

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAN VE ORAL KAVİTE ÖRNEKLERİNDEN
SOYUTLANAN *CANDIDA ALBICANS*
SUŞLARININ FOSFOLİPAZ AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

BUĞSE TUNÇ

**MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2013970177

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KAN VE ORAL KAVİTE ÖRNEKLERİNDEN
SOYUTLANAN *CANDIDA ALBICANS*
SUŞLARININ FOSFOLİPAZ AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**MİKROBİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

BUĞSE TUNÇ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Mine DOLUCA DERELİ

Bu araştırma TÜBİTAK Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı
(1002) tarafından 116S136 numaralı proje ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2013970177

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Buğse TUNÇ 'Kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *Candida albicans* suşlarının fosfolipaz aktivitelerinin araştırılması' konulu Yüksek Lisans tezini 24/06/2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. Mine DOLUCA DERELİ

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

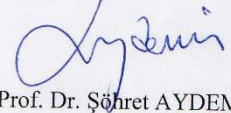
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Mehmet Ali ÖKTEM

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

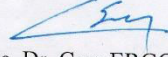
Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Şöhret AYDEMİR

ÜYE

Ege Üniversitesi

Tıp Fakültesi


Doç. Dr. Cem ERGON

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Ayşın ZEYTİNOĞLU TÜRKES

YEDEK ÜYE

Ege Üniversitesi

Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

TABLolar DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR	vii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1.GİRİŞ VE AMAÇ	5
2.GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Tarihçe	7
2.2. Genel Özellikler	8
2.3 Hücre Yapısı	10
2.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri.....	12
2.4.1. Adezyon	12
2.4.2. Temas Algılama ve Tigmotropizm (Temasla Büyüme).....	14
2.4.3. Biyofilm Oluşumu.....	16
2.4.4. Enzimler	17
2.4.4.1. Salgısal Aspartik Proteinaz (Sap)	17
2.4.4.2. Fosfolipaz	19
2.4.4.2.1. Fosfolipaz A.....	20
2.4.4.2.2. Fosfolipaz B	21
2.4.4.2.3. Fosfolipaz C	23
2.4.4.2.4. Fosfolipaz D	24
2.4.4.2.5. Lizofosfolipaz	25
2.4.4.2.6. Lizofosfolipaz-transačilaz	25
2.4.4.3.Lipazlar	26
2.4.5. Morfolojik Dönüşüm.....	26
2.4.6. Fenotipik Değişim	28
2.4.7. Hücre Yüzey Hidrofobisitesi (HYH)- Hidrofobik ve Hidrofilik Hücrelerin Yapısı	29
2.4.8. Sideroforlar.....	31
2.5. <i>Candida</i> Türlerinin Neden Olduğu Enfeksiyonlar.....	31

2.5.1. Yüzeyel Kandidoz (Kutanöz ve Mukozal Kandidoz)	31
2.5.2. Sistemik Kandidoz	33
2.5.3. Kronik Mukokutanöz Kandidoz	34
2.6. <i>Candida</i> Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı	34
2.6.1. Direk Bakı	37
2.6.2. Kültür	37
2.6.3. Serolojik Testler	41
2.6.4. Moleküler Tanı	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. Araştırmanın Tipi	46
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	46
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	46
3.4. Çalışma Materyali	46
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	46
3.6. Veri Toplama Araçları	46
3.6.1. Hazırlanan Besiyerleri	50
3.6.1.1. Sabouraud Dekstroz (%2) Agar (SDA) ve Sabouraud Dekstroz (%4) Agar (SDA)	50
3.6.1.2. “Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) Broth”	50
3.6.1.3. Beyin Kalp İnfüzyon Buyyonu (BHI)	50
3.6.1.4. %50 Beyin Kalp İnfüzyon Buyyonu	50
3.6.2. <i>Candida</i> Suşları	50
3.6.2.1. <i>C. albicans</i> ATCC (“American Type Culture Collection”) 90028 Suşu	51
3.6.3. Fosfolipaz Aktivitesinin Yumurta Sarılı Besiyerinde Plak Yöntemi ile Araştırılması	51
3.6.4. Fosfolipaz Aktivitesinin Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PZT) ile Belirlenmesi	52
3.6.4.1. RNA İzolasyonu	52
3.6.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	53
3.6.4.3. PZT Uygulaması	53
3.6.4.4. Agaroz Jel Elektroforezi	56
3.6.4.5. RT-PZT Ürünlerinin Kantitasyonu	56
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	57
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	57

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	58
3.10. Etik Kurul Onayı.....	58
4. BULGULAR	59
4.1. Kültür Yönteminin Bulguları.....	59
4.2. Moleküler İnceleme	63
4.2.1. <i>PLBI</i> Ekspresyon Düzeyleri	63
4.2.1.1. Kan Örneklerinden Soyutlanan Suşlar-Kan İzolatları	63
4.2.1.2. Oral Kavite Örneklerinden Soyutlanan Suşlar- Oral Kavite İzolatları.....	67
4.2.2. <i>PLCI</i> Ekspresyon Düzeyleri	73
4.2.2.1. Kan Örneklerinden Soyutlanan Suşlar-Kan İzolatları	73
4.2.2.2. Oral Kavite Örneklerinden Soyutlanan Suşlar-Oral Kavite İzolatları.....	78
5. TARTIŞMA.....	83
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	94
7.KAYNAKLAR.....	96
8. EKLER	118

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. <i>C. albicans</i> için başlıca adezinler ve ligandları	14
Tablo 2. <i>Candida</i> enfeksiyonları için örnek alınacak vücut bölgeleri, örneklerin toplanması ve tanı yöntemleri.....	35
Tablo 3. Çalışma sırasında kullanılan cihaz, kimyasal ve sarf malzemelere ait bilgiler	46
Tablo 4. RT-PZT' de kullanılan “forward” ve “reverse” öncüller	54
Tablo 5. Fosfolipaz B1 PZT’inde kullanılan malzemelerin konsantrasyonları ve hacimleri.....	55
Tablo 6. Fosfolipaz C1 PZT’inde kullanılan malzemelerin konsantrasyonları ve hacimleri.....	55
Tablo 7. Fosfolipaz B1 ve C1 PZT amplifikasyon koşulları	56
Tablo 8. Araştırma planı ve takvimi	57
Tablo 9. Kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan <i>C. albicans</i> suşlarının plak yöntemi ile belirlenen Pz değerleri	60
Tablo 10. Çalışmaya alınan kan ve oral kavite örneklerinden elde edilen <i>C. albicans</i> suşlarının fosfolipaz sonuçları	62
Tablo 11. Kan örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşuna ait <i>PLB1/ACT1</i> normalizasyon oranları	64
Tablo 12. Kan örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşunun <i>C. albicans</i> ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen değerler	66
Tablo 13. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşuna ait <i>PLB1/ACT1</i> normalizasyon oranları	69
Tablo 14. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşunun, <i>C. albicans</i> ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen değerler	71
Tablo 15. Kan örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşuna ait <i>PLC1/ACT1</i> normalizasyon oranları	74
Tablo 16. Kan örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşunun <i>C. albicans</i> ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen değerler	76
Tablo 17. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşuna ait <i>PLC1/ACT1</i> normalizasyon oranları	79
Tablo 18. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşunun <i>C. albicans</i> ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen değerler	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>C. albicans</i> 'ın çeşitli ortamlardaki morfolojisi	9
Şekil 2. Fungal hücre duvar yapısı	10
Şekil 3. <i>C. albicans</i> 'ın temasa bağımlı filemantasyonu ve MS iyon kanalları	15
Şekil 4. <i>C. albicans</i> 'ın in vitro ve in vivo koşullarda ürettiği biyofilm yapısı.....	16
Şekil 5. <i>C. albicans</i> türünde maya-hif dönüşümü	28
Şekil 6. Hidrofobik ve hidrofilik hücre yüzey yapıları	30
Şekil 7. Çalışmaya alınan bazı <i>C. albicans</i> suşlarının CHROMagar Candida besiyerindeki görünümleri	59
Şekil 8. Oral kavite ve kan örneklerinden soyutlanan her suş için belirlenen Pz değerleri	61
Şekil 9. Çalışmaya alınan üç fosfolipaz olumlu, bir olumsuz (sol üst) <i>C. albicans</i> suşunun yumurta sarılı agarda koloni ve presipitasyon zonlarının görünümü	61
Şekil 10. Kan ve oral kavite örneklerinden elde edilen <i>C. albicans</i> suşlarının ortalama Pz değerleri.....	62
Şekil 11. Kan örneklerinden soyutlanan 30 suşun (üstteki ve alttaki) <i>PLB1</i> ve <i>ACT1</i> gen öncülleri kullanılarak uygulanan RT-PZT ürünlerinin agaroz jelde 110 V'da 60 dk. yürütüldükten sonra elde edilen görüntüsü.....	63
Şekil 12. Kan örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşunun <i>ACT1</i> ile normalizasyon sonrası oluşturulan grafiği	65
Şekil 13. Kan örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşunun <i>PLB1</i> ekspresyonu açısından <i>C. albicans</i> ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen grafik.....	67
Şekil 14. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 suşun (üstteki ve alttaki) <i>PLB1</i> ve <i>ACT1</i> gen öncülleri kullanılarak uygulanan RT-PZT ürünlerinin agaroz jelde 110 V'da 60 dk. yürütüldükten sonra elde edilen görüntüleri	68
Şekil 15. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşunun <i>ACT1</i> ile normalizasyon sonrası oluşturulan grafiği.....	70
Şekil 16. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşunun <i>PLB1</i> ekspresyonu açısından <i>C. albicans</i> ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen grafik.....	72
Şekil 17. Kan örneklerinden soyutlanan 30 suşun (üstteki ve alttaki) <i>PLC1</i> ve <i>ACT1</i> gen öncülleri kullanılarak uygulanan RT-PZT ürünlerinin agaroz jelde 110V'da 60 dk. yürütüldükten sonra elde edilen görüntüleri	73

Şekil 18. Kan örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşunun <i>ACT1</i> ile normalizasyon sonrası oluşturulan grafiği	75
Şekil 19. Kan örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşunun <i>PLC1</i> ekspresyonu açısından <i>C. albicans</i> ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen grafik.....	77
Şekil 20. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 suşun (üstteki ve alttaki) <i>PLC1</i> ve <i>ACT1</i> gen öncülleri kullanılarak uygulanan RT-PZT ürünlerinin agaroz jelde 110 V'da 60 dk. yürütüldükten sonra elde edilen görüntüsü.....	78
Şekil 21. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşunun <i>ACT1</i> ile normalizasyon sonrası oluşturulan grafiği.....	80
Şekil 22. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 <i>C. albicans</i> suşunun <i>PLC1</i> ekspresyonu açısından <i>C. albicans</i> ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen grafik.....	82

KISALTMALAR

RT-PZT	Ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi
PLB	Fosfolipaz B
PLC	Fosfolipaz C
SDA	Sabouraud dekstroaz agar
YPD	“Yeast extract peptone dextrose broth”
Pz	Fosfolipaz aktivitesi
ATCC	“American type culture collection”
NK	Negatif kontrol

Kan ve Oral Kavite Örneklerinden Soyutlanan *Candida albicans* Suşlarının Fosfolipaz Aktivitelerinin Araştırılması

Buğse TUNÇ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

e-posta: busetunc1989@gmail.com

ÖZET

Amaç: İnvaziv ve mukozal enfeksiyonlara neden olan fırsatçı patojenlerden *Candida spp.* sahip olduğu önemli virulans faktörü olan fosfolipaz enzimleri ile konak hücre membranlarındaki fosfolipidleri parçalayarak hücreleri lizise uğratar. Çalışmamızda, kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* izolatlarında fosfolipaz B1 ve C1 aktivitesinin incelenmesi ve bu iki grup arasındaki farkın araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Ocak 2015-Aralık 2015 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarı'nda kan kültürü (n=30) ve oral kavite örneklerinden (n=30) soyutlanan toplam 60 adet *C. albicans* suşu çalışmaya alındı. Suşların fosfolipaz aktivitesi, yumurta sarılı agar besiyerinin kullanıldığı plak yöntemi ve fosfolipaz B1 ve C1 enzimlerini *C. albicans* türünde kodlayan *PLB1* ve *PLC1* genleri ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) yöntemi ile araştırıldı. Her iki grup için elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Bulgular: Plak yöntemi ile kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan suşların sırasıyla 26'sı (%86.7) ve 24'ünde (%80) fosfolipaz aktivitesi belirlendi. Gruplar arasında olumluluk oranları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmedi ($\chi^2=0.48$; $p=0.49$). Kan ile oral kavite suşlarının Pz ortalamaları (0.6138 ± 0.9823 ; 0.6988 ± 0.9910) arasında ise anlamlı bir fark saptandı (Mann Whitney U=173.500; $p=0.007$). RT-PZT yöntemi ile çalışılan 30 kan ve 30 oral kavite suşların tümünde (%100) *PLB1*, sırasıyla 27'sinde (%90) ve 22'sinde (%73.3) *PLC1* ekspresyonu saptandı. Çalışmaya alınan suşların RT-PZT sonuçlarının

kantitasyonlarının yapılması sonucunda, *PLB1* ekspresyonu kan izolatları için 0.52-1.05; oral kavite izolatları için 0.70-1.33 değerleri arasında izlendi. *PLB1* ekspresyonu açısından her iki grup suş arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($t=-0.307$; $p=0.760$). *PLC1* ekspresyonu, kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan suşlar için sırasıyla 0.35-1.04 ve 0.75-1.33 değerleri arasında belirlendi. *PLC1* ekspresyon düzeyi oral kavite izolatlarında, kan izolatlarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Mann Whitney $U=103.500$; $p<0.001$).

Sonuç: Çalışmamızda oral kavite ve kan örneklerinden elde edilen *C. albicans* izolatlarında yüksek oranlarda fosfolipaz aktivitesinin belirlenmesi, bu enzimlerin üretiminin virulansta önemli bir rol oynadığını desteklemekte olup; bulgularımız doğrultusunda *PLC1* enziminin mukozal enfeksiyonlarda önemli bir rolü olduğu söylenebilir ancak bu konuda daha geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim söz konusudur.

Anahtar sözcükler: *Candida albicans*, fosfolipaz B1, fosfolipaz C1, RT-PZT

Investigation of Phospholipase Activity in *Candida albicans* Strains Isolated From Blood and Oral Cavity Specimens

Buğse Tunç

Dokuz Eylul University, Health Sciences Institute,

Department of Microbiology and Clinical Microbiology

e-mail: busetunc1989@gmail.com

ABSTRACT

Objective: An opportunistic pathogen, *Candida* spp, cause invasive and mucosal infections with its important virulence factor, phospholipase enzymes which break down and lyse the phospholipids of the host cell membranes. In our study, investigation of phospholipase B1 and C1 activities of *C. albicans* strains isolated from blood and oral cavity specimens and comparison of the two groups were aimed.

Methods: A total number of 60 *C. albicans* strains isolated from blood culture (n=30) and oral cavity specimens (n=30) in Dokuz Eylul University Hospital Mycology laboratory between January 2015-December 2015 were included. Phospholipase activity of the strains were investigated by plate method using egg yolk agar and *PLB1* and *PLC1* genes encoding phospholipase B1 and C1 enzymes in *C. albicans* were examined by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The data obtained for two groups were compared statistically.

Results: Twenty six (86.7%) and 24 (80.0%) of the strains isolated from blood and oral cavity specimens had phospholipase activity by plate method, respectively. When the positivity rates of the groups were compared, no statistically important difference was observed ($\chi^2=0.48$; $p=0.49$). There was an important difference between the average Pz values (0.6138 ± 0.9823 and 0.6988 ± 0.9910) of the groups (Mann Whitney U=173.500; $p=0.007$). All blood and oral cavity isolates expressed *PLB1* and 27 (90.0%) and 22 (73.3%) of the strains isolated from blood and oral cavity, respectively expressed *PLC1*. When the results of RT-PCR test were quantitated, *PLB1* expression was found to be between 0.52-1.05

for blood and 0.70-1.33 for oral cavity isolates. No statistically important difference was detected between the *PLB1* expression values of two groups. *PLC1* expression values were determined to be between 0.35-1.04 and 0.75-1.33 for blood and oral cavity strains, respectively. *PLC1* expression values of the oral cavity isolates were statistically higher when compared with the values of blood strains (Mann Whitney U=103.500; p<0.001).

Conclusion: Determination of high phospholipase activity of *C. albicans* strains isolated from oral cavity and blood samples; support that the production of these enzymes play an important role in virulence and from the results of our study it can be concluded that *PLC1* enzymes have an important role in mucosal infections however more comprehensive studies are required.

