gibi konak hücreye ait birçok proteini parçalayabilirler. SAP1, 2, 3 ve 6 büyük amino asitlerdeki peptit bağlarını koparır; SAP1, 2 ve 6 fenilalinin üzerinden, SAP3 lösin üzerinden ve SAP9-10 yapsin üzerinden etki eder. Böylece, *Candida* türlerinin farklı dokulardan azot elde etmesini sağlar ve dokudan kandidal hücrelerin adezyonu ve vasküler sistem yoluyla yayılması için potansiyel bağlanma bölgelerini ortaya çıkararak patojeniteye yardımcı olur. İn vivo çalışmalar, SAP genlerinin kolonizasyon, artan adezyon ve doku penetrasyonundaki rolünü doğrulamıştır. SAP1, 2 ve 3'ün inaktivasyonu, fare modellerinde virülansın azalmasıyla sonuçlanmıştır (10, 38, 39).

SAP1, 2 ve 3 maya formda eksprese edilir ve pH 3.5' da aktif olup erken adezyon ve invazyonda görev alır. SAP4-6 ise hifal formlarda eksprese edilir; pH: 5-7'de aktif olup kolonizasyonda ve farklı dokulara invazyonda görevlidirler.

SAP8-9 her iki formda da eksprese edilir. SAP8 penetrasyonda rol almaktadır. SAP1 – SAP3 ekspresyonu mukozal enfeksiyonlarda, SAP4 – SAP6 ekspresyonu sistemik enfeksiyonlarda belirgindir. SAP9 ve SAP10 tarafından kodlanan proteinazlar hücre bütünlüğünde, adezyonda ve hücre ayrılmasında rol oynar. Antifungal ajanlara maruz kalma, SAP genlerinin artan ifadesi ile dirençli suşların gelişimini teşvik ettiği görülmüştür (10, 37).

2.7.2.2. Fosfolipazlar

Fosfolipaz ailesi hücre zarı gliserofosfolipidlerin ester bağlarını hidrolize ederek, konak hücre lizisini indükler ve dokuya penetrasyonu kolaylaştırırlar. Kestikleri ester bağına bağlı olarak dört sınıf fosfolipaz vardır: A, B, C ve D. Hemen hemen tüm *Candida* suşları, tüm bu sınıflara ait çeşitli fosfolipazları sentezleme kapasitesine sahiptir. *C. albicans*, non-*albicans Candida* grubunun temsilcilerinden çok daha yüksek miktarlarda üretir. Fosfolipaz ailesi dört farklı sınıftan (A, B, C ve D) oluşur. Sınıf B'nin (PLB1–5) yalnızca beş üyesi hücre dışıdır ve konak hücre zarının bozulması yoluyla patojeniteye katkıda bulunabilir (10, 36).

2.7.2.3. Lipazlar

Salgılanan hidrolazların üçüncü ailesi olan lipazlar, 10 üyeden oluşur (LIP1–10) ve triaçilgliserolün hidrolizi ve sentezinde rol oynarlar. Bir çalışmada Lip8 mutasyonu fare modelinde azalmış virülansla ilişkili bulunmuştur. Bu durum, *C. albicans* patojenitesinde bu hücre dışı hidrolazların rolü olduğunu desteklemiştir (10, 36).

2.7.3. Morfogenez

Morfogenez, maya formundan filamentöz forma (psödohif veya hif) geçiş olarak tanımlanır. Sadece *C. albicans* ve *C. dubliniensis* morfogenez geçirebilir. Maya formundan hif formuna geçiş besinler, nötr pH, 37°C–40°C sıcaklık, yaklaşık %5,5 CO₂ konsantrasyonu ve N-asetil-D-glukozamin, serum, bazı amino asitler ve biyotin varlığıyla kolaylaştırılır. Hif formundan maya formuna geçiş daha düşük sıcaklıklar,

düşük pH ve yüksek glikoz konsantrasyonu ile tetiklenir. Bu patojenite için önemli bir virölans faktörüdür. Maya formu dokularda yayılmak için daha uygundur, oysa hif formları doku hasarı ve istila için gereklidir. Mayadan hifal forma geçişte, PHR1, ECE1, HYR1, RBF1 gibi pek çok gen düzenleyici olarak görev alır. Özellikle RBF1 maya-hif geçişinde temel rolü olan gendir (36, 38).

2.7.4. Fenotipik değişim

Fenotipik değişim *Candida* türlerinin stres altında geri dönüşümlü olarak morfolojilerini değiştirmesidir. Bu, *Candida*'nın enfeksiyon sırasında farklı bir konak ortamına uyum sağlamasını sağlar ve daha virölant hale gelmek için hücre yüzeyi davranışında, koloni görünümünde, metabolik, biyokimyasal ve moleküler özelliklerde değişikliklere neden olur. *Candida* kolonileri, pürüzsüz, pürüzlü, yıldız, benekli, kırışık ve tüylü olmak üzere birtakım morfolojik çeşitlilik gösterir. Maya-hif geçişi durumunda, bir popülasyonun tüm hücreleri aynı çevre koşulları altında aynı fenotipi sergilerken, fenotipik değişimde bir popülasyonun bazı hücreleri aynı çevre koşulları altında farklı fenotipler sergiler (37, 38).

2.7.5. Biyofilmler

2.7.5.1. Tanım

Mantar biyofilmi genellikle mantar hücrelerinden ve hücre dışı polimerik maddelerden (EPS) oluşan üç boyutlu bir yapı olarak tanımlanır. Biyofilm, tek bir tür veya bakteri ve mayadan oluşan karışık mikroorganizmalar tarafından canlı dokuda ya da katater gibi tıbbi gereçler, doğal çevresel ortam yüzeyleri gibi birçok yerde oluşturulabilir. *Candida* türleri ise 38-72 saat içinde bir biyofilm oluşturabilir (9, 40).

2.7.5.2. Quorum sensing

İnsan vücudundaki hücrelerde olduğu gibi mikroorganizmalar da iletişim kurmak için sinyal moleküllerini kullanırlar. “Çoğunluk algılanması” ya da “Quorum sensing” (QS) olarak bilinen bu iletişim şekli ile mikroorganizmalar, ortama verdikleri sinyal molekülleri ile çevresel değişikliği algılayabilmektedirler. Yeterli sayıda mikroorganizma bir araya geldiklerinde birbirleriyle iletişim kurarak ortama birlikte uyum sağlayabilmektedir. Mikroorganizma popülasyonu arttıkça quorum algılama moleküllerinin konsantrasyonu belli bir eşiğe ulaşılır ve ilişkili hedef genlerin

koordineli ekspresyonuna veya baskılanmasına yol açan bir yanıt tetiklenir. Bu sayede koloni olarak göstermeleri gereken davranış şekilleri, bir hücreden diğerine sinyal molekülleri ile iletilebilmektedir. Biyofilmdeki mikroorganizma sayısı belli bir yoğunluğa ulaştığında, yeterli besine ulaşamayan yüzeydeki mikroorganizmaların biyofilmden ayrılması bu sayede olmaktadır (41-43). Farnesol, *Candida* türlerinde ilk tanımlanan, “quorum sensing” molekülüdür. Farnesolün en belirgin etkilerden biri, hif-maya geçişinin indüklenmesi, çevreye maya hücrelerinin dağılmasını sağlaması ve çeşitli *Candida* türlerinde biyofilm oluşumunun engellenmesidir (44).

2.7.5.3. Biyofilmlerin yapısı

Biyofilmler, mikroorganizma topluluğunun geri döndürülemez bir şekilde bir yüzeye bağlandığında ve daha sonra bu mikroorganizmalar tarafından üretilen bir hücre dışı matrikse gömüldüğünde oluşur (45).

Yapısal olarak bakıldığında biyofilm kütesinin yaklaşık %97’si sudur. Mikroorganizma türüne, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamına, akışkanın türüne göre biyofilm yapısı değişir. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; %1-2 EPS, %1-2 globüler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipid, fosfolipitlerdir (40). Ekstraselüler matriks ise polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşur biyofilm hücrelerinin tutunmasını sağlar. EPS üretimi, mikroorganizmanın yüzeye dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir. Olgun bir biyofilmin kütesinin %75–90’ını EPS oluşturmaktadır. Biyofilmle ilişkili enfeksiyonların kontrolünü zorlaştıran şey, EPS’ nin çevreden izole olmasıdır. Ayrıca, adezyonu arttıran ve bazı ağır metallerin salgılanmasını güçlendiren şey de EPS üretimidir. Bu nedenle, EPS bileşenlerinin biyofilmlerde oynadığı önemli rolleri anlamak, biyofilmlerin yapısını ve işlevini incelemek için önemlidir (40, 42).

Biyofilmin üç boyutlu bir yapısı vardır ve bu üç boyutlu yapı besinler, konak reseptörü, mikrobiyal ürünler, sıvı akışı gibi çeşitli konak ve *Candida* kaynaklı değişkenlerden etkilenir (40).

Biyofilmlerde bulunan yapılardan biri de koloniler arasındaki su kanallarıdır. Besin maddelerinin alınması, atık maddelerin uzaklaştırılması, oksijen taşınması bu kanallar aracılığı ile yapılır (40).

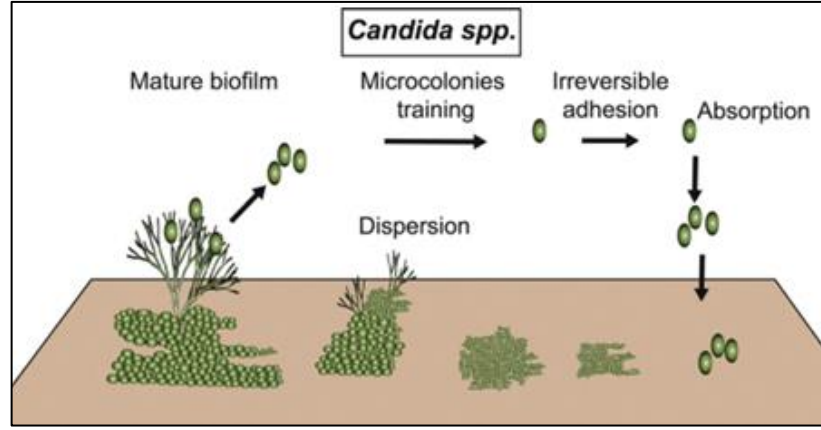
Biyofilm oluşumunda konak, mikroorganizma, çevre birbirlerine bağlı faktörlerdir. Enfeksiyon bölgesindeki sıvı akışının azalması, büyüme ortamında şeker, lipit ve serum gibi besinlerin bulunması genel olarak biyofilm oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, *C. albicans*' in diğer türlere göre daha büyük ve daha karmaşık biyofilmler oluşturduğu belirtilmiştir, *Candida*' nın biyofilm oluşturma yeteneği, ek *Candida* türlerinin veya farklı bakteriyel birlikte yaşayanların varlığından da etkilendiği bildirilmiştir (Örneğin; Laktobasillerin *Candida*' nın hücrelere yapışmasını önemli ölçüde azaltır). Adezyon yüzeyinin de biyofilm oluşumunda oldukça önemli olduğu vurgulanmıştır. (Örneğin; *C. glabrata* hariç tüm türlerin teflon üzerinde daha fazla biyofilm oluşturma kapasitesi gösterdiğini, *C. glabrata*' nın polivinil klorür üzerinde daha yüksek biyofilm oluşturma kapasitesi gösterdiği bildirilmiştir (9, 40, 46, 47).

Özetle biyofilm oluşumunu ve biyofilm yapısını *Candida* türü ve suşu, üzerinde büyüdüğü materyal, alkol dehidrogenaz, pirüvat kinaz gibi bazı enzimlerin ve birçok genin varlığı etkiler (9, 45, 48).

Candida spp.'de biyofilm gelişiminin aşamaları Şekil 4' te verilmiştir. *Candida* biyofilmlerinin oluşum aşaması şu şekildedir (49).

1. Yüzeyde tutunmayı kolaylaştıran hazırlayıcı film tabakası oluşumu (yüzeyin hazırlanması, “surface conditioning”),
2. Mikroorganizmaların yüzeye tutunması (adezyon)
3. Çoğalma ve Olgunlaşma
4. Kopma ve ayrılma

Yüzeyde Hazırlayıcı Film Tabaka Oluşumu: Bu aşama adezyonun ön aşamasıdır. Tıbbi gereçlerin implantasyonu ile; tükürük, mukus, serum veya kan gibi vücut sıvılarındaki bazı makromoleküller (fibrinojen, fibronektin, kollajen ve laminin gibi) yüzey üzerinde birikerek adezyon aşaması için hazırlayıcı bir film tabaka oluştururlar. Mikroorganizmalar genellikle bu film tabakasına tutunurlar (49).



Şekil 4. *Candida spp.*'de biyofilm gelişiminin aşamaları (45)

Adezyon (Yapışma): Adezyon yeteneği, kolonizasyonun başlaması ardından enfeksiyonun gelişmesi için gerekli olan *Candida* türlerinin virülansındaki en önemli faktördür (10). *Candida* hücrelerinin yüzeye adezyonunda, yüzey hidrofobikliği veya elektrostatik kuvvetler gibi spesifik olmayan faktörlerin yanı sıra spesifik yapışma proteinleri aracılık eder (10, 50). *Candida* hücreleri, fibronektin, fibrinojen ve kollajen tip I ve IV gibi konakçı dokuların hücre dışı matrisindeki çeşitli proteinlere bağlanır (50). *Candida* türlerinin adezyonunda önemli olan bir diğer faktör, genellikle adezinler olarak adlandırılan spesifik hücre duvarı proteinlerinin varlığıdır. Bu adezinlerin C-terminal kısmı bir GPI bölgesi içerir ve adezini hücre duvarına bağlar, N-terminal kısmı hücre yüzeyinden dışarı çıkarak genellikle bir karbonhidrat veya peptit bağlanma alanı içerir. ALS, EAP, EPA genleri iyi tanımlanmış *Candida* adezin gen ailelerinden bazılarıdır (51).

Adezyon geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olabilir. Dönüşümlü adezyonda, hücre yüzey ile tam olarak temas etmemekte ancak çevreyle elektrostatik, hidrofobik etkileşimlerde bulunmaktadır. Geri dönüşümsüz adezyonda ise güçlü bağlantılar kurulur (40).

Çoğalma ve Olgunlaşma: Bu aşamada hücre sayısı artar ve hücre filamentasyonu meydana gelir. Çoğalma süreci yaklaşık 12-30 saat sürebilir. Bu aşamada ekstraselüler matris de artar. Yeni oluşan tek tabaka üzerinde mikrokoloniler oluşur ve bunu maya hücreleri, germ tüpleri ve genç hifler içeren makro kolonilerin farklılaşması izler. Olgunlaşma fazı, biyofilm oluşumunun başlamasından yaklaşık 72 saat içinde tamamlanır. Olgunlaşma, hifal hücreler, psödohif ve hücre dışı matrisle çevrili

yuvarlak maya hücreleri dahil olmak üzere polimorfik hücrelerin birkaç katmanından oluşan üç boyutlu karmaşık bir ağ ile sonuçlanır (9, 40).

Kopma ve Ayrılma: Biyofilmin olgunlaşarak belli bir seviyeye gelmesiyle beraber sonra besin ve oksijen azlığı ortaya çıkar. Biyofilm içindeki hücreler, “quorum sensing” molekülleri sayesinde birbirleri ile iletişim kurar ve bazı hücreler yapıyı terk ederek ve planktonik faza geçerek başka yüzeyleri kolonize etmek için biyofilmden ayrılır (42). Biyofilmdeki hücrelerinin dağılımı/ayrılması klinik ortamda çok önemli bir etkiye sahiptir. Biyofilm ayrılması kateterle ilişkili septisemiye, doğal kalp kapakçıklarından biyofilm ayrılması ise enfeksiyöz endokardite yol açtığı belirtilmiştir (49).

