

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN
SOYUTLANAN *CANDIDA* SUŞLARININ
VİRULANS FAKTÖRLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

MÜJGAN ÖZHUN

MİKROBİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2015

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2010970076

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN
SOYUTLANAN *CANDIDA* SUŞLARININ
VİRULANS FAKTÖRLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

MİKROBİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MÜJGAN ÖZHUN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. Mine DOLUCA DERELİ

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2010970076

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Müjgan ÖZHUN ‘ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN SOYUTLANAN *CANDIDA* SUŞLARININ VİRULANS FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI’ konulu Yüksek Lisans tezini 26.10.2015 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

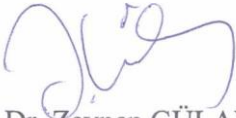


Prof.Dr. Mine DOLUCA DERELİ

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

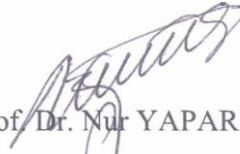


Prof. Dr. Zeynep GÜLAY

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Nur YAPAR

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Prof.Dr. Vildan AVKAN OĞUZ

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Doç. Dr. M. Cem Ergon

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vi
TEŞEKKÜR	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Tarihçe	7
2.2. Genel Özellikler	7
2.3. Hücre Yapısı	8
2.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri	10
2.4.1. Aderans (Tutunma)	13
2.4.2. Biyofilm	14
2.4.3. Enzimler	16
2.4.3.1. Salgısal Asit Proteinaz	16
2.4.3.2. Fosfolipaz	17
2.4.3.3. Lipaz	18
2.4.3.4. Hemolizin	19
2.4.4. Morfolojik Değişim	19
2.4.5. Fenotipik Değişim	20
2.4.6. Hücre Yüzey Hidrofobisitesi	21
2.4.7. Siderefor Kullanımı	21
2.4.8. Hücre Duvar Yapısı	21
2.4.9. Moleküler Benzeme	22
2.5. <i>Candida</i> Türlerinin Neden olduğu İnfeksiyonlar	22
2.5.1. Kutanöz ve Mukozal Kandidoz	22
2.5.2. Sistemik Kandidoz	23
2.5.3. Kronik Mukokutanöz Kandidoz	24
2.6. <i>Candida</i> İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı	24
2.6.1. Direkt Bakı	24

2.6.2.	Kültür	25
2.6.3.	Serolojik Tanı.....	28
2.6.4.	Moleküler Tanı.....	29
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	31
3.1.	Araştırmanın Tipi.....	31
3.2.	Araştırmanın Yeri ve Zamanı	31
3.3.	Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	31
3.4.	Çalışma Materyali	31
3.5.	Araştırmanın Değişkenleri	32
3.6.	Veri Toplama Araçları	32
3.6.1.	Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	32
3.6.2.	Biyofilm Üretiminin Araştırılması	34
3.6.2.1.	Petri Aderans Yöntemi ile Biyofilm Üretimi Araştırılması	34
3.6.2.1.1.	Safranin Boyasının Hazırlanışı	34
3.6.2.1.2.	Deneyin Uygulanması.....	35
3.6.2.1.3.	Sonuçların Değerlendirilmesi	35
3.6.2.2.	Modifiye Mikropalak Yöntemi ile Biyofilm Üretimi Araştırılması	35
3.6.2.2.1.	Kristal Viyole Boya Çözeltilisinin Hazırlanması.....	35
3.6.2.2.2.	Deneyin Uygulanması.....	35
3.6.2.2.3.	Sonuçların Değerlendirilmesi	36
3.6.3.	Fosfolipaz Enzim Varlığı Araştırılması	36
3.6.3.1.	Besiyerinin Hazırlanışı	36
3.6.3.2.	Deneyin Uygulanması.....	36
3.6.3.3.	Sonuçların Değerlendirilmesi	36
3.6.4.	Hemolitik Aktivite Varlığının Araştırılması	37
3.6.4.1.	Besiyerinin Hazırlanması.....	37
3.6.4.2.	Deneyin Uygulanması.....	37
3.6.4.3.	Sonuçların Değerlendirilmesi	37
3.6.5.	Jelatinaz Enzim Varlığı Araştırılması	37
3.6.5.1.	%0.1'lik Civa Klorür Hazırlanması.....	37
3.6.5.2.	Besiyeri Hazırlanması.....	38
3.6.5.3.	Deneyin Yapılışı	38
3.6.5.4.	Sonuçların Değerlendirilmesi	38

3.7.	Araştırma Planı	38
3.8.	Verilerin Değerlendirilmesi	38
3.9.	Araştırmanın Sınırlılıkları.....	39
3.10.	Etik Kurul Onayı.....	39
4.	BULGULAR	40
4.1.	Biyofilm Üretimi Sonuçları	40
4.1.1.	Petri Aderans Yöntemine Göre Biyofilm Üretimi Sonuçları.....	40
4.1.2.	Modifiye Mikroplak Yöntemine Göre Biyofilm Üretimi Sonuçları.....	41
4.2.	Fosfolipaz Aktivite Sonuçları.....	44
4.3.	Hemolitik Aktivite Sonuçları	47
4.4.	Jelatinaz Aktivite Sonuçları.....	49
5.	TARTIŞMA	50
7.	KAYNAKLAR	57
8.	EKLER.....	69
8.1.	Etik Kurul Onayı	69
8.2.	Özgeçmiş	72

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Suşların soyutlandıkları örnek gruplarına göre dağılımı.....	32
Tablo 2. Petri aderans yöntemi ile biyofilm üretiminin türlere göre dağılımı.....	40
Tablo 3. <i>Candida</i> suşlarının türlere göre modifiye mikropalak yöntemi ile biyofilm üretimi sonuçları.....	43
Tablo 4. Suşların her iki yöntem ile saptanan biyofilm üretimi sonuçları.....	43
Tablo 5. Türler göre suşların fosfolipaz aktivite dağılımı.....	45
Tablo 6. Pz değerine göre <i>Candida</i> kökenlerinin dağılımı.....	46
Tablo 7. Suşların izole edildikleri bölgelere göre fosfolipaz aktivitesi dağılımı.....	46
Tablo 8. Türler göre suşların hemoliz aktivitesi dağılımı.....	47
Tablo 9. Suşların izole edildikleri bölgeye göre hemolitik aktivite oluşturma oranları...	48
Tablo 10. <i>Candida</i> suşlarının hemolitik aktivite derecelendirmesi.....	48
Tablo 11. Suşların soyutlandıkları bölgeye göre olumluluk düzeyleri.....	49

SEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Biyofilm üretimi pozitif ve negatif olarak belirlenen <i>C. albicans</i> izolatları.....	40
Şekil 2. Petri aderans yöntemi ile pozitif olarak belirlenen izolatların soyutlandıkları bölgelere ve türlere göre dağılımı.....	41
Şekil 3: Biyofilm üretiminin modifiye mikropalak yöntemi ile çalışıldığı <i>Candida</i> suşlarının mikropalak görüntüsü.....	42
Şekil 4. Modifiye mikropalak yöntemi ile biyofilm üreten suşların soyutlandığı bölgelere göre dağılımı	44
Şekil 5. Fosfolipaz enzimi pozitif ve negatif olarak belirlenen <i>C. albicans</i> ve <i>C. parapsilosis</i> suşları.....	45
Şekil 6. %7 Kanlı SDA besiyerinde α ve $\alpha+\beta$ hemoliz gösteren suşların görünümü.....	47
Şekil 7. Negatif jelatinaz aktivitesi gösteren <i>Candida</i> suşları.....	49

KISALTMALAR

SDA: Sabouraud Dekstroz Agar

NPC: Nukleer Por Kompleksi

ER: Endoplazmik Retikulum

PRRs: Patern Tanıma Reseptörü

PAMPs: Patojen İlişkili Moleküler Paternler

TLRs: “Toll”- benzeri reseptörler

CLRs: C-tip Lektin Reseptörleri

NLRs: “Nod”-benzeri Lektin Reseptörleri

Th: Yardımcı T Hücreleri

IFN- γ : İnterferon γ

IL: İnterlökin

ALS: “Aglutinin-like sequence”

GPI: Glikozilfosfotidilinositol

HWP: Hifal Hücre Proteini

EPA: Epitelial Adezin

ECM: Hücre Dışı Matriks

BCR: “Biofilm And Cell Wall Regulator”

SAP: Salgısal Asit Proteinaz

HLP : “Hemolysin Like Protein”

VVK: Vulvovaginal Kandidoz

KMK: Kronik Mukokutanöz Kandidoz

BOS : Beyin Omurilik Sıvısı

KOH: Potasyum Hidroksit

PAS : Periyodik Asit-Schiff

SABHI : Sabouraud Beyin Kalp İnfüzyon Agar

MALDI-TOF : “Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-Of-Flight”

BG: *1,3-β-D*-Glukan

PZT: Polimeraz Zincir Tepkimesi



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve önerileri ile yol gösteren, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mine DOLUCA DERELİ'ye, eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalı hocalarıma,

Desteklerini ve dostluklarını esirgemeyen yüksek lisans, doktora ve uzmanlık eğitimi alan arkadaşlarıma ve tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Müjgan ÖZHUN

Çeşitli Klinik Örneklerden Soyutlanan *Candida* Suşlarının Virulans Faktörlerinin Araştırılması

Müjgan ÖZHUN, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İnciraltı/İzmir

ÖZET

Son yıllarda *Candida* infeksiyonlarının insidansı ve prevalansı gittikçe artmakta olup, gelişen ilaç direnci, yeni antifungal ilaç hedeflerinin gereksinimi arttırmaktadır. Virulans faktörlerinin tanımlanması, fungal patogenezin anlaşılmasına ve yeni ilaç hedeflerinin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır. Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden soyutlanan farklı *Candida* türlerinde fosfolipaz, jelatinaz, hemolitik aktivite ve biyofilm üretimlerinin belirlenmesi ve bu virulans faktörlerinin türlere ve örnek gruplarına göre farklılıklarının incelenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmamıza, 2011 Temmuz – 2012 Kasım ayları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarı'nda kan, idrar, oral kavite ve alt solunum yolu örneklerinden soyutlanmış ve tanımlanmış *C. albicans* (n=171), *C. tropicalis* (n=94), *C. glabrata* (n=73) ve *C. parapsilosis* (n=81) türlerinden oluşan toplam 409 suş alınmıştır. Suşların biyofilm aktivitesi petri aderans ve modifiye mikropak yöntemi, fosfolipaz aktivitesi yumurta sarılı agar yöntemi, hemolitik aktivite de %7 kan eklenmiş Sabouraud dekstroza agar besiyeri kullanılarak araştırılmıştır. Jelatinaz aktivitesi ise yukarıdaki besiyerine %1 jelatin eklenerek incelenmiştir.

Candida izolatlarının petri aderans yöntemine göre %35'inin (n=143), modifiye mikropak yöntemine göre ise %31,3'ünün (n=128) biyofilm üretimi pozitif olarak saptanmış olup, biyofilm yapımı en çok *C. tropicalis* suşlarında belirlenmiştir. Biyofilm üretimi değerlendirilirken kullanılan yöntemler arasındaki uyum ise %68,5 olarak bulunmuştur. Her iki yöntem ile *Candida* türleri ve biyofilm üretimi arasında *C. tropicalis* suşları lehine istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan yöntemler ile idrar örneklerinden soyutlanan suşlarda biyofilm üretiminin diğer örnek gruplarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiş olup, her iki yöntem ile de örnek grupları ile türler arasında istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmiştir.

Suşların %27,1'inde (n=111) fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. Bu enzim varlığı en fazla *C. albicans* suşlarında görülmüş olup, *C. tropicalis* izolatlarında ise fosfolipaz aktivitesi gözlenmemiştir. Fosfolipaz aktivitesi türlere göre istatistiksel olarak değerlendirildiğinde *C. albicans* lehine anlamlı bir sonuç elde edilmiştir ($X^2=153,3$; $P=0,00$). Bu enzim aktivitesi en çok sırasıyla oral kavite, alt solunum yolu, kan ve idrar örneklerinden soyutlanan suşlarda izlenmiş olup, örnek grupları ile *Candida* türleri karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık gözlenmiştir ($X^2=33,2$; $p=0,00$).

Suşların %93,6'sında (n=383) hemolitik aktivite belirlenmiş olup, % 51,1'i (n=209) alfa hemoliz, % 42,5'i (n=174) ise alfa ve beta hemoliz göstermiştir. Alfa hemoliz en çok idrar örneklerinden, alfa ve beta hemolitik aktivite ise en fazla oral kavite örneklerinden soyutlanan suşlarda saptanmıştır. Çalışmaya alınan *Candida* türleri hemolitik aktivite göstermesi açısından soyutlandığı bölgelere göre istatistiksel yönden incelendiğinde anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir ($X^2=7,3$; $p=0,06$). Çalışmaya alınan izolatların hiçbirinde jelatinaz enzim varlığı gözlenmemiştir.

Bu veriler doğrultusunda, çalışmaya alınan *Candida* suşlarının virulansında biyofilm, fosfolipaz ve hemolitik aktivite üretiminin önemli rol oynadığı, jelatinaz aktivitesinin ise virulansta etkin bir rol oynamadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Candida*, biyofilm, fosfolipaz, hemolitik aktivite, jelatinaz

Investigation of Virulence Factors of *Candida* Strains Isolated From Different Clinical Specimens

ABSTRACT

The incidence and prevalence of *Candida* infections has been increasing in recent years. Development of drug resistance increases the requirement of new antifungal drug targets. Identification of virulence factors helps to clear the fungal pathogenesis and supports the development of new drug targets. In this study we aimed to determine the biofilm production, phospholipase, gelatinase and haemolytic activities in various *Candida* species isolated from different clinical specimens and to investigate the differences of these virulence factors according to *Candida* species and clinical specimens.

A total number of 409 strains consisting of *C. albicans* (n=171), *C. glabrata* (n=73), *C. parapsilosis* (n=81) and *C. tropicalis* (n=94) isolated from blood, urine oral cavity and tracheal secretion cultures in Dokuz Eylul University Hospital Mycology Laboratory between 2011 July- 2012 November were included in our study.

Biofilm and phospholipase activities were investigated by petri adherence, modified microplate and egg-yolk agar plate assays, respectively. Haemolytic and gelatinase activities of the strains were examined by using Sabouraud dextrose agar supplemented with 7% blood and same medium supplemented with 1% gelatin, respectively.

Thirty-five percent (n=143) and 31.3% (n=128) of *Candida* isolates were determined to be biofilm positive by petri adherence and modified microplate assay, respectively. Biofilm production was mostly detected among *C. tropicalis* isolates. The overall agreement between the two biofilm detection methods was found to be 68.5 %. The biofilm production by both methods was detected to be statistically significant among different *Candida* species. In our study, highest biofilm production was determined among *Candida* strains which had been isolated from urine samples when compared with the strains isolated from other sites. Statistically important differences were observed between species and clinical specimen groups with both methods.

Twenty-seven point one percent of *Candida* isolates showed phospholipase activity and most of them were *C. albicans*. Phospholipase activity was not observed among *C. tropicalis* isolates. Statistically significant difference was detected between the phospholipase activities of different species in favor of *C. albicans* ($X^2=153,3$; $P=0,00$). The positivity rate of

phospholipase activity was found to be highest among the isolates obtained from oral cavity specimens and positivity rates declined respectively among the isolates cultured from tracheal secretion, blood and urine specimens. Statistically significant difference was observed between species and clinical specimen groups ($X^2=33,2$; $p=0,00$).

Ninety-three point six percent of the isolates ($n=383$) showed haemolytic activity while 51.1 %of them had only alpha and 42.5% of them had alpha and beta haemolysis together. Alpha haemolysis was observed mostly in strains isolated from urine, alpha and beta haemolysis were mostly observed among oral cavity isolates. There were not statically significant differences between *Candida* species and clinical specimens that the strains had been cultured ($X^2=7.3$; $p=0.06$). None of the *Candida* strains had gelatinase activity.

Insight of these findings it can be concluded that biofilm production, phospholipase and haemolytic activities play important roles while gelatinase doesn't seem to play a role in virulence of *Candida* isolates included in this study.

Key Words: *Candida*, biofilm, phospholipase, haemolytic activity, gelatinase.

1.GİRİŞ VE AMAC

Candida türleri yaygın görülen mayalar olup, insanların sindirim kanalı, ağız, boğaz, vajen normal florasında yer alır (1). Florada bulunan *Candida* türleri, çeşitli hastalıklar, sağaltımlar, invaziv girişimler nedeniyle bağışıklığı bozulmuş hastalarda, dokuları invaze ederek yaşamı tehdit eden infeksiyonlara yol açabilmektedir (2).

Konaktaki zemin hazırlayan faktörlere ek olarak, *Candida* türleri virulans faktörlerine bağlı olarak infeksiyonlara neden olmaktadır. Çimlenme borusu oluşumu, 37°C’de üreme, fosfolipaz, proteinaz, jelatinaz ve lipaz gibi enzimlerin üretimi, hücre duvar yapısı, yüzey hidrofobisitesi, biyofilm üretimi, moleküler benzeme, sidereforları kullanma ve epitel hücrelerine tutunma yeteneği infeksiyon oluşumunda önemli virulans faktörleri olarak kabul edilir (3).

Konak dokuya yayılmak için mikroorganizmaların ürettiği hidrolitik enzimlerin ilk hedefi lipid ve proteinden oluşan konak hücre membranıdır. Hidrolitik enzimleri, peptit bağlarını parçalayan proteinazlar, fosfolipitleri hidrolize eden fosfolipazlar, lipidleri parçalayan lipazlar gibi enzimler oluşturmaktadır. Proteinaz ve fosfolipaz üretimi hücre membranının fonksiyonunun bozulmasına veya parçalanmasına neden olarak mikroorganizmanın konak hücreye adezyonuna kolaylık sağlar. Fosfolipazlar ise hücre lizisini indükler, doku invazyonuna kolaylık sağlar ve hif şeklinde büyümeyi uç kısma doğru yönlendirir (4).

Çoğu *Candida* infeksiyonlarının biyofilm ile ilişkili olduğu da bildirilmiştir. Bu oluşumlar, kalıcı aparatların mukozal ve plastik yüzeylerinde oluşabilmektedir (1). *Candida* suşlarında biyofilm oluşumu, ilk olarak konak dokusu veya tıbbi aletler gibi yabancı substrata tutunma ile başlar. Bu olayı, maya hücrelerinin substrat yüzeyinin üzerinde çoğalması ve hif yapısının oluşumu izler. Biyofilm oluşumunun son basamağı ise olgunlaşma aşamasıdır. Bu aşamada; maya benzeri büyüme baskılanıp, hif şeklinde büyüme öne çıkar ve hücre dışı matris biyofilmi örter.(5)

Hemolizin aktivitesi *Candida* türlerinin yayılımına katkıda bulunan bir başka virulans faktörü olarak kabul edilir. *Candida*’ların hemolitik aktivitesinin varlığı sepsislerdeki yüksek mortalite oranını (%38-75) açıklamaya yardımcı olacağı gibi sağaltımda da yol gösterici olabilir. Hemolizin aktivitesi, konak eritrositlerinden demir alınımını kolaylaştırarak *Candida* türlerinin yayılımını artırır (6).

Çalışmamızda kan, idrar, oral kavite ve alt solunum yolu örneklerinden soyutlanan *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* kökenlerinin hemolitik aktivite, fosfolipaz, jelatinaz ve biyofilm üretimlerinin belirlenmesi ve bu virulans faktörlerinin türlere ve örnek gruplarına göre farklılıklarının incelenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Ağızdaki pamukçuk lezyonları, Hippocrates ve Galen dönemlerinden beri bilinmektedir. 1771'de Rosen von Rosenstein ağızdaki pamukçuğun akciğerlerde invazif olarak yerleşebildiğini bildirmiştir. 1839'da Almanya'da Bernhard Rudolph Conrad von Langenbeck, tifo nedeniyle ölmüş bir hastanın özefageal mukozasından soyutladığı organizmayı bir parazit olarak tanımlamış, bu etkenin tifo ile ilişkili olduğunu düşünmüştür (7,8).

Emil Berg 1841'de, pamukçuğun mantara bağlı geliştiğini ortaya koymuştur. 1842'de Gruby, Langenbeck'in soyutladığı bu organizmanın *Sporotrichum* türü olduğunu bildirmiştir. 1842'de Berg tarafından deneysel olarak oral aft modeli oluşturulup, bu konudaki ilk ve en önemli adım atılmıştır (7,8).

Robin 1843'de mantarı *Oidium albicans* olarak sınıflandırmış, 1849'da Frank ve Wilkinson ağızdaki lezyonun genital organlarda da bulunabileceğini ortaya koymuştur. Hansen, bu mantarı 1888'de *Monilia* olarak sınıflamış ve Zopf 1890'da *Monilia albicans* adını vermiştir (7,8).

Roth Berkhout 1923'te pamukçuk etkeni olan mikroorganizmanın bir *Monilia* türü olmadığını bildirmiş ve jenerik isim olarak *Candida*'yı önermiştir. Antibiyotiklerin kullanımının büyük oranda yaygınlaştığı 1940'lı yıllardan itibaren ise *Candida* infeksiyonlarının sıklığı ve konuyla ilgili çalışmalar artmıştır (7,8).

2.2. Genel Özellikler

Funguslar, Eumycota ailesine ait kemoheterotrofik canlılardır. Bu canlılar, çok çeşitli organik materyali eriyik besin maddelerine parçalayan enzimler salgılar ve parçalanmış besin maddelerini pasif absorpsiyon veya aktif transport ile hücre içine alır. Temel yapısal birimleri; tubüler zincirler, küfler gibi hif oluşturan miçelyum olarak adlandırılan çok hücreli filamentler veya mayalar gibi tek hücreli olabilir (9). Mayalar; ökaryot, tomurcuklanan, tek hücreli, genellikle yuvarlaktan ovale kadar değişebilen şekle sahip, düzgün kenarlı, krem ya da beyaz renkli, parlayan koloniler oluşturan, üç ile altı µm büyüklüğünde olup bakteriye göre daha büyük boyuttadır (4,8).