Key words: *Candida albicans*, phospholipase B1, phospholipase C1, RT-PCR

1.GİRİŞ VE AMAC

Candida türleri insanlarda önemli fırsatçı enfeksiyonlara yol açmakta olup, son 10 yılda *Candida* kaynaklı enfeksiyonlarda bir artış izlenmiştir (1). Yetişkin yoğun bakım ünitelerinde yüksek ölüm oranlarının görüldüğü hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonlarının %15'nin *Candida* türlerinden kaynaklandığı rapor edilmiş ve en sık izole edilen tür *C. albicans* olarak bildirilmiştir (1). Deri/mukoza bütünlüğünün bozulması sonucu *Candida* hücreleri epitel hücrelerinden penetrasyon yoluyla kana giriş yapabilir ya da kateter, sonda gibi medikal aletlerin üzerinde oluşan biyofilmden kana yayılabilir. Kan dolaşımı yoluyla hücreler bütün organları enfekte etmektedir (2). Bu tabloların oluşumunda *Candida* türlerinin virulans faktörleri de önemli rol oynamaktadır. *C. albicans* için tanımlanan virulans faktörleri; konak hücrelere adherans, biyofilm üretimi, fenotipik değişim, hücre yüzey fobisitesi, hücre duvar yapısı, sideroforları kullanma yeteneği, yalancı hif – hif – çinlenme borusu oluşumu, moleküler benzeme, fosfolipaz ve proteinaz gibi ekstrasellüler hidrolitik enzimlerin üretimi olarak sıralanabilir (3). Ekstrasellüler hidrolitik enzimlerden biri olan fosfolipaz enzimi konak hücre membranının bileşeni olan fosfolipitleri parçalayarak hücreleri lizise uğratar. Hücrenin yüzey özelliklerini değiştirerek enfeksiyonun başlangıcı olan adheransa olanak sağlar (1). Ibrahim ve ark. tarafından *C. albicans*'ın patojenitesinde ekstrasellüler fosfolipazın rollerinin incelenmesi amacıyla farklı çalışmalar yapılmış olup, kan kültürü örneklerinden soyutlanan *C. albicans* suşlarının kommensal suşlara göre daha fazla ekstrasellüler fosfolipaz aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir. Hematojen yayımlı kandidemiyi incelemek amacı ile farelerde yapılan bir çalışmada ise dokuz kan izolatu fosfolipaz aktivitesi açısından karşılaştırılmış ve yüksek fosfolipaz aktivitesi gösteren suşların düşük aktivitelilere göre 5.6 kat daha öldürücü olduğu saptanmıştır (4). Farelerde yapılan başka bir çalışmada, yüksek ekstrasellüler fosfolipaz aktivitesine sahip *C. albicans* hücrelerinin düşük aktivite gösterenlere göre oral epitel hücrelerine adheransta ve fareleri öldürme yeteneğinde daha etkili olduğu belirtilmiştir (5). Bu nedenle çalışmamızda kan kültüründen ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* kökenlerinin fosfolipaz aktivitesinin incelenmesi ve her iki grup izolatlarında en sık üretilen fosfolipaz enzimleri olan fosfolipaz B ve C'nin ekspresyon düzeylerinin araştırılması ve gruplar için elde edilen sonuçların karşılaştırılması hedeflenmiştir.

Araştırmamızda *C. albicans*'ın virulansı açısından önemli olan fosfolipaz aktivitesinin araştırılmasında öncelikle standart bir yöntem olan yumurta sarılı agar besiyerinin kullanıldığı plak yöntemi uygulandı. Bunun yanında farklı fosfolipaz enzimlerini kodlayan *PLB1* ve *PLC1* genlerinin moleküler düzeyde incelenmesi amacıyla da daha duyarlı ve kantitatif sonuç alınan ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) yöntemi kullanıldı. Çalışmamızda fosfolipaz aktivitesinin araştırılmasında kullanılan yöntemler arasındaki uyum incelenerek, rutin kullanıma uygun yöntemin de belirlenmesi hedeflendi.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Milattan önce dördüncü yüzyılda Hippocrates yaşadığı dönemden beri varlığı bilinen ağızdaki pamukçuk lezyonları “thrush”, 1665 yılında Pepys tarafından ilk defa yazılı olarak bildirilmiştir. 1846 yılına kadar pamukçuk etkenine bilimsel yaklaşımda bulunulmamıştır. 1846 yılından sonra Berg, pamukçuğun bir fungus ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. 1954 yılına kadar pamukçuk lezyonlarının etkeninin *C. albicans* olduğu resmi olarak kabul edilmemiştir.

1771 yılında Rosen von Rosenstein, pamukçuk etkeninin invaziv formda akciğerlerde bulunabileceğini saptamış ancak yayılımının kan yolu ile nasıl olabileceğini açıklayamamıştır.

1839 yılında Langenbeck, tifo hastalığına yakalanmış bir hastanın oral aftından ilk defa fungus izole ettiğini düşünmüş fakat bu afttan izole ettiği etkenin fungustan ziyade tifo etkeni bakterinin olduğunu ileri sürmüştür.

Langenbeck ilk olarak pamukçukla ilişkili fungusu gözlemlemiş fakat organizmayı doğru identifiye edememiştir. 1842 yılında Langenbeck’in izole ettiği organizmayı çalışan Gruby, bu türün *Sporotrichum* olduğuna karar vermiştir. Bu etken 1847 yılında Robin tarafından çalışmaya alınmış ve *Oidium albicans* olarak tekrar sınıflandırmıştır.

1792 yılında J.P.Frank ve 1849 yılında Wilkinson cinsel organlardaki aft lezyonlarını gözlemleri sonucu etkenin dimorfik fungus olabileceğini düşünmüşlerdir.

1862 yılında Mayer altı kandida vajiniti olgusu tanımlamış ve tavşanlarda deneysel olarak enfeksiyon modeli oluşturmuştur.

Roth Berkhout 1923 yılında pamukçuk etkeni olan mikroorganizmanın *Monilia* olmadığını, jenerik isminin *Candida* olmasını önermiştir. İsim, Latin dilinde Romen Senato adaylarının giydiği beyaz cübbe anlamına gelen “toga candida” kelimesinden gelmektedir. İsim, pamukçuk ya da aft bölgesinden izole edilen etkenin agarda beyaz koloniler oluşturması ile bağdaştırılmıştır.

Berkhout ve Robin’in çalışmalarının ardından serolojik ve biyokimyasal çalışmalarla pamukçuk etkeninin sınıflandırılmasına devam edilmiştir (6).

2.2. Genel Özellikler

Funguslar, *Eumycota* ailesine ait ökaryotik organizmalardır. Maya ve küf olmak üzere iki şekilde ürerler. Mantar hücrelerinde çekirdek, çekirdek zarı, endoplazmik retikulum, mitokondri ve golgi cisimciği bulunmaktadır. Mantarların çoğu zorunlu veya fakültatif aeroptur. Kemotrof olup çeşitli organik materyalleri eriyik besin maddelerine parçalayan enzimler salgılamaktadırlar. Parçalanmış besin maddeleri pasif absorpsiyon veya aktif transport ile hücre içine alınır (7,8).

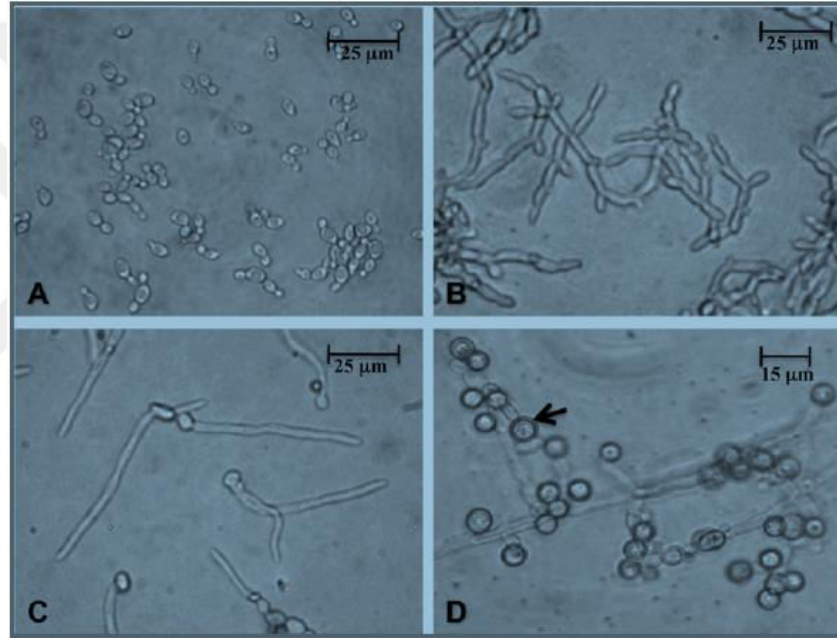
Mayalar; tek hücreli, ökaryotik, çapları 3-15 µm olabilen ve tomurcuklanarak (blastosporlarla) çoğalan organizmalardır. Morfolojileri genellikle yuvarlaktan ovale ya da daha az sıklıkta uzunca, düzensiz şekilde olabilir. Kitin ve glukan bileşenlerinden oluşan sert hücre duvarı ve ergosterol içeren hücre zarı yapıları ile diğer ökaryotlardan ayrılırlar (9).

Candida türleri, *Ascomycota* şubesinin *Saccharomycetes* sınıfında yer alan *Saccharomycetales* takımında bulunmaktadır. *Saccharomycetales* takımındaki funguslar tomurcuklanan vejetatif hücrelerin transformasyonu ya da bağımsız iki hücre arasındaki konjugasyon ile eşeyli; ana hücreden tomurcuklanarak eşeysiz olarak çoğalırlar. *Candida* türleri genellikle tomurcuklanarak çoğalır. Tomurcuklar uzayıp ana hücreden kopmadığı takdirde yalancı hifler (pseudohif) oluşmaktadır (8,9).

Candida cinsi anamorf olup 200'den fazla tür içermektedir (9). *Candida* türleri sağlıklı bireylerin kommensal olarak gastrointestinal, genitoüriner mukozal yüzeyler ve derinin mikrobiyal florasında bulunmaktadır. Konakçının immün sistemi baskılanması halinde enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Candida*'nın prevalansı hamile, diyabetik, yaşlı ve immün sistemi baskılanmış bireylerde, takma diş kullananlarda, antibiyotik ve kortikosteroid tedavisi görenlerde yüksek olup, bunlar *Candida* enfeksiyonları için predispozan faktörlerdir (10,11,12). Bu faktörlere ek olarak *Candida albicans*'ın sahip olduğu virulans faktörleri aracılığıyla konakta enfeksiyonun başlanması tetiklenir. Virulans faktörleri; aderans, biyofilm üretimi, enzimler, morfolojik değişim, fenotipik değişim, hücre yüzey hidrofobisitesi, sideroforları kullanma yeteneği olarak sıralanabilir (13). Kommensal durumda bulunan maya hücreleri virulans faktörleri aracılığı ile patojenik duruma geçiş yapabilmektedir (13).

C. albicans, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. dubliniensis* en çok klinik önemi olan *Candida* türleridir. *C. albicans*, mukozal ve sistemik kandidoz tablolarında sıklıkla izole edilen patojen türdür (14).

C. albicans maya ya da filamentöz form olarak büyüeyebilen polimorfik bir fungustur. Gerçek hif üretiminin *Candida* türleri arasında sadece *C. albicans* ve *C. dubliniensis* tarafından yapıldığı bilinmektedir. Hif, adezyon ve doku invazyonu gibi enfeksiyonu başlatan önemli süreçte rol almaktadır. Her iki türün mukozal ve sistemik enfeksiyon modeli karşılaştırıldığında, hif üretimi açısından *C. albicans* çok daha patojen bulunmuştur (Şekil 1) (15).



Şekil 1. *C. albicans*'ın çeşitli ortamlardaki morfolojisi. A: *C. albicans* maya hücreleri, B: yalancı hif, C: hif, D: klamidospore (16)

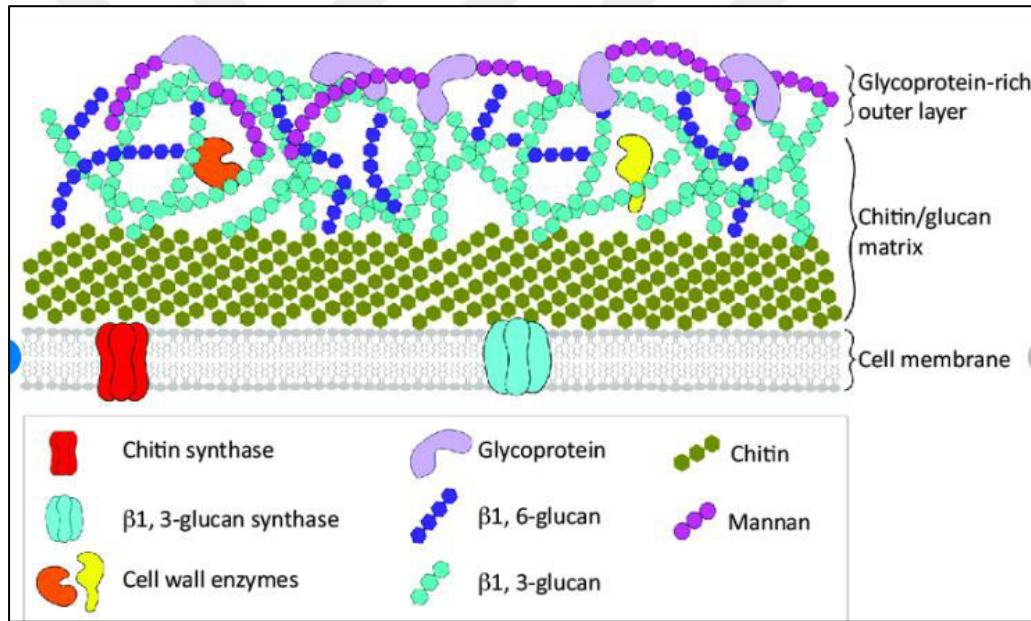
C. albicans genomu 16 MB boyutunda olup, sekiz homolog kromozomdan oluşmaktadır. Genel olarak diploiddir (17).

Candida türleri Sabouraud dekstroza agar besiyerinde kremden sarı renge kadar değişiklik gösteren düz, pürüzsüz, parlayan, kuru, kırışık ve mat görünümünde koloniler oluşturur (9).

2.3 Hücre Yapısı

Mantarlarda hücre duvarı çevredeki ozmotik basınca karşı dayanmak için mekanik destek sağlayan, hücre büyümesi, hücre bölünmesi ve yaşam döngüsü boyunca farklı tipte hücrelerin gelişimine olanak sağlayan kompleks bir yapıdır (18).

Candida türlerinin hücre duvar yapısının yaklaşık %80-%90'nını karbonhidratlar oluşturmaktadır. Hücre duvar polisakkaritleri üç ana birimden oluşur; β -1,3 ve β -1,6 bağlarını (β -glukanlar) içeren dallanmış glukoz primerlerini, β -1,4 bağlarını (kitin) içeren dallanmamış N-asetil-D-glukozamin polimerini ve proteinlerle kovalent olarak ilişkili (gliko [manno]proteinleri) mannoz polimerlerini (mannan) içerir. Ek olarak; yapısında %6-25 oranında protein ve %1-7 oranında lipit içerir (Şekil 2) (19,20).



Şekil 2. Fungal hücre duvar yapısı (21)

Mikrofibriller polimerler olan β -glukanlar ve kitin, hücre duvar yapısının ana bileşenleri olup sert bir iskelet oluştururlar. Bu hücreye güçlü fiziksel bir özellik sağlar. β -glukanlar hücre duvar ağırlığının %47-60'ını, kitin ise %0,4-%9'unu oluşturur. Kitin az miktarda bulunmasına rağmen hücre bölmelerindeki septalarda, tomurcuklanma izlerinde, ana hücre-tomurcuklanan maya hücreleri arasında oluşan halkasal yapıda bulunmaktadır (22,23).

Mannoz polimerleri, proteinlerle kovalent ilişkide bulunur (mannoproteinler) ve hücre duvar polisakkaritlerin %40'ını oluşturarak hücre duvar matriksinin ana bileşeni olarak kabul edilmektedir (18,19).

B-1,3 ve β -1,6 glukanlar, maya ve hif formlarında benzer oranlarda bulunmasına rağmen çimlenme borusu oluşumu esnasında β -1,3 glukan bağları oranının, maya ve olgun hif hücreleri ile kıyaslandığında arttığı belirlenmiştir (24).

Hücre duvarının %90'nını oluşturan polisakkaritler alkali ortamda çözilemeyen fibril iskelet ve çözülebilir amorf çimento yapısındadır. Amorf polisakkaritler tüm hücre duvarında bulunur fakat dış yüzeye daha yakındır. Fibril polisakkaritler mekanik işlevlerinin gerçekleştirmek üzere hücre zarına yakın yerleşim gösterirler (25).

Kitin ve β -1,3 glukan polimerleri hücre zarında sentezlenir ve periplazmaya aktarılır. Mannoproteinler ise sitoplazmada sentezlenir ve salgı yolları aracılığıyla transportu sağlanır. B-1,6 glukan sentezi, endoplazmik retikulum veya golgi kompleksinde gerçekleşir. Bu nedenle kitin, hücre duvar yapısının iç tabakasında, mannoproteinler ise dış tabakasında bulunur (26). Dallanmış glukanlar bir araya gelerek kitin ve mannoproteinlerle çapraz bağlanır ve hücre duvarına mekanik destek sağlar (27).

Maya hücresi ve filamentöz formların hücre duvar yapılarındaki bileşenlerin yüzdesi benzer olmakla beraber β -glukan, kitin ve mannan miktarlarının göreceli olarak *C. albicans*'ın büyüme süreci boyunca değiştiği belirlenmiştir. Kitinin yenilenen protoplastlarda ortaya çıkan ilk polimer olması nedeniyle hif formlarının, maya hücrelerine göre en az üç katı daha fazla kitin içerdiği belirtilmiştir (18,28,29,30). Kitin mikrofibrilleri büyük bir gerilme gücüne sahiptir ve hücre duvarı bütünlüğüne destek olur. Kitin sentezi bozulduğunda hücre duvarının stabilitesi bozulur ve ozmotik açıdan kararsız hale gelir (31).

Candida'ların hücre membranında fosfotidilkolin, fosfotidilserin, fosfotidil etanolamin ve fosfotidil inozitol gibi fosfolipitler bulunmaktadır. Membran lipidlerinin %20'sini sterol içermekte olup, sterolün %95'i ergosterol şeklindedir (19).