2.7.5.4. Biyofilm oluşumunun genetik düzenlemesi

Biyofilmlerin gen düzenlenmesi oldukça karmaşıktır ve hala tam olarak anlaşılamamıştır. Adezyon, hifal büyüme, EPS üretimi, çoğalma, olgunlaşma ve dispersiyonu sağlayan çok sayıda gen biyofilm oluşumunu düzenler (Şekil 5).

Candida türüne ve belirli suşa bağlı olarak genlerin varlığı, ayrıca etkileşimde bulunduğu çevreye bağlı olarak da genlerin ekspresyon düzeyleri değişir. Adezyondan sorumlu başlıca gen büyük hücre yüzeyi glikoproteinlerini kodlayan ALS gen ailesidir. ALS genleri *C. albicans* başta olmak üzere diğer *Candida* türlerinde de bulunur. *C. glabrata*'da ana adhezin grubu EPA (epitelyal adhezin) gen ailesi tarafından kodlanır. Bunun dışında *Candida* adezyonundan sorumlu diğer genler EAP1, PGA10, RBT5, CSA1 sayılabilir. Bazı genler diğerlerini etkiler örneğin; BCR1 RBT5, ECM331, HWP1, ALS3, ALS1 gibi bazı adezyon genlerinin pozitif düzenleyicisi olarak işlev görür. Olgunlaşma ve yayılma aşamasında EFG1, TEC1, BCR1, HWP1, GAS1-3 gibi birçok gen yer alır (9, 10, 45).

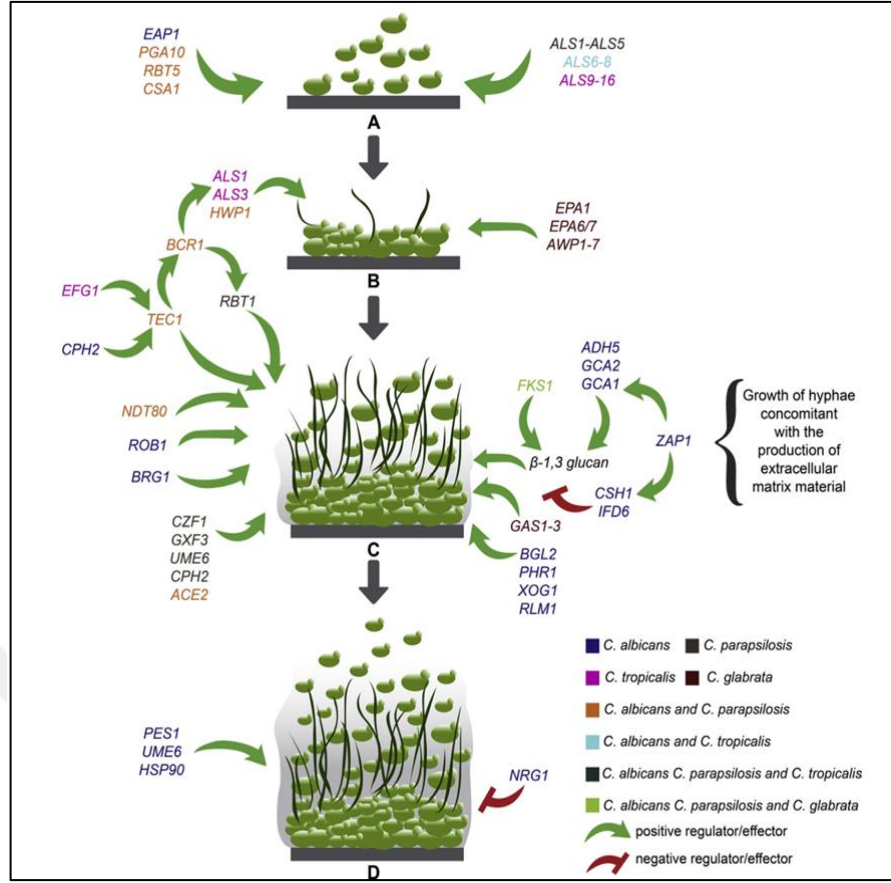
Hifal formunda büyümeyi destekleyen transkripsiyon faktörleri (örneğin EFG1, CPH1, CPH2, TEC1, CZF1, NDT8 ve RİM101) ve negatif hif-spesifik düzenleyicileri (örneğin TUP1, NRG1, RFG1) hifal gelişime katkıda bulunur (9, 10, 45).

Bazı genler ise biyofilm oluşumunun birden fazla aşamasında görev alır. HWP1 geni, hücre duvarı inşası, hücre içi iletişim, hifal gelişim, adezyon gibi çeşitli işlevlerde yer alan proteinini kodlar. EFG1 ve CPH1, hifal büyüme için gerekli genlerin (ECE1, HYR1, HWP1 ve ALS3) ve mayadan-hif geçişte yer alan hücre duvarı ile ilgili

genlerin ifadesini pozitif olarak kontrol eder. Dağılma evresinde, maya formundaki hücreler yeni çevrelere yayılmak üzere serbest bırakılır. Bu evredeki gen düzenlemesi ile ilgili bilgiler sınırlıdır. PES1, hiflerden lateral maya hücrelerinin üretimini ve biyofilm dağılımının indüklenmesini doğrudan kontrol eden bilinen tek moleküler düzenleyicidir (9, 10, 45).

2.7.5.5. Biyofilm enfeksiyonları ve antimikrobiyal direnç

Biyofilm yapısı konağın immün sistemiyle etkileşerek konakta immün yanıt oluşumuna neden olan önemli bir enfeksiyon ve enflamasyon etkenidir. Kateter, stentler, implantlar, yapay kalp kapakçıkları, protezler gibi kalıcı tıbbi cihazların kullanımındaki artışa bağlı olarak biyofilm enfeksiyonlarında da artış görülmektedir. Bu cihazlarda biyofilm oluşumu cihaz disfonksiyonuna yol açan sürekli bir enfeksiyon kaynağıdır. Ayrıca mikroorganizmanın planktonik formuna etkili olan antimikrobiyal dozun biyofilm için yetersiz kalması nedeniyle bu enfeksiyonların tedavisi zorlaşmaktadır. İnsanlarda gelişen enfeksiyonlarının %80'inin biyofilm ilişkili enfeksiyonlar olduğu bildirilmiştir (52, 53).



Şekil 5. *Candida* türlerinde biyofilm oluşumunun farklı aşamalarındaki düzenleyici genleri gösteren şema (A) Maya formundaki hücrelerin yüzeye yapışması. (B) Hücresel çoğalmanın başlaması (C) Olgunlaşma aşamasında hiflerin oluşumu ve hücre dışı matris birikmesi (D) Maya hücrelerin biyofilmden ayrılması ve dağılması (45).

Biyofilm içindeki mikroorganizmaları koruyan bir yapıdır. Biyofilm içinde bulunan mikroorganizmalar, antimikrobiyal ajanlara, dezenfektanlara karşı planktonik (serbest haldeki) hücrelerden daha dirençlidir. Bunun nedeni, biyofilm içinde ozmotik basınç - pH değişikliği, antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu, besinlere sınırlı ulaşım nedeniyle mikroorganizmanın yavaş üreme hızına sahip olması, biyofilm içindeki oksijen yoğunluğu ve biyofilm içine penetrasyonun düşük olmasıdır (54). Antimikrobiyal direncin çoklu mekanizmalarının olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu mekanizmalar arasında antimikrobiyalin ekstraselüler matriks tarafından adsorpsiyon yoluyla inaktivasyonu, antimikrobiyal parçalayıcı enzimlerin artan üretimi, biyofilm içindeki mikroorganizmanın yavaş büyüme oranları, plazmit gen transferinin kolaylaştırılması ve çoklu ilaç dışarı atma pompası genlerinin indüklenmesi yer alır (55). Biyofilmden yer alan mikroorganizmaların planktonik

formlarına kıyasla antibiyotiklere 100-1000 kat, dezenfektanlara 10-100 kat daha dirençli olabildikleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (52).

2.7.5.6. Biyofilm varlığını saptama yöntemleri

Günümüzde biyofilm oluşumunu saptamada çok sayıda farklı in vitro ve in-vivo yöntemlerden faydalanılmaktadır. Yöntem, araştırılmak istenen özelliğe göre seçilmektedir. Kongo kırmızılı agar yöntemi, modifiye tüp aderans yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi), mikroplak kullanılan yöntemler biyofilm oluşumunu saptamada sık kullanılan kalitatif yöntemlerdir. Kantitatif olarak kuru ağırlığın ve metabolik aktivitesinin saptanmasına dayalı yöntemlerle floresan mikroskobu, konfokal lazer tarama ve elektron mikroskobunun kullanıldığı mikroskobik yöntemler de biyofilm saptamasında kullanılır (52).

Kongo kırmızılı agar yönteminde; biyofilm oluşturma özelliği araştırılacak mikroorganizma, içinde belirli miktarlarda süktroz, beyin kalp infüzyon bulyonu, kongo kırmızısı ve agar bulunan besiyerine tek koloni ekimleri yapılır. İnkübasyon sonunda, kolonilerde oluşan renk değişimi incelenir. Siyah- koyu kırmızı renkli koloni oluşumu görülen suşlar biyofilm üretimi açısından pozitif, pembe-kırmızı renkli koloni oluşumu görülenler ise biyofilm üretimi açısından negatif suşlar olarak yorumlanmaktadır (52).

Mikroplak yönteminde mikrolak kuyucuklarına *Candida* süspansiyonu konarak inkübasyona bırakılır daha sonra mikrolak ters çevrilerek kuyucuklar boşaltılır. Fosfat tampon eriyiği (PBS) ile yıkandıktan sonra, her bir kuyucuğa safranin, kristal viyole veya metilen mavisi konur. Boya dökülür, PBS ile yeniden yıkama işlemi yapılır ve oda ısısında kurutulur. Mikrolaklar 490-492 nm dalga boyunda okunur. Belli bir değerin üstünde olan kuyucuklar biyofilm açısından pozitif olarak değerlendirilir (2, 52).

Candida biyofilmlerinin ayrıntılı yapısını görüntülemek için taramalı elektron mikroskobu (scanning electron microscope (SEM)) ve Transmisyon elektron mikroskobu (transmission electron microscope (TEM)) kullanılmıştır. Bu yöntem hücrelerin protein, nükleik asit gibi yapılarını yüksek çözünürlükte görüntülenmesini sağlar. Görüntüleme öncesi dehidratasyon işlemi yapıldığı için biyofilm yapısında deformasyonlar meydana gelebilmektedir. Konfokal lazer tarama mikroskobu

(CLSM), hidrasyonu korunmuş canlı örnekler incelenebildiği için avantajlıdır. Mantar biyofilmleri CLSM tekniği ile incelendiğinde, *C. albicans* ve *C. dubliniensis* biyofilmlerinin su kanallarıyla çevrili mikro kolonilerden oluşan benzer üç boyutlu yapılara sahip olduğunu gözlemlenmiştir (56, 57).

Candida türlerinde fenotipik yöntemlerle biyofilm oluşumunun değerlendirilmesinde en sık kullanılan yöntemlerden biri, hücre canlılığının XTT (2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-5-[(fenilamino) karbonil]-2H-tetrazo-lium hidroksitin) ve MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür) gibi tetrazolyum tuzlarının kullanılarak ölçüldüğü kolorimetrik yöntemdir. Bu kolorimetrik değişim, yaşayan hücre sayısı ile orantılıdır ve ölçülebilir. Bu yöntem, metabolik aktivite varlığında mitokondriyal süksinoksidaz, sitokrom P450 enzimleri ve flavoprotein oksidazlar tarafından XTT' nin turuncu renkli bir bileşik olan suda çözünebilen formazana dönüştürülmesine dayanır. Böylece biyofilm yapısının bozulmadan incelenmesine olanak tanır (58).

Candida izolatlarında biyofilm oluşumunun değerlendirildiği bir diğer sık kullanılan yöntem ise kristal viyole boyama ile toplam kütle değerlendirme yöntemidir. Bu yöntemler arasında biyofilmdeki canlı hücreler XTT ile tespit edilirken, kristal viyole boyama yönteminde biyofilm kütlesi bir bütün olarak değerlendirilir. MALDI-TOF MS ile biyofilm tespiti son yıllarda ön plana çıkmış ve standart yöntemlere kıyasla biyofilmin gösterilmesinde daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir (58, 59).

2.5.6.7. Üriner sistem enfeksiyonlarında biyofilmlerin ve kateterizasyonun rolü

İdrar yolu enfeksiyonları (İYE), %40' ını temsil eden en yaygın sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonlardan biridir. Sağlık bakımı ilişkili İYE' lerin çoğu (%70) idrar kateterleriyle ilişkilidir, yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) İYE' lerin ise %95'i kadarı kateterlerle ilişkilidir. *Candida* türleri de idrar yolu enfeksiyonlarında izole edilen yaygın etkenlerden biridir. Yapılan bir çalışmada hastanede yatan hastalarda kateter ilişkili kandidüri prevalansı %19,49 olarak bulunmuştur. Kandidürde en sık saptanan tür *C. albicans*' tır bunu *C. glabrata* ve diğer non-*albicans Candida*' lar izlemektedir (60-62).

Kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonu; üriner kateterin takılmasından itibaren en az iki gün sonra (yerleştirme işleminin yapıldığı gün dahil), ya da üriner kateterin

çıkartılmasından itibaren en fazla iki gün sonra (kateterin çıkartıldığı gün dahil) ortaya çıkan üriner sistem enfeksiyonları olarak tanımlanmaktadır. CDC raporlarına göre yatarak tedavi alan yetişkin hastaların yaklaşık %12-16' sı hastanede yatışları sırasında en az bir kere kalıcı idrar sondası takacaktır ve kalıcı idrar sondası kaldığı her gün, bir hastanın kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonu (KAÜSİ) edinme riski %3-7 oranında artar (63).

Üriner kateterler yapısal olarak biyofilm gelişimine hazır ortamlardır. Kateterizasyon süresi arttıkça mikroorganizmal kolonizasyon ve sonrasında enfeksiyon gelişim riski artmaktadır. KAÜSİ' ye neden olan mikroorganizmaların çoğu öncelikle perine ve hastanın gastrointestinal kanalını kolonize eden endojen organizmalardır ve bu organizmalar üretraya doğru çıkarak mesaneye kateterin dış yüzeyine göç eder (63).

Kateter ilişkili idrar yolu enfeksiyonuna ait risk faktörleri (64): Değiştirilemeyen, hasta düzeyindeki risk faktörleri:

- Kadın cinsiyeti
- Altta yatan ciddi hastalık
- Cerrahi olmayan hastalık
- Yaşı 50'den büyük
- Şeker hastalığı
- Serum kreatinin düzeyi 2 mg/dl'den büyük

Değiştirilebilir risk faktörleri:

- Kateterizasyon süresi
- Aseptik kateter bakımına uyum
- Hastaneye yatışın altıncı gününden sonra kateter takılması
- Ameliyathane dışında kateter yerleştirilmesi

İdrar kateterizasyonu devam eden inflamasyona neden olmakla birlikte aynı zamanda normal idrar çıkışına da müdahale ederek ve mesanedeki konak savunmasını mekanik olarak bozarak, idrar yolunda mikrobiyal kolonizasyon, çoğalma ve yayılmayı sağlar (65).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 24.04.2024 tarihli ve 2024/221 sayılı karar ile etik onay alınmıştır (EK-1).

Çalışmaya, 2019–2024 yılları arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde pediatrik yoğun bakım ünitelerinden ve 01.01.2024–01.06.2024 tarihleri arasında erişkin yoğun bakım ünitelerinden Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen idrar örneklerinden izole edilen toplam 70 *Candida* izolatu dahil edilmiştir. Erişkin grubun izolatları pediatrik grubun izolatlarıyla karşılaştırılabilmesi için benzer sayıda ve altı aylık sürede laboratuvara gönderilen erişkin yoğun bakım hastalarının izolatlarından rastgele seçildi. Her hastanın yalnızca bir örneği çalışmaya dahil edildi. Bu izolatların n=35'i erişkin, n: 35' i pediatrik hastalardan olacak şekilde toplandı. Biyofilm aktivite testi için kontrol suşu olarak *Candida albicans* ATCC 90028 kullanıldı. Suşlar çalışılncaya kadar saklama besiyerinde -40°C'de muhafaza edildi.