Candida türleri Ascomycetes sınıfında yer alan aseksüel mayalardır. Sekiz kromozom varlığı ile genetik olarak diploid olup (10), tüm koşullarda tek hücreli olarak üreyen *Candida glabrata* farklı olarak haploiddir. *Candida* türleri, maya hücresi veya yalancı hif şeklinde ürer. Yalancı hif, tomurcukların ana hücreye tutunup uzamasına bağlı olarak filamentin hücre-hücre bağlantılarında daralma meydana gelmesi ile oluşur. Ayrıca *Candida albicans* ve *Candida dubliniensis* maya hücresi dışında gelişen apikal sentez aracılığıyla uzayan ve tomurcuk içermeyen gerçek hif oluşturur (7).

Candida türleri tomurcuklanma ile çoğalır. Tomurcuklanma ile çoğalmada hücre duvarının bir noktası lizise uğrar, bu noktadan duvar dışarıya doğru balonlaşma yapar. Bu kısım şişerek genişler, ana hücrede mitoz yolu ile çoğalan kromozomlar ve diğer hücre elemanları yeni hücreye taşınır, sonra iki hücre arasında bölme (septa) gelişerek hücre çoğalması gerçekleşir (11).

Candida cinsi 200'den fazla tür içerir. Bu türler, insanların deri ve mukoza flora üyeleri olup, sadece bazı türler insanda hastalık oluşturur. Klinik açıdan önemli *Candida* türleri; *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* kompleksi, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida norvogenesis*, *Candida rugosa*, *Candida inconspicua* ve *Candida dubliniensis*' dir (9, 12, 13).

Deri, genital sistem, gastrointestinal sistem, ağız boğaz florasında bulunan *Candida* türleri, hastalık, antibiyotik kemoterapötik sağaltımı, invazif girişimler nedeniyle savunması bozulmuş hastalarda, dokulara yayılarak yaşamı tehdit eden patolojilere yol açabilirler (4).

Candida türleri, kolonizasyon, invazyon ve patogeneizde önemli birçok virulans faktörüne sahiptir. Bu virulans faktörleri, infeksiyonun tipine, bölgesine ve konak cevabına göre çeşitlilik gösterir (12).

Candida türleri Sabouraud dekstrozu agar (SDA) gibi rutin olarak kullanılan besiyerlerinde sarımsı, krem renkli yumuşak koloniler oluşturur, koloniler türe göre mat, parlak, kuru, düz ve kıvrımlı yapıda olabilir (13).

2.3.Hücre Yapısı

Candida hücreleri, ökaryotlarda bulunan sitoiskelet, nükleus, endoplazmik retikulum (ER), golgi cisimciği ve mitokondri gibi çeşitli hücre içi yapıları içerir (14).

Hücre duvarının yaklaşık %80-90'ı karbohidrat olup, üç temel polisakkarit bulunur. Bunlar; β -1,3 ve β -1,6 bağları bulunan dallanmış glukoz polimerleri olan β -glukan, β -1,4 bağı

içeren dallanmamış N-asetil-D-glukozamin polimeri olan kitin ve proteinlerle kovalan bağlı mannoz polimerleridir. Hücre duvarı aynı zamanda %6-25 oranında protein ve %1-7 oranında lipit içermektedir. β -glukan ve kitin hücre duvarının yapısal komponentleri olup sert bir iskelet oluşturur. Bu, hücreye güçlü fiziksel özellik kazandırır (15). Kitin, hücre duvarının kuru ağırlığının yaklaşık %1-2'si kadardır. Asetillenmemiş formu olan kitosan ile birlikte bulunduğu hücre duvarında %40 oranında olabilir (16). Kitin, kitin sentaz enzimi tarafından sentezlenen N-asetilglukozaminin β -1,4 homopolimeridir. Bu polisakkarit, birçok fungusta bulunmakta ve β -1,3 glukan ile beraber fungal hücre bütünlüğünü oluşturarak, büyüme ve morfogenez sırasında yapısal güç birliğini sağlamakta esas rolü oynar (17).

Elektron mikroskobu çalışmaları ile hücre duvarında çeşitli tabakaların varlığı gösterilmiş, maya-hif dönüşümü sürecinde bu katmanların sayı ve kalınlığının değiştiği bildirilmiştir. Örneğin *C. albicans*'ta hücre duvarı dört ile sekiz katman arasında görülmektedir. Ayrıca yüksek yoğunluktaki şeker varlığında en dıştaki mannoprotein katman kalınlaşır ve fibriler oluşumlar artar (18,19) .

Hücre duvar proteinleri, konak hücreye yapışmayı sağlayarak fungal patogeneze önemli bir rol oynar. Fungal hücre duvar proteinleri arasında vitronektin, fibronektin, laminin ve entaktin bağlayan proteinler bulunur (20).

Candida'ların hücre membranında fosfotidil serin, fosfotidil kolin, fosfotidil etanolamin ve fosfotidil inozitol gibi fosfolipitler bulunur. Membranlarında bulunan sterol, ergosterol ve zimosterol formundadır. Steroller, lipitlerin %20'sini oluşturmaktadır ve bunların %95'i ergosterol formundadır. Ergosterol hücre membranının geçirgenliği, akışkanlığı, bütünlüğü için düzenleyici olarak işlev görmektedir (4,19).

Candida hücreleri genellikle bir μ m çapında bir nukleus içerirler. Nukleusun çift membran ile sınırlandırılmış bir zarfı bulunur ve bu zarf pek çok nukleer por kompleksi (NPC) içerir. Bu kompleksler, küçük çözünenlerin, proteinlerin ve RNA moleküllerinin nukleer zarftan geçmesine olanak sağlar. Nukleer membran, mitotik bölünme sırasında eriyip daha sonra tekrar oluşmaz. Bu özelliği ile mayalar diğer ökaryotlardan farklıdır. Nukleus DNA'sı lineer yapıda olup nukleolusları RNA'dan zengindir (14,21).

Candida hücre iskeleti, morfoloji, hücre polaritesi ve hücreler arası transport için çok önemlidir. İskeletin iki temel bileşeni aktin ve tubulin filamentleridir. Her iki filament kovalan olarak bağlanmayan protein alt birimlerinden oluşmuştur. Aktin filamentleri, esnek, globüler aktin alt birimlerinin dallanmamış polimerleridir ve iki iplikli helikal yapıdadır. Mikrotübüller, içi boş, tubulin alt birimlerinden şekillenmiş, dallanmamış fibrillerdir.

Miyozinler büyük, dimerik protein komplekslerinden meydana gelmiştir ve aktin bağlayan proteinlerin özel bir sınıfıdır. Aktin, sitoplazmik akışkanlıktan sorumlu iken mikrotübüller membran hareketliliğinde rol alır. Miyozin ise aktin ile birlikte organellerin hareketliliğini sağlar (14,19).

Vakuol, otofaji yolu ile hücresel içeriğin degradasyonunda rol oynar. Ayrıca ozmoregülasyon, pH ve aminoasit, iyon ve polifosfat depolamasında önemli bir fonksiyona sahiptir. Her hücre için vakuol sayısı ve büyüklüğü çok değişkendir. Endoplazmik retikulum, lipid biyosentezinde görevli olup, sekresyon yolu ile hücre tarafından salgılanan proteinler için de bir giriş noktasıdır. Golgi cisimciği ise ER’de sentezlenen proteinleri işler ve paketler (14,19)

Mitokondri çift membran ile çevrili ve dört farklı alt kısımdan oluşmuştur. Bunlar; dış membran, iç zar, membranlar arası boşluk ve matrikstir. Sitoplazma da bulunan mitokondri sayıları solunumsal etkinlik ile ilişkilidir. Hücrenin tomurcuklanması için enerji gereksinimi artışına paralel olarak mitokondri sayısında artma olur (14,21).

2.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri

Son 30 yılda fungal infeksiyonların insidansında önemli bir artış olmuştur. Bu infeksiyonlar; deri, saç, tırnak ve mukozal membranlara etki eden yüzeysel ya da temel vücut organlarını etkileyen sistemik infeksiyonlar olabilir (2). Patojen *Candida* türlerinin, invazif fungal infeksiyonlarının birinci, hastane kökenli dolaşım sistemi infeksiyonlarının ise dördüncü yaygın etkeni olduğu bildirilmiştir (22).

Candida türlerinin oluşturduğu infeksiyonların gelişmesinde konağa ait faktörler ile mantara ait virulans faktörleri arasındaki denge önemlidir (19). Konak ile fungus arasındaki etkileşimin şiddeti, mikroorganizmanın infeksiyon oluşturma yeteneğine, konağın infeksiyona karşı yanıtına ve mikroorganizmanın virulansına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Konağın direnç mekanizmaları arasında sağlam deri dokusu, siliyer hareket, sekresyonlar, mikrobiyal florayı içeren mukokütanoz engeller, kompleman sistemi, sitokinler, immunoglobulin üretimini içeren humoral maddeler, nötrofiller, mononükleer fagositler, NK hücreleri ve T-lenfositleri kapsayan hücresel mekanizmalar sayılabilir. Konak savunmasını bireyin yaşı, beslenme durumu, alkol kullanımı, diabetes mellitus, malign hastalıklar ve kortikosteroid ile diğer immünsupresif ilaçlar etkileyebilir (23). Konak predispozan faktörleri arasında immünsupresif sağaltım, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, intravenöz kateter, mekanik ventilasyon, AIDS, hematolojik hastalıklar ve yanık sayılabilir.

Direnç ve tolerans, *Candida*'ya karşı savunma yeteneğini artıran konak savunma mekanizmasının iki tipidir. *Candida*'ya karşı oluşan enflamatuvar yanıt ilk olarak doğal immun sistem hücreleri tarafından oluşmaktadır. Sonrasında, bu hücreler tarafından oluşturulan sinyaller ile edinilmiş immun yanıt gelişir (24).

Candida infeksiyonuna karşı ilk savunma konak mukoza yüzeylerindeki epitel hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Konağın doğal bağışıklıktaki anahtar hücre olarak *Candida*'yı tanıyan epitel hücreleri, patern tanıma reseptörlerini (PRRs) eksprese eder. PRR'ler mikrobiyal hücreler üzerinde bulunan patojen ilişkili moleküler paternler (PAMPs) ile etkileşime geçer. PRR'ler üç ana grupta incelenmektedir; “Toll”-benzeri reseptörler (TLRs), C-tip lektin reseptörler (CLRs) ve "nod"- benzeri reseptörler (NLRs) dir. Epitel yüzeyindeki bu reseptör gruplarından sadece belli TLRs ve CLRs *Candida*'yı tanıyabilir. *Candida* PAMP'larını tanıyan miyeloid hücrelerde bulunan TLR2 hem PAMP'ları hem de *Candida* hücre duvarında bulunan fosfolipomannanı tanır. TLR4, kısa lineer O-bağlı mannani tanır ve proinflamatuvar sitokin üretimini indükler. TLR9 ise fungal DNA'yı tanır. CLR ailesinden ise mannoz reseptör, dektin-1, dektin-2, DC-SIGN fungal tanımayı gerçekleştirir ve bu reseptörler doğal antifungal bağışık yanıtı indükler (24,25).

Nötrofiller ve makrofajlar, fungusa karşı savunmada önemli bir rol oynarken; dendritik hücreler doğal ve edinilmiş bağışıklığın birleşmesinde daha büyük bir rol oynayarak önem kazanmaktadır. Dendritik hücreler, sitokin sekresyonu yolu ile doğal immun yanıtı arttırmırlar. Bu işlem, diğer lökositleri aktifleştirir ve bir T-hücre cevabının başlamasında kilit rol oynar. Antijen sunulmasına bağlı olarak dendritik hücreler yardımcı T (Th) hücrelerinin, Th1, Th2, Th17'ye veya Treg hücrelerine farklılaşmasını kolaylaştırarak yanıtı başlatır. Th1, fungal infeksiyona karşı korunmada gerekli olan IFN- γ , IL-6 ve IL-12'nin; Th2 yanıtı IL-4, IL-5 ve IL-10'un üretimi ile ilişkilidir. Th17 hücrelerinin antifungal aktivitede büyük bir rol oynadığı gösterilmiştir. IL-1b, IL-23 ve IL-6 sitokinleri Th17 yolunu aktive etmekte ve bu yol izi mukozal bağışıklıkta önem taşımaktadır (26).

Konak predispozan faktörlerinin yanında, *Candida* türleri mikroorganizmanın kendisi ile alakalı intirinsik karakterlerine bağlı olarak da infeksiyona neden olabilir. Çimlenme borusu oluşumu, 37°C'de üreme, proteinaz ve fosfolipaz üretimi ve ağız epitel hücrelerine tutunma yeteneği infeksiyon oluşumunda önemli faktörler olarak kabul edilir. Proteinaz ve fosfolipaz üretimi hücre membranın fonksiyonunun bozulmasına veya parçalanmasına neden olarak organizmanın konak hücreye adezyonuna kolaylık sağlar (27).

Candida infeksiyonlarının ilk adımı epitel kolonizasyondur (9). Kolonizasyonun gerçekleşmesi, çevredeki ve fungustaki çeşitli hücre sinyal kaskadları tarafından indüklenir ve kontrol edilir (28). *Candida*'lar konak hücrenin dış hücre zarfına penetre olarak konak invazyonunu gerçekleştirir. Konak hücre membranının temel kimyasal bileşeni olan fosfolipidlerin birleşmesi ile oluşan fosfolipazlar hücre lizisini indükler ve doku invazyonuna kolaylık sağlar. Fosfolipaz aktivitesi hif şeklinde büyümeyi uç kısma doğru yönlendirir, öte yandan ekstraselüler fosfolipazlar ise doku invazyonu için gereklidir (9).

Candida türleri tıbbi cihazlara adhere olabilir ve biyofilm oluşturabilir. İlk bağlanma, hidrofobisite ve elektrostatik güçler gibi özgün olmayan faktörler aracılığı ile gerçekleşmekte ve fungal hücre yüzeyinde bulunan özgün adezinler tarafından desteklenmektedir. Adezinler protein, fibronektin ve fibrinojen gibi ligandlar tarafından tanınmaktadır (28).

Candida türlerinin oluşturduğu biyofilmler ciddi klinik sorunlara neden olur; biyofilmler bir taraftan sürekli bir infeksiyon kaynağı oluştururken bir taraftan da antifungallere ve dezenfektanlara direnç gösterirler. Biyofilmlerde izlenen bu direncin mekanizmasında biyofilm matriksinin, yavaş üreme hızı veya besin kısıtlılığının, direnç genlerinin ekspresyonunun, atılım pompalarının, sterol miktarının, β -1,3-glukan'ın ve "persister" (dayanıklı) hücrelerin varlığının rol oynadığı düşünülmüştür (29-31).

Ekstraselüler hidrolitik enzimler aderans, doku penetrasyonu, invazyon ve konak doku hasarında önemli role sahiptir. Çeşitli çalışmalar ekstraselüler hidrolitik enzimlerin sentezi ve aktivitesi ile *Candida* hücrelerinin patojenik potansiyeli arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir (28).

Mikrobiyal ekstraselüler lipazın patogenezdaki rolü; besin ihtiyacı için lipitleri parçalaması, immun sistem hücrelerini etkileyerek özgün olmayan inflamatuvar süreci başlatması ve yarışmacı mikroflorayı lize ederek savunmayı sağlamasıdır. Biyofilm oluşumunun lipaz aktivitesi negatif *C. parapsilosis* suşlarında inhibe olduğu, lipitçe zengin ortamlarda bu izolatların üremesinin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca lipaz aktivitesi negatif suşların infeksiyon modellerinde daha az virulan olduğu gösterilmiştir (28).

Hemolizinler eritrositlerin parçalanması için mikroorganizma tarafından üretilen proteinlerdir. Bu proteinler sağkalım için esas rolü üstlenir ve organizmanın demir kazanımı ile ilişkilidir. İnorganik bir bileşik olan demir, mikroorganizmanın yapılanması için gerekli olup, infeksiyon esnasında önemli bir rol oynar (28).

2.4.1. Aderans (Tutunma)

Candida infeksiyonlarında ilk adım, organizmanın konağa veya tıbbi aletlere tutunmasıdır. Tutunma, biyofilm oluşumuna zemin hazırladığı için infeksiyon gelişiminde önemli bir adımdır. Adhezyon gelişiminin derecesi mikroorganizma ve materyalin hidrofobisite, zeta potansiyeli ve yüzeyi gibi özelliklerine bağlı olarak değişmektedir (32,33). Ayrıca, hücre duvarındaki farklılaşma ile ilişkili olan farklı koloni morfolojileri arasındaki değişim hücre-hücre, hücre-yüzey ve hücre- konak doku tutulumunu etkileyebilir (34).

Candida türlerinin adhezyon yeteneği, adezinler gibi hücre duvar proteinlerinin varlığı ile ilişkilidir (35). “Aglutinin-like sequence” (als) ailesinin üyesi olan bu proteinler glikozilfosfatidilinositole (GPI) tutunmuş hücre duvar proteinleri olup, memeli endotel ve epitel hücrelerine adezyonunu artırır (36). *ALS* gen ailesinin *ALS1-7* ve *ALS9* olmak üzere sekiz üyesi vardır (37). Tüm Als proteinlerinin adezyon ve virulansda önemli olduğu ve als1(Δ) ile als3(Δ) mutantları ile yapılan adezyon çalışmalarında Als3’ün daha güçlü bir adezin olduğu gösterilmiştir (38). Sadece *C. albicans*’ta bulunan Als3 proteinin konak hücreye aderans, biyofilm oluşumunda, konak hücre invazyonunda ve demir alımında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (37). Ayrıca GPI’ya tutunmuş hifal hücre proteini (Hwp1), *C.albicans*’ın hif hücrelerinin yüzeyinde özgün olarak eksprese edilmektedir. Hwp1 çimlenme borusu yüzeyi ve *C. albicans*’ın gerçek hif formunda bulunmaktadır (39). Bu protein, transglutaminidaz enzimine substrat görevi görerek çimlenme borusunun epitel hücrelerine tutulumda büyük bir rol oynamaktadır (40). Fare modellerinde, bu proteini kodlayan gen olan *HWPI*’in delesyonu ile endotel hücrelere girişin ve virulansın azaldığı gösterilmiştir (41).

C. albicans suşlarının hidrofobisitesi, özgün büyüme koşullarına oldukça duyarlıyken, pek çok *C. glabrata* izolatu aynı üreme şartlarına duyarlı değildir (2). Camacho ve ark.’nın yaptığı çalışmada lateks kataterler üzerinde bulunan *Candida* hücrelerinin hidrofobisite yeteneği ile aderansının arasında herhangi bir korelasyon olmadığı bildirilmiştir (42). Bu durum, adezyonun olabilmesi için hidrofobisitenin tek başına yeterli olmadığını açıklamaktadır.

C. glabrata’nın *C. albicans*’a kıyasla akrilik yüzeylere iki kat daha fazla adhere olma eğiliminde olduğu ve bu türün diğer *albicans*-dışı *Candida* türlerine göre üriner epitel hücrelerine yüksek oranda tutunduğu gösterilmiştir (43,44).

Candida türlerinin adhezyon yeteneği ile ilişkili önemli bir diğer faktör ise hücre duvarındaki adezin olarak adlandırılan özgün proteinlerdir. *C. glabrata*’da adezinler, epitelial

adezin (*EPA*) gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. Epa proteinlerinin yapısı *C. albicans*'ta ki Als proteinleri ile benzerdir. *EPA* genlerinin fazla olmasına karşın sadece *EPA1* geninin delesyonunun tutulumu azalttığı gösterilmiştir (45). *C. parapsilosis* suşlarının adezyonu ise yüzey hidrofobisitesi ile ilişkilidir (46). Yapılan çalışmalarda akrilik yüzeylere *C. parapsilosis* suşlarının aderans yeteneğinin yüksek olduğu gösterilmiştir. *C. parapsilosis* hücre duvarında beş Als ve altı Pga30 proteini olduğu bilinmesine karşın bu proteinlerin mayanın adezyon yeteneği ile ilişkisinin olup olmadığı bilinmemektedir (47). *C. tropicalis*'in ise üriner epitel hücrelerine, silikon ve lateks kateterlere tutunma yeteneğinde olduğu bildirilmiştir (48).

2.4.2. *Biyofilm*

Candida'nın konağa veya tıbbi cihazlara ilk tutulumun ardından hücre bölünmesi, tomurcuklanma ve sonrasında biyofilm oluşumu meydana gelmektedir (35). Biyofilm, hücre dışı matrikse (ECM) gömülü, yüzey ilişkili mikroorganizma toplulukları olarak bilinmektedir (49). Biyofilm üretimi ile, matrikse maddelerin tutunması kısıtlanarak antifungal sağaltıma direnç geliştirmekte ve organizma, konak immün yanıt hücrelerinden korunmaktadır. Bu nedenle *Candida* türlerinde biyofilm üretimi güçlü bir virulans faktörüdür (50,51).

Yapılan çalışmalar ile konak dokusunda mikroorganizmaların planktonik olmayan formlarının bulunmadığını, gruplaşarak çok hücreli topluluklar halinde dokularda, protezlerde, kateterlerde ve diğer yüzeylerde bulunabildikleri gösterilmiştir (52).