2.4. Patogenez ve Virulans Faktörleri

Candida türleri, bazı ülkelerde hastane kaynaklı sistemik enfeksiyonlardan en sık soyutlanan dördüncü etkindir ve %50'nin üzerinde ölüm oranlarına neden olmaktadır (32,33). *Candida* türleri içinde en fazla insan enfeksiyonlarına *C. albicans*'ın neden olduğu bilinmektedir (16). *C. albicans* insanlarda oral ve vajinal kandidoza neden olan yüzeysel enfeksiyonlar ve hayatı tehdit eden sistemik enfeksiyonlar olarak iki ana enfeksiyon grubu oluşturmaktadır (16). Yüzeysel kandidoz enfeksiyonları öldürücü değildir. Sistemik kandidoz ise antifungal tedaviye rağmen yüksek oranda mortaliteye neden olmaktadır (32,33). Nötropeni ve gastrointestinal mukozanın zarar görmesi sistemik kandidozun gelişimi için risk faktörüdür. Fungusların direk kan dolaşımına yayılımını sağlayan santral venöz kateterler, fungal gelişimi destekleyen geniş spektrumlu antibiyotik uygulamaları, mukozal bariyer bütünlüğünün bozulmasına neden olan travma/gastrointestinal ameliyatlar sistemik kandidozun yayılımı için önemli diğer faktörlerdir (34).

C. albicans'ın yüzeysel ve sistemik enfeksiyon oluşturmaları için deri/mukozal bütünlüğün bozulması sonrasında maya-hif formları arasındaki morfolojik dönüşümü, adezin ekspresyonu ile hücre yüzeyine aderansı, tigmotropizmi, biyofilm oluşumu, fenotipik dönüşümü ve hidrolitik enzimlerinin (salgısal aspartik proteinaz, fosfolipazi lipaz) salgılanması gibi virulans faktörlerine gereksinim vardır. Bunlara ek olarak; ortam pH'sındaki dalgalanmalara hızlı adapte olma, metabolik esneklik, güçlü besin elde etme sistemleri ve sağlam stres yanıtı gibi yapısal özellikleri de virulansa destek olmaktadır (35).

2.4.1. Adezyon

Hücrel adezyon; tek hücreli organizmaların hayat döngüsü ve çok hücreli organizmaların gelişim sürecinde önemli bir biyolojik süreçtir. Çoğu fungus, "adezin" olarak adlandırılan hücre duvar glikoprotein ailelerini içermektedir. Bu proteinlere, fungal hücrelerin birbirleri ile etkileşimleri ve konak-patojen etkileşimleri için ihtiyaç duyulmaktadır (36,37). Patojen mayaların konakçı dokusuna adheransı insan vücudunun farklı bölgelerinde meydana gelmektedir. Potansiyel adezyon hedefleri; hücre membranlarında bulunan karbohidratça zengin biyomoleküllerle birlikte ekstrasellüler olarak etkileşimde bulunan glikokaliks ile hücreler tarafından salgılanan ekstrasellüler ortamlardır (38). Örneğin; patojen mayalardaki lektin aktivasyonu ile adezinler, glikozillenmiş konak reseptörlerini ya da glikokaliksin glikoproteinlerini hedef alır (39,40).

Candida hücrelerinin konak hücrelerine özellikle epitel hücrelerine adezyonu, enfeksiyonu başlatır, süreci invazyon takip eder. *C. albicans*'ın hücre duvarında bulunan adezin proteinlerinin ekspresyonu aracılığı ile adezyon başlar. Glikoproteine bağlanarak *C. albicans* suşlarının mukozal yüzeylere adhere olmasını sağlar (41).

Son 30 yılda adezyonun moleküler mekanizmasında araştırmalar artmış ve birkaç adezin proteinin yapısı çözülmüştür. Bu proteinlerden bazıları; *Saccharomyces cerevisiae*'nın flokulasyon protein ailesi (Flo), *Candida glabrata*'nın epitel adezin protein ailesi (Epa) ve *C. albicans*'ın "agglutinin-like sequence" (Als) protein ailesi, "hyphal wall protein 1" (Hwp1) proteini, integrin (Int1) proteinidir. (42,43).

"Agglutinin like sequence" (Als) ailesinin yüksek derecede sekansı korunmuş Als1p-Als7p ve Als9p olmak üzere sekiz üyesi bulunmaktadır. *C. albicans* Als proteinlerinin üç ana domeni bulunmaktadır; treonine (T) zengin sinyal peptid bölgesini içeren N- terminal bölgesi, çoklu ardışık tekrarları içeren merkezi bölüm, uzun ve yüksek derecede glikozillenmiş Ser/Thr'ce zengin, sonunda GPI (glikofosfatidilinositol) çapasıyla ilişkili 13-20 rezidü sinyal sekanslarından oluşan C- terminal bölgesinden oluşmaktadır. Als1p ve Als3p en iyi çalışılan Als proteinleridir. Bu iki proteinin N-terminal bölgeleri fibronektin, laminin, kollajen IV, fibrinojen, jelatin gibi ligandlarla etkileşim halindedir. N-Als1p ve N-Als3p adezinleri, fibronektine göre laminine 10 kat daha fazla afinite göstermektedir (42). Als3 adezin proteini, Als protein ailesi içinde en önemlilerinden bir tanesidir çünkü hife özgün Als3 proteini kodlar. Alves yaptığı bir çalışmada; *C. albicans* ile enfekte edilmiş insan vajinal epitelinde bütün Als genlerinin ekspresyonunu belirlemiş ve Als3 ile Als6 genlerinin yüksek oranda eksprese olduğunu saptamıştır (44). Ayrıca Als3 adezinin; orofaringeal kandidozun anahtarı olarak oral epitel hücrelerinde ve endotel hücrelerinde *C. albicans*'ın endositozunu tetikleyen bir protein olduğu belirtilmiştir (45). Reseptör olarak rol yaparak demir alınımlı da gerçekleştirmektedir (46). Fu ve ark., hematogen yayımlı fare modellemesi ile yaptıkları çalışmada, Als1p proteinin virulans için zorunlu olduğunu bildirmiştir (47).

HWP1 geni, hif ve çimlenme borusuna özgün yüzey proteinlerini kodlar. Maya formunda eksprese edilememektedir. Amino terminal sekansı (prolin ve glutamine zengin) transglutaminaz substratlarına (TGase) benzerlik göstermektedir. Hwp1 proteini transglutaminazı (TGases) substrat olarak kullandığında, *C. albicans* hifleri insan yatak epitel

hücrelerine (HBEC) sabit ve kovalent olarak bağlanır, bu şekilde reaktifler tarafından kovalent olmayan bağlara çevrilemeyen güçlü bir yapı oluşur (43). *C. albicans* *HWPI* mutanları ile yapılan bir çalışmada, transglutaminaza substrat olarak aktivitesinin ve stabilite seviyesinin azaldığı dolayısıyla da HBEC'e adheransının, parental hücrelerle karşılaştırılma sonucunda %23 oranında azaldığı bildirilmiştir. Tsuchimari ve ark'nın *HWPI* nokta mutasyonlu *C. albicans* hücreleri ile yaptığı çalışmada, enfekte farelerde germinasyonun ve mortalitenin azaldığı dolayısıyla endotel hücrelerine verdikleri hasarın azaldığı belirlenmiştir (48). Bu veriler doğrultusunda adherans ve virulansta *HWPI* geninin önemli bir rol oynadığı görülmektedir.

INT1 geni, *C. albicans*'ta eksprese edilen integrin benzeri proteini kodlamakta olup, çimlenme borusunun, insan epitel hücrelerine adhere olmasını sağlar. *INT1* geninde delesyon meydana gelen *C. albicans* suşları ile yapılan bir çalışmada, epitel hücre hatlarına adheransında %40 oranında azalma yanında hif oluşumunda da azalma dolayısıyla virulansta düşüş gözlenmiştir. *INT1* geni, *C. albicans*'ın adheransı ve hif oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (49).

Tablo 1. *C. albicans* için başlıca adezinler ve ligandları

Adezinler	Ligandlar
Als1p	HBEC, endo (insan endotel hücreleri)
Ala1p (Als5p)	Fibronektin (FN)
Hwp1p	HBEC
Int1p	Epitel hücreler

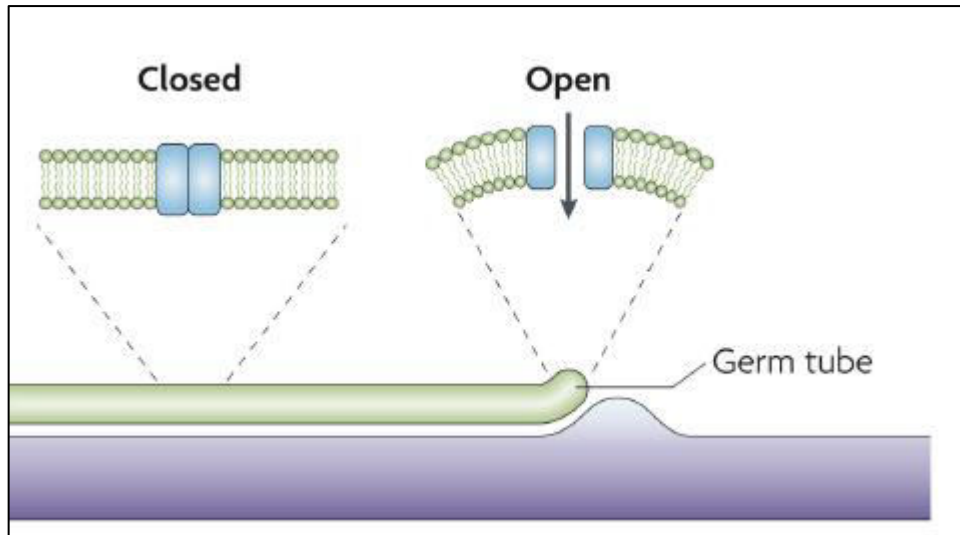
2.4.2. Temas Algılama ve Tigmotropizm (Temasla Büyüme)

C. albicans maya hücrelerinin mukozal ya da besiyeri ortamına teması, hif ve biyofilm oluşumunu tetiklemektedir. Uyarılan maya hücreleri hif formuna dönüşür ve temas ettiği yüzeyden içeri girmeye başlar. Katı yüzeylere temas ile biyofilm oluşumu şekillenmeye başlar (50). Maya hücrelerinin tigmotropizmi için mutlaka temas ettiği yüzeydeki epitel hücrelerinin

zarar görmüş olması gerekmektedir, böylelikle invazyon başlar. (51). Brand ve ark., *C. albicans* hif tigmotropizminin kalsiyum kanalları olan Chc1, Mid1 aracılığı ile alınan ekstrasellüler kalsiyum ile regüle edildiğini göstermişlerdir (51).

Mekaniksensör (MS) iyon kanalları, birçok hücrede mekanik uyarılara karşı oluşturulan yanıtı yardımcı olan kanallar olup, zarı etkileyen fiziksel uyarıcılara karşı cevap olarak açılır. Kanalların açılmasından kaynaklanan iyon değişimi hücresel fizyolojide değişikliğe neden olur ve mekanik uyarının sonucunda biyolojik yanıt oluşur (52,53). Fungal MS iyon kanalları, fiziksel çevrenin topografik özelliklerine karşı yanıt oluşturmalarını sağlar. Büyüyen çimlenme borusu membran tabakasında ilerlerken fiziksel deformasyonla karşılaşması sonucunda duyarlılık oluşur. Kalsiyum ile indüklenen MS iyon kanalları, *C. albicans* hif yapılarını konakçı hücrelerin arasındaki boşluklardan içeri doğru yönlendirir ve organizmanın konak dokusuna girişini sağlar. *C. albicans* MS kanal bileşenlerini kodlayan *MID* geninde meydana gelen delesyon ile tigmotropizmde azalma ve çimlenme borusunu uyarana karşı yönlendirme yeteneğinde düşüş izlenir (54). Çevresel duyarlılık mekanizması olarak MS iyon kanalları fungal patojenlerin virulansı ile ilişkilidir.

Biyofilm oluşumu ve invazyonun yüzeylere doğru temas ve buna karşı yanıtların oluşmasının patojenite için önemli olduğu belirtilmiştir (13).

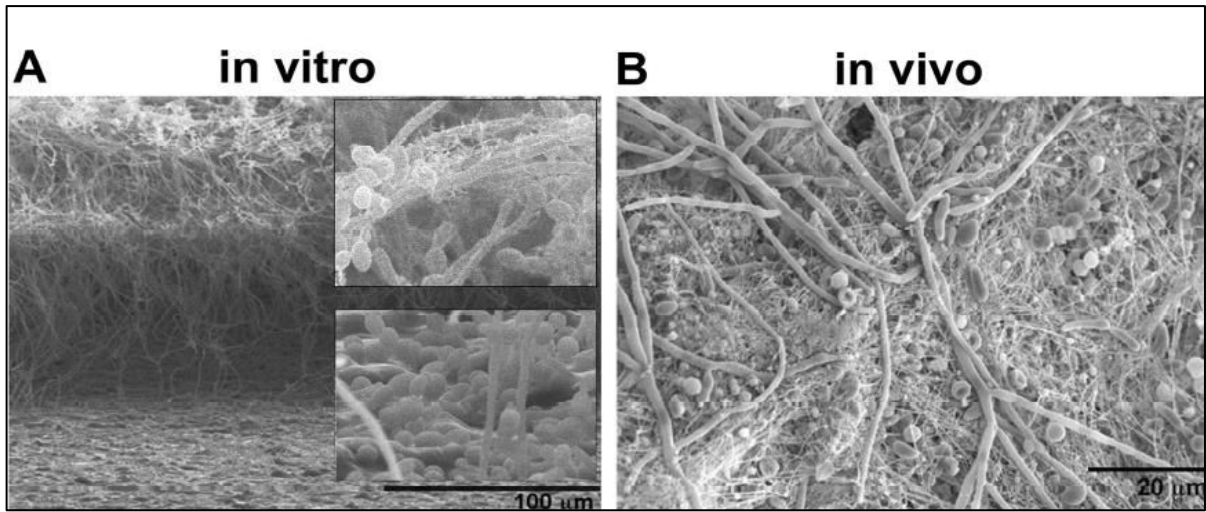


Şekil 3. *C. albicans*'ın temasa bağımlı filemantasyonu ve MS iyon kanalları (50)

2.4.3. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm, mikrobiyal topluluğun, dönüşümsüz olarak substrata bağlanması ile şekillenen kendi ürettikleri ekstrasellüler polisakkarit matriks (EPS) içinde gömülü halde yaşayarak oluşturdıkları kompleks bir yapıdır (55). *C. albicans*; canlı, cansız birçok yüzeyde, kateterler, takma dişler ve mukozal hücre yüzeylerinde biyofilm oluşturur (13). Biyofilm oluşumu ardışık süreçlerden oluşmaktadır: Substrata maya hücrelerinin adheransı ile süreç başlar. Ardından maya hücreleri çoğalarak hif ve yalancı hifleri içeren filamentöz formlar şekillenmeye başlar. Biyofilm yapısı olgunlaştıkça ekstrasellüler matriks birikimi gerçekleşir, bu yapı maya hücrelerine yüksek derecede antifungallere karşı direnç sağlar. Ayrılma basamağı olarak da adlandırılan bu basamakta adhere olmayan maya hücreleri biyofilmden bulundukları ortamın içerisine salınarak EPS yapısından ayrılırlar (56). EPS yapısının içeriğinde %55 protein ve glikoprotein, %25 karbonhidrat, %15 lipid, %5 nükleik asit ve az miktarda da hücre duvar yapıtaşı olan β -1,3 glukan polisakkariti bulunmaktadır (57).

C. albicans biyofilm yapısında küçük, oval maya formunda hücreler (blastospor) ile uzun tübüler filamentöz hücreler olmak üzere iki ana hücre tipi bulunmaktadır. In vitro ortamda oluşan biyofilmlerde çoğunlukla hif tabakasından kaynaklanarak yayılan maya hücreleri bulunmaktadır. Ekstrasellüler matriks, maya ve hif hücrelerini kapsamaktadır (Şekil A) (58). In vivo kateter enfeksiyon modellerinde oluşan biyofilm daha kompleks yapıda olup, ekstrasellüler matrikste maya, hif ve yalancı hifler bulunur (Şekil B) (59).



Şekil 4. *C. albicans*'ın in vitro ve in vivo koşullarda ürettiği biyofilm yapısı

A. In vitro koşullarda oluşan biyofilmin elektron mikroskop (SEM) ile üç boyutlu görüntüsü; bazal tabakada maya hücreleri, orta tabakada hif yapıları, üst tabakada hiflerden tomurcuklanan maya hücreleri. B. In vivo koşullarda (fare kateteri) oluşan biyofilmin SEM ile üç boyutlu görüntüsü; maya hücreleri, yalancı hif ve hif yapıları belirgin.

Olgunlaşmış biyofilm yapısındaki hücreler, ilk yüzeye tutunan planktonik hücrelere kıyasla antimikrobiyal ajanlara ve konak immün faktörlerine daha dirençlidir. Farelerde oluşturulan yaygın enfeksiyon modelinde olgun biyofilmden ayrılan maya hücrelerinin daha virulan olduğu belirtilmiştir (60). Bunun nedeni biyofilmden kaynaklanan hücrelerin, planktonik hücrelere göre ilaç atılım pompalarını daha fazla eksprese etmesi ve EPS tabakasının antifungal moleküllerin yapı içerisine girmesine izin vermemesidir (61). Son yapılan çalışmalara göre *C. albicans* biyofilminin nötrofillere karşı dirençli olduğu dolayısıyla reaktif oksijen bileşenlerinin (ROS) üretimini tetiklemediği anlaşılmıştır (62).