3.1. Çalışmaya Dâhil Edilen Ticari Hazır Besiyerleri

- RPMI-1640 R6505 toz (Thermo)
- Yeast Pepton Dekstroz (YPD) Broth (Condalab)
- Sabouraud %2 Dekstroz Broth (SDB) (Merck)
- Sabouraud %4 Dekstroz Agar (SDA) (Condalab)
- Brain Heart Infusion Broth (Condalab)
- Blood Agar Base (Condalab)

3.2. Çalışmaya Dâhil Edilen Kimyasal Maddeler

- Etanol (Tekkim)
- Aseton (Tekkim)
- Menadion (Alfa Aeser)
- Morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) (AFG Bioscience)

- Phosphate buffered saline (Ecotech)
- XTT Sodium Salt (Goldbio)

3.3. Çalışmaya Dâhil Edilen Gereçler

- Buzdolabı
- Hassas Terazî
- Etüv
- Dondurucu
- Otoklav
- Pastör fırını
- ELISA reader optik okuyucu (Chromate Awareness Technology, ABD)
- Agaroz (Sigma-Aldrich, Almanya)
- Elektroforez ünitesi (BIO-RAD, PowerPac™ Basic Power Supply, ABD)
- UV Transillumunator (BIO-RAD, ABD)
- Etidium Bromid (Sigma-Aldrich, Almanya)
- TBE Elektroforez Tamponu 5X
- PCR Cihazı (SensoQuest Labcycler, Almanya)
- Santrifüj
- McFarland Densitometre (BD PhoenixSpec™)
- Vorteks karıştırıcı
- 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
- 1 mililitrelik pipet ucu
- 5 mililitrelik pipet ucu
- Steril 90x17 mm petri
- Şırınga ucu 0.22 µm por çaplı 25 mm filtre

3.4. Çalışmaya Dahil Edilen PZR Malzemeleri ve Primerler

- Primer ALS-1 çift (Oligomer)
- Primer HWP1 çift (Oligomer)
- Primer SAP 1 çift (PROB)
- dNTP mix 10 mM 1 ml (A.B.T.)
- 6 X DNA Loading dye (5x1) (Ecotech)

- 100 bp Plus DNA Ladder (Abmgood)
- Taq DNA polimeraz (Thermo Fisher)

3.5. İzolasyon ve İdentifikasyon

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2018- 2024 yılları arasında pediatrik ve erişkin yoğun bakım ünitelerinden gönderilen idrar örneklerinden gram boyalı preparatlar hazırlandı. Gram boyamada maya olarak tanımlanan örnekler saflaştırılmak amacıyla SDA besiyerine pasajı yapılarak 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Saf olan kültürlerin tür tanımlaması, makroskopik ve mikroskopik morfoloji incelemesi için germ tüp testi, kromojenik agar (BES LAB), Piriç-Tween 80 agar ve VITEK-MS MALDI-TOF (bioMérieux, Fransa), BD™ MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, MA) sistemi kullanıldı.

3.6. Biyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi

İzolatların biyofilm aktivitelerinin tespiti için mikropakta modifiye XTT (2,3- bis-(2-metoksi-4- nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid) redüksiyon yöntemi kullanıldı. 96 kuyucuklu mikropaklarda biyofilm oluşumu, Pierce ve ark.'nın (66) daha önce kullandıkları yöntemin modifiye edilmesiyle araştırıldı. İzolatlar YPD besiyerinde aşağıda anlatılan şekilde üretildi, RPMI 1640 besiyerinde Mcfarland ayarlanarak mikropak çukurlarına eklendi ve uygun koşullarda inkübe edildi. Üreme aşamasının ardından kuyucuklar yıkandı ve çukur yüzeyine tutunamayan maya hücreleri uzaklaştırıldı. Sonuçlar bir kimyasal olan XTT kullanılarak spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

Bu yöntem için kullanılan besiyerleri, kimyasal maddelerin içerikleri, hazırlanma aşamaları ve yöntemin uygulanışı şu şekildedir:

3.6.1. YPD besiyeri hazırlama

YPD sıvı besiyeri için 10 g maya özütü, 20 g pepton ve 20 g dektroz içeren toz karışımı bir litre distile suda çözündürüldü ve homojenize edildi. Ardından çözelti her birinde 10'ar ml olacak şekilde cam tüplere bölünerek 121°C'de 15 dakika sterilizasyon için otoklavlandı, oda sıcaklığına ulaştıktan sonra buzdolabına kaldırılarak kullanıncaya kadar +4°C'de saklandı.

3.6.2. RPMI 1640 sıvı besiyeri

RPMI 1640 sıvı besiyeri için 10,4 g RPMI 1640 ve 69 g 3-(N-morfolino) propan sülfonik asit (MOPS) 900 mL distile su ile karıştırıldı, homojenize edildi ve sonrasında 1M NaOH (sodyum hidroksit) ile pH 7.0'ye ayarlandı. Son hacim 1 L olacak şekilde distile su eklenip ardından 0.22 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edildi. Kullanıma kadar buzdolabında +4°C'de bekletildi.

3.6.3. XTT / Menadion çözeltisi

XTT çözeltisinin hazırlanması: pH 7,0 olan PBS içinde XTT' nin çözündürülmesiyle 0,5 g/L 'lik çözelti hazırlandı. XTT PBS içerisinde tamamen çözündükten sonra 0.22 µm por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edildi. Çözelti 10'ar ml hacimlere bölündü. XTT çözeltisi ışığa duyarlı olduğu için alüminyum folyo ile kaplayıp 70°C'de saklamaya alındı.

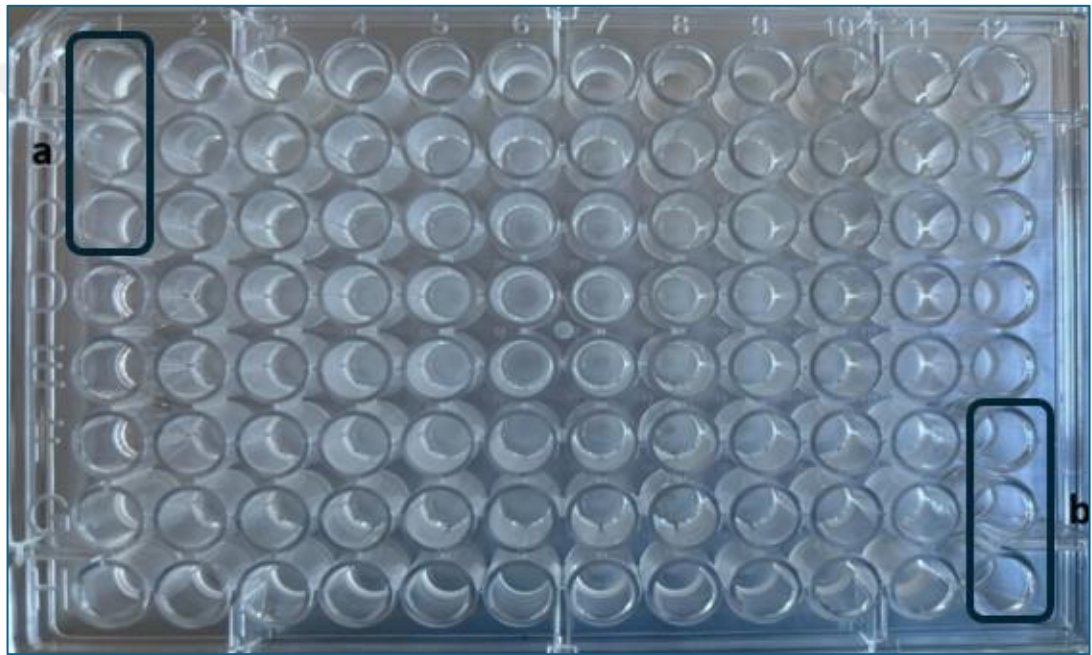
Menadion çözeltisinin hazırlanması: 10 ml %100'lük aseton içinde 17,22 mg menadionun çözündürülerek 10 Mm çözelti olacak şekilde hazırlandı. Steril ependorflara 10 'ar µl dağıtıldı ve -70°C'de saklandı.

XTT/ Menadion çözeltisinin hazırlanması: Çalışmadan hemen önce XTT ve menadion çözeltilerinin -70°C'lik derin dondurucudan çıkarılıp oda sıcaklığında eridikten sonra 10 ml XTT çözeltisine 1 µl menadion stok solüsyonu eklendi.

3.6.4. XTT redüksiyon yöntemi (66)

Modifiye XTT redüksiyon yöntemiyle biyofilm oluşumunun tespit aşamaları: SDA' da 37 °C'de 18-24 saat inkübasyon sonrası üreyen *Candida* izolatları 10 ml YPD sıvı besiyerine konuldu ve 30°C'de 180 rpm de 48 saat inkübe edildi. 48 saat sonunda içinde üreme olan sıvı besiyeri içindeki maya hücreleri PBS ile üç kez yıkanarak ayrıldı. (YPD besiyeri 3000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi, üst kısımdaki sıvı dökülerek kalan çökeltiye 5 ml steril PBS eklenerek vortekslendi. Sonrasında 3000 rpm'de tekrar santrifüjlendi ve üsteki sıvı dökülerek bu kez 2 ml steril PBS eklendi (Bu basamak 2 kez yapıldı)). Yeniden vorteksleme ve santrifüj yapıldı ve kalan çökeltiye 37°C sıcaklıkta 1 ml RPMI eklendi ve daha sonra RPMI içinde 0.5 McFarland olacak şekilde (1.0×10^6 hücre/ml) süspansiyon hazırlandı ve her mikropalak kuyucuğuna 100'er µl suş süspansiyonlarından eklendi. Her izolat üçer kez

test edildi. Tüm plaklara negatif kontrol olarak 6 kuyucuğa 100 µl RPMI 1640 ve pozitif kontrol olarak 6 kuyucuğa *C. albicans* ATCC 90028 suşu konuldu. Plaklarda buharlaşmayı engellemek amacıyla kapak kullanıldı. Hazırlanan plaklar karanlıkta 37°C’de 24 saat inkübasyon sonrası kuyucuklar otomatik çok kanallı pipet kullanılarak 200 µL steril PBS ile üç kez yıkama yapıldı (yıkama sonrası plak görüntüsü Şekil 6’da verilmiştir). Mikroplaklar ters çevrilerek kurutuldu ardından her kuyucuğa 100µl XTT/ menadion solüsyonu eklenerek alüminyum folyo ile kapatıldı ve karanlıkta 2 saat 37°C’de inkübe edildi. Daha sonra plak 492 nm’de okutularak OD (optik dansitometre) değerleri belirlendi.



Şekil 6. Yıkama işleminden sonra, plak görüntüsü (kuyucuk tabanında tabaka gözlenmesi biyofilm varlığını, tabaka gözlenmemesi biyofilm yokluğunu göstermektedir) (a: Pozitif kontrol, b: Negatif kontrol)

3.6.5. Test sonuçlarının değerlendirilmesi

Sonuçlar Christensen ve ark.’nın (67) yaptıkları çalışmaya göre değerlendirildi:

- Her bir kuyucukta ölçülen OD değerinden negatif kontrol kuyucuğunun OD değeri çıkarılarak test değeri hesaplandı.
- Her bir izolat için üç test değerinin aritmetik ortalaması alındı ve bu sonuç değeri olarak ifade edildi.

- Negatif kontrol kuyucuklarının OD değerlerinin ortalamasına üç standart sapma eklenerek sınır değer hesaplandı ve sonuç değeri, sınır değeri ile karşılaştırıldı.
- İzolatın sonuç değeri <sınır değeri ise izolat negatif,
- Sınır değeri <izolatın sonuç değeri <2 x sınır değeri ise izolat zayıf pozitif,
- 2 x sınır değeri <izolatın sonuç değeri <4 x sınır değeri ise izolat orta derecede pozitif,
- İzolatın sonuç değeri > 4 x sınır değeri ise izolat güçlü pozitif olarak değerlendirildi.

3.7. *Candida* İzolatlarında Virülans Genlerinin Moleküler Yöntemler ile Tespit Edilmesi

3.7.1. Kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar

3.7.1.1. SDA

Ticari olarak toz SDA besiyeri 65 g/L olacak şekilde distile su içinde eritildi. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanan besiyeri yaklaşık 60 °C' ye soğutularak 9 cm çapında steril petri plaklarına döküldü, katılaştıktan sonra kullanılıncaya kadar 4 °C'de muhafaza edildi.

3.7.1.2 Sabouraud %2 dextrose broth

Ticari olarak toz Sabouraud %2 Dextrose Broth (Neogen, UK) 30 g/L olacak şekilde distile su içinde eritildi, uygun tüplere dağıtıldı, otoklavda 121°C'da 15 dakika sterilize edildi. Kullanılıncaya kadar 4 °C'de muhafaza edildi.

3.7.1.3 Gliserollü brain-heart infüzyon broth toz besiyeri (Condalab, İspanya)

37,0 g/L olacak şekilde distile su içinde çözündürüldü, otoklavda 121° C' de 15 dakika sterilize edildi. Sterilize edildikten sonra gliserol eklenip uygun tüplere dağıtıldı.

3.7.2 Genomik DNA ekstraksiyonu (18)

- İlk olarak gliserollü brain-heart infüzyon brothda –20°C'de saklanan suşlar çözülerek canlandırma pasajı yapıldı.
- Moleküler analizden önce tüm izolatlar iki kez SDA plaklarına pasajlandı.

- SDA’ da saf olarak üreyen *Candida* kolonilerinden bir öze dolusu alınarak 2 cc Sabouraud Dekstroz Broth (SDB)’da 37°C’de bir gece inkübe edildi.
- İnkübasyonun ardından suş süspansiyonlarından steril eppendorf tüpüne 1 cc alınarak 13000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.
- Üst kısımdaki sıvı döküldü ardından üzerine 200 µl steril distile su eklendi ve 20 dakika kaynatıldı ve ardından 13000 rpm’de 10 dakika tekrar santrifüj edildi.
- İçerisinde DNA’ nın olduğu üst kısımdan 150 µl alınarak yeni bir steril eppendorf tüpüne aktarıldı.

3.7.3. PZR amplifikasyonu

Tablo 1’deki primerleri kullanılarak izole edilen genomik DNA örneklerinden PZR amplifikasyonu yapıldı. Bu işlem öncesinde PZR reaksiyon karışımı hazırlandı. ALS1, HWP1, SAP1 primerleri ayrı ayrı kullanılarak toplam 25 µL’ lik bir reaksiyon karışımı elde edildi. Primer dizileri ve ampikon uzunlukları ve PZR koşulları Tablo 1’ de verilmiştir.

ALS1 reaksiyon karışımı: 20 mM MgCl₂ içeren 5 µL 10X reaksiyon tamponu (Thermoscientific), 10 mM’ lık her bir deoksinükleozit trifosfattan (dNTP) 0,5 µL (A.B.T), 1 µL 25 mM MgCl₂ (Thermoscientific), 1 U Taq polimeraz (Thermoscientific) (0,2 µL), 1,5 µL primer (Oligomer) ve 4 µL’de yaklaşık 10 ng genomik DNA’ dan oluşuyordu ve daha sonra distile su ile 25 µL’ lik son hacme getirildi (68).

HWP1 reaksiyon karışımı: 20 mM MgCl₂ içeren 5 µL 10X reaksiyon tamponu (Thermoscientific), 10 mM’ lık her bir deoksinükleozit trifosfattan (dNTP) 0,5 µL (A.B.T), 1 U Taq polimeraz (Thermoscientific) (0,2 µL), 1,5 µL primer (Oligomer) ve 4 µL’de yaklaşık 10 ng genomik DNA’ dan oluşuyordu ve daha sonra distile su ile 25 µL’ lik son hacme getirildi (68).