Biyofilm organizasyonu, hücre bölünmesi ile meydana gelen yeni hücrelerin rastgele toplanması ile değil, sinyal moleküllerinin kontrolü ile hücrelerin bir araya gelmesi ile oluşan özel bir oluşumdur. Bu biyolojik topluluk, ECM içerisinde gömülü olarak bulunur. Her bir organizmanın hücre dışı matriksi farklı oranda karbohidrat ve protein içermekte olup, genel olarak biyofilm matriksi karbohidrat, protein, fosfor ve heksosaminden oluşur. Ortam şartları, pH ve oksijen gibi çevresel faktörler ile fungal tür ve izolatlar, biyofilm oluşumunu ve matriks içeriğini etkilemektedir. Silva ve arkadaşları *C. glabrata* suşlarının oluşturduğu biyofilm matriksinin, yüksek oranda karbohidrat ve protein; *C. parapsilosis* izolatlarının matriksinin yüksek oranda karbohidrat ve daha az oranda protein; *C. tropicalis* suşlarının ise diğer *albicans*-dışı *Candida* izolatlarına göre daha az oranda karbohidrat ve protein içerdiğini bildirmiştir (35). Buna ek olarak Al-Fattani ve arkadaşları *C. albicans* ve *C. tropicalis* suşlarının biyofilm matriksinin karbohidrat, protein, heksosamin, fosfor ve üronik asitten oluştuğunu, *C. tropicalis* izolatlarında biyofilm matriksinin esas komponentinin heksosamin

olduğunu da bildirmiştir (49). Ayrıca *C. parapsilosis* suşlarının biyofilm oluşturmaları için biyofilm ve hücre duvar düzenleyici (BCR- “biofilm and cell wall regulator”) genlerinin gerekli olduğu, *C. parapsilosis* lipaz mutantlarının daha az biyofilm ürettikleri ve bu suşların daha az virulan özellik gösterdiği bilinmektedir (53). *C. glabrata* ve *C. tropicalis* için biyofilm oluşumunda görevli genler çok fazla bilinmemektedir (2).

C. tropicalis izolatları hızlı bir şekilde biyofilm oluşturmakta ve olgun biyofilm yapıları yoğun maya hücrelerine ek olarak filamentöz formları da içermektedir. *C. glabrata*’nın biyofilm üreten mutant türlerinin biyofilm oluşumunda dört gen içerdiği tanımlanmış, *EPA6* ve *EPA7*’nin transkripsiyonu ile biyofilm olgunlaşmasının arttığı bildirilmiştir (54).

Hawser ve Douglas 1994’te *C. albicans*’ın, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata*’ya göre daha fazla biyofilm ürettiğini bildirmiştir. *C. albicans*’ın biyofilm oluşturmaları, özellikle mayadan hif formuna dönüşümü ile ilişkilidir (35). *C. albicans* biyofilmleri genellikle küçük oval maya hücreler yani blastosporlar ve uzun tübüler hif hücreleri olmak üzere iki hücre tipi içermektedir. Maya ve filamentöz hücreler yoğun bir hücre dışı matriks içerisine gömülmüş olarak bulunmaktadır. Biyofilm matriksinin temel bileşeni β -glukandır (55,56). Genetik analizler ile hem maya hem de hif hücrelerinin biyofilm oluşumunda önemli rollerinin olduğu ve her hücrenin oluşum aşamasında tek bir görevi bulunduğu gösterilmiştir (49,55,57). Sinyalleşme (“quorum-sensing”) molekülleri, hif oluşumunu önlemek için biyofilm oluşumunun ileri safhalarında hücre tarafından salgılanır. Ökaryot hücrelerde sinyalleşme molekülü olan farnesolün *Candida*’larda maya-hif dönüşümünü ve biyofilm oluşumunu önlediği saptanmıştır. Farnesol, “Mitogenactivated” protein (MAP) kinaz ve cAMP-protein kinaz A (PKA) yol izlerinin azaltıcı efektörleri Ras proteini tarafından aktive edildiğinde, bu yol izlerini baskılayarak çimlenme borusu oluşumunu inhibe eder (22,58,59). Diğer bir sinyalleşme molekülü olan tirozolün ise, üremenin lag fazı uzunluğunu kısalttığı, biyofilm ve çimlenme borusu oluşumunu stimüle ettiği bildirilmiştir (29,60).

Biyofilmler, hastane kökenli patojenleri ve endojen flora üyelerini kapsayarak polimikrobiyal olarak da oluşabilir. Bu biyofilmler, bakterileri ve fungusları kapsayan çeşitli mikroorganizmalar için enfeksiyon kaynağı olarak görev görür. Bu yapıların tanımlanması ve sağaltılması zordur. *C. albicans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* türleri ve *S. aureus* türlerini içeren bu biyofilmler sistemik enfeksiyonlara, *Candida* türleri ve *Gardnerella vaginalis*’i içeren biyofilmler ise vajinal enfeksiyonlara neden olabilmektedir (61,62).

2.4.3. Enzimler

Candida türlerinin konak doku hasarı, hidrolitik enzimlerin çevreye salınımı ile kolaylaşmaktadır. Salgısal asit proteinaz (Sap), fosfolipaz, lipaz ve hemolizinler *Candida* türleri patogenezinde rol oynayan önemli enzimlerdir (2).

2.4.3.1. Salgısal Asit Proteinaz

1965 yılında ilk kez *C. albicans*'ta proteolitik aktivite tanımlanmıştır. Bu enzim patojenin, proteini nitrojen kaynağı olarak kullanmasına olanak sağlar (63). Sap'lar konak mukoza membranlarına, önemli immunolojik ve yapısal savunma proteinlerine hasar vererek konak dokuya kolonizasyonu ve invazyonu kolaylaştırmaktadır (2).

C. albicans'ta proteolitik aktivite, 10 üyesi bulunan *SAP* çoklu gen ailesi ile ilişkilidir. Sap protein ailesinin tüm üyeleri dört sistein ve iki korunmuş aspartat rezidü içermektedir. Bu proteinazların sekizi (Sap1-8) hücre dışı matrikse salgılanırken, Sap9 ve Sap10 membrana bağlı glikozilfosfolipid proteinleridir. GPI, *Saccharomyces cerevisia*'da bulunan hücre-hücre etkileşimleri ve hücre-duvar bütünlüğünde rol oynayan yapsinler ile yapısal olarak benzerdir. Bu izoenzimler, pepstatin A tarafından inhibe edilir ve asidik pH'da en uygun aktiviteyi gösterir (63,64).

Patojen olmayan *Candida* türlerinin proteolitik aktivitesi genellikle düşük olup, Sap üretimi düzeyi ile virulansın ilişkili olduğu bildirilmiştir (63). *C. albicans*'ın tüm *SAP* genleri preproprotein formunda öncül olarak sentezlenmektedir. Prepropeptid, bir sinyal peptid ile bir propeptid içermekte olup; sekresyon ve uygun proteinin doğru katlanması için gereklidir. Sap2, *in vitro* olarak en çok salgılanan proteinazdır. Sap1-Sap6 proteinazları, yapı ve aktif bölge özellikleri bakımından benzerlik göstermektedir. Hücre dışı matris ve kollajen, laminin, fibronektin ve müsin gibi konak yüzey proteinleri Sap2 tarafından parçalanmaktadır. Çeşitli konak savunma proteinleri, alfa-makroglobulin proteinaz inhibitörü ve salgısal IgA dahil tüm immunoglobulinler bakteriyal proteinazlara karşı dirençli iken, Sap2 tarafından parçalanabilmektedirler (63).

SAP üretimi; hif oluşumu, aderans ve fenotipik değişim ile ilişkili olup, *in vitro* çalışmalar ile *SAP1*, 2 ve 3'ün maya formunda; *SAP4*, 5 ve 6'nın ise hif formunda, *SAP9* ve 10'un ise her iki formda da eksprese edildiği bildirilmiştir (65-67). Epidermal ve vajinal kandidoz modellerinde *SAP4-6*'nın sistemik hastalıklar ile ilişkili olduğu bulunmuş ve *SAP7*'nin oral kavite örneklerinde bulunabildiği bildirilmiştir (68). "White-opaque" 1 (WO1) suşu ile yapılan çalışmalarda, *SAP1-3*'ün ilk tutulum, invazyon ve kutanöz infeksiyonlar ile

ilişkili olduğu, *SAP8*'in çoğunlukla penetrasyon ile ilişkisi olduğu belirlenmiş, *SAP6* ve *SAP9*'un ise hif şeklinde büyüme ileri düzeylerinde eksprese edildiği saptanmıştır (65-67). Ayrıca oral infeksiyonlu bireylerden elde edilen klinik örneklerin bazılarında *SAP 7* geninin eksprese edildiği, *SAP8* geninin ise vajinal infeksiyonlarda yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir (68).

Sap'ların farklı pH derecesinde gösterdikleri aktivite ile *Candida* türleri, çeşitli pH'daki farklı dokulara kolonize olabilirler. Örneğin Sap 1-3 proteinleri pH 3.5'da aktif iken, Sap 4-6 proteinleri pH 5.0-7.0 aralığında etkindirler. *C. albicans*'ta Sap izoenzimleri arasındaki bu pH farklılıkları, fungusun farklı bölgelerde infeksiyon oluşturabilmesi açısından önem taşımaktadır. Ayrıca Sap'lar, protein özgüllüğü düzeyinde de farklılıklar göstermektedir. Sap1,2,3 ve 6 büyük hidrofobik aminoasitlerde peptid bağlarını kırar; Sap 1,2 ve 6 fenilalanini, Sap3 ise lösinini etkiler. Sap 9 ile 10 keksin ve yapsini hidrolize etmektedir. Bu sayede *Candida*' lar, farklı dokulardan nitrojeni elde edebilir ve dokulara adezyonda potansiyel bağlanma bölgesini belirleyerek patogeneze katkı sağlar (69). *C. glabrata*'nın proteinaz üretimi yapabildiği gösterilmiş fakat proteinaz tipi belirlenememiştir (70), öte yandan bu türde hiçbir *SAP* geni saptanamamıştır (71). *C. parapsilosis*'de üç *SAP* (*SAPP1-3*) geni, *C. tropicalis*'de ise dört *SAP* (*SAPT1-4*) geni tanımlanmıştır. *C. tropicalis*'in oral epitele tutulum sırasında *SAP* üretiminin invazyon ve doku hasarı ile ilgili olmadığı bildirilmiştir (71).

SAP genlerinin sayısı ile kommensal organizmanın patojen organizmaya dönüşümü arasında bir ilişki bulunduğu ileri sürülmüştür. *C. glabrata* ve *C. krusei* suşları hariç patojen olmayan *Candida* suşları, patojenlere göre daha az Sap kodlayan gene sahiptir (71).

2.4.3.2.Fosfolipaz

Fosfolipaz enzimi, konak hücrelerini etkileyerek doku hasarına neden olur, epitel hücre membranını bozar ve hifin sitoplazmaya tutunmasını sağlayarak etki gösterir (72). Bu hidrolitik enzim, gliserofosfolipitlerin bir veya daha fazla ester bağını hidroliz etme yeteneğinde olan heterojen bir enzim grubudur. *C. albicans*'ta dört farklı fosfolipaz (PL) vardır; PLA, PLB, PLC ve PLD (63). Tüm tiplerin hidrolaz aktivitesi olup, PLB ek olarak lizofosfolipaz transaçilaz aktivitesine de sahiptir. Böylece fungus, fosfolipitlerden yağ asitleri de sentezleyebilmektedir (12). PLA, gliserolün iki yağ asidinin ayrılmasını katalize eder. PLA'nın iki izoenzimi bulunmaktadır; PLA1 dış yağ asidini, PLA2 ise iç yağ asidini parçalar.

PLA'nın, hücrelerarası membranda ve hücrelerdeki fosfolipidleri hidrolize ederek çimlenme borusu oluşumunda ve tomurcuklanmada rol oynadığı bildirilmiştir PLB, her iki yağ asidini de tek seferde parçalayabilmektedir (73). PLB1'in eksprese edilmesi, besin ortamı, sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörler ve *C. albicans* hücrelerinin büyüme fazı aracılığı ile kontrol edilmektedir. PLB1'in ekspresyonu ile çimlenme borusu oluşumu, hücre-yüzey hidrofobisitesi, adhezyon ve hemolizin üretimi gibi virulans faktörleri arasında herhangi bir ilişki bulunmamıştır. *PLB2* geni *PLB1* ile %65 benzerlik göstermekte olup, *PLB2* geni sinyal peptid içeren preprotein kodlamaktadır (63). PLC, fosfatidilkolinde bulunan karbon-fosfat bağlarını ayırır. PLC'nin fosfoinositidi de ayırarak ökaryot hücrenin plazma membranındaki reseptör-işaretli sinyal transdüksiyonunda önemli rol oynadığı bildirilmiştir. *C. albicans*'ta PLC kodlayan *PLC1*, *PLC2* ve *PLC3* geni tanımlanmış olup *PLC1*'in asıl önemli gen olduğu bildirilmiştir (74). PLD ise fosfatidik asit oluşturmak için fosfatidilkolinden kolini ayırır. PLD'nin aktivitesinin dimorfik değişim süresince stimüle edildiği bildirilmiştir (73). *Saccharomyces cerevisia*'da PLD'nin sporulasyon, büyüme ve membran lipid sentezi gibi çeşitli hücresel olaylarda yer aldığı gösterilmiş olup; *C. albicans*'da bu görevi yerine getiren PLD motifini *PLD1*'in kodladığı bildirilmiştir (74).

2.4.3.3.Lipaz

Lipazlar, mono-di-triaçilgliserollerin sentezinde ve hidrolizinde yer alır. Yüksek sıcaklıkta ve organik çözücülerde stabil olup, proteolize karşı direnç gösterir. Lipazların, lipid moleküllerinden serbest yağ asitlerinin salınımı ile besin kazanımı, konak hücreye adhezyon ve inflamatuvar yanıtın başlatılması gibi birçok süreçte rol oynadığı bildirilmiştir (75). Lipaz enzimi bulanmayan izolatların genel olarak daha az virulan oldukları bilinmektedir (76). *C. albicans*'da 10 lipaz geni tanımlanmıştır (*LIP1-10*). *C. tropicalis*'de benzer genlerin varlığı belirlenmiş olup, *C. glabrata*'da bu genler bulunmamaktadır (2,63). *C. parapsilosis* suşlarında ise *CpLIP1* ve *CpLIP2* olmak üzere iki lipaz geni bulunduğu bildirilmiştir. *CpLIP2* geni aktif proteini kodlamaktadır. *C. parapsilosis* enfeksiyonu süresince lipaz inhibitörünün doku hasarını büyük ölçüde azalttığı ve *CpLIP1/CpLIP2* mutantlarının ince ve daha az kompleks biyofilm oluşturduğu ileri sürülmüştür (2). *C. parapsilosis*'in lipaz aktivitesi aracılığı ile makrofaj içinde canlılığını sürdürebildiği ve inflamatuvar yanıtı azalttığı saptanmıştır (76). *C. albicans*'da maya-hif dönüşümü süresince tüm lipaz genlerinin ekspresyonun virulansta rol oynadığı bildirilmiştir (74).

Son yıllarda iki yeni hidrolitik enzim olan ekstraselüler serin ve metalloproteinaz aktiviteleri *C. albicans* ve *C. guilliermondii* suşlarında bildirilmiştir. Fakat bu iki enzimin patogenezdaki rolü tam olarak bilinmemektedir (77).

2.4.3.4.Hemolizin

Hemolizinler, kırmızı kan hücrelerini lize ederek, özellikle infeksiyonda önemli bir büyüme faktörü olan demirin salınımına neden olur (78). Konak hücrede serbest demir bulunmadığından, çoğu patojenin demir ihtiyacını hemoglobin gibi demir içeren bileşiklerden indirekt sağladığı bildirilmiştir (79). Ayrıca demir alınımlı ile mikroorganizmanın hif formundan maya formuna dönüşümünün arttığı saptanmıştır (78).

İlk defa Moors ve arkadaşları tarafından *C. albicans*'ın demir kaynağı olarak hemoglobinden yararlandığı, *C. albicans* infeksiyonlarında, fungusun kompleman sistem reseptörleri aracılığı ile eritrositlere bağlandığı ve hemolitik enzim salgılayarak eritrositleri parçaladığı bildirilmiştir (80). Eritrosit yıkımı iki aşamada gerçekleşir. İlk olarak, *Candida* kolonileri tarafından alfa-hemolitik faktör aracılığıyla kısmi yıkım gerçekleşir. Bu ilk aşamanın metabolik ürünleri, sekonder hemolitik faktör olan beta hemolizinin sekresyonu için katalizör görevi üstlenir ve hemoglobin yıkımı tamamlanır (81). Hemolizinlerin, sistemik kandidozda hif invazyonunun gerçekleşmesinde rol oynadığı ve *Candida* hiflerinin maya formuna göre daha fazla hemoglobin reseptörü içerdiği bildirilmiştir (82,83).

C. glabrata, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*'in *in vitro* bir veya daha fazla tip hemolizin ürettiği saptanmıştır (81). *Candida*'ların hemolitik aktivitesinin genetik ekspresyonu hala daha tam olarak bilinmemekle birlikte, "hemolysin like protein" (*HLP*) geninin *C. glabrata*'da hemolitik aktivite ile ilişkili olabileceği, bu genin bakteriler ve nematodlar gibi farklı türlerde bulunan *HLP* genlerine benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (83).

2.4.4. Morfolojik Değişim

C. albicans çevre şartlarına bağlı olarak maya, hif ve yalancı hif formunda büyüme yeteneğine sahiptir. Maya formundan filamentöz forma geçiş serum, prolin, N-asetilglukozamin, düşük oksijen düzeyi, yüksek karbondioksit (CO₂) miktarı, sıcaklık (25°C,37°C) gibi çevresel koşullara bağlı olarak değişmektedir (84,85). *C. albicans* izolatlarında *CCP1*, *CPH1*, *EFG1* ve *SSK1* genlerinin, mayadan hif formuna dönüşümde rol oynadığı bildirilmiştir (86).

Maya formu, fungusun kan dolaşımı aracılığı ile yayılımında ve epitel hücrelere adhere olmasında rol oynarken, filamentöz form mikroorganizmanın konak epitel dokuya invazyonunda ve morfolojisi nedeniyle fagositoza karşı direnç göstermesinde etkili olmaktadır. *C. albicans* gibi dimorfik fungusların farnesol, tirosol ve östradiol gibi çeşitli sinyal metabolitleri ürettiği, farnesolün ayrıca *C. albicans*'da filamentöz form oluşumunu baskıladığı bilinmektedir (84).

Morfolojik değişim, çevresel faktörler tarafından salgılanan sinyallerin maya hücre membranındaki reseptörler tarafından algılanması ile başlar. Bu sinyaller hücre içine iletdikten sonra cAMP, cGMP ve bazı iyonların miktarlarında değişiklikler meydana gelir. Oluşan iyon akımı sonucunda hif uzaması gerçekleşir. Hif formunun, maya formuna göre dokuya ve plastik yüzeylere daha fazla adhere olduğu fakat fagosit edilemediği bilinmektedir (19).

2.4.5. Fenotipik Değişim

Candida'ların fenotipik dönüşüm yeteneği ile düzgün, tüylü, düzensiz, yıldız, halka, noktalı ve şapka gibi farklı koloni fenotipleri izlenmiştir. Bazı suşlarda fenotipik değişim sonucu varyant koloni morfolojileri ortaya çıkabilmekte ve bu durumun en yaygın örneği *C. albicans*'ın WO-1 suşunda gözlenmektedir. *C. albicans* çoğunlukla düz, beyaz ve kubbe şeklinde koloniler oluşturur, bu koloni morfolojisindeki oval şekilli hücreler beyaz ("white") olarak adlandırılır. Koloniler, 10^{-4} sıklıkta yassılaştırmış, gri renkli koloni şeklinde farklı bir görünüm alır. Yüzeyleri pürüklü bu uzun, büyük hücreler opak ("opaque") olarak tanımlanır. "White-opaque" (W-O) dönüşümünde sadece koloni fenotipinde değil hücre fenotipinde de değişiklik olmaktadır. Düşük doz UV ve sıcaklık değişimi'nin WO dönüşümünü indüklediği bilinmektedir. Fenotipik değişim ile antifungal ilaçlara duyarlılık, konak hücre adezyonu, aspartik proteinaz aktivitesinin düzeyi, nötrofil ve oksidanlara duyarlılık etkilenmektedir. *C. albicans* dışında *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* ve *C. lusitaniae* suşlarında da fenotipik değişim görülmektedir (86).

Beyaz-opak fenotipik değişiminde 450'den fazla genin birbirinden farklı regüle edildiği, bu farklılıkların *C. albicans*'ın patojenitesi, tomurcuklanma etkinliği ve biyofilm oluşumunu etkilediği bildirilmiştir. Ayrıca, beyaz ve opak hücrelerin makrofajlar tarafından farklı şekillerde fagosit edildiği ve bu nedenle WO değişiminin konak immun sistem yanıtından kaçış için bir uyarı mekanizması olabileceği düşünülmüştür (87).

2.4.6. Hücre Yüzey Hidrofobisitesi

Hidrofobisite, genellikle adezyonu başlatan bir virulans faktörü olarak bilinmektedir (88). *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata*'da hücre yüzey hidrofobisitesi, büyüme sıcaklığı ile düzenlenmekte ve 22°C'de daha hidrofobik olmaktadır. *C. albicans* hidrofobik hücrelerinin, hidrofilik olanlara göre daha virulan olduğu bildirilmiş fakat hidrofobisitenin virulansta tek başına yeterli olamayacağı belirtilmiştir. Hidrofobik olan mikroorganizmaların özellikle dakron, teflon, akrilik gibi yüzeylere adezyonunun daha iyi olabileceği ileri sürülmüştür (88,89).

2.4.7. Siderefor Kullanımı

Çoğu bakteri ve fungus tarafından sentezlenen ve salgılanan sideroforlar, düşük molekül ağırlıklı Fe^{3+} ile yüksek oranda ilişkili organik şelatörlerdir (90). Bağlı demiri ayırabildiğinde, mikroorganizmanın iyi üreyebildiği bildirilmiştir. Demir iyonları, nötral pH'de çözünürlüklerinin çok düşük olması sebebi ile mikroorganizmalar tarafından kullanılamaz. Sideroforlar, şelasyon yoluyla bu iyonların çözülmesini ve aktif taşıma ile hücre içine alınmasını sağlar. Transferrin ve laktoferrin içeren vücut proteinlerinin de demiri ayırdığı bildirilmiştir. *C. albicans*'da, *S. cerevisia*'da bulunan *FTR1* homologu iki gen tanımlanmıştır. *FTR1*'in, mikroorganizmanın demir içeren ortamda yaşaması ve virulansı için gerekli olduğu saptanmıştır (91).