CDR1, *CDR2* (“ATP binding cassette-ABC- transporter”) ve *MDR1* (“major facilitator superfamily-MFS- transporter”) genleri, atılım pompalarını kodlayan genler olup, ilk olarak *C. albicans*’ta tanımlanmıştır. Bu üç genin ekspresyonunda meydana gelebilecek mutasyonlar sonucunda *C. albicans* hücrelerinde dirençli fenotipler oluşmaktadır (63). Mukherjee ve ark., bu üç gende meydana gelecek mutasyonlar sonucunda biyofilm oluşum aşamasında flukanozole direnç geliştiğini belirtmiştir. Bu durum biyofilmin erken aşamalarında etkisini göstermekte iken olgun biyofilm hücrelerinde flukanozole direnç oluşmamaktadır (64).

2.4.4. Enzimler

Candida suşları, konak hücre yüzeyine adherans ve hif şeklinde büyümeyi takiben, hiflerin konak hücrelerine penetrasyonunu sağlayan hidrolazları salgılar. *C. albicans* tarafından eksprese edilen üç farklı hidrolaz sınıfı vardır: Salgısal aspartik proteinaz (Sap), fosfolipaz, lipazlardır (13).

2.4.4.1. Salgısal Aspartik Proteinaz (Sap)

C. albicans Sap proteinlerinin en temel işlevi, konak proteinlerini parçalayarak hücreler için nitrojen kaynağı elde etmektir (65). Sap enzim ailesinin Sap1-10 olmak üzere on üyesi bulunmaktadır (13). Sap proteinleri, *C. albicans* dışında *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* suşlarında da izlenmektedir (43). Sap enzimleri enfeksiyon sırasında farklı fenotipte farklı işlevler göstermektedir; *SAP2* geni, *C. albicans* maya hücresinde eksprese edilen temel protein olup, hücrelere destek mekanizması olarak işlev görür. Yüksek molekül

ağırlıklı proteinleri proteoliz ederek peptitleri elde eder ve *SAP2* gen ekspresyonunu destekler (66). *SAP1* ve *SAP3* genleri, fenotipik dönüşüm sırasında eksprese edilmektedir (67). *SAP8* geninin ekspresyonu sıcaklık ile regüle edilerek gerçekleşmektedir (68). *SAP9* ve *SAP10* genleri hem maya hem de hif formunda bulunmakta olup, çevresel şartların regülasyonu ile düzenlenmektedir (68). *SAP4-6* genleri, asidik koşullarda eksprese edilen diğer *SAP* genlerinin aksine nötral pH'da eksprese edilir (69). Bu bilgilerden *SAP* gen ailesinin, farklı koşullarda farklı üyeleri eksprese ettiği anlaşılmaktadır.

Sap2 enzimi, ortamdaki serumda bulunan albümin ya da diğer proteinleri nitrojen kaynağı olarak kullanmaktadır. Konak dokusuna adezyonda yardımcı olur, konak hücreye ait hücre yüzey yapılarını ve intrasellüler maddelerini degrade ederek ya da hücreleri parçalayarak invazyonu gerçekleştirir. Ayrıca konak immün sistemin antimikrobiyal saldırılarına karşı direnç gösterir. Sap2 enzimi ekstrasellüler matriks ile keratin, kollajen, laminin, fibronektin, müsin gibi konak hücre yüzey proteinlerini parçalayabilmektedir. Bunun yanında farklı konak savunma proteinleri olan laktoferrin, proteinaz inhibitörleri, alfa-makroglobulin, makrofajlardan salınan enzimler, immunoglobulinler de Sap2 enzimi tarafından hidrolize edilebilmektedir (70,71,72).

In vitro oral kandidoz enfeksiyon modelinde *SAP1-8* genlerinin enfeksiyonun belirli zaman aralıklarında eksprese edildiği bulunmuştur. *SAP1-3* genleri enfeksiyon oluşumundan 42 saat sonra eksprese edilmekte iken bu süreci takiben *SAP6*, 48 saat sonra; *SAP2* ile *SAP8*, 80. saatlerde eksprese edilmektedir. *SAP4-5* genleri saptanamamıştır. Doku hasarı 48. saatten sonra başlamaktadır (43). In vitro oral ve kutanöz *C. albicans* enfeksiyon modelinde *SAP-1-3* genleri yüzeysel enfeksiyon sırasında başlıca eksprese edilen genlerdir (73,74). Bu sonuç fare vajinit modelinde de *SAP1* ve *SAP2*'nin eksprese edilmesi ile desteklenmiştir (75). *C. albicans* sistemik enfeksiyon modelinde ise *SAP4-6* temel eksprese edilen genlerdir (76). Sap4-6 enzimleri, *C. albicans* hücrelerini fagositik saldırılara karşı korumaktadır. Fagolizozom oluşum esnasında *C. albicans* hücreleri tarafından Sap4-6 proteinleri salgılanmaktadır. *SAP4-6* mutant hücrelerde makrofajlar tarafından oluşturulan fagositik saldırıya duyarlılık izlenmektedir (77).

In vitro ve hayvan modeli deneyleri, *SAP* genlerinin ekspresyonunun *C. albicans* virulansı ile ilişkili olduğunu ve farklı *C. albicans* enfeksiyonları sırasında farklı *SAP* genlerinin eksprese edildiğini göstermektedir.

2.4.4.2. Fosfolipaz

Fosfolipazlar hücre membran yapısında bulunan gliserofosfolipitlerin ester bağlarını hidrolize ederek doku invazyonuna neden olarak, hücrenin yüzey özelliklerini değiştirerek enfeksiyonun başlangıcı olan adheransa olanak sağlar. Bunun yanında dokulara zarar verir, epitel hücre membranlarını yıkıma uğratar ve hiflerin sitoplazmaya penetre olmasına yol açar. Bütün fosfolipazlar substrat olarak fosfolipitleri kullanır ve her enzimin özgün ester bağına bağlanabilme özelliği bulunmaktadır. Fosfolipitler, hayvan, bitki ve bakterilerde hücre membranı ya da membrana bağlı veziküller gibi ana biyolojik komponentlerde bulunur. Doğada en çok bulunan fosfolipit, fosfotidilkolindir (lesitin) ve fosfolipaz A, B, C, D için substrattır. Fosfotidilkolin, membranları oluşturan yapısal bir molekül olup, hücre zarında sinyal transdüksiyonunda rol alır. Çeşitli fosfolipazların etkisiyle açığa çıkan diaçilgliserol (DAG), fosfotidik asit gibi reaksiyon ürünleri, diğer enzimleri aktive ederek hücre dışındaki bir sinyalin hücre metabolizmasına etki etmesini sağlar. Fosfolipazlar, fosfotidilkolin molekülünü hangi kimyasal bağından kestiğine bağlı olarak fosfolipaz A, B, C, D olarak adlandırılır (78,79).

Fosfolipaz enzimi virulans faktörü olarak *Candida* türleri dışında *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Rickettsia* spp gibi bazı bakteri ve *Toxoplasma gondii* ile *Entamoeba histolytica* gibi protozoan türlerinde de bulunmaktadır (79).

C. albicans suşlarında ekstrasellüler fosfolipazın salgılanması ilk defa Costa ve ark. tarafından yumurta sarısı veya lesitin içeren katı ortamda mayaların büyümesi ve substratların parçalanması ile ortaya çıkan lipidlerin incelenmesi ile rapor edilmiştir (80). Daha sonra serum ve koyun eritrositi içeren ortamlar kullanılarak çeşitli patojen *C. albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır (81). Elektron mikroskobu ile *C. albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesi maya hücrelerinin yüzeyinde ve hif hücrelerinin büyüme noktalarında yoğunlaştığı bulunmuştur (82). Daha sonra Pugh ve Cawson, fosfolipaz enzimini bir süre sitokimyasal yöntemler ile inceledikten sonra kandidal invazyonun yapısal detaylarını değerlendirmek ve fosfolipaz üretiminin yerini belirlemek amacı ile tavuk modelini kullanmış, membranda lokalize olan durgun fazdaki *C. albicans* blastosporları ile invazyonun başladığını ve blastosporlarda hücresel değişikliklerin stimüle olduğunu belirlemiştir. Büyüme bölgesinde yoğunlaşan fosfolipaz aktivitesi ile birlikte blastosporlar hif oluşumunu

başlatır. Konak hücre membranı ile direk temas kurduğu yerde bulunan hiflerde fosfolipaz aktivitesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Bu deney ile *C. albicans* suşlarının doku invazyonu için ekstrasellüler fosfolipazın önemi anlaşılmıştır (82,83).

C. albicans'ta fosfolipaz A (PLA), B (PLB), C (PLC), D (PLD), lisofosfolipaz ve lisofosfolipaz transaçılaz olmak üzere altı farklı fosfolipaz enzimi tanımlanmıştır (78).

2.4.4.2.1. Fosfolipaz A

Fosfolipaz A (PLA) enziminin varlığı ilk defa 1968 yılında Costa ve ark. tarafından kimyasal ve kromatografik yöntemler ile *C. albicans* türünde bulunmuştur (84). 1975 yılında ise *C. albicans* türlerinin genç ve yaşlı kültürlerinde ışık ve elektron mikroskobu ile fosfolipaz A enziminin lokalizasyonu tespit edilmiştir. Hızlı büyüyen kültürlerde tomurcuklanan bölgede yoğun, yaşlı kültürlerde ise hücrelerin periferinde lokalize olduğu ve ortama salgılandığı belirlenmiştir. Fosfolipaz enzimi birçok zehir ve toksinin ana bileşeni olup, *C. albicans* suşlarında bulunan fosfolipaz A enzimi, konak dokularında invazyona neden olarak kandidoz lezyonlarının oluşumundan sorumludur. Tomurcuklanma bölgesindeki PLA'nın rolü, hücre büyümesine katkı sağladığı, hücre ve hücre içi membranlarının hidrolizi ile çimlenme borusu oluşumunu desteklediği anlaşılmıştır (82).

Lezyonlar için oluşturulan civciv koryoallantoik zar modelinde *C. albicans* hif ve blastosporlarında enziminin lokalizasyonu bulunmuştur. Konak hücre membranının bütünlüğü bozulması ile blastosporlar epitel hücreye penetre olur ve hif oluşumuna geçer. Konak hücreye adhere olması ile başlayan hif oluşumunda enzim varlığı hif yapılarının apikal bölgesinde saptanmıştır (83).

1977 yılında radyometrik yöntemler ile fosfolipaz A ve lisofosfolipazın aktivitesi ölçülmüş, patojenite ve enzim aktivitesi arasında korelasyon görülmüştür. Yüksek fosfolipaz A aktivitesi gösteren *C. albicans* izolatlarının fare bukkal epitel hücrelerine güçlü şekilde adhere olduğu, düşük fosfolipaz A aktivitesine sahip olan suşların ise epitel hücrelerine adhere olamayıp farelerde ölüme neden olmadıkları belirlenmiştir (85,86).

Fosfolipaz A (PLA), gliserol molekülünün ester bağlarını hidrolize etme özelliğine göre fosfolipaz A1 (PLA1) ve fosfolipaz A2 (PLA2) olarak ayrılmaktadır. PLA1, gliserolün fonksiyonel grubundaki karbon atomunun 1. pozisyonunda yer alan yağ açıl ester bağlarını; PLA2, gliserolün fonksiyonel grubundaki karbon atomunun 2. pozisyonunda yer alan yağ açıl

ester bağlarını hidrolize eder. Bu molekülün hidrolize olması sonucunda serbest yağ asitlerinin, 2-açıl lizofosfolipit ve 1-açıl lizofosfolipitlerin birikimini sağlar. Yağ asitleri hala lizofosfolipitlere bağlı olduğu için lizofosfolipaz enzimi ile yağ asitleri serbest bırakılır. Yıkım sonucunda oluşan lizolesitin, birçok yılan ve arı zehrinin toksik bileşenidir. Bu bileşen eritrosit membranlarını hemolize ederek, hasara uğrattır. (86). *C. albicans*'ın kültüründe tomurcuklanma aşamasında aktive olur, kandidoz lezyonlarında konak hücre dokularına invazyonda rol alır. Bu enzim tomurcuklanma aşamasında konak hücrenin ve intrasellüler membranların fosfolipitlerini yıkarak çimlenme borusu oluşumu ve büyümede rol alır (87).

Fosfolipaz A enziminin intrasellüler aktivitesi, *C. albicans* türünün maya formlarında filamentöz formlarına göre daha fazla görülmektedir. Ekstrasellüler aktivitesi için ise her iki formda da belirgin bir fark gözlenmemiştir (87).

2.4.4.2.2. Fosfolipaz B

Fosfolipaz B (PLB), 1. ve 2. pozisyonundaki yağ asitlerinin her ikisini de serbest bırakmasından dolayı lizofosfolipaz (hidroliz) ve lizofosfolipaz-transaçilaz (LPTA) olarak da adlandırılmaktadır. Hidrolaz aktivitesi, fosfolipitlerden (PLB aktivitesi) ve lizofosfolipitlerden (lizofosfolipaz [Lyso-PL] aktivitesi) yağ asitlerinin serbest bırakılmasını sağlar. Transaçilaz aktivitesi ise serbest yağ asitlerinin lizofosfolipitlere transferini sağlayarak fosfolipit üretimini sağlar (4).

1985 yılında Banno ve ark. tarafından ilk defa *C. albicans* kültür filtratlarında fosfolipaz B (PLB) enziminin varlığı saptanmıştır. Kolon kromatografisi yöntemi ile yoğun kültür filtratlarında fosfolipaz enzimine ait üç farklı fraksiyon saptanmıştır. Bu fraksiyonların, substrat hidroliz yöntemi ile fosfolipaz B, lizofosfolipaz, lizofosfolipaz- transaçilaz oldukları açıklanmıştır (88).

Fosfolipaz B, patojen *C. albicans* suşlarından salgılanan ilk fosfolipazdır ve pH 4-5 gibi asidik ortamlarda aktivite göstermektedir (4). Fosfolipaz B sınıfının beş üyesi (*PLB1-5*) bulunmaktadır ve sadece bu enzim grubu ekstrasellüler özelliktedir. Bu özelliği sayesinde konak hücre membran bütünlüğünü bozarak adheransa olanak sağlar (2).

Fosfolipaz B1 geni ilk defa 1998 yılında Leidich ve ark. tarafından klonlanmıştır. Fosfolipaz B1, *caPLB1* geni tarafından kodlanmaktadır. Yapılan dizi analizi ile genin 6. kromozomda, 605 aminoasit pre-proteini oluşturan 1818 baz çiftine sahip olduğu

bulunmuştur. *C. albicans* fosfolipaz *B1* geni, patojen olmayan *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium notatum*, *Torulaspora delbrückii* ve *Schizosaccharomyces pombe* türlerinin fosfolipaz genleri ile dizi analizi yapılarak karşılaştırılmış ve sırası ile %45, %42, %48 ve %38 oranlarında homoloji gösterdikleri bulunmuştur. Bu türlerde protein büyüklükleri 612-664 aminoasit aralığında değişmektedir. Protein dizi analizi ile yukarıda bahsedilen fungal türlerin sahip olduğu PLB ile *C. albicans* türünün sahip olduğu PLB arasında belirgin bir fark bulunmuştur. *C. albicans* PLB geninde hidrofobik COOH- terminal bölgesi bulunmamaktadır. Bu bölge glikofosfotidilinositol (GPI) çapası ile ilişkili sinyalizasyonu sağlayan olası konsensus sekansını içermektedir. GPI çapasına sahip proteinler kısa süreli plazma membranına veya hücre duvarı bileşeni olan çözünmez glukanlara çapraz bağla bağlanabilirler. Bu nedenle plazma membranı ile ilgili proteinlerin salınımı için GPI-spesifik fosfolipazın aktif olması gerekmektedir. Kandidal PLB geni, GPI bağlanma bölgesi ve hidrofobik COOH-terminal bölgelerinin her ikisini de sahip değildir. Bu özelliği ile kandidal fosfolipazlar, GPI çapalarından kurtulmaktadır. Bu özellik *Candida* türlerinin karakteristik virulans özelliğidir (89). Genomik DNA dizisi ile amino ucundan yoksun olan olgun proteinde 17 aminoasit kalıntısı kodlandığı anlaşılmıştır ve olası sinyal dizisi olarak değerlendirilmiştir. Bu protein yedi adet N-glikolizasyon (Asn-X-Ser/Thr motifi) bölgesi içermektedir. Bu proteinin amino ucunda hidrofobik aminoasitlerin varlığı saptanmış ve bu segmentin protein sentezi için kılavuzluk yaptığı bildirilmiştir (90).

PLB1 geni, hif yapılarına göre maya ve yalancı hif hücrelerinde daha fazla eksprese olmaktadır. *C. albicans* suşlarının *caPLB1* geninde meydana gelen delesyon sonucunda endotel veya epitel hücrelerine adheransında, yabancı suşlara göre belirgin bir fark göstermediği fakat penetrasyon ve virulanslarında azalma olduğu bulunmuştur (89).

Kandidemi hastalarından izole edilen *C. albicans* suşlarının, oral mukoza suşlarına göre daha yüksek seviyelerde fosfolipaz aktivitesi gösterdiği bulunmuştur (4). Aynı çalışmanın devamında ise yeni doğan fare modelinde invaziv *C. albicans* suşlarının, invaziv olmayanlara göre daha fazla fosfolipaz enzim aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (4).