SAP1 reaksiyon karışımı: 20 mM MgCl₂ içeren 5 µL 10X reaksiyon tamponu (Thermoscientific), 10 mM’ lık her bir deoksinükleozit trifosfattan (dNTP) 0,5 µL (A.B.T), 1 µL 25 mM MgCl₂ (Thermoscientific), 1 U Taq polimeraz (Thermoscientific) (0,2 µL), 1,5 µL primer (PROB) ve 4 µL’de yaklaşık 10 ng genomik DNA’ dan oluşuyordu ve daha sonra distile su ile 25 µL’ lik son hacme getirildi (69).

3.7.4. PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi

PZR sonrası amplifikasyon ürünlerini %1,5 'luk agaroz jelde yürütülerek araştırıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında konsantrasyonu %2 olan Trisma-Borik Asit-EDTA (TBE) tamponu kullanıldı. Hazırlanan karışım mikrodalga fırında 2 dk kaynatıldı ardından yaklaşık 60° C'ye kadar soğutulan agaroz jeli yatay elektroforez kabına döküldü ve donması için 25 dk oda sıcaklığında bekletildi. Taraklar çıkartılarak jel elektroforez tankına (Major Science, ABD) yerleştirildi. Amplifiye ürünlerden 8'er µl 2 µl loading (yükleme) tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yerleştirildi. Yükleme sırasında 100 bp'lik DNA marker kullanıldı. Yüklenen ürünler 120 V, 400 A' da 40 dk süresince elektroforezde yürütüldü ardından etidyum bromür (0,5 µg/mL TAE) ile 20 dk boyandı. DNA amplikonları Gel Doc XR (Bio-Rad, ABD) cihazı ile görüntüledi. Görüntüler Quantity One (Bio-Rad, ABD) yazılımı ile kaydedildi.

Tablo 1. Primer dizileri, amplikon uzunlukları ve PZR koşulları

Genler	Primer sekansı (5'-3')	Ürün boyutu	PCR protokolü	Kaynak
ALS1-F	GACTAGTGAACCAACAAATACCAGA	318 bp	94°C 2 dk	İnci ve ark., 2013 (68)
ALS1-R	CCAGAAGAAACAGCAGGTGA		94°C 4 dk	
			52°C 1 dk 35X	
			72°C 2 dk	
HWP1-F	ATGACTCCAGCTGGTTC	572 bp	72°C 5 dk	İnci ve ark., 2013 (68)
HWP1-R	TAGATCAAGAATGCAGC		94°C 4 dk	
			94°C 30 sn	
			55°C 1 dk 35X	
SAP1-F	GCTCTTGCTATTGCTTTATTA	253	72°C 2 dk	Dikmen ve ark., 2021 (69)
SAP1-R	CATCAGGAACCCATAAATCAG		72°C 5 dk	
			95°C 5 dk	
			95°C 4 dk	
			49°C 1 dk 30X	
			72°C 1 dk	
			72°C 5 dk	

3.8. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntüleme

Pediyatrik yoğun bakım hastalarından izole edilen biyofilm üretmeyen 32 numaralı izolat ile biyofilm üreticisi olan 30 numaralı izolat, elektron mikroskobu ile görüntülenebilmesi için seçildi. İzolatlar SDA besiyerine pasajlandı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Üreyen saf koloniler YPD besiyerine aktarıldı ve 30°C' de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra sıvı besiyeri içindeki maya hücreleri PBS ile üç kez yıkanarak ayrıldı. Kalan çökeltiye 37°C sıcaklıkta 1 ml RPMI eklendi ve daha sonra RPMI içinde 0.5 McFarland olacak şekilde (1.0×10^6 hücre/ml) süspansiyon

hazırlandı. Elde edilen süspansiyonlardan 2 ml, 12 kuyucuklu plağa dağıtıldı ve bu plağa önceden otoklavlayarak steril edilmiş lamel parçaları yerleştirildi ve sonra 37°C’ de 24 saat inkübe edildi. Sonrasında kuyucuklardaki besiyeri aspire edilerek lameller yıkandı. Başka bir plağa üzerinde biyofilm olan lameller aktarıldı. Yeni plaktaki kuyucuklara %4’ lük gluteraldehit 1 ml eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında bekletildi sonrasında gluteraldehit boşaltıldı ve sırayla kuyucuklara; %70, %80, %90, %96 ve %100 şekilde 1’er ml etil alkol (Isolab, Almanya) eklendi. Her basamakta oda ısısında 10 dakika beklendi. Son olarak plaktaki saf alkol aspire edilip karanlık bir ortamda kuruması için bırakıldı.

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi’nde SEM görüntülemesi yapıldı. Lamel parçaları kaplama cihazında altın/pal (Au/Pd) ile kaplandı. Taramalı elektron mikroskopunda (JEOL, ABD) 1000, 2000, 5000’lik büyütmelemlerde görüntüldü.

3.9. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizinde SPSS 26.0 paket programı kullanıldı. Niteliksel veriler sayı (n) ve yüzde (%) olarak sunuldu. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında Ki-Kare testi kullanıldı. İkili oran karşılaştırmalarında iki oran testi kullanıldı. İstatistiksel açıdan anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 *Candida* İzolatları ve Tür Dağılımı

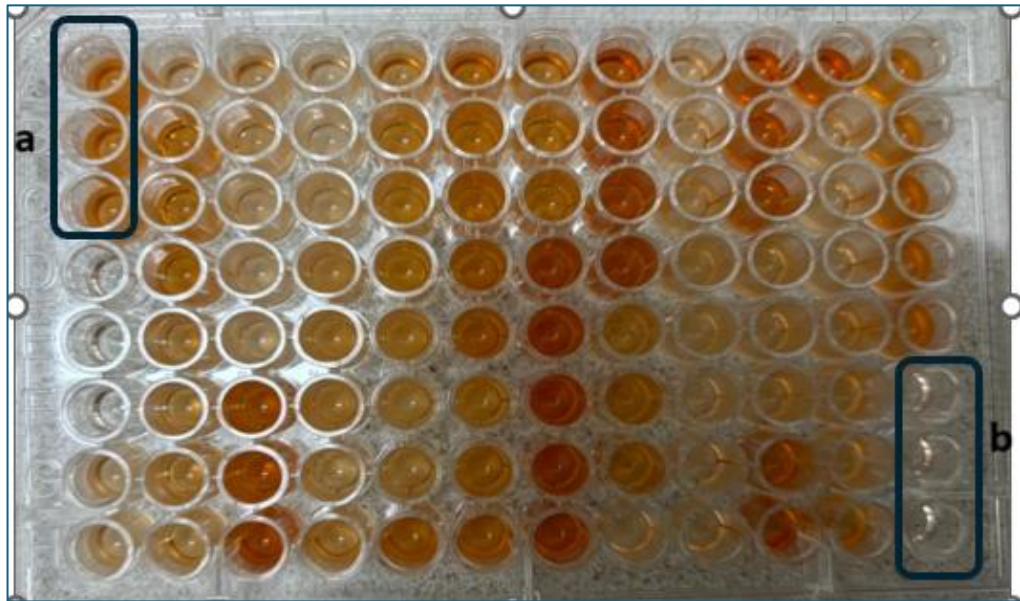
Çalışmada Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı Mikoloji Laboratuvarına 2019-2024 yılları arasında pediatrik(n:35) ve erişkin yoğun bakım(n:35) idrar örneklerinden izole edilmiş ve stoklanmış toplam 70 *Candida* izolatı çalışmaya alındı. Bunların 23'ü (%32,9) *C. albicans*, 47' si (%67,1) non-*albicans Candida* izolatıydı. *Candida* tür dağılımı Tablo 2'deki gibidir.

Tablo 2. *Candida* tür dağılımı

İzolat	Gönderilen Birim	
	Pediyatrik Yoğun Bakım	Erişkin Yoğun Bakım
<i>C. albicans</i> (n:23) (%32,9)	13	10
<i>C. tropicalis</i> (n:22) (%31,5)	12	10
<i>C. glabrata</i> (n:6) (%8,5)	2	4
<i>C. parapsilosis</i> (n:8) (%11,4)	4	4
<i>C. krusei</i> (n:4) (%5,7)	1	3
<i>C. lusitaniae</i> (n:7) (%10)	3	4
Toplam (n:70) (%100)	35	35

4.2. Mikroplakta XTT İndirgenmesi ile Biyofilm Oluşumunun Test Edilmesi - Sonuçlar

Kuyucuklara 100µl XTT/ menadion solüsyonu eklenerek 2 saat inkübasyon sonucu oluşan renk değişimi Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. Biyofilm oluşumunun modifiye XTT yöntemiyle değerlendirilmesi (a: Pozitif kontrol b: Negatif kontrol)

Tablo 3: Pediatrik yoğun bakım *Candida* izolatları biyofilm yapma özelliği

Suş No	Tür	Biyofilm Yapma Özelliği			
		Negatif	Zayıf Pozitif	Orta Pozitif	Güçlü Pozitif
1	<i>C. albicans</i>			+	
2	<i>C. albicans</i>				+
3	<i>C. albicans</i>				+
4	<i>C. albicans</i>			+	
5	<i>C. albicans</i>				+
6	<i>C. albicans</i>			+	
7	<i>C. albicans</i>				+
8	<i>C. albicans</i>				+
9	<i>C. albicans</i>				+
10	<i>C. albicans</i>				+
11	<i>C. albicans</i>				+
12	<i>C. albicans</i>			+	
13	<i>C. albicans</i>	+			
14	<i>C. tropicalis</i>	+			
15	<i>C. tropicalis</i>				+
16	<i>C. tropicalis</i>			+	
17	<i>C. tropicalis</i>	+			
18	<i>C. tropicalis</i>				+
19	<i>C. tropicalis</i>				+
20	<i>C. tropicalis</i>		+		
21	<i>C. tropicalis</i>				+
22	<i>C. tropicalis</i>		+		
23	<i>C. tropicalis</i>			+	
24	<i>C. tropicalis</i>				+
25	<i>C. tropicalis</i>			+	
26	<i>C. parapsilosis</i>	+			
27	<i>C. parapsilosis</i>	+			
28	<i>C. parapsilosis</i>				+
29	<i>C. parapsilosis</i>		+		
30	<i>C. glabrata</i>				+
31	<i>C. glabrata</i>				+
32	<i>C. lusitaniae</i>	+			
33	<i>C. lusitaniae</i>			+	
34	<i>C. lusitaniae</i>			+	
35	<i>C. krusei</i>			+	

Tablo 4: Erişkin yoğun bakım *Candida* izolatları biyofilm yapma özelliği

Suş No	Tür	Biyofilm Yapma Özelliği			
		Negatif	Zayıf Pozitif	Orta Pozitif	Güçlü Pozitif
1	<i>C. albicans</i>			+	
2	<i>C. albicans</i>			+	
3	<i>C. albicans</i>				+
4	<i>C. albicans</i>				+
5	<i>C. albicans</i>				+
6	<i>C. albicans</i>				+
7	<i>C. albicans</i>		+		
8	<i>C. albicans</i>				+
9	<i>C. albicans</i>				+
10	<i>C. albicans</i>		+		
11	<i>C. tropicalis</i>		+		
12	<i>C. tropicalis</i>				+
13	<i>C. tropicalis</i>				+
14	<i>C. tropicalis</i>			+	
15	<i>C. tropicalis</i>			+	
16	<i>C. tropicalis</i>		+		
17	<i>C. tropicalis</i>		+		
18	<i>C. tropicalis</i>				+
19	<i>C. tropicalis</i>				+
20	<i>C. tropicalis</i>				+
21	<i>C. parapsilosis</i>	+			
22	<i>C. parapsilosis</i>				+
23	<i>C. parapsilosis</i>		+		
24	<i>C. parapsilosis</i>		+		
25	<i>C. glabrata</i>				+
26	<i>C. glabrata</i>				+
27	<i>C. glabrata</i>				+
28	<i>C. glabrata</i>				+
29	<i>C. lusitaniae</i>			+	
30	<i>C. lusitaniae</i>		+		
31	<i>C. lusitaniae</i>			+	
32	<i>C. lusitaniae</i>		+		
33	<i>C. krusei</i>				+
34	<i>C. krusei</i>		+		
35	<i>C. krusei</i>				+

Tablo 5: Mikroplakta XTT indirgenmesi yöntemine pediatrik ve erişkin yoğun bakım hastalarından elde edilen suşların biyofilm yapma özelliği

Biyofilm	Pediatrik Yoğun Bakım		Erişkin Yoğun Bakım		Toplam	
	n	%	n	%	n	%
Güçlü	16	45,7	18	51,5	34	48,6
Orta	10	28,6	6	17,1	16	22,9
Zayıf	3	8,5	10	28,5	13	18,5
Negatif	6	17,2	1	2,9	7	10
Toplam	35	100	35	100	70	100

Pediatrik ve erişkin yoğun bakım *Candida* izolatlarının biyofilm yapma özellikleri Tablo 3 ve Tablo 4’ de verilmiştir. Erişkin yoğun bakım üriner izolatlarının %51,5’inde güçlü, %17,1’ inde orta, %28,5’ inde zayıf biyofilm oluşumu; pediatrik yoğun bakım üriner izolatlarının %45,7’ sinde güçlü, %28,6’ sında orta, %8,5’ inde zayıf biyofilm oluşumu görüldü (Tablo 5). Biyofilm üretim oranı erişkin grupta (%97,1) pediatrik gruba (%82,8) göre fazla iken aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p=0,106$).

Tablo 6: *Candida* türlerinde mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi ile saptanan biyofilm sonuçları

<i>Candida</i> Türleri	XTT Deneyi			
	Güçlü pozitif n (%)	Orta pozitif n (%)	Zayıf pozitif n (%)	Negatif n (%)
<i>C. albicans</i> (n:23)	14 (61)	6 (26)	2 (8,7)	1 (4,3)
<i>C. tropicalis</i> (n:22)	10 (45,5)	5 (22,7)	5 (22,7)	2 (9,1)
<i>C. glabrata</i> (n:6)	6 (100)	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (n:8)	2 (25)	0	3 (37,5)	3 (37,5)
<i>C. krusei</i> (n:4)	2 (50)	1 (25)	1 (25)	0
<i>C. lusitaniae</i> (n=7)	0	4 (57,2)	2 (28,5)	1 (14,3)
Toplam (n=70)	34 (48,6)	16 (22,8)	13 (18,6)	7 (10)

Biyofilm üretimi türlere göre incelendiğinde *C. albicans* izolatlarının %95,6 ‘sı, *C. tropicalis* izolatlarının %90,9’sı, *C. glabrata* izolatlarının %100’ü, *C. parapsilosis* izolatlarının %62,5’i, *C. krusei* izolatlarının %100’ü, *C. lusitaniae* izolatlarının %85,7’ si biyofilm üretti (Tablo 6). Biyofilm üretimi açısından türler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. ($p=0,179$). Non-*albicans Candida* izolatlarının genel biyofilm üretim oranı %87,2 bulundu. *C. albicans* ve non-*albicans Candida* izolatlarında biyofilm üretimi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p=0,413$).