2.4.8. Hücre Duvar Yapısı

Fungal hücre duvarı, hücre şeklini ve dış çevredeki değişikliklerden hücreyi korumayı sağlayan dinamik bir yapı olup, konak-fungus etkileşiminde ilk ve esas rolü oynar. Hücre duvarı, β -glukan ve kitin tabakadan oluşan iç iskeletten oluşmuş ve mannopteinlerce zengin bir dış tabaka ile kaplanmıştır. *N*- ve *O*- bağlı mannanlar, hücre duvar bütünlüğü korur, adezyonda rol oynarak virulansa katkı sağlar. Ayrıca bu yapının, konak doğal immun sisteminin oluşturduğu *C. albicans* PAMPs'larından biri olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. *C. albicans*'da *O*-mannan, 1,5- α -1,2-bağlı mannoz rezidürlерinden oluşmakta ve serin veya treonine bağlanmaktadır. Mikroorganizma virulansının tam olarak etki göstermesi için bu bağlanmanın olması gerektiği bildirilmiştir (92).

2.4.9. Moleküler Benzeme

Candida türleri tarafından eksprese edilen çeşitli hücre yüzey molekülleri, konak reseptörlerini taklit ederek mikroorganizmanın konak immün yanıtından kaçmasına yardım etmektedir (93). Maya yüzeyinde tanımlanan CR3-RP, memelilerdeki nötrofil reseptörü CD11b/CD18'nin α alt birimine antijenik, yapısal ve fonksiyonel olarak benzemesi nedeniyle integrin ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmaktadır. Bu reseptörün insan kompleman bileşeni olan iC3b'ye bağlanması, opsonizasyon inhibisyonunu ve fagositozu kısmi olarak engellemektedir (94).

2.5. *Candida* Türlerinin Neden olduğu İnfeksiyonlar

Candida türleri, mukozal kolonizasyondan çoklu organ tutulumuna kadar geniş bir yelpazede yer alan infeksiyonlara neden olabilir. İnfeksiyonlar, klinik olarak yüzeysel (kutanöz ve mukozal), kronik mukokutanöz ve sistemik kandidoz olmak üzere başlıca üç grupta incelenmektedir (19).

2.5.1. Kutanöz ve Mukozal Kandidoz

Yüzeysel kandidoz, lokal olarak *Candida* sayısının artması, deri ve epiteldeki hasarın maya veya yalancı hişlerin lokal invazyonuna izin vermesiyle oluşur. AIDS, gebelik, diabetes mellitus, çok genç ve ileri yaşlar, oral kontraseptif, antibiyotik ve kemoterapötik ajanların kullanımı ile travma yüzeysel kandidoz ile ilişkili risk faktörleridir. Kutanöz kandidoz ise daha çok derinin travma, yanık veya maserasyon gibi nedenlerle bütünlüğünün bozulması durumlarında meydana gelmektedir. İnfeksiyon koltuk altı, kasıklar ve gluteal alanlar gibi vücudun nemli ve ılık, kıvrım yerlerinde ortaya çıkmaktadır (95).

Mukozal kandidoz, çeşitli lokalizasyonlarda görülebilir. Vücutta en sık tutulan mukozalar vulvovaginal bölge ve orofarinkstir. Vulvovaginal kandidoz (VVK) iritasyon, yanma, kaşıntı ve “süt keşiği” benzeri vaginal akıntı ile seyreder (96). Diabetes mellitus, gebelik ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı önemli risk faktörleridir (19). Bu infeksiyon, zemin hazırlayan faktörlerin varlığında bağışıklık sistemi sağlam bireylerde de izlenebilir. Kadınların %75'inde VVK'un ve bu vakaların %5-8'inde ise tekrarlayan VVK'un görüldüğü saptanmıştır. Olguların %80'inden *C. albicans*'ın sorumlu olduğu, onu %5 ile *C. glabrata*'nın izlediği bildirilmiştir. Ayrıca *C. krusei*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* izolatlarının da vajinite neden olduğu ileri sürülmüştür (19,97).

Pamukçuk olarak bilinen oral kavite kandidozunun en çok süt emen bebeklerde ve yaşlılarda, CD4+ düzeyi düşük olan HIV pozitif ve kanserli bireylerde görüldüğü bildirilmiştir. Dil üzerinde, yanak mukozasında, damak ve bazen boğazda yama tarzında yalancı membran meydana gelmektedir. *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis*'in infeksiyon gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Diabetes mellitus, endokrin sistem hastalıkları, kanser, protez kullanımı, kemoterapötik ajanların kullanımı, organ transplantasyonu gibi faktörlerin oral kandidoz gelişiminde rol oynadığı bildirilmiştir (96,98,99).

2.5.2. Sistemik Kandidoz

Sistemik kandidoz, *Candida* türlerinin kan dolaşımına girmesi, konak fagosit savunmasının üreme ve yayılmayı engellemedeki yetersizliği sonucu gelişir. Kronik kortikosteroid ve immunsupresif ilaç kullanımı, lösemi, lenfoma, aplastik anemi gibi hematolojik hastalıklar ya da kronik granülamatöz hastalık ile sistemik kandidozun ilişkisi olduğu bilinmektedir.

Son yıllarda fungal sepsisin mortalite oranının bakteriyal sepsisten daha yüksek olduğu bildirilmiştir (100). Sistemik kandidoz, immun sistem baskılanmış bireylerde gastrointestinal sistem, yoğun bakım ünitesindeki akut nötropenik olmayan hastalarda ise deri kökenli olarak gelişebilir. Antibiyotik kullanımı ile bağırsaktaki *Candida* yükünün artması, gastrointestinal mukozal bariyere girişi kolaylaştırır, sitotoksik kemoterapi ise fagosit yıkımını indükler. Nötropenik olmayan hasta grubunda ise devamlı kateter kullanımı kutanöz bariyerin mikroorganizma tarafından aşımını kolaylaştırır. Her iki şekilde de *Candida*'nın kan dolaşımına girişinin sağladığı bildirilmiştir (101). Patojen *Candida* türlerinin, invazif fungal infeksiyonlarının birinci, hastane kökenli dolaşım sistemi infeksiyonlarının ise dördüncü yaygın etkeni olduğu bildirilmiştir (22).

Candida türleri, kalpte endokard, miyokard ya da perikardı tutabilir. *Candida* endokarditinin, maya hücreleri ve yalancı hiflerin protez kalp kapakları veya vejetasyonların üzerine yerleşip üremesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Üriner sistem *Candida* infeksiyonlarının ise sistit ya da piyelonefrit biçiminde ortaya çıktığı, bu infeksiyonların foley kateteri, diabetes mellitus, gebelik ve antibiyotikler ile ilişkili olduğu bilinmektedir (95, 96).

2.5.3. Kronik Mukokutanöz Kandidoz

Kronik mukokutanöz kandidoz (KMK) deri, muköz membranlar, saç ve tırnaklarda *Candida* türlerinin neden olduğu kronik persistan infeksiyonlarla seyreden ender bir hastalıktır (96). Bu hastalık, hücresel immün yetmezlik ve endokrinopatilerle ilişkili olup, tutulan tüm deri ve mukozalarda kronik infeskiyona bağlı deformasyonlarla sonuçlanır (95).

2.6. *Candida* İnfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı

Candida infeksiyonlarının tanısı için infeksiyon bölgesi ile ilişkili olarak kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), bronkoalveolar lavaj, bronş lavaj, aspirat, doku biyopsileri, idrar, yüzeysel lezyonlardan kazıntı ve sürüntüler, intravenöz kateter örneği örnek olarak alınabilir (95).

Bu örnekler direkt mikroskopik inceleme, kültür, antijen, mantara özgül metabolit ve nükleik asit saptanması, hücre duvarı komponentlerinin belirlenmesi ve serolojik tanı ile *Candida* varlığı açısından incelenmektedir (102).

2.6.1. Direkt Bakı

Klinik örneklerle uygulanacak ilk işlem direk bakıdır. Direk bakı için boyasız yaş preparat, %10'luk potasyum hidroksit (KOH), kalkoflor beyazı preparatları ile Gram, Giemsa, Wright, metilen mavisi gibi boyalar ile hazırlanan preparatlar örnek türüne göre seçilip kullanılabilir.

Deri ve ekleri örnekleri için %10'luk KOH veya kalkoflor beyazı preparatı hazırlanmakta, sistemik ve mukozal örnekler için ise yaş, boyasız preparat ve Gram, Giemsa, Wright, metilen mavisi boyama yöntemleri ile boyanan preparatlar incelenmektedir. (103). %10'luk KOH ilavesi ile konak hücrenin protein kısımları sindirilir, mantar hücre duvarı ise daha belirgin hale gelir. Kalkoflor beyazı ise mantar duvarındaki β -1,3 ve β -1,4 polisakkaritlere bağlanır Bu örneklerde maya hücreleri izlenir, bu hücreler tomurcuklanmaları ile ayırt edilir (102).

Gram boyama, en çok kullanılan boyama yöntemi olup, maya hücreleri ve yalancı hifler genellikle gram pozitif, gerçek hifler ise gram negatif olarak boyanır (104).

Doku örneklerindeki *Candida*'ların araştırılmasında ise hematoksilen eozin, periyodik asit-schiff (PAS) ve methanamin gümüş boyaları kullanılmaktadır. Bu boyalar, mantarın dokuya yayılım gösterip göstermediğinin saptanmasına olanak tanır (105). PAS ile boyanan

preparatlarda, zıt boya olarak pikrik asit kullanıldıysa mantarlar turuncu, zıt boya olarak açık yeşil kullanıldıysa parlak pembemsi-kırmızımsı mor ya da erguvan renkli olarak görünürler. Metanamin gümüş boyalı preparatlarda ise mantar ve elemanları, soluk yeşil ya da sarı zemin üzerinde siyah renkte belirgin bir şekilde görünürler (102).

2.6.2. *Kültür*

Candida türlerinin soyutlanmasında primer izolasyon besiyeri olarak SDA besiyeri kullanılmaktadır. Ayrıca modifiye SDA, Sabouraud dekstrozu buyyon, beyin kalp infüzyon buyyonu ve Sabouraud beyin kalp infüzyon (SABHI) agar da izolasyon için kullanılan diğer besiyerleridir. Bu besiyerleri içine sikloheksimit gibi kontaminant mantarların üremesini engelleyen maddeler ve kloramfenikol, gentamisin gibi bakterilerin üremesi engelleyen antibiyotikler de ilave edilebilir (105).

Candida türlerinin çoğu aerob koşullarda, 25-30°C’de iyi üreme gösterir, birçoğu da 37°C ve üstündeki ısılarda üreyebilir. Koloniler genelde 48-72 saatte görünür hale gelmektedir. *Candida* türlerinin kolonileri genellikle hamurumsu, beyaz, krem rengi ile sarımsı kahverengi ve opaktır. Koloni yüzeyleri düzgün veya kıvrımlı bir morfolojide olabilmektedir (105). Türler arasındaki morfolojik farklılıklar mısır unlu agar gibi özel besiyerlerinde saptanabilir (19). *C. albicans* kolonileri, SDA’daki ilk izolasyonlarında buruşuk veya pürüzlü görünümde olup, daha sonraki pasajlarında düzgündür. Çoğu *C. albicans* kökeni koyun kanlı agarda “ayaklı koloniler” oluşturmaktadır. Diğer birçok mayada bu morfoloji görülmez iken *C. tropicalis* ve *C. krusei*’nin %25’inin bu tarz koloni oluşturduğu bildirilmiştir (106).

C. albicans’ın hızlı ön identifikasyonu için kullanılan en değerli ve basit testlerden biri çimlenme borusu testidir (107). Çimlenme borusu testinde 37°C’de nötral pH ve serum varlığında hif oluşumu uyarılmaktadır. Çimlenme borusu çıktığı maya hücresinin kalınlığının 1/3’ü, boyunun ise en az üç katı olmalıdır. Dikkat edilmesi gereken nokta ise çimlenme borusunun çıktığı yerde boğumlanma olmamasıdır. *C. tropicalis*’in bu boruya benzeyen yapılarının ayrımında bu durum önem taşımaktadır. Teorik olarak *C. albicans* ve *C. dubliniensis* izolatlarının çoğu çimlenme borusu oluşturur. Yoğun maya inokulumu, uzun inkübasyon süresi ve ortamda bakterilerin bulunması yalancı negatif sonuçlara neden olabilir. Hasta, bağışıklık sistemi baskılanmış veya antifungal sağaltım alıyorsa bu bireyden izole edilen *C. albicans* kökenlerinin %5’inin çimlenme borusu oluşturmadığı bildirilmiştir (107,108).

Candida'ların tanımlanmasında kullanılan bir diğer yöntem ise mısır unlu tween 80 agarda izolatların morfolojik yapılarının incelenmesidir. Bu yöntemle mayaların oluşturdukları gerçek ve yalancı hifler, blastokonidyalar, klamidosporların yapı ve yerleşimlerine göre tür düzeyinde tanımlamaya gidilir. Mikroorganizmalar, bu besiyerine ekildikten sonra 25 °C'de 72 saat inkübe edilir.

C. albicans genellikle büyük, kalın duvarlı, tek, terminal klamidospor ve yalancı hiflerin boğumlanmasında küme halinde blastokonidya oluşturmaktadır. Klamidospor oluşumu 30-37°C'de inhibe olmaktadır.

C. dubliniensis, yalancı veya gerçek hif, septalarda küme halinde blastokonidya ve birden fazla büyük, kalın duvarlı klamidospor oluşturmaktadır.

C. tropicalis, yalancı hif ve bu hiflerin yanında tek ya da gözyaşı damlası şeklinde kümeler halinde blastospor oluşturmaktadır. Bazen gerçek hif oluşumu da gözlenmektedir.

C. krusei, yalancı hif ve yanlarında ağaç ya da çapraz konulmuş odun kütüğü şeklinde uzun blastokonidyalar olarak görülmektedir.

C. parapsilosis, yalancı hif boyunca tek tek ya da küçük gruplar halinde blastokonidya ve dev hücre denilen genişlemiş hifal yapılar oluşturmaktadır.

C. kefyr, *C. krusei* gibi uzun blastokonidyalar üretmekte, fakat *C. krusei*'den farklı olarak blastokonidyaların hepsi aynı yöne doğrudur. Uzamış blastokonidyalar derede yüzen kütük görünümü vermektedir.

C. glabrata, küçük, oval, tekli tomurcuklanmış maya hücreleri oluştururken, yalancı hif oluşumu gözlenmez.

C. lusitaniae, dallanmış, kıvrık şekilli yalancı hif ve kısa zincir oluşturan uzun blastokondiyalar şeklinde izlenir.

C. guilliermondii, yalancı hiflerin çevresinde küçük blastospor kümeleri oluşturur, yalancı hifler kısa ve az sayıdadır. Gerçek hif oluşumu yoktur.

C. lipolytica, kısa zincirli blastokondiya, yalancı hif ve gerçek hif oluşturur. Bazen artrokonidya oluşumu gözlenebilir.

C. famata çoklu tomurcuklanma gösteren maya hücreleri oluşturur.

C. utilis ise uç uca dizilim gösteren ve dallanan elips şeklinde blastokonidya oluşturmaktadır (13,103).

Candida türlerinin identifikasyonu için kromojenik besiyerleri de kullanılmaktadır. Bu besiyerleri esas olarak *Candida* türlerinin hızlı ve ön identifikasyonuna destek amacı ile kullanılır. Kromojenik besiyerleri, hedef mikroorganizmalar tarafından salgılanan enzimler ile tepkimeye giren substratlar içermekte olup, bu substratlar enzimler tarafından hidrolize edilerek farklı renk ve morfolojide koloniler oluşmaktadır (108). Piyasada bu amaçla kullanılan birçok kromojenik besiyeri bulunmaktadır. Bunlara, CHROMagar *Candida* (Becton Dickenson), Albicans ID2 (BioMérieux), *Candida* ID2 (BioMérieux), ChromID *Candida* agar (CAN2)(BioMérieux), CandiSelect 4 (Bio-Rad), Bismuth Sulfite Glucose Glycine Yeast (BiGGY) Agar (Oxoid), Oxoid Chromogenic *Candida* (OCCA) Agar (Oxoid) örnek olarak verilebilir.

Candida türlerinin tanımlanmasında bir ileri aşamada karbohidrat, asimilasyon fermentasyon testleri kullanılmaktadır. Karbohidrat asimilasyon testlerinde, mayanın oksijen varlığında belirli bir karbohidratı tek karbon kaynağı olarak kullanabilme yeteneği ölçülür. Bu konuda standardize edilmiş, otomatize, ticari sistemler de bulunmaktadır. Bunlardan en sık kullanılanlar API 20C AUX (BioMérieux) ve API ID32 (BioMérieux)'dir. Fermentasyon testlerinde ise, fermantatif mayalar karbondioksit ve alkol oluşturur. Bu nedenle, gaz oluşumu fermentasyonun bir göstergesi olarak kabul edilir.

Üreaz ve hızlı trehaloz testleri de tanımlamada kullanılan diğer araçlardır. Üreaz testinde, maya uygun substrat varlığında üreaz enzimi varsa üreyi parçalayıp amonyak oluşturur; amonyak da pH'yı yükselterek, fenol kırmızısı indikatöründe, koyu sarı renkten pembemsi kırmızı bir renk dönüşümüne neden olur. *C. krusei* ve *C. lipolytica*'nın bazı kökenleri dışında çoğu *Candida* türü üreaz negatiftir. Hızlı trehaloz testi ise özellikle *C. glabrata*'nın üç saat içerisinde tanımlanması için kullanılan bir asimilasyon testidir. Test değerlendirilirken, kanlı agar kullanıldığında *C. albicans* ve *C. tropicalis* yalancı pozitiflik verdiği için bu besiyerinin kullanılmaması, CHROMagar ve SDA besiyerinin kullanılması önerilmektedir.

Candida türlerinin tanımlanması polimeraz zincir tepkimesi (PZT), dizi analizi, nükleik asit hibridizasyon "probe"ları gibi moleküler yöntemler kullanılarak tür düzeyinde farklılık gösteren gen bölgeleri incelenerek de yapılabilir. *Candida* türleri için en yaygın olarak

ribozomal alt birimleri kodlayan gen bölgelerinin arasına giren ve protein kodlamayan “internal transcribed spacer” (ITS1, ITS2) bölgeleri, sitokrom P450 lanosterol alfa-demetilaz, SAPs, aktin, kitin sentaz ve ısı şok proteinini kodlayan bölgeler hedef olarak seçilmektedir. Tanımlamada referans yöntem ise dizi analizidir (109).

Son yıllarda rutin laboratuvarlarda tür tanımlanmasında kullanılan “matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight” (MALDI-TOF) kütle spektrofotometresinin, hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi sebebi ile *Candida* türleri için de kullanıldığı bildirilmiştir. Bu yöntem ile türe özgü protein parmak izi oluşturularak, suşların veritabanındaki diğer türler içerisinde kolayca tanımlanması sağlanır (110,111).

2.6.3. Serolojik Tanı

Candida enfeksiyonlarının tanısında serolojik yöntemler de kullanılabilir ancak kullanılan serolojik testlerin özgüllüğü ve duyarlılığının düşük olduğu bildirilmiştir (112). Serolojik yöntem olarak antikor, antijen, her ikisini bir arada arayan ve metabolitleri inceleyen testler uygulanabilmektedir.

Sistemik kandidozda, çeşitli *Candida* antijenlerine karşı antikor titreleri yükselir fakat serolojik olarak tanı koyduracak bir ölçüt bulunmamaktadır. Öte yandan *Candida* türlerinin normal florada bulunması, immunsupresif hastalarda antikor titrelerinin düşük olması da tanı açısından önemli dezavantajlardır. İmmün sistemi baskılanmış invazif fungal enfeksiyonlu bireylerde düşük düzeyde antikor üretilmesi ve enfeksiyona neden olmayan, *Candida* kolonizasyonuna bağlı olarak antikor düzeylerinin yükselmesi yalancı pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Ticari olarak anti-*Candida* antikor kitleri mevcut olup, IgG Platelia (Bio-Rad Laboratories) dışında diğerlerinin düşük özgüllük ve duyarlılık gösterdiği, bu testin duyarlılığının da %59, özgüllüğünün ise %63 olduğu bildirilmiştir (113).

Serolojik tanıda en yaygın olarak kullanılan *Candida* antijeni, hücre duvar bileşeni olan mannanıdır (105). Kan dolaşımından mannan antijeninin atılımının hızlı olması nedeniyle hastadan alınan serum örneklerinin sayısı yöntem duyarlılığını etkilemekte ve sadece bir serum örneği olduğunda test duyarlılığı %40’tan %11’e düşmektedir. Lateks agglutinasyon veya enzim immunoassay kullanılarak dolaşımdaki mannan antijeninin saptanması çok daha özgündür, fakat hastalar geçici olarak pozitif olduğundan veya hastalığın ilerleyen dönemlerine kadar belirgin ve anlamlı düzeyde belirlenemediğinden duyarlılığı düşüktür (95). BOS veya oral kavite örneklerinde mannan antijeni saptanması, *Candida* menenjit veya oral

Candida infeksiyonlarının erken tanısı için kullanılabilir olduğu bildirilmiştir (112). Platelia antijen kiti (Bio-Rad)'nin duyarlılığının %86, özgüllüğünün ise %79 olduğu bildirilmiştir (113).

Çalışmalarda invazif kandidoz tanısında mannan antijen ve antikor testlerini tek başına kullanmak yerine bu testlerin kombinasyonunun kullanılması önerilmiş ve bu şekilde test performansının arttığı bildirilmiştir. *C. albicans* infeksiyonlarında kombine testlerin duyarlılığının %100'e ulaştığı, diğer *Candida* türlerinde ise bu oranın % 40-83 arasında olduğu bildirilmiştir (112). Milkulska ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise kombine testin duyarlılığı %83, özgüllüğü %86 olarak belirlenmiş olup, antijen testleri tek başına kullanıldığında duyarlılığın %58, özgüllüğün %93; antikor testleri kullanıldığında ise duyarlılığın %59, özgüllüğün %83 olduğu belirtilmiştir (114).