Yapılan çalışmalarda *caPLB1* delesyonunun olmasının fosfolipaz aktivitesinin %100 azalmasına neden olmadığı saptanmıştır. Bu bölgenin bir diğer gen olan lizofosfolipaz (Lyso-PL) enzimini de kodlaması nedeniyle fosfolipaz aktivitesi devam etmektedir (4).

Fosfolipaz *B2*, *caPLB2* geni tarafından kodlanmakta olup, bu gen ilk defa Sugiyama ve

ark. tarafından klonlanmıştır. *CaPLB2*, GPI bağlanma bölgesinin (karboksil terminal bölgesinde hidrofobik aminoasitler topluluğu) yokluğu ve N-terminal ucunda hidrofobik amino asitlerinin ve N-glikolizasyon bölgenin varlığı ile *caPLB1* genine benzerlik, %65 oranında da amino asit homolojisi göstermektedir. Bir adet okuma penceresine (ORF- open reading frame) sahip olup 608 aminoasitlik pre-proteini kodlamaktadır ve 67 kDa moleküler ağırlığındadır. Amino asit dizisi ile genin altı N-glikolizasyon bölgesi [Asn-X-(Ser/Thr) motifi] içerdiği anlaşılmıştır. *CaPLB2* geni, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbruckii*, *Penicillium notatum* *PLB* genleri ile sırası ile %42, %46, %42 oranında homoloji gösterir (91). Hidropati yöntemi ile olası proteinin N-terminal bölgesinde potansiyel sinyal dizisini kodlandığı anlaşılmıştır. Bu dizinin içeriği iki polar amino asiti (Gln-Ser) takip eden altı hidrofobik amino asit grubu bulunur. Bu dizi, proteinin sekresyonunda kılavuzluk görevi yapmaktadır (89).

2.4.4.2.3. Fosfolipaz C

Bu enzim, ilk defa 1968 yılında Costa ve ark. tarafından fosfolipaz A ile birlikte bulunmuştur (84). Hücre içi fosfolipaz C, sitozol ve mikrozom bölgesinde bulunur. Bu enzimin optimum pH'sı 7.5'tir (92).

Fosfolipaz C, fosfatidilkolini ve özgün grup olan fosfoinosititi parçalar. Bu tepkime ökaryot hücrelerin plazma membranlarındaki reseptörlerle ilişkili sinyal iletiminde çok önemlidir. Fosfoinositit temelli fosfolipaz C'nin aktivasyonu, hücre fonksiyonları için önemli olan Ca^{+2} iyonlarının bağırsaktan serbest bırakılmasını ve protein kinaz C'nin aktivasyonunu sağlayan 1,2- diaçilgliseridin açığa çıkmasına yol açar. Bu olay salgılama, hücre büyümesi ve üreme gibi hücresel aktiviteler için zorunlu bir eylemdir (78). Fosfolipaz C, maya ve hif formlarında bulunur ancak hif yapısında daha fazla saptanmıştır (93).

Memeli fosfoinositide özgü fosfolipaz C (PI-Plc) ailesi β , γ , δ , ϵ olmak üzere dört gruba ayrılan alt ailelerden oluşmaktadır ve yapısal olarak X ve Y domeynlerini içermektedir. Alt aileler arasındaki genel benzerlikler düşük olmasına rağmen her birinin enzim yapısı birinci aminoasitleri ve moleküler ağırlıklarının farkı ile ayırt edilmektedir. δ izoenzimler, en küçük ve en basit fosfoinositide özgü fosfolipaz C'lerdir (PI-Plc) ve bütün alt aile grupları için ortak olarak bulunur. Bu enzim, maya ve hiflerde, bitkilerden memelilere kadar bütün ökaryotlarda bulunur (93,94).

Saccharomyces cerevisiae türünde Pl-Plc enzimini kodlayan *PLC* geni ile *C. albicans* türünde kodladığı *PLC1* geni ortologtur. *C. albicans PLC* geni ilk olarak Bennett ve ark. tarafından identifiye edilmiştir. *PLC1*, *caPLC1* geni tarafından kodlanır. *CAPLC1*, *C. albicans* suşlarının maya ve hif formlarında gözüken klasik 18-19 aminoasitlik X katalitik domeynini içeren 2997 baz çiftine sahip moleküler ağırlığı 124.6 kDa olan 1099 aminoasitlik proteini kodlar. Aminoasit dizisi ile *C. albicans PLC1* geni ile *Saccharomyces cerevisiae* ve *Schizosaccharomyces pombe PLC* genleri %27 oranında homoloji göstermektedir. *C. albicans PLC1* tarafından kodlanan fosfolipaz C1 enzimi, δ izoenzim yapısındadır (93).

2.4.4.2.4. Fosfolipaz D

Fosfolipaz D (PLD) aktivitesi *C. albicans* suşlarında ilk defa 1997 yılında tanımlanmış olup, bu enzimin membranlarla ilişkili olduğu anlaşılmıştır. *Saccharomyces cerevisiae* suşlarında bu enzim hem çözünür hem de membranla ilişkili halde geniş moleküler ağırlığa sahip olarak belirlenmiştir. *C. albicans* suşlarında ise bu enzimin birden fazla formunun olduğu fakat tam olarak tanımlanamadığı bildirilmiştir (95).

Fosfolipaz D, lizofosfatidilkolini hidrolize ederek fosfatidik asit ve kolin üretimini sağlar. *PLD* geni hem memeli hem de funguslar tarafından kodlanmaktadır. Memelilerdeki fosfolipaz D'nin hücrelerarası sinyalleşmede anahtar enzim olduğu düşünülmüştür (96). *S. cerevisiae* için fosfolipaz D'nin mayozun gerçekleşebilmesi için zorunlu bir enzim olduğu bildirilmiştir. *C. albicans*'ta mayoz olayının gerçekleşmemesi sonucu diploid hücreler oluşmakta ve bu şekilde dimorfik dönüşüm regüle edilmektedir (95,97). Fosfolipaz D, dimorfik dönüşüm sırasında uyarılmaktadır. Bu durum mayadan hif formuna geçiş sırasında diğer virulans faktörlerin ekspresyonu için gereklidir (98).

Kanoh ve ark. kandida *PLD* genini klonlamak için insan *PLD1a* ve *SPO14* proteininde bulunan korunmuş aminoasit dizisine dayanarak iki oligonükleotit öncül ile PZT yöntemi kullanılarak *PLD* geni tam boyutunda klonlanmıştır. Klonlanan *PLD* geni, 1.710 aminoasit proteini kodlayan 196.4 kDa moleküler ağırlığında açık okuma penceresine sahiptir. Aminoasit dizisi ile dört korunmuş (I, II, III, IV) bölge bulunmuştur ve bu bölgeler bitki, maya ve insan fosfolipit D yapısında ortak olarak bulunur. Yapılan çalışmada, *C. albicans* *PLD* ve *SPO14* proteinin moleküler ağırlıkları ve aminoasit sayıları birbirine yakın ve iki protein arasındaki aminoasit homolojisinin %42 olduğu anlaşılmıştır. Dört korunmuş bölge arasındaki homoloji ise %65-71 arasında belirlenmiştir (99).

Farklı türler ile oluşturulan fosfolipaz D filogenetik ağaç üç farklı kümeye ayrılmaktadır. İlk kümede memeli fosfolipaz D1 (PLD1) ile bitki, nematod ve *Streptomyces* fosfolipaz D'leri; ikinci kümede memeli fosfolipaz D2 (PLD2) ve üçüncü kümede ise *C. albicans* PLD ve SPO14 proteinin bulunduğu fungal PLD yer almaktadır (99). Fungal fosfolipitler, insan ve diğer fosfolipit D proteinlerinden ayrı bir grupta bulunmakta olup, bu durum fungallere özgü enzim olabileceğini desteklemektedir.

2.4.4.2.5. Lizofosfolipaz

1975 yılında Pugh ve ark. tarafından *C. albicans* suşlarında intrasellüler fosfolipaz A enziminin lokalize olduğu yerin araştırılması sırasında ilk defa lizofosfolipaz tanımlanmıştır. Lizofosfolipaz, fosfolipaz A enziminin aktivitesi sonucu oluşan toksik lizolesitini, gliserolfosforilkolin ve yağ asitlerine yıkımını gerçekleştirir. Bu enzim mayalarda membranların yapımında ve tomurcuklama aşamasında üretilen lizolesitini etkisiz hale getirerek maya hücrelerini korur. Olgun maya hücreleri konak dokusuna saldırı sırasında yüksek fosfolipaz A enzim aktivitesinden korunmaktadır (82).

C. albicans blastosporlarında, lizofosfolipaz ve fosfolipaz A enzimi birlikte hücre periferinde bulunur ve bulundukları ortamın içine salgılanır. İki enzim de hızlı büyüyen kültürlerde tomurcuklanma oluşumunda etkilidir (83).

1985 yılında Banno ve ark. *C. albicans* izolatlarında fosfolipaz B, lizofosfolipaz, lizofosfolipaz-transaçilaz enzimlerini izole etmiştir. Bu enzimler maya formlarında, filamentöz formlarına göre yüksek aktivite göstermektedir. *C. albicans* türünde bulunan lizofosfolipaz intrasellüler ve ekstrasellüler olarak bulunmaktadır (88).

Lizofosfolipaz, hücre içinde farklı yerlerde lokalize olmaktadır. Sitozol, mikrozomlar ve en yüksek aktivitesini mitokondride göstermektedir (87).

2.4.4.2.6. Lizofosfolipaz-transaçilaz

C. albicans suşlarının hif ve daha fazla aktivite gösteren maya formlarında bulunur (88). Bu enzimin lizofosfolipaz-transaçilaz I (LPTA I) ve lizofosfolipaz-transaçilaz II (LPTA II) olmak üzere iki formu mevcuttur. Bu iki izoenzim moleküler ağırlıkları, aminoasit kompozisyonu ve enzimatik özellikleri bakımından farklılık göstermektedir. LPTA I, 81 kDA; LPTA II ise 41 kDA ağırlığındadır. LPTA I formunda hidrolaz ve transaçilaz aktivitesi, LPTA II formuna göre beş kat daha fazladır. *C. albicans* türünde lizofosfolipaz enzim aktivitesinin

tam olarak rolü bilinmemektedir. Memelilerde benzer enzim olan dipalmitoil fosfotidilkolin akciğer surfaktanı olarak sentezlenmektedir (100).

C. albicans suşlarında farklı bir lizofosfolipaz-transaçilaz olan h-LPTA tanımlanmıştır. Bu enzim ekstrasellüler olarak sentezlenmektedir. Kimyasal olarak glikopeptit yapıdadır. Moleküler ağırlığı 84 kDa olup, LPTA I formuna benzemektedir. Yüksek h-LPTA seviyeleri mayaların konak hücrelere adheransını arttırdığı düşünülmektedir (101).

Albicans dışı *Candida* türleri olan *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae* türlerinde de ekstrasellüler fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır (93). Salgılanan fosfolipaz enzim miktarı bu türlerde *C. albicans*'a kıyasla oldukça düşüktür. Yapılan bir çalışmada hastalardan izole edilen *C. albicans* suşlarında, *albicans* dışı *Candida* türlerine kıyasla daha fazla fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. Barrett-Bee ve ark.'nın farede oluşturdukları *C. albicans* enfeksiyonunda, yüksek fosfolipaz aktivitesi gösteren suşların bukkal epitel hücrelerine daha güçlü adhere olduğunu ve daha fazla patojenite gösterdiğini saptamıştır. *C. albicans*'ın daha az patojen suşları ile *C. parapsilosis* suşlarında, epitel hücrelerine adezyonun azaldığı ve daha düşük fosfolipaz aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir (86). Fosfolipaz enzimi *C. albicans*'ın virulansında oldukça önemli olup, fosfolipaz aktivitesi ile virulans arasında olumlu bir korelasyon bildirilmiştir (86).

2.4.4.3. Lipazlar

Bu enzimler, mono-, di-, triaçilgliserol molekülünün ester bağlarını hidroliz ederek katalizleyen ekstrasellüler proteinazdır. Lipaz enzim ailesinin Lip1-10 olmak üzere on üyesi bulunmaktadır (102). *C. albicans* dışında *albicans* dışı *Candida* türlerinden *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* suşlarının da lipaz aktivitesi bulunmaktadır (103). Lipaz genlerinin transkripsiyonu maya-hif dönüşümü esnasında olmaktadır (104).

2.4.5. Morfolojik Dönüşüm

Morfolojik dönüşüm, maya hücreleri ile filamentöz formlar arasında geçişi ifade etmekte olup, bu morfolojik değişim sırası ile maya (blastospor)-çimlenme borusu-yalancı hif-gerçek hif oluşumunu kapsamaktadır (105). Her iki form da enfeksiyon bölgesinde bulunabilir (106) ancak virulans için mutlaka filamentöz yapılarının olması gerekmektedir.

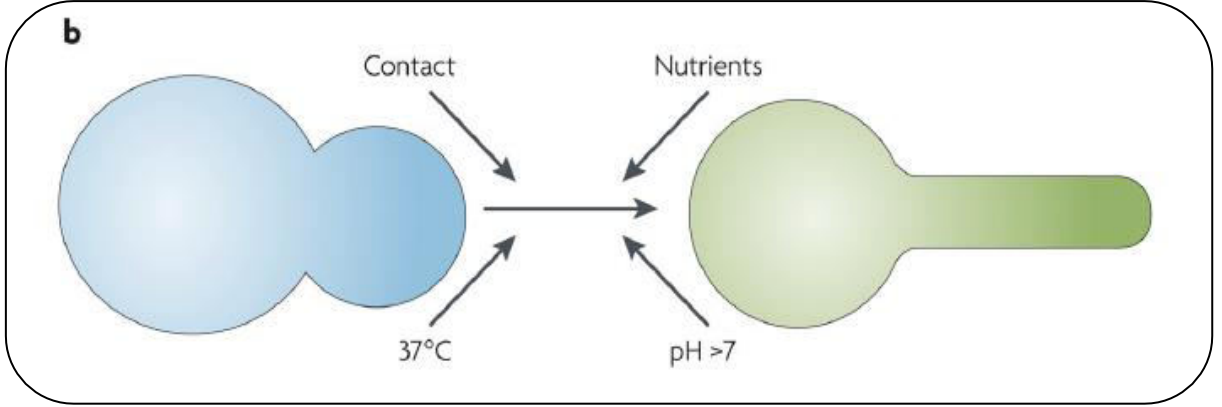
C. albicans'ın bulunduğu çevresel şartlar hücrenin morfolojisini değiştirmektedir. *C. albicans* düşük pH (<6) durumunda maya formunda iken, yüksek pH'da (>6) hif formundadır.

C. albicans, 37°C, nötral pH ve serum ortamında filamentöz formdadır. Serum ortamı dışında N-asetilglukoz, amino asitler, biotin, sülfidril bileşenleri, hem grupları ve çinko çimlenme borusu oluşumu için gereklidir (105). Çimlenme borusunun memeli hücrelerine adheransı maya hücrelerine kıyasla daha fazladır (12,107). Makrofajlar tarafından yakalanan maya hücreleri, hif yapılarının üretimini arttırır ve makrofajları lizise uğratar. Hif formları, konak savunma mekanizmasına karşı koruyucu görevde bulunmaktadır. Bu formların maya formlarına göre daha invaziv olduğu anlaşılmıştır (12,108). Hif oluşumu, virulans faktörlerini kodlayan gen ailelerinin ekspresyonu ile ilişkilidir. “Hyphal wall protein” (Hwp1p), agglutinin like sequence protein (Als)3, salgısal aspartik proteinaz Sap4-6, Ece1 ve Hyr1 proteinlerinin hif oluşumunu destekledikleri bildirilmiştir. Hife özgün G1 siklinle ilişkili proteini kodlayan *HCG1* geninde meydana gelen mutasyon sonucunda maya formlarında büyüme gözlemlenirken, hif oluşumu başarısızdır. Farede oluşturulan sistemik enfeksiyon modelinde homozigot *hgc1* mutantlarında *HWPI*, *ECE1*, *HYR1* ve *ALS3* ekspresyonu devam etmekte fakat zayıf virulans özelliği göstermektedir. Bu durum hif formunun güçlü virulans sağladığını göstermektedir (109,110).

C. albicans morfogenezi esnasında eksprese edilen *PHR1* ve *ECE1* genleri üzerinde çalışmalar yapılmış ve *PHR1* geninin, GPI bağlantılı hücre yüzey glikoproteini kodladığı ve büyüme ortamının pH'ına bağlı olarak belirtildiği saptanmıştır. *PHR1* geninde meydana gelen mutasyona bağlı olarak morfogenezin pH'ya bağlı dönüşümünde farklı etkiler ortaya çıkmaktadır. *C. albicans*'ın tomurcuklanan maya hücrelerinde *ECE1* geninin ekspresyonu gözlemlenmez iken, hif oluşumu için uygun koşullar oluştuktan 30 dakika sonra bu genin ekspresyonu gözlenmiştir (43). Yapılan bir çalışmada ise *ECE1* mutantlarında morfolojik dönüşümün gerçekleşmediği belirtilmiştir (111).

Morfogenez, mikrobiyal topluluk oluşumunu sağlayan çoğunluğu algılama (“quorum sensing”) mekanizması ile regüle edilebilmektedir. *C. albicans*'ta çoğunluğu algılama molekülleri olan farnesol, tirozol, dodekanol hücre yoğunluğuna göre topluluktan *C. albicans* hücrelerinin ayrılmasını düzenleyen moleküllerdir. *C. albicans* hücre yoğunluğu $>10^7$ hücre/ml⁻¹ ise çoğunluğu algılama molekülleri ile maya hücrelerinin, $<10^7$ hücre ml⁻¹ ise biyofilmde hif formlarının bulunmasını sağlar (112,113).