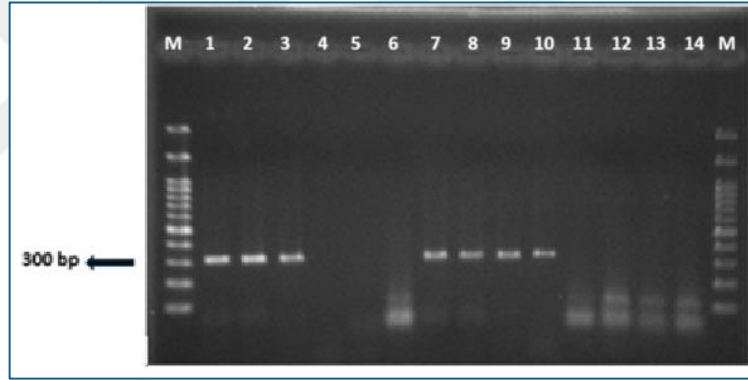
Pediatrik yoğun bakım hasta grubunda *C. albicans* ve non-*albicans Candida* izolatlarının biyofilm oluşum oranı sırasıyla %92,3 ve %77,2 saptandı. Aradaki fark

istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p=0,377$). Tür düzeyinde en fazla biyofilm oluşumu *C. glabrata* (%100), *C. krusei* (%100) izolatlarında görüldü. Genel biyofilm üretim oranı %82,8 bulundu.

Erişkin yoğun bakım hasta grubunda *C. albicans* ve non-*albicans Candida* izolatlarının biyofilm oluşum oranı sırasıyla %100 ve %96 saptandı. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p=0,121$). Tür düzeyinde biyofilm oluşumu *C. parapsilosis* hariç diğer türler için %100' dü (*C. parapsilosis* %75). Genel biyofilm üretim oranı %97,1 bulundu.

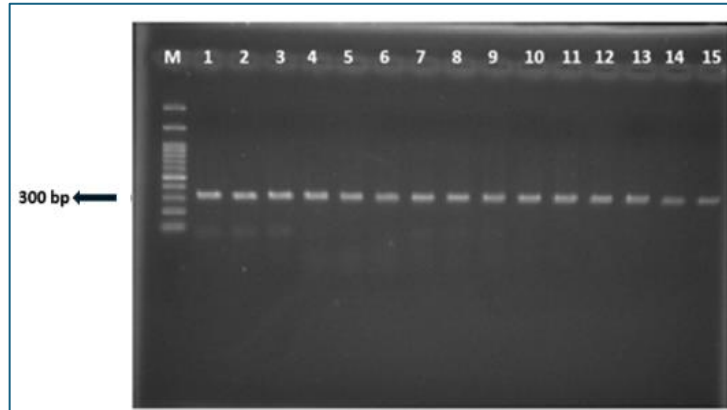
4.3. Virulans Genlerinin Tespiti İçin Yapılan PZR Sonuçları

ALS1 geni için yapılan PZR ve elektroforez işlemleri sonunda pozitif kontrol suşunda ve 20 izolatta 318 bp bölgesinde pozitif bant saptandı, PZR jel görüntüsü Şekil 8 ve Şekil 9' da verildi.



Şekil 8. ALS1 geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü

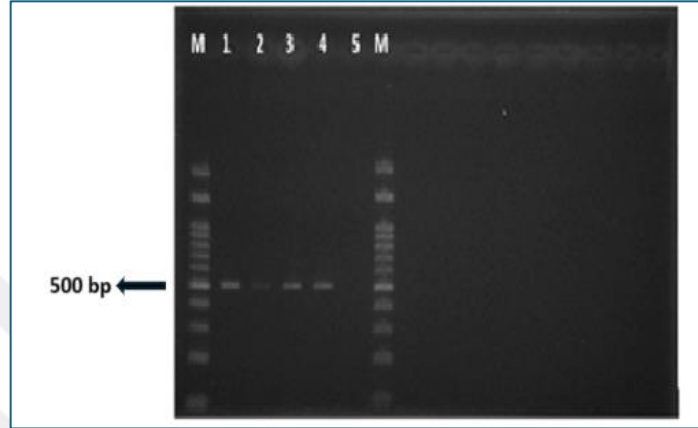
(M: Marker, 1. bant: ALS1 pozitif kontrol, 2,3,7,8,9,10. bantlar: ALS1 pozitif hasta izolatları, 4-6,11-14. bantlar ALS1 negatif hasta izolatları, ALS1 :318 bp)



Şekil 9. ALS1 geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü

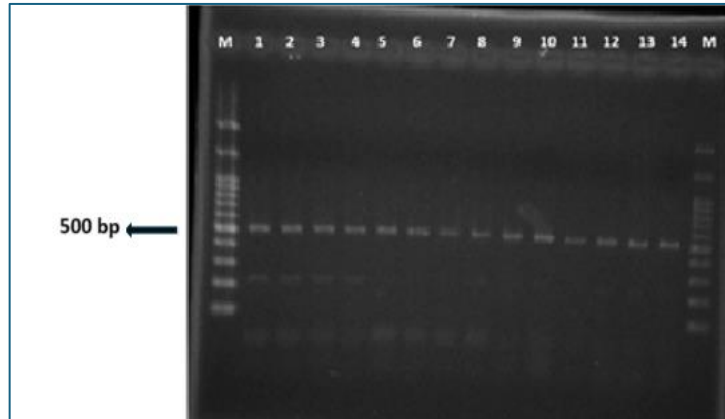
(M: Marker, 1. bant: ALS1 pozitif kontrol, 2-15. bantlar: ALS1 pozitif hasta izolatlari, ALS1 :318 bp)

HWP1 geni için yapılan PZR ve elektroforez işlemleri sonunda pozitif kontrol suşunda ve 15 izolatta 572 bp bölgesinde pozitif bant saptandı, PZR jel görüntüsü Şekil 10, Şekil 11 ve Şekil 12’ de verildi.



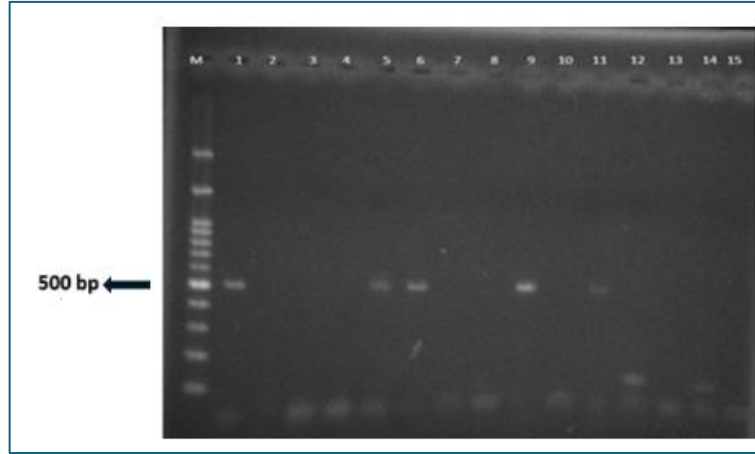
Şekil 10. HWP1 geni yönünden pozitif izolatlarn PZR jel görüntüsü

(M: Marker, 1. bant: HWP1 pozitif kontrol, 3,4. bantlar: HWP1 pozitif hasta izolatlari, 5. bant HWP1 negatif hasta izolati, HWP1 :572 bp)



Şekil 11. HWP1 geni yönünden pozitif izolatlarn PZR jel görüntüsü

(M: Marker, 1. bant: HWP1 pozitif kontrol, 2-14. bantlar: HWP1 pozitif hasta izolatlari, HWP1 :572 bp)



Şekil 12. HWP1 geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü

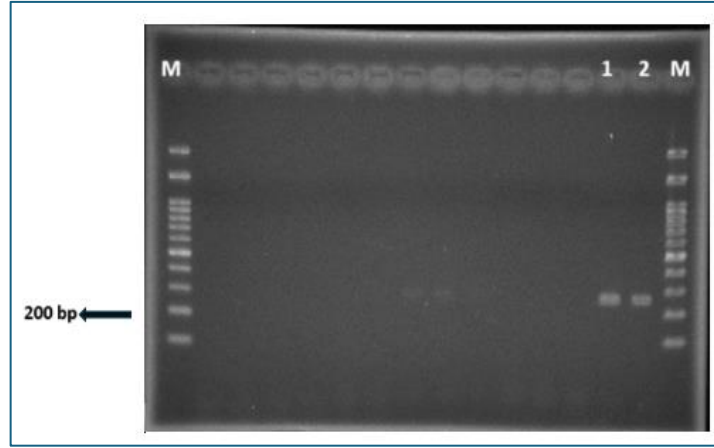
(M: Marker, 1. bant: HWP1 pozitif kontrol, 5,6,9,11. bantlar: HWP1 pozitif hasta izolatları, 2-4,7,8,10,12-15. bant HWP1 negatif hasta izolatı, HWP1 :572 bp)

SAP1 geni için yapılan PZR ve elektroforez işlemleri sonunda pozitif kontrol suşunda ve 19 izolatta 253 bp bölgesinde pozitif bant saptandı, PZR jel görüntüsü Şekil 13 ve Şekil 14’te verildi.



Şekil 13. SAP1 geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü

(M: Marker, 1. bant: SAP1 pozitif kontrol, 2-5,8,9,12,14. bantlar: SAP1 pozitif hasta izolatları, 6,7,10,11,13. bant SAP1 negatif hasta izolatı, SAP1 :253 bp)



Şekil 14. SAP1 geni yönünden pozitif izolatların PZR jel görüntüsü

(M: Marker, 1. bant: SAP1 pozitif kontrol, 2. bant: SAP1 pozitif hasta izolatu, 3-14. bant SAP1 negatif hasta izolatları, SAP1 :253 bp)

Tablo 7. İdrar örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinde virülans faktörlerin dağılımı

<i>Candida</i> türleri (n)	ALS1	HWP1	SAP1
	Pediatric n (%) / Erişkin n (%)	Pediatric n (%) / Erişkin n (%)	Pediatric n (%) / Erişkin n (%)
<i>C. albicans</i> (23)	9 (%39,1) / 7 (%30,4)	6 (%26) / 6 (%26)	8 (%34,7) / 8 (%34,7)
<i>C. tropicalis</i> (22)	2 (%9) / 0 (%0)	2 (%9) / 0 (%0)	2 (%9) / 0 (%0)
<i>C. parapsilosis</i> (8)	1 (12,5) / 0 (%0)	0 (%0) / 0 (%0)	0 (%0) / 0(%0)
<i>C. glabrata</i> (6)	1(%16,6) / 0 (%0)	1(%16,6) / 0 (%0)	0 (%0) / 1 (%16,6)
<i>C. lusitaniae</i> (7)	0 (%0) / 0 (%0)	0 (%0) / 0 (%0)	0 (%0) / 0 (%0)
<i>C. krusei</i> (4)	0 (%0) / 0 (%0)	0 (%0) / 0 (%0)	0(%0) / 0 (%0)

Candida türlerinde virülans faktörlerin pediatrik ve erişkin yoğun bakım izolatlarına göre dağılımı Tablo 7’ de verilmiştir. *C. albicans* izolatlarında en yüksek oranda (%69,5) SAP1 ve ALS1 geni varlığı tespit edilirken HWP1 oranı %52 tespit edildi. *C. tropicalis* izolatlarında ALS1, HWP1 ve SAP1 oranı 3 gende de %9 bulundu. ALS1 pozitifliği *C. albicans*’ ta %69,6; non-*albicans Candida*’ da %8,5 bulunmuş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). HWP1 gen pozitifliği oranı *C. albicans*’ ta %52,2; non-*albicans Candida*’ da %6,4 bulunmuş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). SAP1 pozitifliği *C. albicans*’ ta %69,6; non-*albicans Candida*’ da %6,4 bulunmuş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$).

Tablo 8. *Candida* türlerinde virülans genlerinin dağılımı ve biyofilm oluşumu

İzolat	ALS1 + n (%)	HWP1 + n (%)	SAP1 + n (%)	Biyofilm + n (%)
<i>C. albicans</i> (23)	16 (69,5)	12 (52)	16 (69,5)	22 (95,6)
<i>C. tropicalis</i> (22)	2 (9)	2 (9)	2 (9)	20 (90,9)
<i>C. parapsilosis</i> (8)	1 (12,5)	0	0	5 (62,5)
<i>C. glabrata</i> (6)	1 (16,6)	1 (16,6)	1 (16,6)	6 (100)
<i>C. lusitaniae</i> (7)	0	0	0	6 (85,7)
<i>C. krusei</i> (4)	0	0	0	4 (100)
Toplam (70)	20 (28,5)	15 (21,4)	19 (27,1)	63 (90)

XTT yöntemi ile biyofilm oluşumunun tespit edildiği 63 *Candida* izolatının 26 'sında (%41,2) ALS1, HWP1, SAP1 genlerinden en az biri pozitif bulundu (Tablo 8). Bu genlerden herhangi birinin varlığı ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p=0,236$). Biyofilm üreten 22 *C. albicans* izolatının 15' inde (%68,1) ALS1, 12' sinde (%54,5) HWP1, 16' sında (%68,1) SAP1 geni tespit edildi. Biyofilm üretenler arasında ALS1 ve SAP1 genine sahip olanlar ve olmayanlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu $p<0,001$. Biyofilm üretenler arasında HWP1 genine sahip olanlar ve olmayanlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmadı ($p=155$). Biyofilm üreten 22 *C. albicans* izolatından 18'inde (%81,8) ALS1, HWP1, SAP1 genlerinden en az biri pozitif bulundu. Biyofilm üretmeyen bir *C. albicans* izolatında gen pozitifliği saptandı. Biyofilm üreten *C. albicans* izolatlarında bir veya daha fazla gen pozitifliği olan ve herhangi bir gen pozitifliği olmayanlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu ($p<0,001$) Biyofilm üreten 20 *C. tropicalis* izolatından 5'inde (%25) ALS1, HWP1, SAP1 genlerinden en az biri pozitif bulunmuşken biyofilm üretimi olmayan *C. tropicalis* izolatlarında gen pozitifliği oranı %0 tespit edilmiş olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı ($p=1,000$). ALS1, HWP1, SAP1 genlerinden bir veya birden fazlasına sahip olan toplam 27 izolatın 26' sında (%96,3) biyofilm üretimi saptandı. ALS1, HWP1, SAP1 genlerinden bir veya birden fazlasına sahip bir (%3,7) izolatta biyofilm oluşumu tespit edilmedi. Bu üç genden bir veya birden fazlasının varlığında biyofilm oluşturan ve oluşturmayanlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu ($p<0,001$).

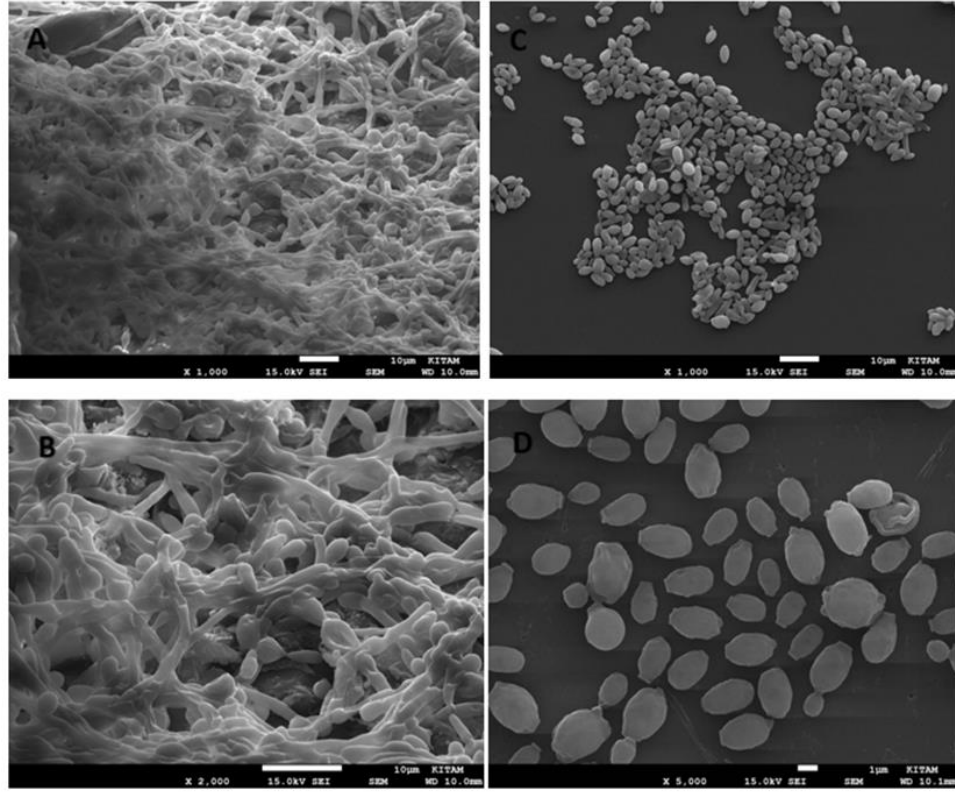
Tablo 9. ALS1, HWP1, SAP1 genlerinin fenotipik testle karşılaştırılması

Gen varlığı		XTT Yöntemi		
		Pozitif (n)	Negatif (n)	Toplam n (%)
ALS1	Pozitif	19	1	20 (28,5)
	Negatif	44	6	50 (71,5)
HWP1	Pozitif	15	0	15 (21,4)
	Negatif	48	7	55 (78,6)
SAP1	Pozitif	18	1	19 (27,1)
	Negatif	45	6	51 (72,9)
Toplam n (%)		63 (90)	7 (10)	70 (100)

ALS1 pozitif olan 20 izolatın 19' unda (%95) biyofilm oluşumu gözlemlendi. ALS1 geni pozitif olanlarda biyofilm üreten ve üretmeyen izolatlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu ($p<0,001$). HWP1 pozitif olan 15 izolatın 15' inde (%100) biyofilm oluşumu gözlemlendi. HWP1 geni pozitif olanlarda biyofilm üreten ve üretmeyen izolatlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu ($p<0,001$). SAP1 pozitif olan 19 izolatın 18' inde (%94,7) biyofilm oluşumu gözlemlendi. SAP1 geni pozitif olanlarda biyofilm üreten ve üretmeyen izolatlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu ($p<0,001$), (Tablo 9).