Hücre duvar bileşeni olan 1,3- β -D-Glukan (BG) serolojik tanıda kullanılan bir diğer *Candida* antijenidir. Fakat BG antijen testi, infeksiyon etkeni türü belirleyememektedir. Sağlıklı bireylerin serumunda da az miktarda ve doğada BG bulunabilmesi nedeniyle, yalancı pozitiflik izlenebilmektedir. Bu nedenle pozitif BG sonuçları kültür, histopatoloji ve görüntüleme yöntemleri ile doğrulanmalıdır (112). Çeşitli çalışmalarda BG testinin duyarlılığının %44-100, özgüllüğünün % 20-96 arasında bildirilmiştir (115-118).

D-arabinitol, *C. glabrata* ve *C. krusei* dışında çoğu *Candida* türü tarafından salgılanan bir metabolit olup; serum düzeylerinin, invazif kandidozlu hastalarda yükseldiği, bu hasta grubundan sağlıklı ve *Candida* kolonizasyonu olan bireyleri ayırt edebildiği gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar tanımlayıcı duyarlılık ve özgüllüğün serumdaki veya idrardaki D-arabinitol/L-arabinitol oranının ölçülmesi ile geliştirilebileceğini belirtmektedir (113).

2.6.4. Moleküler Tanı

Klinik örnekte mantara özgü nükleik asitlerin direkt olarak saptanması amacıyla PZT uygulanması, mantar infeksiyonlarının hızlı tanısı için büyük ümit vermektedir. Hedef dizi olarak aktin, kitin sentetaz, P450, ITS ve ribozomal RNA genleri kullanılmaktadır (104). PZT özellikle de “real time” PZT ile *Candida* DNA'sının kantitasyonu yapılarak kolonizasyon ile derin infeksiyon ayırımına gidilebilmektedir (19).

Moleküler yöntemlerin en büyük avantajı yüksek duyarlılık ve sonuçlara hızlı erişilebilmesi ve bu sayede antifungal sağaltıma zamanında başlanabilmesidir (119). Ancak moleküler yöntemler ile ilgili en büyük sorun standardizasyonun tam yapılamamış olmasıdır.

Uygun örnek türü, miktarı, çoğaltılacak gen bölgesi ve protokoller arasında bir standardizasyon bulunmamaktadır. Umut veren ve hızlı, güvenilir sonuçlar vereceği düşünölen bu yöntemlerin rutin tanı amaçlı kullanıma girebilmesi için standardizasyon ve geçerlilik çalışmalarına gereksinim söz konusudur (120).



3. GEREK ve YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yapılan çalışma, girişimsel olmayan deneysel nitelikte bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Tez kapsamındaki deneysel nitelikli çalışmalar 2011-2013 yılları arasında Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Mikoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırmamızda, 2011 Temmuz – 2012 Kasım ayları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarı'nda kan, idrar, oral kavite ve alt solunum yolu örneklerinden soyutlanmış *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* suşları kullanıldı. Merkez Laboratuvarı başkanlığından suşların kullanılacağına dair izin alındı ve insan üzerinde bir çalışma yapılmadı.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmaya, Temmuz 2011- Kasım 2012 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarı'nda kan, idrar, oral kavite ve alt solunum yolu örneklerinden soyutlanan ve rutin olarak uygulanan, çimlenme borusu testi, mısır unu tween 80 agar, CHROMagar Candida (Becton Dickenson) besiyerlerindeki morfoloji ve otomatize karbohidrat asimilasyon testi olan API 20C AUX (BioMérieux) identifikasyon sistemi ile tanımlanan *C. albicans* (n=171), *C. tropicalis* (n=94), *C. glabrata* (n=73) ve *C. parapsilosis* (n=81) türlerinden oluşan toplam 409 suş alındı. Suşların, soyutlandığı örnek gruplarına göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir. Biyofilm üretimi araştırılırken pozitif kontrol olarak Prof.Dr. Beyza ENER'den aldığımız biyofilm üretimi pozitif olduğu bilinen *C. albicans* suşu kullanıldı. Suşların hemolitik aktivitesi incelenirken ise pozitif kontrol olarak *C. albicans* ATCC 90028 suşu kullanıldı. Ayrıca α hemoliz zonu açısından Prof. Dr. Zeynep GÜLAY'dan sağlanan *Streptococcus pneumoniae* ve β hemoliz zonu için *Streptococcus pyogenes* izolatları kullanıldı. Tüm suşlar %50 gliserol içeren beyin kalp infüzyon buyyonunda (BHI) stoklanarak, -80°C'de saklandı.

Tablo 1. Suşların soyutlandığı örnek gruplarına göre dağılımı

<i>Candida</i> Türleri	Kan	İdrar	Alt solunum yolu örnekleri	Oral kavite
<i>C. albicans</i>	45	50	34	42
<i>C. tropicalis</i>	20	41	23	-
<i>C. parapsilosis</i>	40	31	10	-
<i>C. glabrata</i>	15	42	16	-
TOPLAM	120	164	83	42

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişkenler; çalışılacak olan 409 suşun fosfolipaz aktivitesi, biyofilm oluşturma yeteneği, hemolitik aktivitesi ve jelatinaz aktivitesi olup; bağımsız değişkenler belirtilen tarihler arasında soyutlanan *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* izolatlarıdır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Sıra No.	Malzeme Adı	Marka	Model, Katalog No	Kullanıldığı Analiz
1.	Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)	Oxoid	CM0041	<i>Candida</i> suşlarının pasajlanması
2	Beyin Kalp İnfüzyon Buyyon	Fluka	53286	Suşların stoklanması
3	Gliserol	Riedel-de Haën	15524	Suşların stoklanması
4	Pepton	AppliChem	A2208,0500	Sabouraud dekstroz buyyonun

				hazırlanması
5	Dekstroz	AppliChem	A3666,0500	Sabouraud dekstrozu buyyonunun hazırlanması
6	Jelatin	Merck	K44224378	Jelatinaz ilaveli SDA hazırlanması
7	CaCl ₂	Fluka	21097	pH düzenlenmesi
8	NaOH	AppliChem	A6829,0500	pH düzenlenmesi
9	HgCl ₂	Sigma	31005	Jelatinaz aktivitesinin belirlenmesi
10	Metanol	Merck	K27905808	Fiksasyon
11	Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS)	AppliChem	A0964,9010	Mikroplak ile biyofilm oluşumu yıkama aşaması
12	Eppendorf tüp, 1.5 ml	Greiner bio- One	616201	Suşların stoklanması
13	Petri kutusu	FıratMed		Suşların pasajlanması
14	96 kuyucuklu, U tabanlı mikroplak	Greiner bio- one/Cellstar	650180	Biyofilm üretiminin incelenmesi
15	Filtreli pipet ucu (0,5-10, 10-100, 100-1000µl)	Greiner bio- one		Tüm analizler

16	Pipetör seti (10, 100, 1000µl)	Thermo Scientific-FinnPipette	4700410	Tüm analizler
17	Spektrofotometre	Thermo MultiScan		Mikroplak kullanılarak biyofilm üretiminin saptanması
18	-80°C derin dondurucu	Thermo	705 REL#2 805797-117	Suşların saklanması
19	Etüv	Memmert INE 500	E509.04 76	Suşların üretilmesi
20	Tartı	Adam Equipment Co.	AE 326611770	Besiyeri ve kimyasalların hazırlanması
21	Otoklav	HICLAVE Hirayama	HV-85 000685748	Tüm analizler

3.6.2. Biyofilm Üretiminin Araştırılması

Suşların biyofilm üretimlerinin araştırılması için iki farklı yöntem (petri aderans ve modifiye mikroplak yöntemi) kullanıldı (121,122). Çalışmaya alınan suşlar SDA'ya pasajlanıp, saf oldukları belirlendikten sonra işlemlere başlandı.

3.6.2.1. Petri Aderans Yöntemi ile Biyofilm Üretimi Araştırılması

3.6.2.1.1. Safranin Boyasının Hazırlanışı

"Safranin O" tozu 1gr

Distile Su 100 ml

Karışım homojenize hale getirildi. Bir gün bekletildikten sonra kullanıldı.

3.6.2.1.2. Deneyin Uygulanması

SDA' da 35°C'de 48 saatlik inkubasyon sonucu üretilen *Candida* kökenlerinden bir öze dolusu alınıp, 25 ml %8 glukoz ilaveli Sabouraud Dekstroz Buyyon (SDB) içeren petrilere pasaj yapıldı. Plaklar, 24 saat 35°C'de inkübe edildikten sonra SDB yavaş biçimde döküldü ve petriler beşer ml steril distile su ile iki kez yıkandı. Oluşan biyofilm tabakasını göstermek üzere her bir petri beş ml %1'lik safranin boyası ile bir dakika süre ile boyandı (121,123).

3.6.2.1.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Değerlendirme, iki kişi tarafından kör olarak yapıldı. Renk tutulumu ve boyanmanın olduğu petriler biyofilm oluşumu yönünden olumlu olarak değerlendirildi.

3.6.2.2. Modifiye Mikroplak Yöntemi ile Biyofilm Üretimi Araştırılması

3.6.2.2.1. Kristal Viyole Boya Çözeltisinin Hazırlanması

Kristal viyole	1 gr
Ferrik asit kristali	2 gr
%98'lik etil alkol	10 ml
Distile su	100 ml

Cam havanda boya ezilirken yavaş yavaş alkol ve ferik asit kristalleri eklendi. Karışımın hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Bir gün bekletildikten sonra kullanıldı.

3.6.2.2.2. Deneyin Uygulanması

SDA'da 35°C'de 48 saatlik inkubasyon sonucu üretilen *Candida* kökenlerinden bir öze dolusu alınarak, 10 ml %8 glukoz içeren SDB'a pasaj yapıldı. 35°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra 1/100 oranında %8 oranında glukoz içeren sıvı besiyeri ile dilue edilerek "U" tabanlı mikroplaklara her bir kuyucuğa 0,2 ml pipetlendi. Mikroplakların üzeri steril alüminyum folyo ile kapatılıp 35°C'de 24 saatlik inkübasyona kaldırıldı. Kuyucuklar inkübasyon sonunda dikkatli bir şekilde boşaltıldı. Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile kuyucuklar dört kez yıkandı. Metanol ile üç dakika tespit edilen kuyucuklar %2'lik kristal viyole ile bir dakika süre ile boyandı. Boyama sonrası iki kez PBS ile yıkanan mikroplakların

optik dansiteleri, kurumalarının ardından 492 nanometre dalga boyunda mikropalak okuyucuda belirlendi (122,124)

3.6.2.2.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Her suş için çalışılan uç kuyucuğun optik dansitelerinin ve her plak için boş besiyeri bulunan altı kuyucuğun absorbanslarının ortalaması alındı. Boş kuyucukların ortalama değerine 2 standart sapma değeri eklenerek sınır değer (cut-off) saptandı. Belirlenen bu sayısal değerin uzerindeki değerde olan kuyucuklar pozitif, altında olanlar ise biyofilm uzerimi yonunden negatif olarak değerlendirildi.

3.6.3. Fosfolipaz Enzim Varlığı Araştırılması

Fosfolipaz enzim varlığı Samaranyake ve ark.ları tarafından geliştirilen, Price ve ark.ları tarafından modifiye edilen yumurta sarılı agar yontemi kullanılarak araştırıldı (125).

3.6.3.1. Besiyerinin Hazırlanışı

13 g SDA, 11.7 g NaCl, 0.111 g CaCl₂, 184 ml distile su karışımı otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edilerek hazırlandı. 80 g yumurta sarısı ağzı kapalı steril bir tup icerisine alındı ve tup 1000g’ de 15 dakika santrifuj edilip supernatant distile su ile ilk hacmine tamamlandı. Besiyeri 45-50°C’ye kadar soğutulduktan sonra yumurta sarısı son konsantrasyon 80g/L olacak şekilde besiyerine yavaş yavaş eklendi. Sitrik asit/disodyum fosfat tamponu kullanılarak besiyeri pH’sı 4,3 olacak şekilde ayarlandı.

3.6.3.2. Deneyin Uygulanması

SDA’da 37°C’de 18-24 saat inkubasyon sonrası ureyen maya kolonilerinden McFarland 0.5 bulanıklığına gore suspansiyonlar hazırlandı. Her bir besiyerinde dort suş olacak şekilde suspansiyonlardan 10 µL besiyeri yuzeyine inokule edildi. 37°C’de alti gun inkubasyon sonunda fosfolipaz aktivitesi koloni çapının, presipitasyon zonununapına oranı (Pz) hesaplanarak kontrol suşları ile karşılaştırılarak değerlendirildi (125).

3.6.3.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Bulunan presipitasyon zonu değerlerine gore aktivite, dort grupta incelendi; 0.9-1 arası (+1), 0.89-0.80 arası (+2), 0.79-0.70 arası (+3), <0.69 arası (+4) olarak belirlendi. Bu

değerlendirmeye göre Pz değeri küçüldükçe fosfolipaz aktivitesi artmakta, Pz=1.00 değeri ise negatif fosfolipaz aktivitesini göstermektedir (126).

3.6.4. Hemolitik Aktivite Varlığının Araştırılması

Suşların hemolitik aktiviteleri %7 kanlı ve %3 glukoz ilaveli SDA besiyeri kullanılarak araştırıldı (127).

3.6.4.1. Besiyerinin Hazırlanması

30 g glukoz, hazırlanan 1L'lik SDA içine eklenip, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. Besiyeri, su banyosunda 40-45°C'ye kadar soğutulduktan sonra litrede 70ml olacak şekilde kan eklendi.

3.6.4.2. Deneyin Uygulanması

SDA'da üreyen 24 saatlik *Candida* suşlarından McFarland 2'ye göre bulanıklık ayarı yapılarak süspansiyonlar hazırlandı. Her petri kutusunda dört köken olacak şekilde 10µl süspansiyonlardan inokulasyon yapıldı. 37°C'de inkübe edilen plaklar hem 24 hem de 48 saat sonunda α ve β hemoliz varlığı açısından kontrol suşları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. (127).

3.6.4.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

İzolatlar non-hemolitik (γ), α ve $\alpha+\beta$ olarak değerlendirildi. 24 ve 48 saat sonunda hem hemoliz zonunun hem de koloninin çapı ölçüldü. Her bir izolat iki farklı zamanda çalışıldı. Her çalışmada 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda hemoliz zon çapı koloni çapına bölünerek elde edilen değerlerin ortalaması alındı (79).

İnokulum çevresinde oluşan hemoliz zonunun çapı ölçülüp, bu zon $\leq 1,5$ mm olanlar (+) zayıf aktivite, 1,5-2,0 mm ise orta aktivite (++) , zon çapı >2 ise kuvvetli aktivite (+++) olarak değerlendirildi.

3.6.5. Jelatinaz Enzim Varlığı Araştırılması

3.6.5.1. %0.1'lik Civa Klorür Hazırlanması

Steril distile su 100ml

Civa klorür 0.1 gr

Çözelti, manyetik karıştırıcıda homojen olana kadar karıştırıldı.

3.6.5.2. Besiyeri Hazırlanması

Kökenlerin jelatinaz aktivitesi %1 jelatin eklenmiş SDA besiyeri kullanılarak incelendi (128).

3.6.5.3. Deneyin Yapılışı

İzolatlar tek difüzyon yöntemi ile besiyerine pasajlandı. Her besiyerinde dört suş olacak şekilde ekim yapıldı ve plaklar 37°C’de 48 saat inkübe edildi (128).

3.6.5.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

Koloni etrafındaki zon varlığı %0.1’lik civa klorür eklenerek değerlendirildi.

3.7. Araştırma Planı

2011-2012	Suşların toplanması
2012	Suşlara petri aderans ve modifiye mikropalak yöntemlerinin uygulanması
Ocak-Ağustos 2013	Suşlarda fosfolipaz, hemolitik aktivite ve jelatinaz varlığının araştırılması
Eylül- Aralık 2013	Sonuçların değerlendirilmesi
Ocak 2014- Haziran 2015	Tez Yazımı

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Suşların biyofilm üretimini belirlemek için kullanılan petri aderans ve modifiye mikropalak yöntemi arasındaki uyum “% uyum” hesabı yapılarak belirlendi. Çalışmaya alınan *Candida* türlerinin biyofilm, fosfolipaz, hemolitik aktivite ve jelatinaz enzim varlığı araştırılması sonucu elde edilen veriler, istatistiksel olarak ki-kare testi kullanılarak değerlendirilip, $p < 0,05$ ise anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırma ile ilgili sınırlamalara tartışma kısmında değinilmiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı

“Çeşitli Klinik Örneklerden Soyutlanan *Candida* Suşlarının Virulans Faktörlerinin Araştırılması” konulu tez çalışması Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelenmiştir ve çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna karar verilmiştir (Onay Tarihi: 11/07/2013 Karar No: 2013/26-16).



4. BULGULAR

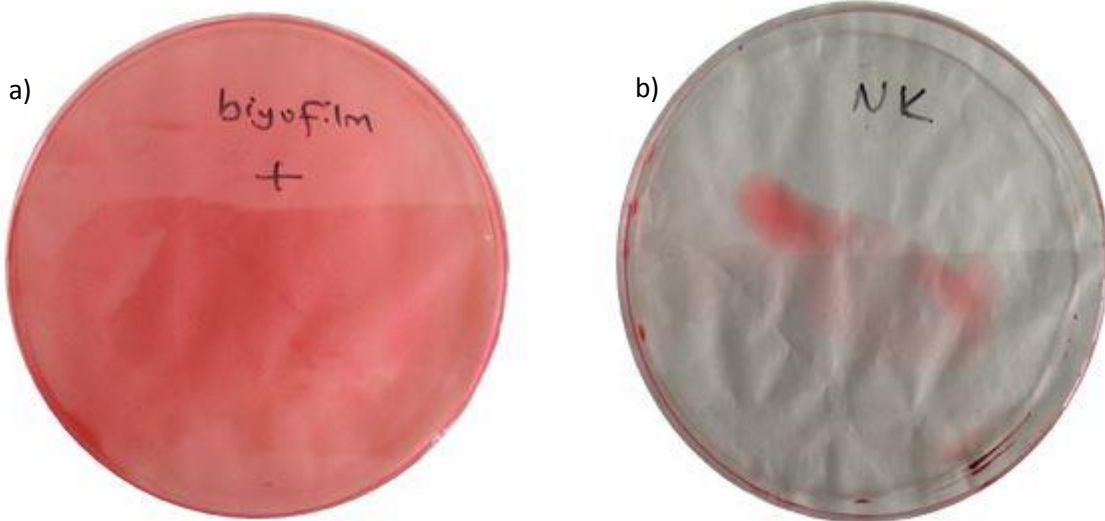
4.1. Biyofilm Üretimi Sonuçları

4.1.1. Petri Aderans Yöntemine Göre Biyofilm Üretimi Sonuçları

Petri aderans yöntemi ile biyofilm üretimi çalışılan *Candida* izolatlarının sonuçları pozitif ve negatif kontroller referans alınarak değerlendirildi (Şekil 1). Tablo 2’de suşların petri aderans yöntemi ile biyofilm üretim aktivitelerinin türlere göre dağılımı görülmektedir. Buna göre çalışmamızdaki suşların 143 (%35,0)’ü pozitif, 266 (%65,0)’sı negatif olarak belirlendi. Biyofilm üretimi en fazla *C. tropicalis* (%91,6), en az *C. albicans* (%2,3) suşlarında gözlemlendi. Çalışmaya dahil edilen izolatların petri aderans yöntemi ile belirlenen biyofilm sonuçları türlere göre incelendiğinde *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* türleri lehine istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi ($X^2=253,1$; $p=0,00$).

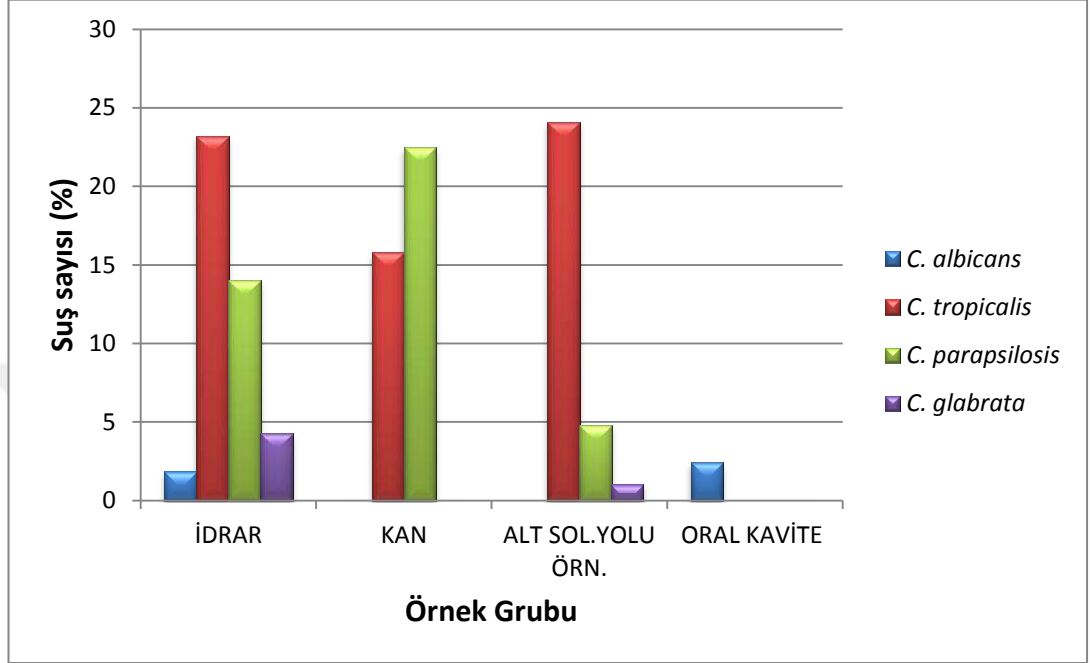
Tablo 2. Petri aderans yöntemi ile biyofilm üretiminin türlere göre dağılımı

SUŞLAR	POZİTİF (%)	NEGATİF (%)	TOPLAM (%)
<i>C. albicans</i>	4 (2,3)	167 (97,7)	171 (100)
<i>C. tropicalis</i>	77 (91,6)	7 (8,4)	84 (100)
<i>C. parapsilosis</i>	54 (66,6)	27 (33,3)	81 (100)
<i>C. glabrata</i>	8 (11,0)	65 (89,1)	73(100)
TOPLAM	143 (35,0)	266 (65,0)	409 (100)



Şekil 1. Biyofilm üretimi a) pozitif ve b) negatif olarak belirlenen *C. albicans* izolatları

Pozitif kökenlerin, soyutlandıkları bölgelere ve türlere göre dağılımı Şekil 2’de izlenmektedir. İdrar örneklerinin % 43,3’ü (n=71), kan örneklerinin %38,3’ü (n=46), alt solunum yolu örneklerinin %30,1’si (n=25), oral kavite örneklerinin ise %2,4’ü (n=1) pozitif olarak belirlendi.