Candida türlerinden sadece *C. albicans* ve *C. dubliniensis* polimorfik özellik göstermektedir (12).



Şekil 5. *C. albicans* türünde maya-hif dönüşümü (50)

2.4.6. Fenotipik Değişim

Yapılan bir çalışmada düşük doz ultraviyole ışığına maruz bırakılan *C. albicans* kolonilerinin yüksek sıklıkta pürüzlü şekilde olduğu gözlenmiştir. Bu dönüşümün orijinal düz, pürüzsüz koloni tipine dönüşümü 0,0009 oranında olmaktadır (114). Her 10^{-10} kolonide bir koloni morfolojisinin değiştiği bildirilmiştir (115). Buna göre koloni tipinde fenotipik değişim geri dönüşümlü ve yüksek frekansta olmaktadır (114).

Farklı bir çalışmada 3153A suşunda yıldız, düzgün, tüylü, düzensiz, halka, şapka şeklinde, noktalı olmak üzere farklı koloni tipleri tanımlanmıştır. Bu koloni tipleri yüksek frekansta diğer koloni morfolojisine geçiş göstermektedir (116).

Fenotipik dönüşüm sırasında gözlenen koloni morfolojileri tanımlandıktan sonra beyaz-opak (“white-opaque”) (WO1) suşunda koloni geçişi gösterilmiştir. Düz, pürüzsüz olan beyaz koloniler, yassı gri opak kolonilere dönüş yapabilmektedir. Beyaz koloniyi oluşturan hücreler düzgün ve yuvarlak, opak koloniyi oluşturan hücreler ise uzun ve fasülye şeklindedir. Opak koloniyi oluşturan hücrelerin yüzeyinde çıkıntılar bulunmaktadır. Beyaz hücreler 37°C ve $\text{pH}=6.7$ ’de çimlenme borusu oluştururken, opak hücreler oluşturamaz (116,117).

Beyaz-opak koloni dönüşümünde, opak hücreler tarafından opak faz spesifik genlerden *OPA1* geni ile birlikte *SAP3* geni eksprese edilmektedir. Beyaz koloniler tarafından da *SAP2* geni eksprese edilmektedir. Sap1 ve Sap3 proteinine sahip opak hücrelerin, Sap2 proteinini üreten beyaz hücrelere göre daha virulan olduğu belirtilmiştir (118,119).

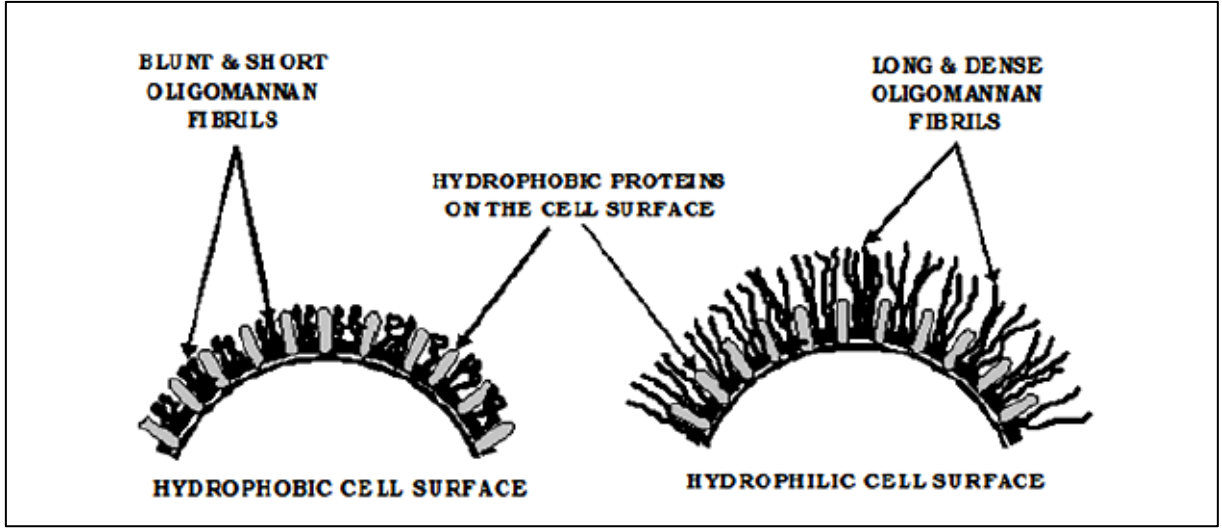
Sistemik kandidozlu hastaların vajinasından izole edilen *C. albicans* suşlarında fenotipik dönüşümün yüksek oranda olduğu saptanmıştır (120). Opak hücrelerin, kutanöz enfeksiyonda beyaz hücrelere göre deriye daha iyi kolonize olduğu gösterilmiş fakat sistemik hayvan modellerinde daha az virulan etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır (121). *C. albicans* tarafından eksprese edilen faz özgün genlerin anatomik bölgelere adaptasyonda önemli olduğu belirlenmiştir (43).

2.4.7. Hücre Yüzey Hidrofobisitesi (HYH)- Hidrofobik ve Hidrofilik Hücrelerin Yapısı

Hücre yüzey hidrofobisitesi (HYH) *C. albicans* virulansının başlamasında önemli bir faktördür. HYH; konak dokusuna ve/veya tıbbi araçlara özgün olmayan bağlanma ile adezyonu başlatır ve çimlenme borusu oluşumunu tetikler. Hücrelerin kolonize olması ile biyofilm şekillenmeye başlar ve nötrofil aracılı öldürme işleminden kaçarak konak savunma mekanizmasından korunurlar (122,123,124,125). Özgün olmayan adezyon, patojenlerin en çok kullandığı adezyon yoludur. Fiziksel kuvveti içermekte olup, elektrostatik etkileşimler, van der waals bağları ve hidrofobik etkileşimleri kapsamaktadır (126,127).

C. albicans hücreleri bulunduğu ortama göre hidrofilik ya da hidrofobik olabilir. Biyokimyasal özellikleri aynı olmasına rağmen, hücre duvar yapıları farklıdır (128). *C. albicans* hücre duvarı %80-90 polisakkarit (β -glukan, kitin, glikoprotein), %5-15 protein ve %1-7 lipitlerden oluşmaktadır. *C. albicans* hücre duvarından hidrofobik proteinler olan hidrofobinler salgılanmaktadır. Bunlar; β -glukan enzimleri, laminin bağlayıcı protein, Csh1p proteini, alkol dehidrogenaz, lizofosfolipaz, fibrinojen bağlayıcı proteinler hücre duvarı proteinleri olarak belirlenmiştir (129,130,131,132).

C. albicans hücre yüzeyinin, hidrofilik hücrenin duvar yapısında uzun, yoğun şekilde paketlenmiş ve eşit aralıklarda yerleşmiş fibrillere sahip olduğu anlaşılmıştır. Hidrofobik hücre yüzeyinde ise kısa, eşit aralıklı ve kör fibriller bulunmaktadır (128). Hidrofilik ve hidrofobik hücre yüzeyinde bulunan hidrofobik proteinlerde bu iki türü belirleyecek özgün bir fark bulunmamıştır. Tek fark hidrofobik davranışa katkıda bulunan proteinlerin, hidrofilik hücrelerde yüzeye kolayca ortaya çıkmamasıdır. Bu durum, hidrofilik hücrelerin yüzeyinde hidrofobik proteinleri maskeleyen yüksek molekül ağırlıklı mannoprotein fibrillerinin ve mannoz-glikoprotein yapılarının olmasından kaynaklanmaktadır. Hidrofilik hücre yüzeyi dışındaki fibriller mannoprotein tabakalarının kaybı veya zayıflaması sonucunda hücre yüzeyinde hidrofobik proteinler açığa çıkar (131).



Şekil 6. Hidrofobik ve hidrofilik hücre yüzey yapıları (125)

Hidrofobik hücreler, polimorfonükleer nötrofiller (PMN) tarafından hidrofilik hücrelerden daha hızlı alınır. Bununla birlikte bu alınmış hücrelerin çimlenme borusu formuna geçmesi, PMN'ler tarafından öldürülmeyi önler (133).

Yüzey hidrofobikliği gösteren organizmaların, sıkı beslenme koşullarına daha fazla adapte olabileceği bulunmuştur. Bunun nedeni, artmış HYH'nin hidrokarbon agregatlarını veya çözünmeyen bileşikler eritmeye yardımcı olan bir biyo-yüzey aktif madde olarak işlev görmesindendir (134).

C. albicans'ın konak dokusuna ya da implantlara özgün olmayan adezyonu, hidrofobik ya da hidrofilik etkileşimlerde önemlidir (135). Hidrofobik hücreler su moleküllerinin hidrofobik etkileşimlerinden dolayı su veya sulu ortamlardan dışlanır (134). Hidrofobik mikroorganizmalar bu nedenle sıvı-katı arayüze yakın kalma eğilimindedirler. Hidrofobik hücreler katı yüzeyler ile kolayca etkileşime girebilme eğiliminde iken, hidrofilik hücreler sulu ortamda dağılım gösterme eğilimindedirler (136).

C. albicans hücre yüzeyi hidrofobisitesi ile ilişkili majör protein Csh1p olup *CSH1* geni tarafından kodlanmaktadır (123). *C. albicans*'ta tanımlanan Csh1p proteininin, konak hücrenin epitel hücrelerine, endotel hücrelerine, fibronektin ve diğer ekstrasellüler matriks

proteinlerine adezyonunda rolü bulunmuştur ve adezyon ile aralarında pozitif korelasyon saptanmıştır (132).

HYH, *C. albicans*'ın büyüme aşamasına göre de değişir. Logaritmik fazda, Csh1p ekspresyonu daha yüksektir, durağan fazda ise bu miktar azalır (137). Maya hücresi, yalancı hif ve gerçek hif gibi morfolojik formlar HYH durumunda değişiklik gösterir. HYH, çimlenme borusu oluşumu sırasında da rol oynamaktadır (123). *C. albicans*'ın çimlenme borusu, ana maya hücresinin yapısından bağımsız olarak yüksek oranda hidrofobiktir (138). Hidrofilik hücrelerin indüklemeye koşulları altında 37°C'de büyüdüklerinde hidrofobikliklerinin çimlenme borusu oluşumundan önce arttığı bulunmuştur. Çimlenme borusu aynı çevresel koşullarda tutulan ana maya hücrelerinden daha hidrofobik olma eğilimindedir (139). Farelerde yapılan çalışmalarda hidrofobik hücrelerin, hidrofilik hücrelere kıyasla daha virulan olduğu anlaşılmıştır (123).

2.4.8. Sideroforlar

Demir, çoğu yaşam formları için gerekli olan, Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyon formlarında bulunan bir elementtir. Bu element oksidasyon-redüksiyon enzimleri için bir kofaktör görevi yapmaktadır. Demir, aerobik ortamlarda çözünmez formda bulunmaktadır ve serbest radikallerin üretimini katalizlediği için toksiktir. Funguslar bu durumu sideroforları aracılığıyla çözmeyi başarmışlardır. Özellikle *C. albicans* türü şiddetli demir stresinin olduğu durumlarda düşük moleküler ağırlıklı sideroforlar olarak bilinen ferrik iyon şelatörlerini üretir ki bunlar hidroksamat olarak bilinirler. Bu bileşikler ferrik demiri çözüp mikrobiyal hücrelere taşınmasını sağlar (140,141,142,143).

2.5. *Candida* Türlerinin Neden Olduğu Enfeksiyonlar

Candida türleri, oral kavite, gastrointestinal sistem, vajina ve derinin normal florasında bulunur. Enfeksiyonlar yüzeysel (kutanöz veya mukozal), sistemik kandidoz ve kronik mukokutanöz kandidoz olarak sınıflandırılmaktadır (144).

2.5.1. Yüzeysel Kandidoz (Kutanöz ve Mukozal Kandidoz)

Yüzeysel kandidoz, lokal olarak *Candida* sayısının artması, deri ve epiteldeki hasarın maya ve yalancı hiflerin lokal invazyonuna izin vermesi ile oluşur.

Kutanöz kandidoz, genellikle kasık, karın deri kıvrımları, göğüs altı derisi, parmaklar ve ayak parmak aralarında görülür. Tipik olarak döküntülü, kuru, pullu, sızıntılı, kırmızı renkte tabakalar veya püstüller halinde görülür. Travma, radyasyona bağlı mukozit, ülserasyonlar gibi faktörler *Candida* türlerinin adheransını artırır ve kişi enfeksiyona yatkın hale gelir (144).

Mukozal kandidoz, oral, gastrointestinal ve vajinal mukozayı kapsayan yüzeysel kandidoz formudur. Bazı hastalıklar ve risk faktörleri oral kandidozu (OK) tetiklemekte olup, hematolojik maligniteler, kontrolsüz diyabet, kserostomi, HIV gibi immün yetersizlik durumlarında OK gelişimi ile kolaylaşır. Steroid ve antibiyotik tedavisi, baş ve boyun radyasyon terapisi, nötropeniye tetikleyen kemoterapi ve takma diş kullanımı OK'nın ortaya çıkması için risk faktörleridir. HIV ile enfekte bireylerin %90'ından fazlasında ve diyabetiklerde risk faktörleri olmaksızın OK'nın gelişimi artmaktadır. Yaşlılarda kserostomi, takma diş ve steroidlerin kullanımından dolayı OK sıklıkla görülmektedir (145,146,147,148,149). Oral lezyonlardan sıklıkla *C. albicans* izole edilir, bunu *C. glabrata* ve *C. tropicalis* takip eder. *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* nadiren saptanır (149). OK'da mayaların kontrolü, konak T hücre özellikle CD4⁺ fagositik yanıtının oluşması ile sağlanır. AIDS hastalarında CD4⁺ T lenfosit düzeyinin düşük olmasından dolayı OK'nın engellenmesi gerçekleşmemektedir (150). *Candida* türlerinin virulans faktörleri ile mukozal hastalıklar arasında bir ilişki olduğu, mukozaya adherans, hif şeklinde büyüme, biyofilm oluşumu, hidrolitik enzimlerin salınımının enfeksiyon oluşumunu arttırdığı saptanmıştır (151). *C. albicans*'ın, *albicans* dışı *Candida*'lara göre mukozal yüzeylere adheransının daha fazla olduğu ve bu durumun patojeniteyi arttırdığı bilinmektedir (151).

Mukozal enfeksiyonlardan biri olan özofajeyal kandidoz (ÖK), OK'ya göre daha az sıklıkta izlenmektedir. HIV'li bireylerde ÖK oluşumunda artış olduğu gözlenmiştir (152).

Vajinal kandidoz, *Candida*'ların neden olduğu dünyada ikinci en sık rastlanan vajinal enfeksiyondur. Kadınların %75'inin ergenlik dönemlerinde bir kere vulvovajinal kandidoz (VVK) izlenmiş olup, hastaların %40-50'si ikinci atağı da geçirirler. Ergenlik dönemdeki sağlıklı kadınların %10-20'sinde asemptomatik olarak genital bölgelerinden *Candida* soyutlanmaktadır (153). *Candida*'ların perianal bölgeden kontaminasyonu olduktan sonra vajina epiteline adheransı gerçekleşir. *C. albicans*'ın vajinal epitel hücrelerine adheransı,

albicans dışı *Candida*'lara göre daha fazladır. Hamilelik, yüksek östrojen içerikli doğum kontrol hapları, kontrolsüz diyabet, kortikosteroid, antibiyotik kullanımı, intrauterin araçlar ve çok sık cinsel birliktelik asemptomatik vajinal *Candida* kolonizasyonunu ve *Candida* vajinitini arttırmaktadır (154). Sistemik veya intravajinal antibiyotik kullanımı da semptomatik VVK artmasına neden olmaktadır. *Lactobacillus* türlerinin varlığı, vajinada potansiyel patojen *Candida*'ların çoğalmasını önleyen, baskılayan doğal koruma mekanizmasıdır. Antibiyotik kullanımı bu bakterilerin elimine olmasına neden olmaktadır (155,156). VVK'nın klinik tablosu ağrı, kaşıntı, vulvar yanma, dizüri ve "süt kesiği" olarak adlandırılan vajinal akıntı ile birlikte seyreder (157).

2.5.2. Sistemik Kandidoz

Kandidemi, *Candida* türlerinin kan dolaşımına girmesi ile konak fagositik savunmasının üreme ve yayılmayı engellemedeki yetersizliği ile gelişir. Dolaşan *Candida* türleri böbrekleri, protez kalp kapaklarını tutabilir veya vücudun herhangi bir yerinde enfeksiyon oluşturabilir.

Yoğun bakım ünitelerinde girişimsel işlemlerin yapılması, immünsupresif ilaçların kullanılması, nötropeni, geniş spektrumlu antibiyotikler, santral venöz kateterler, total parenteral beslenme, gastrointestinal ameliyatlar, hemodiyaliz, yanık yaralanmaları, böbrek nakli gibi durumlar kandidemi için risk faktörlerini oluşturmaktadır (158).

Sağlıklı bireyler enfeksiyonlara karşı nötrofilleri aracılığı ile direnç gösterirler. İmmünsupresif tedavi gören veya maligniteli bireylerde nötrofillerin düşük olmasından dolayı kandidemi gelişmektedir (159).