4.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntüleme

Elektron mikroskobu ile biyofilm üretmeyen 32 numaralı ve biyofilm üreten 30 numaralı izolatların 1000'lik, 2000'lik, 5000'lik büyütmelelerdeki görüntüleri Şekil 15' te verilmiştir. Görseller incelendiğinde 2 numaralı *C. albicans* izolatında (A, B) biyofilm üretimi gözlemlendi; 32 numaralı *C. lusitaniae* izolatında (C, D) ise biyofilm üretimi gözlenmedi.



Şekil 15. Biyofilm üreten 2 numaralı izolat ve biyofilm üretmeyen 32 numaralı *Candida* izolatının SEM görüntüsü

(A: 1000'lik büyütme; B: 2000'lik büyütme; C: 1000'lik büyütme; D: 5000'lik büyütme)

5. TARTIŞMA

İdrar yolu enfeksiyonu (İYE), en yaygın sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonlardan biridir. Hastane kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarında *Candida* türleri en sık izole edilen beş mikroorganizmadan biridir. Yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) izlenen hastalarda yara, entübasyon, vasküler ve üriner kateter gibi nedenlerle deri ve mukoza bütünlüğünün bozulması ile geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı, *Candida* kolonizasyonunu artıran başlıca etkenlerdir. Yedi günden uzun yoğun bakım yatışı olan hastalarda kandidüri insidansının %22 olduğu ve kandidürisi olan hastalarda mortalitenin, kandidürisi olmayanlara oranla önemli ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (61, 70).

Candida türleri kommensal organizmalardır ve enfeksiyona yol açmaları sahip oldukları virülans faktörlerine, enfeksiyon türüne, enfeksiyonun yerine ve aşamasına ve konak yanıtına bağlı olarak değişebilir. *Candida*'nın virülansına katkıda bulunan önemli faktörlerden biri, "biyofilm" olarak adlandırılan yüzeye bağlı mikrobiyal toplulukların oluşumudur (71).

Bu çalışmada erişkin ve pediatrik yoğun bakım hastalarından izole edilen *Candida* türlerinin biyofilm oluşturma kapasiteleri ile bazı virülans genlerinin (ALS1, HWP1, SAP1) varlığı araştırılmıştır.

Ökaryot hücre aktivitesinin belirlenmesinde kalorimetrik analizler 1980lerden bu yana kullanılmaktadır. Mantarların biyofilm ve antifungal aktivitesini ölçmek için XTT kullanan çalışmalar, kolorimetrik sinyal ile hücre sayısı ve aktivitesi arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. XTT, metabolik aktivite varlığında renkli bir formazana dönüştürülür. Formazan suda çözünmesi sayesinde kolayca ölçülür ve bu durum biyofilm araştırmalarında özellikle önemlidir çünkü biyofilm yapısının bozulmadan incelenmesine olanak tanır (41, 58).

Aslan (41), toplam 50 üriner *Candida* izolatında (*C. albicans* n: 10, non-*albicans Candida* n: 40) XTT ve Kongo kırmızısı agar yöntemleri ile biyofilm oluşumunu değerlendirilmiştir. XTT yöntemiyle tüm izolatların biyofilm pozitif olduğu belirlenirken, Kongo kırmızısı yönteminde yalnızca 12 izolatta biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Aslanın çalışmasında kongo kırmızısı agar yönteminin biyofilm oluşumunu göstermede XTT yöntemine göre duyarlılığının düşük olduğu görülmüştür.

Bizim çalışmamızda tüm izolatlar için XTT ile biyofilm oluşturma oranı %90 (n:63) bulunmuştur.

Biyofilmlerdeki maya hücreleri, antifungallere karşı artan direnç ve konak savunmalarına karşı koruma gibi, planktonik yapılarına göre önemli ölçüde farklı fenotipik özellikler gösterir. Jain ve ark. (72) kandidürisi olan hastalardan elde edilen 67 *Candida* izolatında biyofilm oluşumunu XTT yöntemi ile araştırmışlardır. Tür dağılımı *C. albicans* (%54), *C. glabrata* (%36) ve *C. tropicalis* (%10) şeklinde olup, en fazla biyofilm oluşumu *C. glabrata* izolatlarında görülmüştür. Bizim çalışmamızda en yüksek biyofilm oluşturma oranı *C. glabrata* ve *C. krusei* izolatlarında (%100) gözlenmiştir.

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 116 *Candida* izolatında biyofilm oluşumunun modifiye mikropak yöntemi kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada 33 (%28) izolatın biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Non-*albicans Candida* izolatlarında (%41) biyofilm oluşumu *C. albicans*' a (%23) göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca kan kültürlerinden izole edilen *Candida*' larda diğer klinik örneklerden izole edilen *Candida*' lara göre daha yüksek oranda biyofilm oluşumu saptamışlardır (73).

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 128'i *C. albicans* olmak üzere toplam 216 izolatta biyofilm oluşumunu modifiye XTT ve modifiye mikropak yöntemi ile araştırıldığı bir çalışmada XTT yöntemi ile toplam 49 izolatta biyofilm oluşumu saptamışlardır. Biyofilm oluşum oranı non-*albicans Candida*' da (%33) *C. albicans*' a (%15,6) göre daha yüksek saptanmıştır. En fazla biyofilm oluşumu *C. tropicalis*' de (%40) görülmüştür. Bunu *C. parapsilosis* (%31,8) *C. glabrata* (%31) izlemektedir (2).

Freitas ve ark.'nın idrardan izole edilen 40 *C. albicans*, 31 *C. glabrata*, 24 *C. tropicalis* olmak üzere toplam 95 maya izolatında biyofilm oluşumunu mikropak yöntemi ile araştırdıkları çalışmada *C. tropicalis* (%91,7) izolatları, *C. albicans* (%82,5) ve *C. glabrata* (%61,3) ile karşılaştırıldığında daha yüksek biyofilm üretimi göstermiştir (74).

Bir çalışmada idrar örneklerinden elde edilen 87 (%31,03'ü (n=27) *C. albicans* ve %68,97' si (n=60) non-*albicans Candida*) klinik izolatın biyofilm oluşturma yeteneği mikrotitre plak yöntemi ile tespit edilmiştir. 87 izolatın 32' sinin (%36,78) biyofilm ürettiği ve biyofilm pozitifliğinin *C. albicans*' ta (%55,56 (n=15)) non-*albicans*

Candida (%28,33 (n=17)) ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmüştür. Tür düzeyinde biyofilm üretimi en sık *C. tropicalis* izolatlarında gözlenmiş olup (%69,23 (13'ün 9'u)), bunu *C. albicans* (%55,56 (27'nin 15'i)) izlemiştir (75).

Bir çalışmada 30' u idrar olmak üzere çeşitli klinik örneklerden elde edilen 44' ü *C. albicans* 56' sı non-*albicans Candida* olmak üzere toplam 100 *Candida* izolatında biyofilm oluşumu mikropalak ve tüp yöntemiyle araştırılmış ve 30 idrar izolatının mikropalak yöntemi ile %70 oranında biyofilm ürettiği görülmüştür. Aynı çalışmada *C. albicans* ve non-*albicans Candida* izolatlarının biyofilm oluşturma oranı sırasıyla %52.3 ve %62.5 bulunmuştur (76).

Kateterize hastalarda kandidürinin önemini araştırmak için yapılan bir çalışmada İYE ile başvuran hastalardan alınan 100 idrar örneği incelenmiş ve %26' sının *Candida* (16'sı (%61,53) non-*albicans Candida*, 10' u (%38,47) *C. albicans*) türleri tarafından oluşturulduğu gözlemlenmiştir. 26 *Candida* izolatından 14' ünün (%53,84) biyofilm ürettiği bulunmuştur. Biyofilm üretiminin non-*albicans Candida* ' da (%62,5) *C. albicans* ' a (%40,0) göre fazla olduğu görülmüştür. Tür düzeyinde en fazla biyofilm oluşumu *C. glabrata* ' da (n:2; %100) tespit edilmiş olup bunu *C. tropicalis* (n:6, %75) izlemektedir (77).

Agwan ve ark. çeşitli klinik örneklerden elde ettikleri 118 *Candida* izolatında (40 *C. albicans*, 78 non-*albicans Candida*) biyofilm oluşumunu araştırmışlardır. *C. albicans* izolatlarının %13,5'inin, non-*albicans Candida* izolatlarının ise %33'ünün biyofilm oluşturduğunu bildirmişlerdir (78).

Alpay ve ark. 32' si idrardan olmak üzere 53 *Candida* izolatında (34'ü (%64,1) *C. albicans*, 19' u (%35,9) non-*albicans Candida*) biyofilm oluşumunu modifiye tüp aderans yöntemi ile araştırmışlardır. Tüm izolatlarda biyofilm oluşumunu %47,2; *C. albicans* 'ta %38,2; non-*albicans Candida* ' da %63,1 olarak saptamışlardır (6) .

Bizim çalışmamızda 23' ü *C. albicans*, 47' si non-*albicans Candida* olmak üzere toplam 70 üriner izolatta biyofilm oluşumu araştırılmıştır. Biyofilm oluşum oranı *C. albicans* izolatlarında %95,6; non-*albicans Candida* izolatlarında %87,2 saptanmıştır. En fazla biyofilm oluşum oranı *C. glabrata* (%100) ve *C. krusei* ' de (%100) görülmüş olup bunları *C. albicans* (%95,6) izlemektedir. Farklı yazarlar çok çeşitli klinik örneklerde biyofilm oluşumunu araştırmış ve farklı oranlarda *Candida* biyofilm

üretimi bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda diğer çalışmalarla biyofilm üretim oranı arasındaki fark; farklı örnek türleri, yoğun bakım hastalarından izole edilmeleri, izolatların yarısının pediatrik yoğun bakımdan olması (ki pediatrik hastalardaki idrar almadaki zorluk, kolonizasyon enfeksiyon ayrımının zor olması), *Candida* türlerini arasında biyofilm oluşum oranlarının farklı olması sayılabilir. Non-*albicans Candida* izolatlarının yüksek oranda biyofilm oluşturmaları, bunların neden olduğu ciddi enfeksiyon oranlarındaki artışı açıklayabilir.

Kamini ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada İYE olan hastadan elde edilen 55 *Candida* izolatında (*C. albicans* 14, *C. tropicalis* 23, *C. glabrata* 10 ve *C. kefyr* 1, *C. auris* 2, *C. catenulata* 4, *C. lusitaniae* 1) biyofilm oluşumu tüp yöntemiyle araştırılmış olup, büyük bir kısmının biyofilm ürettiği (48/55 (87%)) görülmüştür. 14 *C. albicans* izolatının 4' güçlü, 8' i orta, 2'si zayıf olmak üzere %100' ü; 41 non-*albicans Candida* izolatının 14' ü güçlü, 9'u orta, 11'i zayıf olmak üzere %83' ü biyofilm üretmiştir (79).

Bir çalışmada 47si üriner izolat olmak üzere toplam 55 *Candida* izolatında XTT ile biyofilm oluşumu araştırılmıştır. 14' ü *C. albicans*, 41' i non-*albicans Candida* olmak üzere izolatlarının %100' ünün XTT testi ile biyofilm ürettiği görülmüştür. 14 *C. albicans* izolatının, 10' u güçlü, 2' si orta ve 2' si zayıf, 41 non-*albicans Candida* izolatının 33' güçlü, 6' sı orta ve 2' si zayıf biyofilm ürettiği saptanmıştır (80).

Bizim çalışmamızda 23 *C. albicans* izolatının 14'ü güçlü, 6' sı orta, 2' si zayıf olmak üzere %95,6' sının; 47 non-*albicans Candida* izolatının 20' si güçlü, 10' u orta, 11' i zayıf olmak üzere %87,2' sinin biyofilm ürettiği saptandı.

Husseiny Aya ve ark. (81) yenidoğan yoğun bakım, ayaktan hasta ve servis hastalarını içeren pediatrik 100 hastadan izole edilen toplam 100 üriner *Candida* (*C. albicans* n:48, non-*albicans Candida* n: 52) izolatında biyofilm oluşumunu mikropak yöntemi ile araştırmışlardır. Biyofilm oluşum oranı *C. albicans* izolatlarında %6,2; non-*albicans Candida* izolatlarında %48 saptanmıştır. Tür düzeyinde en fazla biyofilm üretim oranı *C. tropicalis* ' te (%60) saptanmıştır. Bizim çalışmamızda pediatrik yoğun bakım hastalarında elde edilen *C. albicans* ve non-*albicans Candida* izolatlarında biyofilm oluşum oranı sırasıyla %92,3 ve %77,2 saptanmıştır. Tür düzeyinde en fazla biyofilm oluşumu *C. glabrata* (%100), *C. krusei* (%100) izolatlarında görülmüştür.

Çalışmamızda ayrıca pediatrik ve erişkin yoğun bakım izolatlarının biyofilm oranları karşılaştırılmış ve erişkin hastalarda (%97,1) pediatrik hastalara (%85,7) kıyasla daha yüksek oranda biyofilm oluşumu görülmüştür. Pediatrik grupta biyofilm oranının daha düşük saptanmasının nedeni bu hasta grubunda idrar almaktaki zorluk ve enfeksiyon-kolonizasyon ayrımının tam yapılamaması olabilir.

Biyofilm üreten *Candida* türleri ile enfekte hastalardaki altta yatan bazı temel nedenler yoğun bakım hastaları olmaları, uzun süreli antibiyoterapi almaları, kateterizasyondur. Bu çalışmada izolatlarının büyük çoğunluğu biyofilm üretmiştir bunun nedeni hepsinin yoğun bakım hastaları olmaları ve hastanede kazanılmış enfeksiyonlardan izole edilmiş olması olabilir.

Yapılan çalışmalarda, *Candida* türlerinde tespit edilen biyofilm oranlarının %6 ila %100 arasında değiştiği görülmektedir. Bu biyofilm oranları türlerin izole edildiği bölgelere, yaş grubuna, biyofilm saptamak için kullanılan yöntem, enfeksiyon etkeni olup olmamalarına ve *Candida* türüne göre farklılık göstermektedir. Bu durum biyofilm oranlarındaki farklılığı açıklamaktadır.