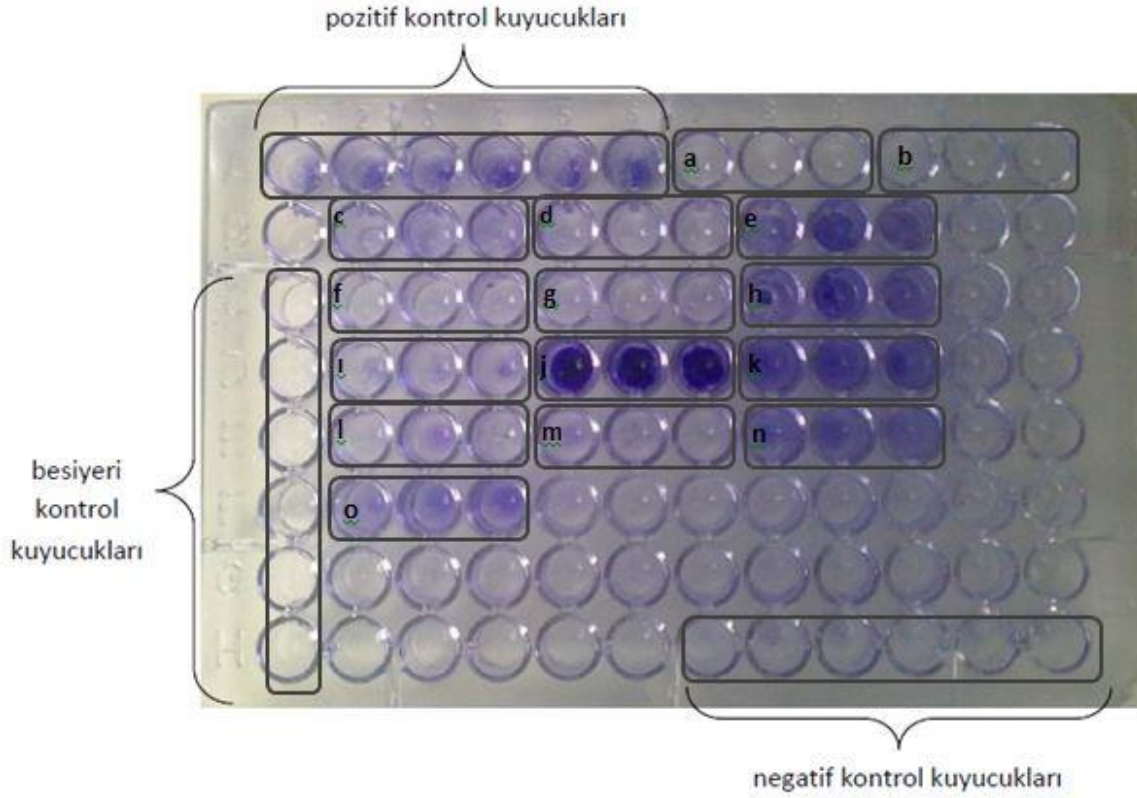


Şekil 2. Petri aderans yöntemi ile pozitif olarak belirlenen izolatların soyutlandıkları bölgelere ve türlere göre dağılımı

Candida türlerinin petri aderans yöntemi ile biyofilm üretimi suşların izolasyon bölgelerine göre incelendiğinde *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* için bölgelere göre suş sayısı az olması nedeniyle istatistiksel yöntem kullanılamaz iken, sadece *C. parapsilosis* suşları için biyofilm üretimi açısından izolasyon bölgelerine göre değerlendirme yapıldı ancak istatistiksel anlamlılık elde edilmedi ($X^2=4,0$; $p=0,13$).

4.1.2. Modifiye Mikroplak Yöntemine Göre Biyofilm Üretimi Sonuçları

Bu yöntemde, çalışmaya alınan suşların biyofilm üretimi belirlenen sınır değer baz alınarak incelendi. Biyofilm üretimi incelenen suşlardan 15 tanesinin kontrollerle birlikte çalışıldığı mikroplak Şekil 3’de görülmektedir.



Şekil 3: Biyofilm üretiminin modifiye mikroplak yöntemi ile çalışıldığı a) *C. albicans* b) *C. parapsilosis* c) *C. albicans* d) *C. albicans* e) *C. tropicalis* f) *C. albicans* g) *C. albicans* h) *C. tropicalis* ı) *C. albicans* j) *C. tropicalis* k) *C. parapsilosis* l) *C. albicans* m) *C. albicans* n) *C. parapsilosis* o) *C. parapsilosis* suşlarının mikroplak görüntüsü

Çalışılan *Candida* suşlarının türlere göre modifiye mikroplak yöntemi ile biyofilm üretimi sonuçları Tablo 3'te gösterildi. Buna göre *Candida* kökenlerinin 128 (%31,3)'i pozitif olarak belirlenirken, biyofilm üretimi en fazla %44,0 (n=37) ile *C. tropicalis* suşlarında, en az %20,5 (n=15) ile *C. glabrata* izolatlarında gözlemlendi. Suşların her iki yöntem ile saptanan biyofilm üretimi karşılaştırmalı olarak Tablo 4'te gösterilmiştir. Çalışmamızdaki *Candida* suşlarının modifiye mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşturma özelliği türlere göre incelendiğinde *C. tropicalis* suşları lehine istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi ($X^2=16,6$; $p=0,00$).

Tablo 3. *Candida* suşlarının türlere göre modifiye mikropalak yöntemi ile biyofilm üretimi sonuçları

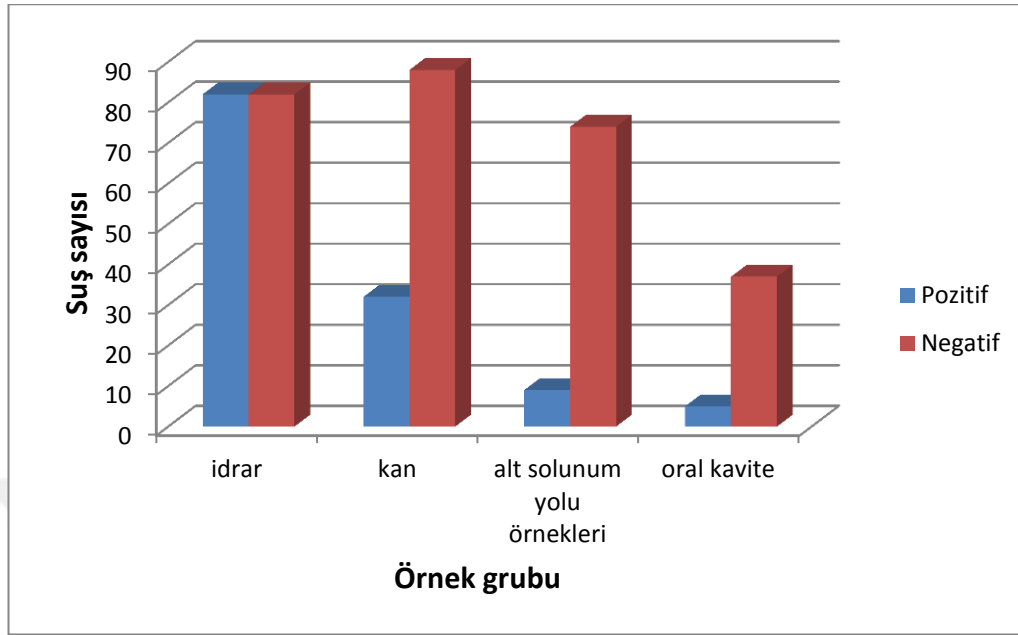
SUŞLAR	POZİTİF (%)	NEGATİF (%)
<i>C. albicans</i>	43 (25,1)	128 (74,8)
<i>C. tropicalis</i>	37 (44,0)	47 (55,9)
<i>C. parapsilosis</i>	33 (40,7)	48 (59,2)
<i>C. glabrata</i>	15 (20,5)	58 (79,4)
TOPLAM	128 (31,3)	281 (68,7)

Tablo 4. Suşların her iki yöntem ile saptanan biyofilm üretimi sonuçları

SUŞLAR	Petri aderans yöntemi	Modifiye mikropalak yöntemi
	Pozitif (%)	Pozitif (%)
<i>C. albicans</i>	4 (2,3)	43 (25,1)
<i>C. tropicalis</i>	77 (91,6)	37 (44,0)
<i>C. parapsilosis</i>	54 (66,6)	33 (40,7)
<i>C. glabrata</i>	8 (11,0)	15 (20,5)
TOPLAM	143 (35,0)	128 (31,3)

Bu yöntem ile biyofilm ürettiği belirlenen suşların, izole edildikleri bölgeye göre incelendiklerinde ise en fazla idrar (%64,0) örneklerinden soyutlanan kökenlerin biyofilm oluşturduğu gözlenirken, oral kavite örneklerinden soyutlanan suşların en az (%3,9) biyofilm ürettiği saptandı (Şekil 4). Çalışmaya dahil edilen tüm türlerdeki *Candida* izolatlarının modifiye mikropalak yöntemi ile biyofilm üretimi, suşların izole edildiği bölgelere göre istatistiksel olarak değerlendirilip anlamlı sonuç elde edildi ($X^2=51,4$; $p=0,00$). Bu istatistiksel farklılığın idrar örneklerinden soyutlanan suşlardan kaynaklandığı görüldü. Bu açıdan türler tek tek incelendiğinde, *C. albicans* izolatları ile suşların soyutlandığı bölge arasında biyofilm üretimi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilirken ($X^2=43,3$; $p=0,00$), *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* izolatlarında istatistiksel bir farklılık izlenmedi ($X^2= 5,5$; $p=0,06$;

$X^2=5,4$; $p=0.06$). *C. glabrata* suşlarında ise suşların soyutlandığı bölgelere göre dağılımın az olması sebebiyle istatistiksel değerlendirme yapılamadı.

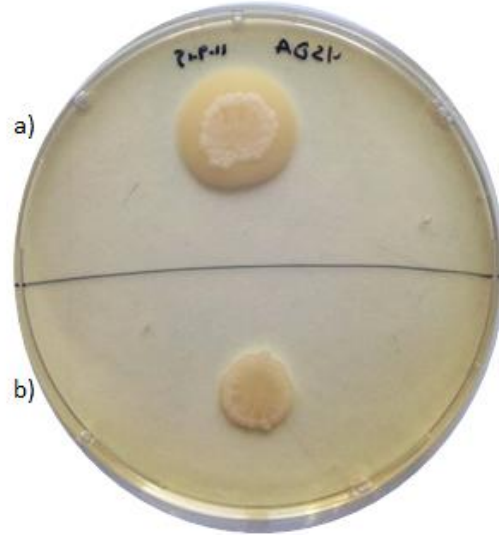


Şekil 4. Modifiye mikrolak yöntemi ile biyofilm üreten suşların soyutlandığı bölgelere göre dağılımı

Petri aderans yöntemi ile suşların % 35,0'i, modifiye mikrolak yöntemi ile ise %31,3'unun biyofilm ürettiği belirlendi. İki yöntem arasında % 68,5 uyum saptandı.

4.2. Fosfolipaz Aktivite Sonuçları

Çalışmaya alınan *Candida* kökenlerinin, 111 (%27,1)'i fosfolipaz olumlu olarak belirlendi (şekil 5). Bu suşların 101 (%91)'i *C. albicans*, yedisi (%6,3) *C. glabrata*, üçü (%2,7) *C. parapsilosis* iken, *C. tropicalis* suşlarında fosfolipaz aktivitesi saptanmadı. Çalışmaya dahil edilen *Candida* izolatlarının fosfolipaz aktivitesi türlere göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak *C. albicans* lehine anlamlı bir sonuç elde edildi ($X^2=153,3$; $p=0,00$).



Şekil 5. Fosfolipaz enzimi a) pozitif *C. albicans* b) negatif *C. parapsilosis* suşlarının görüntüsü

Çalışılan 171 *C. albicans* suşunun 101 (%59,1)'i, 81 *C. parapsilosis* izolatının üçü (%3,7), 73 *C. glabrata* suşunun ise yedisi (%9,6) fosfolipaz olumlu olarak belirlendi. Türler gere fosfolipaz aktivitesi gösteren suşların olumluluk oranları, Pz, ortalama ve ortanca değeri Tablo 5' te görölmektedir.

Tablo 5. Türler gere suşların fosfolipaz aktivite dağılımı

	Olumlu suş sayısı	Türe göre olumluluk oranı (%)	En düşük değeri	En yüksek değeri	Ortanca	Ortalama Pz Değeri	SD
<i>C. albicans</i> (n=171)	101	59,1	0,94	0,45	0,75	0,72	0,14
<i>C. tropicalis</i> (n=84)	0	0	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> (n=81)	3	3,7	0,95	0,6	0,805	0,72	0,19
<i>C. glabrata</i> (n=73)	7	9,6	0,92	0,55	0,8	0,74	0,14
TOPLAM	111	27,1					

Pz değerlerine göre izolatların dağılımı Tablo 6’da gösterildi. Buna göre fosfolipaz olumlu izolatların 46 (%41,4)’sı “+4”, 16 (%14,4)’sı “+3”, 36 (%32,4)’sı “+2”, 13 (%11,7)’ü “+1” pozitif olarak değerlendirildi.

Tablo 6. Pz değerine göre *Candida* kökenlerinin dağılımı

Pz Değerleri	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>
<0.69 (+4)	42	0	2	2
0.70-0.79 (+3)	15	0	0	1
0.80-0.89 (+2)	33	0	0	3
0.90-0.99 (+1)	11	0	1	1
1.00 (-)	70	84	78	66
TOPLAM	171	84	81	73

Tablo 7’de suşların soyutlandığı bölgeye göre fosfolipaz aktivite dağılımı gösterildi. Buna göre; oral kavite örneklerinden soyutlanan izolatlarda fosfolipaz aktivitesinin en çok olduğu (%57,1), idrar örneklerinden izole edilen suşlarda ise fosfolipaz aktivitesinin en az (%15,8) olduğu görülmektedir. Tüm türlerdeki *Candida* suşlarının fosfolipaz enzim aktivitesi soyutlandıkları bölgelere göre istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık elde edilip ($X^2=33,2$; $p=0,00$), suşlar ayrı ayrı incelendiğinde *C. albicans* izolatlarında istatistiksel olarak anlamlı ($X^2=14,5$; $p=0,0002$), *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* suşlarının soyutlandıkları bölgelere göre dağılımın az olması sebebiyle, *C. tropicalis* izolatlarında ise pozitif fosfolipaz aktivitesi gösteren suş olmadığı için istatistiksel analiz yapılmadı.

Tablo 7. Suşların izole edildikleri bölgelere göre fosfolipaz aktivitesi dağılımı

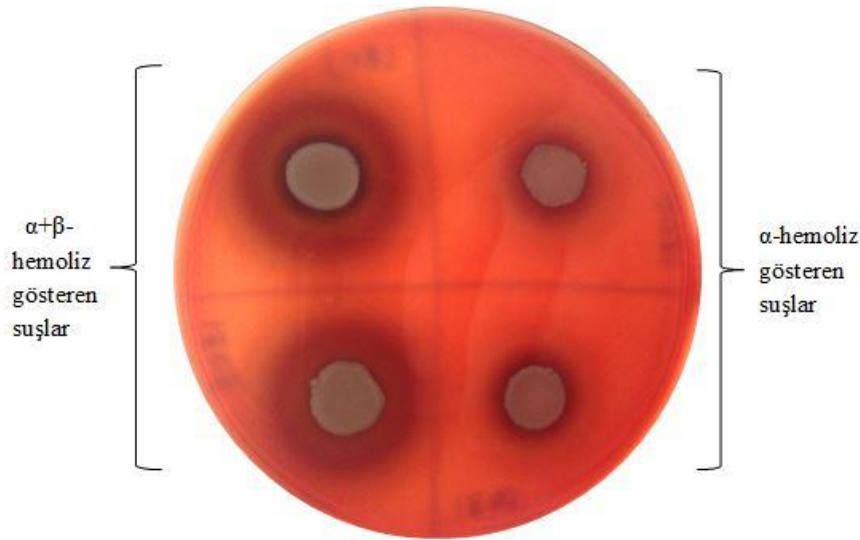
Klinik Örnek	Suş Sayısı	Fosfolipaz aktivitesi (%)
Kan	120	31 (25,8)
İdrar	164	26 (15,8)
Alt solunum yolu örnekleri	83	30 (36,1)
Oral kavite	42	24 (57,1)
TOPLAM	409	111 (27,1)

4.3. Hemolitik Aktivite Sonuçları

İncelenen *Candida* izolatlarının 209'u (%51,1) alfa hemoliz, 174'ü (%42,5) hem alfa hem de beta hemolitik aktivite gösterirken, 26'sı (%6,4) hemolitik aktivite göstermedi. Alfa ve beta hemoliz izlenen suşlar Şekil 5'de görülmektedir. Buna göre; alfa-hemoliz en fazla % 31,6 (n=66) ile *C. albicans* suşlarında görülürken, en az % 13,9 (n=29) ile *C. glabrata* kökenlerinde belirlendi. Alfa ve beta-hemolitik aktivite ise en çok %60,3 (n=105) ile *C. albicans* suşlarında, en az %1,8 (n=3) ile *C. parapsilosis* izolatlarında izlendi (Tablo 8).

Tablo 8. Türler göre suşların hemoliz aktivitesi dağılımı

Tür grupları	Hemoliz çeşitleri n (%)		
	α	$\alpha+\beta$	γ
<i>C. albicans</i>	66 (31,6)	105 (60,3)	0 (0)
<i>C. glabrata</i>	29 (13,9)	42 (24,2)	2 (7,7)
<i>C. parapsilosis</i>	54 (25,8)	3 (1,8)	24 (92,3)
<i>C. tropicalis</i>	60 (28,7)	24 (13,8)	0 (0)
TOPLAM	209 (51,1)	174 (42,5)	26 (6,4)



Şekil 5. %7 Kanlı SDA besiyerinde α ve $\alpha+\beta$ hemoliz gösteren suşların görünümü

Suşıların hemoliz oluşturma özelliği, soyutlandıkları bölgeye göre incelendiğinde $\alpha+\beta$ hemolitik aktivite en çok % 69,0 ile oral kavite örneklerinden izole edilen suşlarda, α hemoliz % 58,5 ile idrar örneklerinden soyutlanan suşlarda görülürken kan örneklerinden izole edilen suşların %9,2'si hemolitik aktivite göstermedi (Tablo 9). Çalışmaya alınan *Candida* suşları hemolitik aktivite göstermesi açısından soyutlandığı bölgelere göre istatistiksel yönden incelendiğinde anlamlı bir sonuç elde edilmedi ($X^2=7,3$; $p=0,06$).

Tablo 9. Suşların izole edildikleri bölgeye göre hemolitik aktivite oluşturma oranları

Suşların soyutlandıkları bölge n (%)				
	İdrar	Kan	Alt solunum yolu örnekleri	Oral kavite
α	96 (58,5)	65 (54,1)	35 (42,2)	13 (31,0)
$\alpha+\beta$	55 (33,5)	44 (36,7)	46 (55,4)	29 (69,0)
γ	13(7,9)	11 (9,2)	2 (2,4)	0 (0)

Suşlar ayrıca zon çapları baz alınarak -, +, ++ ve +++ olarak derecelendirildi. İzolatların 26'sı (-), 61'i (+), 202'si (++) ve 120'si (+++) olarak değerlendirildi. *Candida* kökenlerinin skorlama yöntemi ile hemolitik aktivite sonuçları Tablo 10'da gösterildi. Buna göre *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* izolatları en çok “++” hemolitik aktivite gösterirken, *C. parapsilosis* suşlarında çoğunlukla “+” hemoliz izlendi.

Tablo 10. *Candida* suşlarının hemolitik aktivite derecelendirmesi

		Suş sayısı (%)			
<i>Candida</i> izolatları (n)		Hemolitik aktivite skorlaması			
		-	+	++	+++
<i>C. albicans</i>	(171)	0 (0)	12 (7,0)	85 (49,7)	74 (43,3)
<i>C. glabrata</i>	(73)	2 (2,7)	7 (9,6)	34 (46,6)	30 (41,1)
<i>C. parapsilosis</i>	(81)	24 (29,6)	30 (37,0)	24 (29,6)	3 (3,7)
<i>C. tropicalis</i>	(84)	0 (0)	11 (13,1)	60 (71,4)	13 (15,5)

* Türler gere göre en yüksek hemolitik aktivite skoru koyu işaretlenmiştir.

Suşların, soyutlandıkları bölgeye göre değerlendirilmesi Tablo 11’de görölmektedir. Buna göre; “+” ve “++” pozitiflik en çok idrar örneklerinde, “+++” pozitiflik ise en fazla oral kavite örneklerinde belirlendi.

Tablo 11. Suşların soyutlandıkları bölgeye göre olumluluk düzeyleri

Hemolitik aktivite sonucu	Suşların soyutlandıkları bölge n (%)			
	İdrar	Kan	Alt solunum yolu örnekleri	Oral kavite
-	13 (7,9)	11 (9,2)	2 (2,4)	0 (0)
+	32 (19,5)	23 (19,7)	5 (6,0)	1 (2,4)
++	87 (53,0)	56 (46,7)	42 (50,6)	17 (40,5)
+++	32 (19,5)	30 (25,0)	34 (41,0)	24 (57,1)

* *Candida* türlerinin soyutlandıkları bölgeye göre en yüksek hemolitik aktivite oranı koyu belirtilmiştir.