Gelişmiş ülkelerde kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan patojenler, *Staphylococcus aureus*, koagülaz negatif stafilokok, *Enterokok* ve *Candida* türleridir. Avrupa ülkelerinde invaziv kandidemi enfeksiyonlarında en çok soyutlanan tür *C. albicans* olmakla beraber *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* %14, *C. tropicalis* %7, *C. krusei* %2 oranları ile saptanan türler arasındadır. Dünya genelinde 2009 yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) yapılan bir çalışmada enfeksiyonların %18'inde etkenin *Candida* türleri olduğu bildirilmiş olup, bu enfeksiyonların %50'sinin kandidemiye neden olduğu anlaşılmıştır (160,161,162).

2.5.3.Kronik Mukokutanöz Kandidoz

Kronik mukokutanöz kandidoz (KMK) deri, mukoz membran veya tırnakların *Candida* türleri özellikle *C. albicans* ile kronik ve tedaviye dirençli enfeksiyonları ile karakterize, nadir görülen bir hastalıktır. Mantar enfeksiyonları genellikle sistemik ve yayılımcı bir özellik göstermez. Etiyopatogenezi tam olarak bilinmeyen bu hastalıkta kandidaya karşı antikor yanıtları normal iken, hücresel immünitelerinde selektif bir bozukluk, T lenfositlerin *Candida* türlerine karşı yanıtlarında bir yetersizlik söz konusudur. Hastalarda sürekli mukokutanöz *Candida* lezyonları, tırnak tutulumu ve vajinit gözlemlenebilir. Bu lezyonlar hızlıca granülomatoz hale geçer (163,164).

2.6. *Candida* Enfeksiyonlarının Laboratuvar Tanısı

Candida türlerinin neden olduğu ciddi enfeksiyonlarda hızlı tanı identifikasyon ile uygun antifungal tedaviye başlanması önemlidir.

Fungal enfeksiyonların tanımlanabilmesi için örneklerin enfeksiyon bölgesine uygun yerden alınması gerekir. Örnekler kan, serum, beyin omurilik sıvısı (BOS), idrar, vajinal-üretral salgılar, balgam, bronkoalveolar lavaj (BAL), aspirat, doku biyopsileri, yüzeysel lezyonlardan sürüntü ve kazıntı olarak sıralanabilir (Tablo 2) (165).

Bu örnekler, direk mikroskopi, kültür, antijen, hücre duvarı komponentleri ve fungal metabolitlerin belirlendiği serolojik testler ve nükleik asit testleri ile *Candida* varlığı açısından incelenmektedir (166).

Tablo 2. *Candida* enfeksiyonları için örnek alınacak vücut bölgeleri, örneklerin toplanması ve tanı yöntemleri

Enfeksiyon Bölgesi	Örnek	Örnek Alma Yöntemi	Tanı
Kan			
	Kan	İntravenöz kan alınması (steril)	Kültür, buyyon, lizis-santrifügasyon, nükleik asit amplifikasyonu
	Serum	İntravenöz kan alınması (steril)	Antijen, nükleik asit amplifikasyonu, β -D-glukan
Merkezi Sinir Sistemi			
	Beyin omurilik sıvısı	Lomber ponksiyon (steril)	Mikroskopik inceleme, kültür
	Biyopsi	Steril, steril olmayan histopatolojik örnek	Mikroskopik inceleme, kültür (doku ezilmemeli)
Kemik ve Eklem Dokusu			
	Aspirat	Steril	Mikroskopik inceleme, kültür
	Biyopsi	Steril, steril olmayan histopatolojik örnek	Mikroskopik inceleme, kültür (doku ezilmemeli)
	Serum	İntravenöz kan alınması	Seroloji, antijen, antikor
Göz			
	Kornea	Kazıntı veya biyopsi	Mikroskopik inceleme, kültür
	Vitöz sıvı	Steril aspirat	Mikroskopik inceleme, kültür
Ürogenital Sistem			
	İdrar	Steril	Mikroskopik inceleme, kültür
	Vajinal, üretral, prostatik salgılar	Sürüntü	Mikroskopik inceleme, yaş preparat, kalkoflor beyazı/KOH, kültür
	Serum	İntravenöz kan alınması	Seroloji (antikor)
	Biyopsi	Steril, steril olmayan histopatolojik örnek	Mikroskopik inceleme, kültür (doku ezilmemeli)

<i>Solunum Yolları</i>			
	Balgam*	Direk alınan örnek	Mikroskopik inceleme, kültür, nükleik asit amplifikasyonu
	Lavaj	Direk alınan örnek	Mikroskopik inceleme, kültür, β -D-glukan, nükleik asit amplifikasyonu
	Transbronşiyal	Aspirat ya da biyopsi	Mikroskopik inceleme, kültür
	Açık akciğer biyopsisi	Steril, steril olmayan histopatolojik örnek	Mikroskopik inceleme, kültür (doku ezilmemeli)
	Serum	İntravenöz kan alınması	Seroloji, antijen, antikor, nükleik asit amplifikasyonu, β -D-glukan
<i>Deri ve Mukoz Membran</i>			
	Biyopsi	Steril, steril olmayan histopatolojik örnek	Mikroskopik inceleme, kültür (doku ezilmemeli)
	Mukozal	Sürüntü	Mikroskopik inceleme, yaş preparat, kalkoflor beyazı/KOH, kültür
	Deri kazıntısı	Steril değil	Kalkoflor beyazı/KOH
	Serum	İntravenöz kan alınması	Seroloji, antijen, antikor, nükleik asit amplifikasyonu
<i>Çoklu Sistemik Bölgeler</i>			
	Kan	İntravenöz kan alınması	Kültür, buyyon, lizis-santrifügasyon, nükleik asit amplifikasyonu
	Serum	İntravenöz kan alınması	Seroloji, antijen, antikor, nükleik asit amplifikasyonu, β -D-glukan
	Biyopsi	Steril, steril olmayan histopatolojik örnek	Mikroskopik inceleme, kültür (doku ezilmemeli)

**Candida* türleri normal ağız florasında bulunduğu için balgam kültürünün hiçbir değeri yoktur.

2.6.1. Direk Bakı

Laboratuvara gelen örneklere ilk olarak direk bakı yapılır. Mikroskopta incelemek üzere örneğin türüne göre; boyasız yaş, %10'luk potasyum hidroksit (KOH) preparatları ile Gram boyama, kalkoflor beyazı, Giemsa, hematoksilen eozin (H&E), Gomori metenamin gümüş (GMS) ve periyodik asit-Schiff (PAS) boyaları seçilip kullanılır (165).

Deriden alınan kazıntı örnekleri %10 KOH solüsyonu veya Kalkoflor beyazı ile incelenerek, lezyonlu bölgede maya ve yalancı hiflerin varlığına bakılır (167).

Deri kazıntı örnekleri dışındaki örneklerin direk bakısı amacıyla Gram boyama yapılır. Örneklerde *Candida* türlerine ait maya hücrelerinin ve özellikle muköz membran örneklerinde maya hücreleri ile birlikte yalancı hif, hif yapılarının görülmesi tanı açısından önemlidir (165).

H&E, GMS, PAS boyaları sitoloji ve histopatoloji laboratuvarlarında sitolojik preparatlarda, aspiratlarda, doku örneklerinde, vücut sıvılarında ve eksudalarda *Candida* türlerinin görülmesi amacıyla kullanılır. Mantarların saptanmasında GMS ve PAS boyaları, H&E boyasına göre daha özgündür. (165). H&E boyamada kırmızı zeminde fungal sitoplazma pembe, nukleus mor renkte gözükür. GMS boyamada soluk yeşil veya sarı zeminde fungal yapılar siyah renkte gözlemlenir. PAS boyamada fungal yapılar, pikrik asit karşıt boya olarak kullanıldığında turuncu zeminde parlak kıvılcımsı mor renkte; karşıt boya açık yeşil kullanıldığında yeşil zeminde mor renkte gözükür.

Fungal örneklerin direk mikroskop ile incelenmesi pratik olmasına rağmen yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuç verebilir. Mikroskop, kültüre göre daha düşük duyarlılıkta olmasına rağmen negatif sonuç vermesi, fungal enfeksiyonun olmadığı anlamına gelmeyebilir. Bu nedenle her direk bakı kültür ile doğrulanmalıdır (165).

2.6.2. Kültür

Etiyolojik ajanı belirlemek için kültür altın standarttır. *Candida* türlerinin izolasyonunda primer besiyeri olarak Sabouraud dekstroz agar (SDA) kullanılmaktadır. Yavaş büyüyen türler için zenginleştirilmiş besiyerleri olan beyin kalp infüzyon (BHI) agar ya da Sabouraud beyin kalp infüzyon (SABHI) agar kullanılmaktadır. Besiyerinde hızlı büyüyecek kontaminant maya veya küfleri inhibe etmek için ortama sikloheksimit eklenebilir ancak bu madde fırsatçı patojen olan *Candida* türlerinin üremesini engelleyebilir. Bu nedenle

sikloheksimit içermeyen primer besiyerine de eş zamanlı ekimin yapılması uygun olur. Ayrıca besiyerine kloromfenikol, gentamisin, siprofloksasin, penisilin, streptomisin eklenerek ortamın bakteriler tarafından kontaminasyonu engellenebilir (165,167).

Çoğu *Candida* türü aerop koşullarda, 25-30°C’de iyi üreme gösterir, bazıları ise 37°C ve üzeri sıcaklıklarda da üreyebilir. *Candida* kolonileri 24-72 saatte beyaz, krem, sarı renklerde; krema, membranöz, kıvrımlı morfolojide izlenebilir. SDA’ya ekimi yapılan *C. albicans*’ın oluşan ilk kolonileri buruşuk, kıvrık morfolojiye sahip iken pasajlama işlemleri ile koloniler pürüzsüz görünüme dönüşebilmektedir. Çoğu *C. albicans* suşu kanlı agarda “ayaklı koloniler” oluşturmaktadır. Diğer maya gruplarında bu koloniler gözlenmez iken sadece *C. tropicalis* ve *C. krusei* izolatlarının %25’inde bu tip koloni oluşumları belirlenmiştir (168).

Üreyen *Candida* kolonilerinin identifikasyon işleminde yaş preparat, çimlenme borusu testi, mısır unu tween 80 agardaki morfoloji, karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon gibi geleneksel yöntemler, enzimatik ve florojenik hızlı testler, kromojenik besiyerleri kullanımı, ticari karbonhidrat asilimilasyon temelli otomatik sistemler ile moleküler yöntemler kullanılmaktadır (165).

Çimlenme borusu testi *C. albicans*’ın diğer *Candida* türlerinden ayrılmasında hızlı, basit ve güvenilir bir yöntemdir. Çimlenme borusu testi serumda, 37°C’de ve nötral pH’da yapılmaktadır. Hif yapılarının kümelenmesini önlemek ve yanlış pozitif sonuç verilmesini önlemek için 2-3 saat içerisinde değerlendirilmelidir. Çimlenme borusu septasız, çıktığı hücre ile bağlantı noktasında bir daralma olmaması ile karakterize edilir. Ayrıca çıktığı hücrenin kalınlığının 1/3’ü, boyunun ise en az 3 katı olmalıdır (169,170).

Çimlenme borusunun oluşumunu sıcaklık, inokulum konsantrasyonu, besiyeri bileşenleri, *Candida* türleri ve suşları, bakteriyel kontaminasyon etkilemektedir. Fazla maya inokulasyonu ve bakterilerin varlığı yanlış negatif sonuç oluşmasına neden olabilir. *C. albicans*’ın çimlenme borusu oluşumu için en iyi ortamın insan serumu olduğu bildirilmiştir. Hayvan serumları, RPMI ile kıyaslandığında insan serumu için duyarlılığın %98, özgüllüğün ise %100 olduğu belirtilmiştir (170).

C. dubliniensis türünde de çimlenme borusu oluşumu söz konusudur fakat çoğu izolatlar ticari besiyerlerinde oluşturmazlar.

Serum içerisindeki *C. tropicalis* suşlarında, *C. albicans* hücreleri tarafından oluşturulan çimlenme borusuna benzer hif benzeri oluşumlar gözlenir. Gerçek çimlenme borusu, kısa ve blastospor ile çimlenme borusunun deydiği noktada daralma olmaması ile belirlenir. *C. tropicalis* türünde ise oluşan hif benzeri yapılar uzun ve büyük bir blastokonidyaya sahiptir, hif uzantısı ile blastokonidya arasında bir daralma oluşumu söz konusudur. Bu oluşum gerçek çimlenme borusu olarak değerlendirilmez (4).

İleri identifikasyon için kolonilerden mısır unlu tween 80 agara lam kültürü yapılır ve 35°C’de 48-72 saat inkübasyona bırakılır. Klamidor oluşumu ve konumu, blastosporların konumu, yalancı ve gerçek hif oluşumu gibi morfolojik özellikler *Candida* türlerinin ayrımını sağlamaktadır. Özellikle klamidosporun pozisyonu, gerçek hif ve yalancı hif üreten *C. albicans* ile *C. dubliniensis* suşları arasında ayrımı kolaylaştırmaktadır. *C. albicans* suşlarında; hiflerin veya yalancı hiflerin terminalinde, kısa yan dalların ucunda büyük, kalın duvarlı, tek klamidospor oluşumu ve yalancı hiflerin boğumlarında küme halinde blastokonidyalarda bulunmaktadır. *C. dubliniensis* suşlarında ise; yalancı ve gerçek hif, klamidosporlar birden fazla, büyük ve kalın duvarlı, septalarda kümeler halinde blastokonidyalarda görülür (170).

C. albicans ile *C. dubliniensis* suşlarının ayrımında farklı sıcaklık değerleri uygulanması basit ve ucuz bir yöntemdir. Primer besiyerine ekimi gerçekleştirilen suşlar 42°C ve 45°C’lerde inkübasyona bırakılır. *C. dubliniensis* suşlarında çok zayıf üreme veya hiç üreme gözlenmezken, *C. albicans* suşlarında iyi üreme gözlenmektedir (170).

Candida türlerinin izolasyonu ve identifikasyonu için kromojenik substratlar içeren kromojenik besiyerleri kullanılmaktadır. B-N-asetilhekzoaminidaz, β -glukosidaz, fosfataz gibi türe özgü enzimler aracılığı ile ortamdaki kromojenik substratların hidrolize edilmesi ile türe özgü renk oluşumları ve koloni morfolojileri meydana gelir. Karışık kültürlerin izolasyonunda ve identifikasyonunda oldukça kullanışlıdır. Çeşitli ticari kromojenik besiyerleri mevcut olup, *Candida* diagnostic agar (CDA) (PPR Diagnostics, Ltd), *Candida* Chromogenic Agar (Laboratorios CONDA), Candi Select4 (Bio-Rad Laboratories), CHROMagar *Candida* (CHROMagar Microbiology), BBL CHROMagar (BD Diagnostic Systems), chromID *Candida* agar (bioMérieux, Inc.), HardyCHROM *Candida* (Hardy Diagnostics), HiCrome *Candida* differential agar (HiMedia Laboratories), Oxoid Brilliance *Candida* agar (Oxoid) şeklinde sıralanabilir (167).

Candida türlerinin identifikasyonu amacıyla karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon testleri kullanılmaktadır. Karbonhidrat asimilasyon testleri, oksijen varlığında tek karbon kaynağı olarak özgün karbonhidrat kullanma yeteneğine göre identifikasyonu sağlayan bir yöntemdir. API 20C AUX (bioMérieux SA), API-Candida, API ID32C (bioMérieux SA), Auxacolor 2 (BioRad, Hercules, CA), Vitek sistemleri (bioMérieux SA) bu amaçla üretilmiş otomatize ya da yarı otomatize ticari kitleridir (167).

Fermentatif mayalar CO₂ ile asit üretirler ve oluşan gaz fermentasyonun göstergesidir. Fermentasyon testleri, sıvı bir besiyerinde gerçekleştirilen ve asit ve/veya CO₂ oluşumuna dayalı bir yöntemdir. *Candida* türlerinin ayırımında kullanılabilir ancak asimilasyon testlerine göre daha az duyarlı ve daha az güvenilir bir yöntemdir (169,170).

Üreaz testi, *Candida* türlerinin identifikasyonunda kullanılan bir test olup, *Yarrowia* (*Candida*) *lipolytica* ve bazı *C. krusei* suşları haricinde klinik örneklerden soyutlanan bütün *Candida* türleri üreaz negatiftir (169).

Hızlı trehaloz testi tanımlamada kullanılabilecek bir başka yöntem olup, Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu *C. glabrata* suşlarının hızlı trehaloz yöntemi ile 3 saat içerisinde identifikasyonunu onaylamaktadır. Bazı besiyerlerinde yanlış pozitif sonuç alınabilmekte olup, *C. albicans* ve *C. tropicalis* suşlarının kanlı agarda üretilmesi durumunda trehaloz testi yanlış pozitiflik vermektedir. Gerçek pozitif sonuç alınımı için CHROMagar ve SDA (%4) besiyerlerinin kullanımı önerilmektedir (171).