Candida hücrelerinin sahip olduğu konağın çeşitli mukozal yüzeylerine ve sentetik materyallere yapışma yeteneği, enfeksiyon gelişimine katkıda bulunan önemli bir patojenite özelliğidir. Bu yetenek *C. albicans* için en fazladır ancak mantar türüne göre değişir. Yapışma sürecinde çevresel koşullar, mantar ve konak hücrelerine bağlı faktörler rol almaktadır. ALS1, HWP1, SAP1 mantarların hücre duvarında bulunan adezinlerden bazılarıdır.

HWP1 ekspresyonu mantar ve epitel hücreleri arasındaki fiziksel temasla artan adezyon sürecinden sorumlu en önemli genlerden biridir. Kandidozu olan kişilerden izole edilen suşlarda HWP1 geninin ekspresyonun daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (82).

Konak-patojen etkileşiminde bir rol oynayan diğer bir gen ALS genleridir. ALS genleri, yapışma ve erken biyofilm oluşumunda rol oynadığı bilinen bir gen ailesidir. Yapılan çalışmalarda *C. albicans* ALS1 gen ifadesinin endotel ve epitel hücrelerine yapışmada görevli olduğu ve biyofilm oluşum sürecinde düzeyinin arttığı gösterilmiştir (83).

İran’ da çeşitli klinik örneklerden toplanan 103 *Candida* izolatında (*C. albicans* n = 65, 63%; non-*albicans Candida* n :38, %37) ALS1, HWP1 genlerinin varlığı araştırılmıştır. Bunlardan 46’sı (*C. albicans* (n = 29), *C. glabrata* (n = 9), *C. tropicalis* (n = 3), *C. krusei* (n = 2) and *C. lusitaniae* (n:1), *C. dubliniensis* (n:1), *C. kefyr* (n:1) üriner izolatıdır. ALS1, HWP1 varlığının sırasıyla türlere göre dağılımı *C.albicans* 60 (92%), 62 (95%); *C. glabrata* 8(40%), 11 (55%); *C. tropicalis* 0 (0%), 2 (25%); *C. krusei* 0 (0%), 0 (0%); *C. lusitaniae* 2 (67%), 3(100%); *C. kefyr* 0 (0%), 0 (0%) şeklinde bulunmuştur (83).

İnci ve ark. nın çeşitli klinik örneklerden topladıkları 206 *C. albicans* izolatında ALS1, HWP1 genlerinin varlığını ve bu izolatlarda mikropalak ve tüp aderans yöntemi ile biyofilm oluşumunu araştırmışlardır. Tüm izolatlarda ALS1 ve HWP1 genlerinin varlığı sırasıyla %53,9, %5,3’ tür. ALS1 ve/veya HWP1 geninin bulunduğu izolatların %62,2’ inde biyofilm oluşumu gösterilmiştir. Biyofilm oluşumunun tespit edildiği izolatların %76,7’ inde araştırılan genlerin var olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada 206 *C. albicans* izolatının 82’ si idrar izolatıdır. Üriner izolatta ALS1 ve HWP1 genlerinin varlığı sırasıyla %52,4 (n:43), %4,8 (n:4)’ tür. Tüm üriner izolatta mikropalakta biyofilm oluşum oranı %31,7 (n:26) bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada ALS1 pozitif olan 111 izolatın 59’ unda (%53,1), HWP1 pozitif 11 izolatın 8’inde (%72,7) biyofilm oluşumu gösterilmiştir (68).

Turan ve ark. 50’ si üriner izolat olmak üzere toplam 100 *C. albicans* izolatında ALS1 ve HWP1 genini araştırdıkları çalışma gen varlığını sırasıyla %29 ve %31 bulmuşlardır (84) .

Hamady ve Marei (85) hastanede yatan üriner kateteri olan hastalardan topladıkları 28 *C. albicans* izolatında ALS1 ve HWP1 genlerini araştırmışlar ve gen varlığını sırasıyla %46,4 ve %57,1 bulmuşlardır.

Shrief ve ark. hastane kaynaklı enfeksiyonlardan 56’ sı kan, 44’ü üriner izolat olmak üzere toplam 100 *C. albicans*’ta biyofilm oluşumunu ve virülans genlerinin varlığını araştırmışlardır. Biyofilm oluşum oranını %58; ALS1, HWP1 ve SAP1 varlığını sırasıyla %77, %65, %65 oranında tespit etmişlerdir. Ayrıca biyofilm oluşturan izolatların biyofilm oluşturmayan izolatlara kıyasla ALS1, HWP1 yaygınlığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu tespit etmişlerdir (86).

Bizim çalışmamızda XTT yöntemi ile biyofilm oluşumunun tespit edildiği 63 *Candida* izolatının 26 'sında (%41,2) ALS1, HWP1, SAP1 genlerinden en az biri pozitif bulundu. ALS1, HWP1, SAP1 genlerinden bir veya birden fazlasına sahip olan toplam 27 izolatın 26' sının (%96,3) biyofilm ürettiği görüldü. Biyofilm üreten 22 *C. albicans* izolatının 15' inde (%68,1) ALS1, 12' sinde (%54,5) HWP1, 16' nda (%68,1) SAP1 geni tespit edildi. Biyofilm üreten 22 *C. albicans* izolatından 18'inde (%81,8) ALS1, HWP1, SAP1 genlerinden en az biri pozitif bulundu. Biyofilm üretmeyen 1 *C. albicans* izolatında gen pozitifliği saptandı. Ayrıca çalışmamızda ALS1 pozitif olan 20 izolatın 19' unda (%95), HWP1 pozitif 15 izolatın 15'inde (%100), SAP1 pozitif 19 izolatın 18'inde (%94,7) biyofilm oluşumu görüldü.

İlk defa Staib tarafından 1960larda *C. albicans*' ta gösterilen SAP geni maya-hif dimorfizmi ve fenotipik değişim ile ilgili olduğu ortaya konulmuştur. Genellikle *C. albicans* üzerinde çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalarda proteinaz üretmeyen suşların üretenlere oranla virülanslarının düşük olduğu gösterilmiştir (18).

Bir çalışmada 78' i idrar olmak üzere toplam 149 *C. albicans* izolatında biyofilm oluşumu ve SAP (1-10) genlerinin varlığı araştırılmıştır. İdrar örneklerinin %92 'sinde biyofilm oluşumunu, %59' unda SAP1 genini pozitif bulmuşlardır ancak biyofilm oluşumu ve SAP1 geni varlığı arasındaki ilişkiyi istatistiksel olarak anlamlı bulmamışlardır (18).

Bir çalışmada vajinal sürüntü örneklerinden izole edilen 100 *Candida* türü ALS1, HWP1 ve SAP 1 varlığı açısından analiz edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen 100 izolatın %57'si (57) *C. albicans*, %26'sı (26) *C. glabrata*, %12'si (12) *C. kefyr*, %3'ü (3) *C. krusei* ve %2'si (2) *C. dubliniensis* tir. HWP1 geni en sık *C. krusei*' de (%100) ve *C. albicans*' ta (%86) saptanmıştır. ALS1 geni en sık *C. albicans* (%75,4), *C. krusei* (%66,7) ve *C. kefyr* (%66,7)'de saptanmıştır. SAP1 geni en yüksek *C. albicans* (%93)'ta saptanmış olup, bunu *C. glabrata* (%88,5) izlemiştir (11).

Bir başka çalışmada 111' i idrar olmak üzere izole edilen toplam 148 *Candida* izolatında virülans genleri araştırılmıştır. İdrar izolatlarının tür dağılımı *C. albicans* n:55, *C. tropicalis* n:15, *C. glabrata* n:11, *C. parapsilosis* n:4, *C. kefyr* n:3, *C. krusei* n:1 şeklindedir. HWP, SAP, ALS genlerinin sırasıyla *C. albicans*' ta 31(%56,3), 26(%47,2), 21(%38,1); *C. tropicalis*' te 3(%20), 2(%13,3), 8(%53,3); *C. glabrata*' da

5(%45,4), 3(%27,2), 1(%9); *C. parapsilosis* 'te 1(%25), 1(%25), 2(%50); *C. krusei* 'de 0, 0, 0 saptanmıştır (87).

Bir çalışmada idrardan elde edilen 50 *Candida* izolatında SAP geni araştırılmıştır. Tür dağılımı *C. albicans* n:7 (%14,0), *C. tropicalis* n:26 (%52,0), *C. glabrata* n:15 (%30,0), *C. krusei* n:2 (%4,0) şeklindedir. SAP1, 3 (%6) *C. albicans* 'ta, 2 (%4) *C. tropicalis* 'te saptanmıştır (88) .

Bizim çalışmamızda ALS1, HWP1, SAP1, genleri sırasıyla *C. albicans* 'ta 16 (%69,5), 12 (%52), 16 (%69,4); *C. tropicalis* 'te 2 (%9), 2 (%9), 2 (%9); *C. parapsilosis* 'te 1 (%12,5),0,0; *C. glabrata* 'da 1(%16,6), 1(%16,6), 1(%16,6); de saptandı. *C. lusitaniae* ve *C. krusei* 'de bu genler saptanamadı.

Çalışmamızda sonuç olarak, *C. albicans* izolatlarında ALS1, HWP1 ve SAP1 genlerinin görülme sıklığının, non-*albicans Candida* izolatlarına göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu üç genden bir veya daha fazlasının bulunduğu durumlarda biyofilm oluşum oranının yüksek olduğu tespit edildi. Farklı çalışmalarda farklı oranların elde edilmesi örnek türü ve farklı tanı tekniklerinden kaynaklanıyor olabilir. Araştırılan genler dışındaki birçok gen *Candida* türlerinde biyofilm oluşumuna katkıda bulunabilir. Bir genin varlığı her zaman fenotipe yansımaz, ilgili genin ekspresyonu ve ekspresyon düzeyi çevresel şartlara, izole edildiği bölgeye ve *Candida* türüne bağlı olarak değişebilir.

Bu çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır:

I) Bu çalışmada *Candida* türlerinde yalnızca PZR yöntemiyle ALS1, HWP1 ve SAP1 genlerinin varlığı araştırılmış, gen ekspresyon düzeyi değerlendirilmemiştir.

II) ALS gen ailesi içerisinde yer alan diğer genler bu çalışmaya dahil edilmemiştir. Benzer şekilde, SAP ve HWP gen ailelerinin yalnızca sınırlı alt tipleri değerlendirilmiştir. Daha kapsamlı bir genetik analiz, bu virülans faktörlerinin biyofilm oluşumuna katkısını daha net ortaya koyabilir.

6. SONUÇLAR

- Pediatrik ve erişkin yoğun bakım üriner örneklerden elde edilen *Candida* izolatlarının (n=70) biyofilm oluşturma oranları %90 (n=63) olarak bulundu. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu oran literatürdeki çoğu çalışmadan daha yüksek bulunmuş olup; yüzdesel oranlarda farklılıkların görüldüğü diğer çalışmalarla aradaki farkın örnek türüne, biyofilm tespit etmek için kullanılan yöntem ve yoğun bakım hastalarından elde edilen izolatlarının kullanılmasına bağlı olduğu düşünüldü.
- Pediatrik ve erişkin yoğun bakım izolatlarının biyofilm oluşturma yüzdelere bakıldığında biyofilm üretim oranı erişkin grupta (%97,1) pediatrik gruba (%82,8) göre fazla iken aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,106). Biyofilm oluşum oranlarındaki farklılık pediatrik hastadan idrar almanın zorluğu, flora elemanı alınması gibi nedenlere bağlı olabilir. Literatürde bu iki örnek türünün biyofilm oluşturma oranlarının karşılaştırılması ile ilgili pek fazla çalışma bulunamamıştır. Yoğun bakım hastası olmak, üriner katater kullanmak gibi biyofilm oluşumunun önemli olduğu bazı durumlar için hastalık patogenezi anlamak açısından bu iki grubun karşılaştırıldığı yeni çalışmalarla bu çalışmanın desteklenmesi gerekmektedir.
- Biyofilm üretimi suşlara göre incelendiğinde en fazla biyofilm üretimi *C. glabrata* (%100), *C. krusei* (%100) ve *C. albicans*' ta (%95,6) gözlemlendi. Biyofilm üretimi açısından türler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (p=0,179). Non-*albicans Candida* izolatlarının genel biyofilm üretim oranı %87,2 bulundu. Biyofilm üretimi açısından *C. albicans* ve non-*albicans Candida* izolatları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (p=0,413). Literatür incelendiğinde *Candida* türlerinde biyofilm oluşumu ve oranları çok değişkenlik göstermektedir. Hasta yaşı, altta yatan hastalık, hastanedeki yatış yeri (yoğun bakım ünitesi veya servis), kalıcı idrar kateteri varlığı, yüksek doz antibiyotik maruziyeti gibi değişkenler, idrar yolu enfeksiyonlarına neden olan *Candida* türlerinin sıklığını, sırasını ve biyofilm oluşum oranını etkileyebilir.
- Tüm *Candida* izolatlarına bakıldığında ALS1, HWP1, SAP1 genlerinin varlığı sırasıyla %28,5, %21,4 ve %27,1 bulundu. Tür düzeyinde en fazla pozitiflik

literatürdeki birçok çalışmayla uyumlu olarak *C. albicans*' ta saptandı (ALS1, HWP1, SAP1 genlerinin varlığı sırasıyla %69,5, %52 ve %69,5).

- XTT yöntemi ile biyofilm oluşumunun tespit edildiği 63 *Candida* izolatının 26'sında (%41,2) ALS1, HWP1, SAP1 genlerinden en az biri pozitif bulundu. Tür düzeyinde bakıldığında en fazla gen pozitifliği literatürdeki çoğu çalışmayla uyumlu olarak *C. albicans*' ta gözlemlendi; biyofilm üreten 22 *C. albicans* izolatından 18'inde (%81,8) ALS1, HWP1, SAP1 genlerinden en az biri pozitif bulundu. Biyofilm üreten *C. albicans* izolatlarında bir veya daha fazla gen pozitifliği olan ve herhangi bir gen pozitifliği olmayanlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu ($p<0,001$).
- ALS1, HWP1, SAP1 genlerinden bir veya birden fazlasına sahip olan toplam 27 izolatın 26'sında (%96,3) biyofilm üretimi tespit edildi. Bu üç genden bir veya birden fazlasının varlığında biyofilm oluşturan ve oluşturmayanlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulundu ($p<0,001$). ALS1, HWP1, SAP1 genlerinin özellikle *C. albicans* başta olmak üzere *Candida* biyofilmlerinde önemli roller oynadığı görülmektedir.
- Çalışmamızda yoğun bakım hastalarından izole edilen *Candida* türlerinde ALS1, HWP1, SAP1 genlerinin varlığı ile biyofilm üretimi arasındaki ilişkiyi değerlendirmiş olduk. Daha geniş ve farklı çalışmalar yapılarak *Candida* enfeksiyonlarının patojenitesine katkıda bulunan virülans faktörlerine hâkim olup özellikle yoğun bakımda yatmak gibi *Candida* enfeksiyonlarına yatkınlık yapan durumlarda farklı gen bölgelerin hedeflendiği yeni antifungaller geliştirilebileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Tıbbi Mikrobiyoloji, Çeviri: Us, DA, Başustaoğlu, A. Ankara: Çeviri Ed. Us AD, Başustaoğlu A, 7. Baskı; 2016. 605-714. p.
2. Tüzüner U, İnci R. Candida türlerinde biyofilm oluşumunun modifiye mikropalak ve modifiye XTT redüksiyon yöntemleri ile saptanması. Ege Tıp Dergisi. 2017;56(4):178-82.
3. Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y, Kırdar S, Aydın N. Kan kültürlerinden izole edilen Candida suşlarında antifungal duyarlılığın ve bazı virülans faktörlerinin araştırılması ve RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. Mikrobiyol Bul. 2011;45(2):306-17.
4. Atencia-Carrera MB, Cabezas-Mera FS, Vizuete K, Debut A, Tejera E, Machado A. Evaluation of the biofilm life cycle between Candida albicans and Candida tropicalis. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2022;12:953168.
5. Çalışkan S, Keçeli Özcan S, Cınar S, Corakçı A, Çalışkan E. Vajinal Yakınması Olan Kadınların Vajen ve Rahim İçi Araç İpi Örneklerinden İzole Edilen Candida Türlerinin İn Vitro Biyofilm Oluşturma Özellikleri ve Antifungal Direnç ile İlişkisi. Mikrobiyol Bul. 2011;45(4):697-706.
6. Alpay Y, Ağalar C, Karabıçak N, Kılıç D, Kaygusuz S, Ayaşlıoğlu E, et al. 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.
7. Donlan RM. Biofilms and device-associated infections. Emerging infectious diseases. 2001;7(2):277.
8. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single-and multi-species Candida albicans biofilms. Nature Reviews Microbiology. 2018;16(1):19-31.
9. Malinovská Z, Čonková E, Váczi P. Biofilm formation in medically important Candida species. Journal of Fungi. 2023;9(10):955.
10. Czechowicz P, Nowicka J, Gościński G. Virulence factors of Candida spp. and host immune response important in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(11):5895.
11. Tokak S, Kılıç İH, Mutlu EG, Beyazyüz F, Horasanlı JE, Taşbent FE. Vulvovajinal Kandidiyazisli Hastalardan İzole Edilen Candida Türlerindeki Int, Hwp, Plb, Sap ve Als Genlerinin Moleküler Tespiti. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2023;25(3):431-7.
12. Sundstrom P. Adhesion in Candida spp. Cellular microbiology. 2002;4(8):461-9.