4.4. Jelatinaz Aktivite Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 409 izolatın hiç birinde jelatinaz aktivitesi saptanmadı. Her bir suş iki kere çalışıldı, kolonilerin çevresinde herhangi bir zon gözlenmedi (Şekil 6).



Şekil 6. Negatif jelatinaz aktivitesi gösteren a) *C. albicans* b) *C. albicans* c) *C. tropicalis* d) *C. tropicalis* suşları

5. TARTIŞMA

İmmun sistemi baskılanmış ve/veya ciddi başka bir hastalık sebebi ile hastanede yatan bireylerde invazif fungal infeksiyonların insidansı ve prevalansı artmaktadır (28). Geniş spektrumlu antibiyotiklerin ve organ transplantasyonu sonrasında immün sistemi baskılayıcı ajanların kullanımı, kemoterapi ve cerrahi girişimler fungal infeksiyon riskini arttırmaktadır. Bu infeksiyonların sağaltımında kullanılan antifungallere karşı ilaç direnci gelişmesi ve toksisite sorunları, fungal patojenler hakkında konak-mantar ilişkileri ve virulans faktörleri ile ilgili yeni çalışmalara gereksinim olduğunu göstermektedir. Virulans faktörlerinin tanımlanmasının, fungal patogenezin anlaşılmasına ve yeni ilaç hedeflerinin geliştirilmesine yardımcı olacağı bildirilmiştir (129).

Çeşitli hasta gruplarında izlenen fungal infeksiyonların en sık etkeninin *Candida* türleri olduğu rapor edilmiştir (130). Bu sebeple çalışmamızda farklı klinik örneklerden üretilen *Candida* izolatlarında önemli virulans faktörleri olan biyofilm oluşumu, fosfolipaz enzim aktivitesi, hemolitik aktivite ve jelatinaz enzim varlığı araştırılmıştır.

Biyofilm üretimi ile antifungallere ve dezenfektanlara karşı direnç ortaya çıkmakta ve mikroorganizma, konak immün yanıt hücrelerinden korunmaktadır. Bu nedenle *Candida* türlerinde biyofilm üretiminin güçlü bir virulans faktörü olduğu bildirilmiştir (50,51). 2005-2006 yılları arasında 393 *Candida* suşu ile yapılan bir çalışmada izolatların % 58,8'inin biyofilm ürettiği saptanmış, bunların %88,7'sinin *albicans*-dışı *Candida* suşları olduğu bildirilmiştir (1). Aynı şekilde Shin ve arkadaşlarının 360 *Candida* izolatı ile yaptığı çalışmada biyofilm üretimi pozitif izolatların (%39), %8'nin *C. albicans*, %61'nin ise *albicans*-dışı *Candida* suşları olduğu saptanmıştır (131). Fakat Udayalaxmi ve arkadaşları, 82 *Candida* izolatı ile yaptıkları araştırmalarında *C. albicans* suşlarının diğer *Candida* türlerine göre daha yüksek oranda biyofilm ürettiğini belirtmiştir (132).

Benzer şekilde ülkemizde yapılan çalışmalarda da *albicans*-dışı *Candida* izolatlarının, *C. albicans* suşlarına göre daha yüksek oranda biyofilm ürettiği bildirilmiş olup, *albicans*-dışı *Candida* suşlarında bu oran %41 ile %89,4, *C. albicans* kökenlerinde ise %11,1 ile %82,0 arasında saptanmıştır (123,124,133,134).

Bu çalışmada *Candida* suşlarının biyofilm üretimi iki yöntem ile araştırılmıştır. Biyofilm üretimi açısından standart kabul edilen bir yöntem bulunmamakla birlikte uzun yıllar tüp aderans testi kullanılmış ancak değerlendirmenin zor ve subjektif olması nedeniyle

farklı yöntem arayışları sürmüştür. Bu açıdan çalışmamızda değerlendirmenin daha kolay ve objektif olduğunu düşündüğümüz, kendi geliştirdiğimiz petri aderans yöntemi uygulanmıştır. Bunun yanında tüp aderans yöntemine göre değerlendirmesinin daha objektif olduğu bildirilen modifiye mikropalak yöntemi de uygulanarak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Petri aderans yöntemi ile, *C. albicans* izolatlarının %2,3'ünde; *albicans*-dışı *Candida* izolatlarının %58,4'ünde biyofilm oluşumu belirlenmiştir. *Candida* suşlarının bu yöntem ile biyofilm üretimi türlere göre incelendiğinde, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* lehine istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir ($X^2=253,1$; $p=0,00$). Modifiye mikropalak yöntemiyle ise *C. albicans* suşlarının %25,1'inde, *albicans*-dışı *Candida* izolatlarının %35,7'sinde biyofilm yapımı saptanmıştır. Bu yöntem ile yine biyofilm oluşturma özelliği türlere göre incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlılık izlenmiştir ($X^2=16,6$; $p=0,00$). Biyofilm üretimi belirlenmesinde kullanılan her iki yöntem ile de *albicans*-dışı *Candida* kökenlerinde biyofilm üretimi en fazla *C. tropicalis* türünde gözlenirken, sonrasında en fazla *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* suşlarında görülmüştür. Bu bulgular, önceki çalışma sonuçları ile paralel doğrultudadır (131, 135). Her ne kadar yöntemler arasında %68,5 oranında bir uyum belirlense de bazı türler için bu fark dikkat çekiciydi. Bu durum, petrilerin daha büyük, mikropalak kuyucuklarının ise daha küçük bir yüzey olmasından kaynaklanabileceği gibi, mikropalakların yıkamasında boya artıklarının kalması ile de ortaya çıkmış olabilir. Bunun yanında her iki yöntemde kullanılan boyaların farklı olması da bu duruma yol açmış olabilir. Şöyle ki; modifiye mikropalak yönteminde kullanılan kristal viyole boyasının özellikle biyofilm matriksinde fazla miktarda su bulunan mikroorganizmalarda fiksasyon basamağının uygun yapılamayacağı için tekrarlanabilir sonuçlar vermemesi nedeniyle sorun yaratabileceği bildirilmiştir (136).

Shin ve arkadaşları 360 kan kültüründen soyutlanan *Candida* suşları ile yaptıkları çalışmada izolatların %57'sinin, diğer klinik örneklerden elde edilen suşların ise %32'sinin biyofilm ürettiğini bildirmiştir. Kan örneklerinden izole edilen *C. albicans* suşları ile diğer klinik örneklerden elde edilen kökenler arasında biyofilm üretimi açısından anlamlı bir fark bulunmadığı ($p>0.05$) fakat *albicans*-dışı *Candida* suşlarında biyofilm üretimi açısından bu iki örnek grubu arasında anlamlı bir fark görüldüğü ($p=0,0001$) ileri sürülmüştür (131). Ülkemizde Demirbilek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da kan kültürlerinden soyutlanan *Candida* suşlarında %44 oranında biyofilm üretimi saptanırken, steril vücut sıvıları (%26),

mukoza (%24) ve cilt lezyonlarından (%21) elde edilenlerde biyofilm üretim oranının daha az olduğu bildirilmiştir (133).

Araştırmamızda diğer çalışmaların aksine her iki yöntem ile de idrar örneklerinden soyutlanan suşlarda biyofilm üretiminin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu kökenlerin, petri aderans yöntemi ile %43,3'ünde, modifiye mikropalak yöntemi ile ise %64,1'inde biyofilm üretimi pozitif saptanmıştır. Bu farklılığın idrar örneklerinden soyutlanan *Candida* suş sayısının, diğer örnek gruplarına göre fazla olmasından veya suşların soyutlandığı yatan hastalarda kateter ya da sonda varlığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Fosfolipaz gibi ekstraselüler hidrolitik enzimlerin, *Candida*'nın konak dokuya aderans, penetrasyon ve invazyonunda büyük rol oynadığı bilinmektedir (137). Yapılan birçok çalışmada fosfolipaz aktivitesi, *C. albicans* suşlarında %52 ile %92 oranlarında, *albicans* dışı *Candida* suşlarında ise %12 ile %73 arasında belirlenmiş olup, bizim her iki grup için saptadığımız sırasıyla %59,1 ve %4,2'lik sonuçlar bu araştırmaların bulguları ile paralel doğrultudadır. Fosfolipaz aktivitesi türlere göre istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise *C. albicans* lehine anlamlı bir sonuç elde edilmiştir ($X^2=153,3$; $P=0,00$) (126, 132, 137-140). Bu çalışmada, *albicans*-dışı *Candida* izolatlarından en fazla fosfolipaz aktivitesi *C. glabrata* suşlarında saptanırken, *C. tropicalis* türünde fosfolipaz aktivitesi gözlenmemiştir. Bulgularımızın aksine Deorukhkar ve arkadaşları 125 *C. tropicalis* suşu ile yaptıkları çalışmada izolatların %57,6'sının fosfolipaz ürettiğini saptamıştır. Diğer iki farklı çalışmada ise bizim bulgularımıza paralel olarak *C. tropicalis* suşlarında bu aktivite belirlenmemiştir (125, 141). Deorukhkar ve arkadaşları bu durumu izolatlar arasındaki biyolojik farklılıktan kaynaklanabileceğini bildirmiştir (142). Bunun dışında bizim çalışmamız da dahil olmak üzere araştırmalara alınan suş sayısındaki farklılığın da buna neden olabileceği düşünülebilir.

Çalışmamızda en yüksek fosfolipaz aktivitesi oral kavite örneklerinden izole edilen suşlarda saptanmış olup, bunu sırasıyla alt solunum yolu, kan ve idrar örnekleri izlemiştir. *Candida* suşlarının fosfolipaz enzim aktivitesi soyutlandıkları bölgelere göre istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, anlamlı bir farklılık elde edilmiş olup ($X^2=33,2$; $p=0,00$), türler ayrı ayrı incelendiğinde *C. albicans* izolatlarında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç saptanırken ($X^2=14,5$; $p=0,0002$), *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* suşlarında istatistiksel açıdan bir farklılık izlenmemiştir.

Verilerimiz ile paralel doğrultuda bulguları bulunan çalışmalar Kumar ve arkadaşları ile Öksüz ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Kumar ve arkadaşlarının 61 izolat ile yaptıkları araştırmada oral kavite örneklerinden soyutlanan *Candida* izolatlarının tümünün, alt solunum yolu örneklerinden soyutlanan suşların %71,4'ünün, kan örneklerinden soyutlananların ise % 45,8'inin fosfolipaz aktivitesinin pozitif olduğu bildirilmiştir (143). Öksüz ve arkadaşları ise 122 *Candida* ile çalışmışlar ve oral kavite, dışkı, solunum yolu, deri ve ürogenital sistem örneklerinden soyutlanan suşlarda sırasıyla %59, %42,8, %42,3, %41,1, %24,1 fosfolipaz pozitifliği saptamışlardır (144).

Yapılan farklı araştırmalarda, Junior ve arkadaşları çalıştıkları kan, alt solunum yolu örnekleri, idrar, vajinal sekresyon ve kateter örneklerinden idrar izolatlarında, Kantarcıoğlu ve arkadaşları ise oral kavite, alt solunum yolu, ürogenital sistem ve kan örneklerinden alt solunum yolu izolatlarında fosfolipaz aktivitesinin daha yüksek olduğunu bildirilmiştir (145,146). Ancak her iki çalışmada da alt solunum yolu örnekleri arasında balgam örneğinin bulunup bulunmadığı net olarak bildirilmemiş olup, eğer balgam örneklerinden soyutlanan suşlar dahil edildiyse bu örneklerin oral kavite kontaminasyonu olması nedeniyle farklı yorumlara neden olabilecektir. Bizim çalışma bulgularımız bu veriler ile farklılık göstermekte olup, bunun nedeni olarak suşların soyutlandığı hasta farklılıkları ve suşların virulans özellikleri sayılabilir.

Candida türlerinin, hemolitik aktivite yeteneği ile konak dokudan elde ettikleri demiri, konak dokuya invazyon, üreme ve metabolik aktivitelerde kullandığı bildirilmiştir (82). Luo ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada izolatların hemolitik aktivitelerinin 24 ve 48. saatte değerlendirerek; 24 saatlik inkübasyon sonucu incelenen kolonilerde sadece alfa hemoliz olduğunu, beta hemolizin yalnızca 48 saatlik inkübasyondan sonra alfa hemoliz ile birlikte görüldüğünü bildirmiştir (81). Benzer şekilde Furlaneto-Maia ve arkadaşlarının çalışmasında da 24.saatteki değerlendirmede alfa hemoliz, 48.saatteki değerlendirmede hem alfa hem de beta hemoliz izlendiği ileri sürülmüştür (79). Diğer çalışmaların aksine, çalışmamızdaki 13 suşta 24.saatteki değerlendirmede hem alfa hem de beta hemoliz görülmüş, 48. saat sonundaki incelemede ise 209 izolatta sadece alfa hemoliz gözlenmiştir. Bu durumun diğer araştırmalardan farklı olarak çalışmamızda koyun kanlı SDA yerine insan kanlı SDA besiyeri kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Luo ve arkadaşları, beta hemolitik aktivitenin gerçek hemoliz olmayıp ekstraselüler fosfolipaz enzim aktivitesinden kaynaklanabileceği bildirmiştir (81). Ancak çalışmamızda hemolitik aktivite gösteren

izolatların %71,3'inin fosfolipaz enzimi negatif olarak bulunmuştur. Aynı şekilde Furlaneto-Maia ve arkadaşları da hemolitik aktivite olumlu izolatların % 17'sinde fosfolipaz enzimi saptanmadığını belirtmiştir (79). Hemolitik aktivite ile ilgili yapılan bir çok çalışmada *C. parapsilosis* izolatlarının bu özelliğinin olmadığı vurgulanırken, başka grup araştırmalarda bu türe ait suşlarda hemolitik aktivite saptanmıştır (6,81). Çalışmamızda ise *C. parapsilosis* izolatlarının %70,4'ünde hemolitik aktivite izlenmiştir (82, 127).

Çalışmamızda alfa ve beta hemolitik aktivite en fazla oral kavite örneklerinden, α hemoliz ise en çok idrar örneklerinden soyutlanan suşlarda görülmüştür. *Candida* suşları tek tek soyutlandıkları bölgeye göre istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* izolatlarında anlamlı bir sonuç elde edilmemiş olup ($p=0,3$; $p=0,06$; $p=0,65$), *C. parapsilosis* suşları ise suş sayısı azlığı nedeniyle istatistiksel olarak değerlendirilememiştir. França ve arkadaşları kan örneklerinden izole edilen *C. tropicalis* izolatlarında *C. parapsilosis* suşlarına göre anlamlı olarak daha fazla hemolitik aktivite görüldüğünü, trakeal sekresyon ve deri örneklerinden soyutlanan suşlar arasında ise bir fark olmadığını bildirmiştir. Yiğit ve arkadaşları da benzer şekilde suşun izole edildiği bölge ile alfa veya beta hemolitik aktivite arasında herhangi istatistiksel bir ilişki olmadığını bildirmiştir (6,127). Bizim bulgularımız da bu son araştırma ile uyumludur.

Çalışmamızda *Candida* izolatlarının proteinaz aktivitesini belirlemek için jelatinaz enzimi varlığı araştırılarak değerlendirme yapılmıştır. Jelatinaz aktivitesi araştırılan 409 *Candida* suşunun hiçbirinde jelatinaz enzim varlığı saptanmamıştır. Ramesh ve arkadaşları proteinaz varlığını saptamak için jelatinaz ve kazeinaz enzimini birlikte araştırmışlar ve bizim çalışmamıza benzer olarak tüm izolatlarda jelatinaz enziminin saptanmadığını, fakat suşların tümünde kazeinaz enzim üretimi olduğunu ve kazeinaz üretiminin *Candida* izolatlarının virulans faktörlerine katkı yapabildiğini bildirmiştir (128).

Bu veriler doğrultusunda, çalışmaya alınan *Candida* suşlarının virulansında biyofilm, fosfolipaz ve hemolitik aktivite üretiminin önemli rol oynayabildiği, jelatinaz aktivitesinin ise virulansta daha az etkin bir rolü olabildiği düşünülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamıza aldığımız 409 *Candida* izolatının petri aderans yöntemine göre %35'inin (n=143), modifiye mikropalak yöntemine göre ise %31,3'ünün (n=128) biyofilm üretimi pozitif olarak saptanmış olup, biyofilm yapımı, en çok *C. tropicalis* suşlarında belirlenmiştir. Biyofilm üretimi değerlendirilirken kullanılan yöntemler arasındaki uyum ise %68,5 olarak bulunmuştur. Her iki yöntem ile *Candida* türleri ve biyofilm üretimi arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan iki yöntem ile idrar örneklerinden soyutlanan suşlarda biyofilm üretiminin diğer örnek gruplarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiş olup, her iki yöntem ile de örnek grupları ile türler arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir.

İncelediğimiz suşların %27,1'inde (n=111) fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. Bu enzim varlığı en fazla *C. albicans* suşlarında görülmüş olup, *C. tropicalis* izolatlarında ise fosfolipaz aktivitesi gözlenmemiştir. Fosfolipaz aktivitesi türlere göre istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise *C. albicans* lehine anlamlı bir sonuç elde edilmiştir ($X^2=153,3$; $P=0,00$). Bu enzim en çok sırasıyla oral kavite, alt solunum yolu örnekleri, kan ve idrar örneklerinden soyutlanan suşlarda izlenmiş olup, örnek grupları ile *Candida* türleri arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlenmiştir ($X^2=33,2$; $p=0,00$).

Suşların %93,6'sında (n=383) hemolitik aktivite saptanmış olup, % 51,1'i (n=209) alfa hemoliz, % 42,5'i (n=174) ise alfa ve beta hemoliz göstermiştir. Alfa hemoliz en çok idrar örneklerinden, alfa ve beta hemolitik aktivite ise en fazla oral kavite örneklerinden soyutlanan suşlarda saptanmıştır. Çalışmaya alınan *Candida* suşları hemolitik aktivite göstermesi açısından soyutlandığı bölgelere göre istatistiksel yönden incelendiğinde anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir ($X^2=7,3$; $p=0,06$). Araştırma suşlarımızın hiçbirinde jelatinaz enzim varlığı gözlenmemiştir.

Bu veriler doğrultusunda, çalışmaya alınan *Candida* suşlarının virulansında biyofilm, fosfolipaz ve hemolitik aktivite üretiminin önemli rol oynayabildiği, jelatinaz aktivitesinin ise virulansta daha az etkin bir rolü olabildiği düşünülmüştür.

Candida türlerinin fosfolipaz, proteinaz gibi enzimlerinin incelenmesinde moleküler yöntemlerin özellikle gerçek zamanlı PZT'nin kullanılması, yüksek maliyet ve standardizasyon açısından zorluk yaratabilmesine karşın daha duyarlı ve kantitatif verilerin elde edilmesini sağlayacaktır.

Araştırmamızda *Candida* suşlarında jelatinaz varlığı belirlenmemiştir. Proteinaz aktivitesinin değerlendirilmesinde jelatinaz varlığı ile birlikte kazeinaz aktivitesinin de incelenmesi daha doğru ve objektif veriler sağlayabilir.

Çalışmamızda *Candida* türlerinin virulans faktörleri ile ilgili elde ettiğimiz verilerin, fungal patogenezin anlaşılmasına ve yeni ilaç hedeflerinin geliştirilmesine destek olacağı düşüncesindeyiz.



7. KAYNAKLAR

1. Hasan F, Xess I, Wang X, Jain N ve ark. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes Infect* 2009; 11(8-9): 753-61.
2. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R ve ark. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36(2): 288-305.
3. Costa CR, Passos XS, e Souza LK, Lucena Pde A ve ark. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2010; 52(3): 139-43.
4. Howell SA, Hazen KC. Fungi - *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 10th ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 2011. p. 1693-1711.
5. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9(6): 588-94.
6. Yigit N, Aktas AE. Investigation of hemolytic activity in *Candida* species. *Turk J Infect* 2008; 22(2): 91-6.
7. Calderone RA. Introduction and historical perspectives. In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. 1st ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 2002. p. 3-13.
8. Edwards JE. *Candida* species. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, editors. *Principles and practise of infectious diseases*. 7th ed. Churchill Livingston: Elsevier; 2009. p. 3225-40.
9. Vazquez JA, Sobel JD. Candidiasis. In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD, editors. *Clinical mycology*. Oxford Univercity Press 2003; p. 143-87.
10. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 327-35.
11. Saniç A. Mantarlar: Genel mikrobiyoloji özellikler ve sınıflandırma. In: Ulusoy S, Arman D, Uzun Ö, editors. *Önemli ve Sorunlu Fungal Enfeksiyonlar*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2006; p. 9-20.

12. Mohandas V, Ballal M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. J Glob Infect Dis 2011; 3(1): 4-8.
13. Larone DH. Yeast and Yeast Like Organisms. Medically Important Fungi A Guide to Identification. Fifth edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press 2011; p. 109–143.
14. Klei VI, Veenhuis M, Brul S, Klis FM, Groot PWJ, Müller HW, Driel KGA, Boekhout T. Cytology, Cell Walls and Septa: A Summary of yeast cell biology from a phylogenetic perspective. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, editors. The Yeasts. 5th ed. London: Elsevier; 2011. p. 111-28.
15. Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D ve ark. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62(1): 130-80.
16. Munro CA, Gow NA. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. Med Mycol 2001; 39 (1): 41-53.
17. Costa-de-Oliveira S, Silva AP, Miranda IM, Salvador A ve ark. Determination of chitin content in fungal cell wall: an alternative flow cytometric method. Cytometry A 2013; 83(3): 324-8.
18. Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. FEMS Yeast Res 2006; 6(1): 14-29.
19. Topçu AW, Çerikçioğlu N. *Candida* türleri. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editors. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2002. p. 1797- 1808.
20. Yazdanparast SA, Nezarati SS, Heshmati F, Hamzehlou S. Comparison of cell wall proteins in putative *Candida albicans* & *Candida dubliniensis* by using modified staining method & SDS-PAGE. Med J Islam Repub Iran 2012; 26(2): 45-9.
21. Yuluğ N. Mantarlar hakkında genel bilgiler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, editors. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2002. p. 1777-85.
22. Pannanusorn S, Fernandez V, Römling U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. Mycoses 2013;56(3): 264-72.