13. Cavaleiro M, Teixeira MC. Candida biofilms: threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in medicine*. 2018;5:28.
14. Bizuayehu H, Bitew A, Abdeta A, Ebrahim S. Catheter-associated urinary tract infections in adult intensive care units at a selected tertiary hospital, Addis Ababa, Ethiopia. *Plos one*. 2022;17(3):e0265102.
15. Passos XS, Sales WS, Maciel PJ, Costa CR, Miranda KC, Lemos JdA, et al. Candida colonization in intensive care unit patients' urine. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100:925-8.
16. McCool L. The Discovery and Naming of *Candida albicans*. 2010.
17. Knoke M, Bernhardt H. The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. *Mycoses*. 2006;49(4):283-7.
18. Yarar M. Klinik materyallerden izole edilen candida albicans suşlarında sap genlerinin araştırılması. 2014.
19. Tümbay E. Tıbbi Mikoloji. Tıbbi Mikoloji Derneği Yayını No. 2. Birinci baskı. İzmir, Meta Basım 2020
20. Borman AM, Johnson EM. Changes in fungal taxonomy: mycological rationale and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*. 2023;36(4):e00099-22.
21. Kurtzman CP, Sugiyama J. 1 Saccharomycotina and Taphrinomycotina: The yeasts and yeastlike Fungi of the Ascomycota. *Systematics and evolution: Part B*. 2015:3-33.
22. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. 3. ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2002. 970-8 p.
23. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology: Jones & Bartlett Learning; 2020.
24. Magalhães J, Correia MJ, Silva RM, Esteves AC, Alves A, Duarte AS. Molecular techniques and target selection for the identification of *Candida* spp. in oral samples. *Applied Sciences*. 2022;12(18):9204.
25. Richardson MD, Warnock DW. Fungal infection: diagnosis and management: John Wiley & Sons; 2012.
26. O'Shaughnessy EM, Shea YM, Witebsky FG. Laboratory diagnosis of invasive mycoses. *Infectious Disease Clinics*. 2003;17(1):135-58.
27. Casadevall A. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infection and immunity*. 1995;63(11):4211-8.
28. Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*. 2022;13(1):89-121.

29. Barantsevich N, Barantsevich E. Diagnosis and treatment of invasive candidiasis. *Antibiotics*. 2022;11(6):718.
30. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of Fungi*. 2021;7(2):79.
31. Tamo SB. *Candida* Infections: clinical features, diagnosis and treatment. *Infect Dis Clin Microbiol*. 2020;2(2):91-102.
32. AYTEKİN A, PEKSARI Y. Kandidal Enfeksiyonların İmmünolojisi. *Türkiye Klinikleri Journal of Dermatology*. 2002;12(4):229-36.
33. Qin Y, Zhang L, Xu Z, Zhang J, Jiang Y-y, Cao Y, et al. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. *Virulence*. 2016;7(5):512-26.
34. Netea MG, Joosten LA, Van Der Meer JW, Kullberg B-J, Van De Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nature Reviews Immunology*. 2015;15(10):630-42.
35. Mba IE, Nweze EI. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2020;39(10):1797-819.
36. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119-28.
37. Çerikçioğlu N. Mantarlarda virülans faktörleri. *Ankem Dergisi*. 2012;26(2):261-9.
38. Khan MSA, Ahmad I, Aqil F, Owais M, Shahid M, Musarrat J. Virulence and pathogenicity of fungal pathogens with special reference to *Candida albicans*. *Combating fungal infections: Problems and remedy*. 2010:21-45.
39. Silva NC, Nery JM, Dias AL. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. *Mycoses*. 2014;57(1):1-11.
40. Gün İ, Ekinci FY. Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*. 2009;34(3):165-73.
41. Aslan H, Gulmez D. Üriner *Candida* İzolatlarının Biyofilm Yapabilme Özelliğinin Üriner Kateter Kullanımı ile İlişkisinin Araştırılması ve Biyofilim Varlığında Antifungal Duyarlılık Durumunun Değişimi. 2016.
42. Wang D, Zeng N, Li C, Li Z, Zhang N, Li B. Fungal biofilm formation and its regulatory mechanism. *Heliyon*. 2024;10(12).
43. Padder SA, Prasad R, Shah AH. Quorum sensing: A less known mode of communication among fungi. *Microbiological research*. 2018;210:51-8.

44. Kovács R, Majoros L. Fungal quorum-sensing molecules: a review of their antifungal effect against *Candida* biofilms. *Journal of Fungi*. 2020;6(3):99.
45. Rodríguez-Cerdeira C, Gregorio MC, Molaes-Vila A, López-Barcenas A, Fabbrocini G, Bardhi B, et al. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2019;174:110-25.
46. Mukherjee PK, Chand DV, Chandra J, Anderson JM, Ghannoum MA. Shear stress modulates the thickness and architecture of *Candida albicans* biofilms in a phase-dependent manner. *Mycoses*. 2009;52(5):440-6.
47. Chandra J, Mukherjee PK. *Candida* biofilms: development, architecture, and resistance. *Microbial Biofilms*. 2015:115-34.
48. Pathak AK, Sharma S, Shrivastva P. Multi-species biofilm of *Candida albicans* and non-*Candida albicans* *Candida* species on acrylic substrate. *Journal of Applied Oral Science*. 2012;20:70-5.
49. Percival SL, Malic S, Cruz H, Williams DW. Introduction to biofilms. *Biofilms and veterinary medicine*. 2011:41-68.
50. Sikora M, Gołaś M, Piskorska K, Swoboda-Kopeć E. Czynniki wirulencji grzybów z rodzaju *Candida* istotne w patogenezie zakażeń występujących u pacjentów żywionych pozajelitowo. *Postep Mikrobiol*. 2015;3:224-34.
51. Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Molecular microbiology*. 2006;60(1):5-15.
52. Temel A, Eraç B. Bakteriyel biyofilmler: Saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2018;48(1):1-13.
53. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of microbiology*. 2016;198(1):1-15.
54. Altun HU, Şener B. Biyofilm enfeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2008;39:82-8.
55. Dongari-Bagtzoglou A. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert review of anti-infective therapy*. 2008;6(2):201-8.
56. Douglas LJ. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Revista iberoamericana de micologia*. 2002;19(3):139-43.
57. Kırmusaoğlu S. Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. *Antimicrobials, antibiotic resistance, antibiofilm strategies and activity methods*. 2019:99.

58. Kuhn D, Balkis M, Chandra J, Mukherjee P, Ghannoum M. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(1):506-8.
59. Doğan Ö, Ataç N, Babuccu G, Can F. Comparison of crystal violet staining assay and XTT methods in the evaluation of biofilm formation in *Candida parapsilosis* Candidemia isolates. *Infectious diseases and clinical microbiology (Online)*. 2021;3(3):158-63.
60. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clinical microbiology reviews*. 2004;17(2):255-67.
61. Chenoweth CE, Gould CV, Saint S. Diagnosis, management, and prevention of catheter-associated urinary tract infections. *Infectious disease clinics of North America*. 2013;28(1):105.
62. Padawer D, Pastukh N, Nitzan O, Labay K, Aharon I, Brodsky D, et al. Catheter-associated candiduria: Risk factors, medical interventions, and antifungal susceptibility. *American Journal of Infection Control*. 2015;43(7):e19-e22.
63. Use A. Urinary Tract Infection (Catheter-Associated Urinary Tract Infection [CAUTI] and Non-Catheter-Associated Urinary Tract Infection [UTI]) Events Definitions. no January. 2022:1-18.
64. Chenoweth C, Saint S. Preventing catheter-associated urinary tract infections in the intensive care unit. *Critical care clinics*. 2013;29(1):19-32.
65. Flores-Mireles A, Hreha TN, Hunstad DA. Pathophysiology, treatment, and prevention of catheter-associated urinary tract infection. *Topics in spinal cord injury rehabilitation*. 2019;25(3):228-40.
66. Pierce CG, Uppuluri P, Tummala S, Lopez-Ribot JL. A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Journal of visualized experiments: JoVE*. 2010(44):2287.
67. Christensen GD, Simpson W, Younger J, Baddour L, Barrett F, Melton D, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*. 1985;22(6):996-1006.
68. Inci M, Atalay MA, Özer B, Evirgen Ö, Duran N, KOÇ AN, et al. Investigations of ALS1 and HWP1 genes in clinical isolates of *Candida albicans*. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2013;43(1):125-30.
69. Dikmen N, Duran N, Ay E, Cimen F, Tek E. Genotyping, drug resistance and virulence factors of *Candida* species isolated from patients using long-term inhaled steroids. *International Journal of Clinical Practice*. 2021;75(11):e14820.

70. Odabasi Z, Mert A. Candida urinary tract infections in adults. *World journal of urology*. 2020;38(11):2699-707.
71. Golia S, Hittinahalli V, Sangeetha K. T, Vasudha CL. Study Of Biofilm Formation As A Virulence Marker In Candida Species Isolated From Various Clinical Specimens. *Journal of Evolution of medical and Dental Sciences*. 2012;1:1238-46.
72. Jain N, Kohli R, Cook E, Gialanella P, Chang T, Fries B. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of Candida isolates from urine. *Applied and environmental microbiology*. 2007;73(6):1697-703.
73. Demirbilek M, Timurkaynak F, Azap FÖ, Arslan H. Hastane Kaynaklı Candida Türlerinde Biyofilm Oluşumu ve Antifungal Duyarlılık Paternleri.
74. de Freitas AR, Baeza LC, Faria MGI, Dota KFD, Martínez PG, Svidzinski TIE. Yeasts isolated from nosocomial urinary infections: Antifungal susceptibility and biofilm production. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2014;31(2):104-8.
75. Jain AK, Misra V, Ranjan N, Jain SB, Gandhi S. Speciation, biofilm formation and antifungal susceptibility of Candida isolates from clinically diagnosed patient of UTI in a tertiary care hospital. *J Assoc Physicians India*. 2019;67:42-5.
76. Mukhia K, Urhekar A. Biofilm production by various Candida species isolated from various clinical specimens. *Int J Sci Res*. 2016;5:2388-92.
77. Rishpana MS, Kabbin JS. Candiduria in catheter associated urinary tract infection with special reference to biofilm production. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2015;9(10):DC11.
78. 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;58(4):475-8.
79. Kamini P, Premamalini T, Karthika K, Bavadharani S. Antifungal susceptibility profile and biofilm production of Candida spp. isolated from catheterised patients with urinary tract infection. *Journal of The Academy of Clinical Microbiologists*. 2022;24(2):76-83.
80. Tiwari G, Mishra B, Dogra V, sood Loomba P, Arora D. Detection of biofilm production and its quantification in Candida isolates in a tertiary care hospital. *Blood*. 2019;1:00.
81. Hussein AA, Abou-Zeid MA, Hassan YM, Ibrahim NA. Candiduria in Catheterized Children's Patients: Association with UT, In-vitro Biofilm Formation, and Standardized VITEK 2 System for Isolated Candida Species. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*. 2024;33(3):77-85.
82. Modrzewska B, Kurnatowski P. Adherence of Candida sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Annals of parasitology*. 2015;61(1).

83. Ardehali SH, Azimi T, Fallah F, Aghamohammadi N, Alimehr S, Karimi AM, et al. Molecular detection of ALS1, ALS3, HWP1 and SAP4 genes in *Candida* Genus isolated from hospitalized patients in Intensive Care Unit, Tehran, Iran. *Cellular and Molecular Biology*. 2019;65(4):15-22.
84. Turan D, Barış A, Kiraz N. Investigation of Virulence Factors of *Candida albicans* Species Isolated from Clinical Specimens Phenotypically and Genotypically. *Haydarpaşa Numune Medical Journal*. 2024;64(4):450-5.
85. Hamady A, Marei Y. Detection of als1 and hwp1 genes involved in biofilm formation in *Candida albicans* isolated from catheter associated candiduria. *Microbes and Infectious Diseases*. 2021;2(3):558-66.
86. Shrief R, Zaki MES, El-Sehsah EM, Ghaleb S, Mofreh M. Study of antifungal susceptibility, virulence genes and biofilm formation in *Candida albicans*. *The Open Microbiology Journal*. 2019;13(1).
87. Hallum S, Ç. . Genito-üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen *Candida* türlerinde bazı virülans faktörleri ile antifungal ilaç direncinin araştırılması. 2019.
88. Elfiky SAM, Nafees SIM, Harfoush RAH, Abouseada NMA, Sultan GMS. Detection of secreted aspartyl proteinase (sap) in different *Candida* species isolated from urinary tract infection. *International Journal of Current Research*. 2016;8:41227-233.

8. EKLER

Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/297-349 14.06.2024

Sayın Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz Yoğun bakım hastalarının idrar örneklerinden izole edilen Candida türlerinde biyofilm oluşumunun ve HWPI, ALS1, SAP1 genlerinin varlığının araştırılması başlıklı OMÜ KAEK 2024/221 Karar nolu Mikrobiyoloji çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 24.04.2024 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi arz/rica ederim.

Prof.Dr.Ramis ÇOLAK
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Ondokuz mayis Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik kurulu Tel:03623121919/2382 -4576007 Onmutack@gmail.com
Eski Dış Hekimliği Fakültesi 2.Kat Atakum/SAMSUN

Ek 2. Turnitin Orjinallik Raporu

YOĞUN BAKIM HASTALARININ İDRAR ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN CANDIDA TÜRLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMUNUN VE HWP1, ALS1, SAP1 GENLERİNİN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%**21** BENZERLİK ENDEKSİ %**17** İNTERNET KAYNAKLARI %**11** YAYINLAR %**8** ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%7
2	Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%3
3	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	%1
4	repository.qu.edu.iq İnternet Kaynağı	%1
5	pdffox.com İnternet Kaynağı	%1
6	acikerisim.harran.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
7	Irmak, Onur. "Flukonazol Dirençli Candida Albicans Suşlarında Atılım Pompalarını Kodlayan CDR1, CDR2 Ve MDR1 Genlerinin ve 14 Alfa Lanosterol Demetilazı Kodlayan Erg11 Gen Ekspresyon Düzeylerinin Semi-kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi ile Araştırılması", Dokuz Eylül Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	<%1
8	cihaz.omu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
9	www.mikrobiyolbul.org İnternet Kaynağı	<%1