23. Papuccuoglu HU. Patojen fungustan mikotik infeksiyona. In: Papuccuoglu HU. Mikozlar patogenezi ve patoloji. İzmir: İzmir Güven & Nobel Tıp Kitapevi; 1999; p.25-35.
24. Romani L. Immunology of invasive candidiasis. In: Calderone RA, Clancy CJ, editors. *Candida* and Candidiasis. 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press; 2012. p. 142-52.
25. Williams DW, Jordan RP, Wei XQ, Alves CT ve ark. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. J Oral Microbiol 2013; 5.
26. Garcia-Vidal C, Viasus D, Carratalà J. Pathogenesis of invasive fungal infections. Curr Opin Infect Dis 2013; 26(3): 270-6.
27. De Luca C, Guglielminetti M, Ferrario A, Calabr M ve ark. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. New Microbiol 2012; 35(4): 459-68.
28. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM ve ark. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. J Med Microbiol 2013; 62: 10-24.
29. Doluca M. *Candida* biyofilm infeksiyonlarında güncel bilgiler. 34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı; p.44-46. 27 Ekim-1 Kasım 2010, KKTC.
30. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. Odontology. 2010; 98(1):15-25.
31. Kojic EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. Clin Microbiol Rev. 2004; 17(2):255-67.
32. Anil S, Ellepola AN, Samaranayake LP. The impact of chlorhexidine gluconate on the relative cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans*. Oral Dis 2001; 7(2): 119-22.
33. Henriques M, Gasparetto K, Azeredo J, Oliveira R. Experimental methodology to quantify *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. Biotechnol Lett 2002; 24(13): 1111-5.
34. Chaffin WL. *Candida albicans* cell wall proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 2008; 72(3):495-544.
35. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R ve ark. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. Trends Microbiol 2011; 19(5): 241-7.

36. Hoyer LL, Green CB, Oh SH, Zhao X. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Med Mycol* 2008; 46 (1): 1-15.
37. Liu Y, Filler SG. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. *Eukaryotic Cell* 2011; 10(2): 168-73.
38. Zhao X, Oh SH, Cheng G, Green CB ve ark. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiol* 2004; 150: 2415-28.
39. Sundstrom P, Balish E, Allen CM. Essential role of the *Candida albicans* transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. *J Infect Dis* 2002; 185(4): 521-30.
40. Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 1999; 283(5407): 1535-8.
41. Tsuchimori N, Sharkey LL, Fonzi WA, French SW ve ark. Reduced virulence of HWP1-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. *Infect Immun* 2000; 68(4): 1997-2002.
42. Camacho DP, Gasparetto A, Svidzinski TI. The effect of chlorhexidine and gentian violet on the adherence of *Candida* spp. to urinary catheters. *Mycopathologia* 2007; 163(5): 261-6.
43. Luo G, Samaranayake LP. *Candida glabrata*, an emerging fungal pathogen, exhibits superior relative cell surface hydrophobicity and adhesion to denture acrylic surfaces compared with *Candida albicans*. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 2002; 110(9): 601-10.
44. Negri M, Gonçalves V, Silva S, Henriques M ve ark. Crystal violet staining to quantify *Candida* adhesion to epithelial cells. *Br J Biomed Sci* 2010; 67(3): 120-5.
45. De Las Peñas A, Pan SJ, Castaño I, Alder J ve ark. Virulence-related surface glycoproteins in the yeast pathogen *Candida glabrata* are encoded in subtelomeric clusters and subject to RAP1- and SIR-dependent transcriptional silencing. *Genes Dev* 2003; 17(18): 2245-58.
46. Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 2001; 44(1-2): 29-35.

47. Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA ve ark. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 2009; 459(7247): 657-62.
48. Negri M, Martins M, Henriques M, Svidzinski TI ve ark. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. *Mycopathologia* 2010; 169(3): 175-82.
49. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol* 2006; 55: 999-1008.
50. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2): 167-93.
51. Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat* 2004; 7(4-5): 301-9.
52. Soll DR. *Candida* biofilms: is adhesion sexy? *Curr Biol* 2008; 18(16): 717-20.
53. Gácsér A, Schäfer W, Nosanchuk JS, Salomon S ve ark. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol* 2007; 44(12): 1336-41.
54. Iraqui I, Garcia-Sanchez S, Aubert S, Dromer F ve ark. The Yak1p kinase controls expression of adhesins and biofilm formation in *Candida glabrata* in a Sir4p-dependent pathway. *Mol Microbiol* 2005; 55(4): 1259-71.
55. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(2):109-18.
56. Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R ve ark. Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(2): 510-20.
57. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 2003; 11(1): 30-6.
58. Katragkou A, McCarthy M, Alexander EL, Antachopoulos C ve ark. In vitro interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(2):470-8
59. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(11): 5459-63.
60. Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi--a review. *Med Mycol*. 2012 May;50(4):337-45.

61. Klotz SA, Gaur NK, De Armond R, Sheppard D ve ark. *Candida albicans* Als proteins mediate aggregation with bacteria and yeasts. *Med Mycol* 2007; 45(4): 363-70.
62. Harriott MM, Noverr MC. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. *Trends Microbiol* 2011; 19(11): 557-63.
63. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005; 48(6): 365-77.
64. Silva NC, Nery JM, Dias AL. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. *Mycoses* 2014; 57(1): 1-11.
65. Hube B, Rüchel R, Monod M, Sanglard D ve ark. Functional aspects of secreted *Candida* proteinases. *Adv Exp Med Biol* 1998; 436: 339-44.
66. Schaller M, Hube B, Ollert MW, Schäfer W ve ark. *In vivo* expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. *J Invest Dermatol* 1999; 112(3): 383-6.
67. Kvaal C, Lachke SA, Srikantha T, Daniels K ve ark. Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun* 1999; 67(12): 6652-62.
68. Pei-Wen Tsai, Yu-Ting Chen, Po-Chen Hsu, Chung-Yu Lan. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. *Biomed* 2013; 3: 51-64.
69. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(3):400-28.
70. Chakrabarti A, Nayak N, Talwar P. *In vitro* proteinase production by *Candida* species. *Mycopathologia* 1991; 114(3): 163-8.
71. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R ve ark. Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. *J Med Microbiol* 2010; 59: 747-54.
72. Mattei AS, Alves SH, Severo CB, Guazzelli Lda S ve ark. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 46(3): 340-2.
73. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2001 Nov;44(9-10):361-7.
74. Park M, Do E, Jung WH. Lipolytic Enzymes involved in the virulence of human pathogenic Fungi. *Mycobiology* 2013; 41(2): 67-72.

75. Tóth A, Németh T, Csonka K, Horváth P, Vágvölgyi C, Vizler C, Nosanchuk JD, Gácsér A. Secreted *Candida parapsilosis* lipase modulates the immune response of primary human macrophages. *Virulence*. 2014 May 15;5(4):555-62.
76. Bader O. Looking into the virulence of *Candida parapsilosis*: a diagnostic perspective. *Virulence*. 2014; 15;5(4):457-9.
77. Dos Santos AL, Soares RM. *Candida guilliermondii* isolated from HIV-infected human secretes a 50 kDa serine proteinase that cleaves a broad spectrum of proteinaceous substrates. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005, 1;43(1):13-20.
78. Nayak AP, Green BJ, Beezhold DH. Fungal hemolysins. *Med Mycol* 2013; 51(1): 1-16.
79. Furlaneto-Maia L, Specian AF, Bizerra FC, de Oliveira MT ve ark. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathologia* 2008; 166(4): 209-17.
80. Moors MA, Stull TL, Blank KJ, Buckley HR, Mosser DM. A role for complement receptor-like molecules in iron acquisition by *Candida albicans*. *J Exp Med*. 1992 Jun 1;175(6):1643-51.
81. Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol* 2001; 39(8): 2971-4.
82. Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SF, Jorge AO ve ark. Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *Braz Oral Res*. 2013; 27(6):484-9.
83. Luo G, Samaranayake LP, Cheung BP, Tang G. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in in vitro haemolysin production. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 2004; 112(4-5): 283-90.
84. Han TL, Cannon RD, Villas-Bôas SG. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. *Fungal Genet Biol* 2011; 48(8): 747-63.
85. Huang G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Virulence*. 2012 May 1;3(3):251-61.
86. Arıkan S. Mantarlarda Pleomorfizm. In: Yeğenoğlu Y, Erturan Z, editors. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kitabı p.77–86, 27–30 Mayıs 2003, Bodrum-Muğla.
87. Alby K, Bennett RJ. Stress-induced phenotypic switching in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*. 2009; 20(14):3178-91.

88. Gurcan S, Alver O, Ercan İ, Ener B. Evaluation of virulence in various *Candida* Species: *In vitro* and *In vivo* study. *Turkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2010; 30(5): 1493-502
89. Galán-Ladero MA, Blanco-Blanco MT, Hurtado C, Pérez-Giraldo C ve ark. Determination of biofilm production by *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients and its relation to cellular surface hydrophobicity, plastic adherence and filamentation ability. *Yeast* 2013; 30(9): 331-9.
90. Nevitt T, Thiele DJ. Host iron withholding demands siderophore utilization for *Candida glabrata* to survive macrophage killing. *Plos Pathog* 2011; 7(3).
91. Heymann P, Gerads M, Schaller M, Dromer F ve ark. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. *Infect Immun* 2002; 70(9): 5246-55.
92. Bates S, Hall RA, Cheetham J, Netea MG ve ark.. Role of the *Candida albicans* MNN1 gene family in cell wall structure and virulence. *BMC Res Notes* 2013; 6: 294.
93. Gustafson KS, Vercellotti GM, Bendel CM, Hostetter MK. Molecular mimicry in *Candida albicans*. Role of an integrin analogue in adhesion of the yeast to human endothelium. *J Clin Invest* 1991; 87(6): 1896-902.
94. Bujdáková H, Paulovicová E, Borecká-Melkusová S, Gasperík J ve ark. Antibody response to the 45 kDa *Candida albicans* antigen in an animal model and potential role of the antigen in adherence. *J Med Microbiol* 2008; 57: 1466-72.
95. Mitchell TG. Medical Mycology. In: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, editors. *Medical Microbiology*. 24th ed. USA: McGraw-Hill Companies, 2007. p. 621-57.
96. Papuccuoglu HU. Kandidiazis. In: Papuccuoglu HU. *Mikozlar patogenezi ve patoloji*. İzmir: İzmir Güven & Nobel Tıp Kitabevi 1999; p. 63-77.
97. Ilkit M, Guzel AB. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. *Crit Rev Microbiol* 2011; 37(3): 250-61.
98. Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: an overview. *J Oral Maxillofac Pathol* 2014; 18: 81-5.
99. Parihar S. Oral candidiasis-a review. *WMC Dent* 2011; 2 (11): 1-18.
100. Duggan S, Leonhardt I, Hünninger K, Kurzai O. Host response to *Candida albicans* bloodstream infection and sepsis. *Virulence* 2015; 19: 6(4): 316-26.
101. Lionakis MS. New insights into innate immune control of systemic candidiasis. *Med Mycol* 2014; 52(6): 555-64.

102. LaRocco MT. Reagents, stains, and media: Mycolgy. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML editors. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2007. p. 1737–44.
103. Dereli Doluca M. Mikotik örneklerden direk bakı hazırlanması, besiyerlerine ekilmesi, kültür plaklarının değerlendirilmesi ve ileri identifikasyon işlemleri. Mart 2013.
104. Shea YR. Algoritms for Detection and Identification of Fungi. In: Murray PR, Jorgensen JH, Baron EJ, Pfaller MA, Landry ML eds. Manual of Clinical Microbiology. Ninth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2007 p.1745–1761
105. Murray PR, Rosenthal KS, Phaller MA. Laboratory Diagnosis of Fungal Diseases. In: Murray PR, Rosenthal KS, Phaller MA, editors. Medical Microbiology. 6th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, 2009. p. 689-99.
106. Buschelman B, Jones RN, Pfaller MA, Koontz FP ve ark. Colony morphology of *Candida* spp. as a guide to species identification. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 35(1): 89-91.
107. Howell SA, Hazen KC. Fungi - *Candida*, *Cryptococcus* and other yeast of medical importance In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, eds. Manual of Clinical Microbiology. Tenth edition. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2011 p. 1-29.
108. Kiraz N. *Candida* türlerinin makroskopik görünüşleri, identifikasyonunda çimlenme borusu testi ve mısır unu Tween-80 agardaki lam kültürü. 35. Türk mikrobiyoloji kongresi öncesi kursları-Mikoloji kursu Kitapçığı, p 22-9. 2-3 Kasım 2012, İzmir.
109. Sullivan DJ, Coleman DC. Molecular Approaches to Identification and Typing of *Candida* Species In: Calderone RA, editor. *Candida* and Candidiasis. First edition. Washington DC, American Society for Microbiology Press, 2002: p. 427- 441.
110. Jamal WY, Ahmad S, Khan ZU, Rotimi VO. Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. Int J Infect Dis 2014; 26:167-70.
111. Criseo G, Scordino F, Romeo O. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. J Microbiol Methods 2015; 111:50-6.
112. Oz Y, Kiraz N. Diagnostic methods for fungal infections in pediatric patients: microbiological, serological and molecular methods. Expert Rev Anti Infect Ther 2011; 9(3): 289-98.

113. Ostrosky-Zeichner L. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med* 2012; 125: 14-24.
114. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D ve ark. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care* 2010; 14(6): R222.
115. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H ve ark. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004; 39(2): 199-205.
116. Senn L, Robinson JO, Schmidt S, Knaup M ve ark. 1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis* 2008; 46(6): 878-85.
117. Presterl E, Parschalk B, Bauer E, Lassnigg A ve ark. Invasive fungal infections and (1,3)-beta-D-glucan serum concentrations in long-term intensive care patients. *Int J Infect Dis* 2009; 13(6): 707-12.
118. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Weinbergerova B ve ark. Difficulties in using 1,3-{beta}-D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies-high frequency of false-positive results and their analysis. *J Med Microbiol* 2010;59: 1016-22.
119. Bašková L, Buchta V. Laboratory diagnostics of invasive fungal infections: an overview with emphasis on molecular approach. *Folia Microbiol (Praha)* 2012; 57(5): 421-30.
120. Khot PD, Fredricks DN. PCR-based diagnosis of human fungal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 7(10): 1201-21.
121. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 1994;32(2):452-6.
122. Pfaller M, Davenport D, Bale M, Barrett M, Koontz F, Massanari RM. Development of the quantitative micro-test for slime production by coagulase-negative staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1988 Feb;7(1):30-3.
123. Yüce A, Yücesoy M, Yuluğ N. Detection of slime production among isolates of *Candida albicans*. *İnfek Derg* 1996; 10: 267-9.

124. Yücesoy M, Karaman M. *Candida* türlerinin biyofilm üretimi ve antifungal duyarlılık paternleri. Mikrobiyol Bült 2004; 38: 91-98.
125. Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. Sabouraudia 1984;22(3):201-7
126. Yucesoy M, Yulug N. *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. İnfek Derg 1999;13(4): 569-74.
127. França EJ, Furlaneto-Maia L, Quesada RM, Favero D ve ark. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. Mycoses 2011;54(4):44-51.
128. Ramesh N, Priyadharsini M, Sumathi CS, Balasubramanian V ve ark. Virulence Factors and Anti Fungal Sensitivity Pattern of *Candida* Sp. Isolated from HIV and TB Patients. Indian J Microbiol 2011;51(3):273-8.
129. Khan MSA, Ahmad I, Aqil F, Owais M ve ark. Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*. In: Ahmed I, Owais M, Shahid M, Aqil F, editors. Combating Fungal Infections Problems and Remedy, First Edition, Springer Berlin Heidelberg, 2010, p. 21-45.
130. Achkar JM, Fries BC. *Candida* infections of the genitourinary tract. Clin Microbiol Rev 2010;23(2):253-73.
131. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH ve ark. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J Clin Microbiol 2002; 40(4):1244-8.
132. Udayalaxmi, Jacob S, D'Souza D. Comparison between virulence factors of *Candida albicans* and non-albicans species of *Candida* isolated from genitourinary tract. J Clin Diagn Res 2014;8(11):15-7.
133. Demirbilek M, Timurkaynak F, Can F, Azap Ö ve ark. Hastane kaynaklı *Candida* türlerinde biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılık paternleri. Mikrobiyol Bült 2007;41: 261-9.
134. Ozkan S, Kaynak F, Kalkanci A, Abbasoglu U ve ark. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005;100(3):319-23.

135. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R ve ark. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. Med Mycol 2009; 47(7):681-9.
136. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods. 2008;72(2):157-65.
137. Sachin CD, Ruchi K, Santosh S. In vitro evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical specimens. Int J Med Biomed Res 2012;1(2):153-7.
138. Mane A, Pawale C, Gaikwad S, Bembalkar S ve ark. Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of *Candida* isolates from HIV-infected individuals. Med Mycol. 2011;49(5):548-51.
139. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. Mycopathologia 2007; 164(6):265-9.
140. Yıldırım M, Mumcuoğlu İ, Kurşun Ş, Koldaş K ve ark. Enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Candida albicans* ve non-*albicans* *Candida* suşlarındaki bazı virulans faktörlerinin karşılaştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2009; 39(3-4): 62-8.
141. Atalay MA, Koc AN, Demir G, Sav H. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated from blood cultures. Niger J Clin Pract 2015;18(1):52-5.
142. Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. Int J Microbiol 2014;2014:456878.
143. Kumar CP, Kumar SS, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. Mycopathologia 2006;161(4):213-8.
144. Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A ve ark. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. Jpn J Infect Dis 2007;60(5):280-3.
145. D'Eça Júnior A, Silva AF, Rosa FC, Monteiro SG ve ark. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. Rev Soc Bras Med Trop 2011;44(3):334-8.
146. Kantarcioglu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Mycoses 2002;45(5-6):160-5.

8.EKLER

8.1. Etik Kurul Onayı

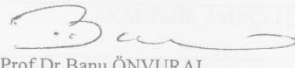
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.- 471 12.07.2013

Sayın Prof.Dr.Mine DOLUCA DERELİ

Kurulumuz tarafından 11.07.2013 tarih ve 1072-GOA protokol numaralı 2013/26-16 karar numarası ile görüşülen “Çeşitli Klinik Örneklerden Soyutlanan Candida Suşlarının Virulans Faktörlerinin Araştırılması” konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

Bilgi Adı	Tarih	Yerleşke	İmza
Prof.Dr. Mine Doluca Dereli	11.07.2013	İnciraltı	İmza: ☐ Başka: ☐ Başka: ☐
Prof.Dr. Banu Önvural	11.07.2013	İnciraltı	İmza: ☐ Başka: ☐ Başka: ☐
Prof.Dr. Ali Rıza Öner	11.07.2013	İnciraltı	İmza: ☐ Başka: ☐ Başka: ☐
Prof.Dr. Mustafa Öner	11.07.2013	İnciraltı	İmza: ☐ Başka: ☐ Başka: ☐
Prof.Dr. Mustafa Öner	11.07.2013	İnciraltı	İmza: ☐ Başka: ☐ Başka: ☐

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	1072-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Çeşitli Klinik Örneklerden Soyutlanan Candida Suşlarının Virulans Faktörlerinin Araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Mine DOLUCA DERELİ Mikrobiyoloji A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2013/26-16	Tarih: 11.07.2013
	Prof.Dr.Mine DOLUCA DERELİ'nin sorumlusu olduğu "Çeşitli Klinik Örneklerden Soyutlanan Candida Suşlarının Virulans Faktörlerinin Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Banu</i>
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Psikiyatri Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Besti</i>
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Reyhan</i>
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>N. Nejat</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>katılmadı</i>
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Hüseyin Baskın</i>
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>katılmadı</i>
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Bilgin</i>
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>M. Mukaddes Güneli</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Ayşe</i>
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Nihal</i>
Doç.Dr.İşıl TEKME	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>katılmadı</i>
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Müge</i>
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	<i>katılmadı</i>
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	<i>İhsan</i>

8.2. Özgeçmiş

MÜJGAN ÖZHUN

TC Kimlik No / Pasaport No:	11273758116
Doğum Yılı:	1988
Yazışma Adresi :	7447/13 Sk. No: 50 D:10 Karşıyaka-İZMİR
Telefon :	05346786978
e-posta :	mujganozhun@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	2.61	2010
Türkiye	Anadolu Üniversitesi	Açık Öğretim Fakültesi	Laboratuvar ve Veteriner Sağlık	69	2009

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Biyoloji, Mikrobiyoloji, Temel ve endüstriyel mikrobiyoloji, mikoloji

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Ergon MC, Özhun M, Dereli Doluca M. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarına Gönderilen Kazıntı Örneklerinin Direkt Bakı ve Kültür Sonuçları, Türk Mikrobiyol Cem Derg 2013;43(3):90-6.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Ozhun M, Doluca M. Farklı Türlerdeki <i>Candida</i> Suşlarının Biyofilm Üretiminin İncelenmesi(Poster Sunum), 35.Türk Mikrobiyoloji Kongresi,3-7 Kasım 2012, Kuşadası-Aydın
Ergon C, Ozhun M, Doluca M. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarına Gönderilen Kazıntı Örneklerinin Direkt Bakı Ve Kültür Sonuçları(Poster Sunum), 35.Türk Mikrobiyoloji Kongresi,3-7 Kasım 2012, Kuşadası-Aydın
Doluc M, Gülat S, Ozhun M, "Klinik Örneklerden Soyutlanan <i>Candida albicans</i> Suşlarının Genotip Dağılımları ve Antifungal Duyarlılıkları", Klimud I.Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Kasım 2011, ANTALYA.