DNA temeline dayanan alternatif yöntemlerden biri olan “matrix-assisted laser desorption ionization -time of flight mass spectrometry-” (MALDI-TOF MS) kütle spektrofotometrisi yöntemi *Candida* türlerinin identifikasyonunda oldukça güvenilir sonuçlar vermektedir. Hızlı, uygun maliyetli bir yöntem olup, mayalara özgü tipik protein parmakizlerini oluşturarak, mevcut iyi belirlenmiş mayalara özgü protein parmakizlerinden oluşan veritabanı ile kıyaslanarak identifikasyonun yapılması hedeflenir (169,170). Kan kültür şişelerinden izole edilen 346 mayanın identifikasyonu için kütle spektrofotometrisinin kullanıldığı bir çalışmada *Candida* türlerinin identifikasyonu için saptanan duyarlılık oranları *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. krusei* için sırası ile %94, %87, %84, %75 olarak belirlenmiştir. Bu yöntem ile kan kültür sonuçlarının 24 saat içerisinde değerlendirilmesi ve sonuçlandırılması konvansiyonel yöntemlere göre büyük avantaj

sağlamaktadır (172). Ayrıca kütle spektrofotometrisi ile *C. albicans*/*C. dubliniensis* ayrımı başarılı şekilde yapılabilmektedir (173).

Candida türlerinin moleküler identifikasyonu açısından ise, “restriction fragment length polimorfizm” (RFLP), “Southern” hibridizasyon ve tRNA profil analizi ile moleküler identifikasyon yapılabilmektedir. Ancak RFLP analizi ile fungusların total genomik DNA’ları fragment parçalarına bölünmesi nedeniyle bu test sonuçlarını objektif olarak yorumlamak zor olabilmektedir. Öte yandan hibridizasyon analizi çok basamaklı bir yöntem olup, sonuç vermek için 24 saatten fazla zamana ihtiyaç duyulmaktadır (174). tRNA profil analizi ile bağımsız türe özgü profillerin elde edilmesi sonucu *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* ve *C. glabrata* türlerinin identifikasyonunun yapılabildiği ancak bu yöntem ile kültür üremesinden sonra en az bir iş gününe gereksinim duyulduğu bildirilmiştir (175).

En büyük potansiyel sunan yaklaşım yüksek duyarlılık, hıza sahip, özgün oligonükleotit öncüller ile termostabil DNA polimeraz aracılığıyla hedef DNA’nın çoğaltılmasını sağlayan polimeraz zincir reaksiyon (PZT) yöntemidir (176).

Candida türlerini PZT yöntemi ile saptamada *C. albicans* ısı şok proteini 90 geni (HSP 90), sitokrom P-450 lanosterol- α -demetilaz geni, 5S rDNA bölgesi ve *C. albicans* E03 elementini içeren çeşitli özgün öncüller ile mümkündür. HSP90, 5S rDNA ve E03 dizileri sadece *C. albicans* türlerine özgüdür. *Albicans* dışı *Candida* türlerinin identifikasyonu için genellikle ribozomal subunit sekanslarını içeren (ribozomal RNA genleri) öncüller kullanılmaktadır (176). Funguslarda çekirdek ribozomal DNA (rRNA gen kümesi) ardışık tekrarlanan rDNA birimlerinden oluşmaktadır. Funguslarda 18S rDNA bölgesi daha yavaş evrim geçirmesinden olayı uzak akraba organizmaların kıyaslanmasında; ITS daha hızlı evrim geçirdiği için tür içindeki suşların ya da cins içindeki fungal türlerin karşılaştırılmasında kullanılmaktadır (177,178).

18S ribozomal DNA (rDNA), 28S rDNA, 5.8S rDNA ve “Internal transcribed spacer” (ITS) bölgelerine ait dizileri içeren öncüller kullanılarak tür tayini yapılmaktadır. Fungusların identifikasyonunda altın standart DNA dizileme yöntemidir (179).

2.6.3. Serolojik Testler

Tanı amacıyla antikor ve antijen araştırılması özellikle bağışıklık sistemi sağlam hastalarda önemli iken immün sistemi baskılanmış hastalarda kullanımı sınırlıdır. Fungal

antijen ve antikor saptanması amacıyla immüdifüzyon (ID), karşı akım immünelektroforez (CIE), enzim immün “assay” (EIA), kompleman fiksasyon testleri (CFT), floresan enzim immün “assay” yöntemi (FEIA) kullanılabilir (180).

Candida türlerine karşı özgün antikorların varlığının saptanması enfeksiyon tanısı açısından çok anlamlı olmayabilir. *Candida* türlerinin çoğunun insanda kommensal olarak yer alması sonucu enfeksiyon haricinde de bu antikorların düşük seviyelerde serumda bulunmasından dolayı antikor testleri tanı açısından sorunludur (181). *C. albicans*’ın çimlenme borusuna karşı oluşmuş antikorların saptanması da sistemik kandida enfeksiyonlarının tanısı açısından gündeme gelmiştir. Bu yöntemle kandidemi hastalarında duyarlılık %77-89; özgüllük %91-100 arasında belirlenmiştir (182,183). Zaragoza ve ark.’nın yaptığı bir çalışmada, YBÜ’de bu testin pozitif olduğu hastalarda, negatif olanlara göre mortalite oranının daha düşük olduğu, bunun da pozitif olan hastalara ampirik tedavi uygulanabileceği bildirilmiştir (184). Aynı grubun yaptığı başka bir çalışmada da antifungallerin kullanımı ya da *Candida* kolonizasyonunun bu yöntemin sonuçlarını etkilemediği bulunmuştur. Bu özellikle YBÜ’de yatan hastalar için bir avantaj sağlamaktadır (185).

Candida enfeksiyonlarının tanısında antijen arama testleri özellikle mannan ve mannoproteinlerin aranması çok daha anlamlıdır. Bu antijenlerin saptanmasında Platelia *Candida* Ag EIA (BioRad) ve CandTec lateks aglütinasyon testleri (Ramco Laboratories, Stafford, TX) gibi ticari kitler kullanılmaktadır. *Candida* mannan bileşenleri dolaşımda hızlı bir şekilde temizlendiği için fungal enfeksiyon saptanmasında sıklıkla tekrarlanarak yapılması önemlidir (181).

Candida enfeksiyonlarının tanısında antijen ve antikorların birlikte bakılmasının tanı açısından çok daha değerli olduğu bildirilmiştir (181). Yapılan bir meta analiz çalışmasında, özellikle mannan antijenleri ve antimannan antikorlarının saptanmasını inceleyen çalışmalardaki duyarlılık, özgüllük ve bu parametrelerin kolonizasyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Sadece mannan antijen saptanmasının duyarlılığı %31-%100 arasında (ortalama %62) bildirilmiştir. Yalnızca antimannan antikorlarının incelenmesinde duyarlılığın %44-100, iki yöntem kombine edildiğinde ise ortalama duyarlılığın %86 olduğu rapor edilmiştir. En iyi duyarlılık *C. albicans* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda saptanmış olup, bunu *C. glabrata* ve *C. tropicalis* türlerinin oluşturduğu tablolar takip etmektedir.

Candida enfeksiyonu olan hastalarda antijen varlığının kolonizasyona etkileri incelendiğinde ise kolonizasyon ve yüzeyel kandidozun mannan ve antimannan antikorlarının saptanması ile ilişkili olmadığı anlaşılmıştır. Mannan ve antimannan antikorlarının sadece invaziv kandidozun tanısında kullanılması önerilmekte olup, testlerin kombine kullanılmasının, serolojik yöntemlerin tek başına kullanılmasından daha iyi sonuç verdiği belirtilmiştir (181).

İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının tanısı amacıyla (1,3)- β -D- gluklan ve galaktomannan hücre duvar polisakkarit yapılarının saptanması gündeme gelmiştir. Ancak test ile ilgili önemli bir nokta, bu testin sadece invazif kandida enfeksiyonlarına özgün olmayıp, sadece fungal enfeksiyon tanısını desteklemesidir (170).

Yapılan bir meta analiz çalışmasında, invaziv fungal enfeksiyonlu 365 hasta için (1,3)- β -D- gluklan testi yapılmış ve %79,1 duyarlılık ve %87,7 özgüllük saptanmıştır. Kandidoz ve aspergilloz tabloları için bu testin duyarlılık oranları arasında belirli bir fark bulunamamıştır, bu nedenle optimal örnek miktarı, yanlış pozitiflik kriterleri ve optimal “cutoff” değerlerinin belirlenmesinin, rutin klinik kullanımlarda yanlış pozitif sonuçların önüne geçilmesi açısından önemli olduğu belirtilmiştir (186,187).

2.6.4. Moleküler Tanı

Konvansiyonel mikolojik testler ile klinik örneklerden *Candida* türlerinin kültürde üretilmesi ve bu türlerin identifikasyonu için minimum 24-48 saat gerekmekte olup, özellikle invaziv kandidozun tanısında özgün, duyarlı ve hızlı bir yöntem gereksinim duyulmaktadır. Bu açıdan günümüze kadar değişkenlik gösteren farklı moleküler yaklaşımlar mevcuttur.

Özellikle kan dolaşımı enfeksiyonların tanısında altın standart yöntem olarak otomatik kan kültür sistemleri kullanılmaktadır. Üreme saptanan şişelerden Gram boyama yapılması, katı besiyerine pasajlanması, üreyen kolonilerin tanımlanması ve gerekirse antifungallere duyarlılıklarının incelenmesi bir ile beş iş gününü kapsamaktadır. Bu zaman kaybını engellemek için mikrobiyolojik tanıda hızlı bir yöntem olan, başta kan olmak üzere hasta örneklerinde PZT ile *Candida* DNA'sının saptanması gündeme gelmiş olup, bu yöntem erken tanı ve tedavi yanında mortalite ve morbidite oranlarının azalması açısından kazanımlar sağlamaktadır (188).

Tanı açısından, çeşitli klinik örneklerde kullanılan DNA amplifikasyon yöntemleri yüksek duyarlılık ve özgüllüğü sahiptir. Klinik laboratuvarlar DNA dizi analizi, izotermal ve

“PNA FISH” yöntemi, yüksek hacimli analiz yöntemleri olan ‘Microarray’ ve Luminex xMAP™ ile PZT yöntemlerini fungusların rutin tanısı için kullanabilmektedir (189).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (“US Food and Drug Administration”) (FDA) peptit nükleik asit floresan ‘in situ’ hibridizasyon (“PNA FISH Candida”) kitlerinin (AdvanDx, Waburn, MA) pozitif kan kültürü örneklerinden direk olarak mayaların tanısı için kullanılabilir olduğunu belirtmektedir. Spesifik 26S rRNA sekanslarını hedefleyen “probe”lar ile tek ya da çoklu maya kolonilerinden *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* türleri saptanabilmektedir. Kan örneklerinde “Yeast Traffic Light PNA FISH” kiti ile birlikte *C. albicans* ve *C. parapsilosis* yeşil, *C. glabrata* ve *C. krusei* kırmızı ve *C. tropicalis* sarı floresan vermekte iken diğer türler için bu yöntem negatiftir. Yöntemde *C. albicans* ile *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* ile *C. krusei* arasında bir ayırım yapılamamaktadır (190,191,192,193). *C. albicans* PNA FISH yönteminin %99 duyarlılık ve %100 özgüllük gösterdiği belirtilmektedir (190,191,192). Bu yöntem 1,5 saat sürmesi nedeni ile avantajlı olmakla birlikte kültür yönteminin yerini alamamaktadır. Kan kültür örnekleri karışık türleri içerebileceğinden maya türlerinin var olup olmadığının anlaşılabilmesi için “PNA FISH” pozitif kan örneklerinin mutlaka katı besiyerine pasajlanması gerekmektedir (190,191,194).

PZT yöntemi ile kandidemi olgularında hastalardan alınan kan, serum, plazma örneklerinde etken patojenin DNA’sını hedef alan özgün öncüller aracılığı ile etkenin varlığı saptanır. Mantarların korunmuş bölgeleri olan 18S, 5.8S ve 28S gen bölgelerini içeren ribozomal DNA (rDNA) kümesi, ribozomal alt ünitelerinin arasında yer alan “internal transcribed spacer (ITS)” bölgeleri, mitokondriyal sitokrom b, P450L1A1 dimetilaz ve aktin bölgelerini hedef alan öncüller kullanılarak PZT yöntemi ile hasta örneklerinde fungal DNA varlığı saptanmaktadır (195).

PZT, çalışılacak örneklerin çeşitliliğine bağlı olarak modifikasyonların yapılmasına uygun bir yöntemdir. Çoklu (“Multipleks PCR”) PZT, yuvalanmış (“Nested PCR”) PZT ve gerçek zamanlı (“Real time PZT”) PZT bu modifikasyonlara örnek olarak verilebilir (170). Hatta *Candida* türlerinde ortak bulunan genomik alanlara ilave türe özgü öncüller ile çalışılarak tür düzeyinde tanımlanmaya da gidilebilmektedir (196,197,198,199,200,201).

Nguyen ve ark.’ı 55 invaziv kandidemi hastalarının kan örneklerinde ITS1 ve ITS2 gen bölgelerini hedef alan öncüller ile gerçek zamanlı PZT yöntemi ile *Candida* DNA’sı saptamış

olup, çalışmada yöntemin duyarlılığı %80 duyarlılık, özgüllüğü ise %70 olarak belirtilmiştir (202).

Trovato ve ark.'ı YBÜ'de yatan 86 yenidoğan kandidemi hastasının kan örneklerinin kültürü yanında 18S rDNA, ITS1, 28S rDNA bölgelerini hedef alan öncüller ile PZT çalışmışlar ve %98,6 özgüllük, %87,5 duyarlılık saptamıştır (203).

Lau ve ark. kültür ve histopatolojik olarak kanıtlanmış invaziv fungal hastalığı olan hastaların taze ve parafine gömülü doku örneklerinde rDNA'nın ITS1 bölgesini hedef alan panfungal PZT yöntemini takiben dizi analizi yöntemi ile fungal DNA saptayıp, tanımlamıştır (204). Panfungal PZT'nin kültürde üremeyen fungusların saptanmasında, histopatolojik olarak kanıtlanmış enfeksiyonlarda, kültür yönteminin tamamlayıcısı olduğu; tanımlamaya destek olmakla birlikte antifungal sağaltıma kılavuzluk yapabileceği belirtilmiştir (205,206,207,208).

Bir başka çalışmada "Light Cycler SeptiFast Test M" (Roche Diagnostic GmbH) yöntemi ile kan örneklerinde beş *Candida* türünün DNA'sı geniş aralıklı ITS PZT ve erime eğrisi analizi ile saptanabilmiştir (209).

Luminex xMAP™ multipleks PZT yöntemi ile yapılan bir araştırmada tek bir örnekte 23 fungus saptanabilmekte olup, pozitif kan kültür şişelerinden *Candida* türlerinin belirlenmesinde duyarlılığın %100, özgüllüğün ise %99 olduğu rapor edilmiştir (210,211).

Moleküler yöntemlerden biri olan 'Microarray' yöntemi ile kan kültürlerinde *Candida* saptanmasının %99 duyarlılık ve %98 özgüllükte olduğu belirtilmiştir (212).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

“Kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *Candida albicans* suşlarının fosfolipaz aktivitelerinin araştırılması” adlı tez çalışması, deneysel niteliktedir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma; Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Ocak 2015’de literatür taraması ile başlanan araştırma Haziran 2019’da tez savunması ile sonlandırıldı.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

30 kan ve 30 oral kavite örnekleri çalışmamızın örneklemi oluşturmaktadır. İnvazif grubu temsil eden kan örnekleri ile invazif olmayan grubu temsil eden normal floralı bölgeden alınan oral kavite örneklerinde virulans faktör olan fosfolipaz aktivitesini incelemek amacı ile örnekler seçildi. İstatiksel analizler için grupların en az ne kadar olacağı danışılarak örnek sayısına karar verildi.

3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışma kapsamında 01.01.2015-31.12.2015 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarı’ndan kan ve oral kavite örneklerinden üreyen ve *C. albicans* olarak tanımlanan suşlar alınarak stoklandı. Stoklanan suşlardan 30 oral kavite, 30 kan izolatu seçildi.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* suşları “bağımsız değişken” iken araştırılan fosfolipaz aktivitesi “bağımlı değişken” olarak değerlendirildi.

3.6. Veri Toplama Araçları

Tablo 3. Çalışma sırasında kullanılan cihaz, kimyasal ve sarf malzemelere ait bilgiler

Sıra No	Malzeme, Cihaz	Marka	Lot No, Seri No, Katalog No, Model	Kullanıldığı Analiz
1	Sabouraud %4	Oxoid	1998645	Fosfolipaz

	Dexstrose Agar (500 g)			aktivasyonu
2	Sabouraud %2 Dexstrose Agar (500 g)	Merck	M107315.500	Suşların canlandırılması
3	Yeast Extract Peptone Dexstrose Broth (YPD) 500 g	BD Bioscience	242820	Pasaj işlemi
4	Brain Heart Infusion Broth (BHI) 500 g	Merck	M110493.0500	Suşların stoklanması
5	Calcium chloride anhydrous powder	Merck	M102378.0500	Fosfolipaz aktivasyonu
6	Sodium chloride	Merck	M106404.1000	Fosfolipaz aktivasyonu
7	Citric acid	Sigma	251275-100G	Fosfolipaz aktivasyonu
8	Petri kutusu	Lamtek	LT10021710	Ekim ve pasaj işlemi
9	Sterilizasyon bandı	HHH	C108550	Sterilizasyon
10	Pastör pipeti	İsolab	S.084.22.001	Pasaj işlemi
11	Steril öze	İsolab	S.082.01.002	Ekim ve pasaj işlemi
12	Etanol	-	100983.2511	Dezenfeksiyon
13	Etanol	Teksol	-	Dezenfeksiyon
14	1,5 ml'lik steril tüp	Isolab	S.078.03.022	RNA izolasyonu, cDNA sentezi, PZT
15	50 ml'lik steril falkon	Isolab	S.078.02.009	Fosfolipaz aktivasyonu
16	Parafilm	Isolab	I.058.01.002	Fosfolipaz aktivasyonu
17	PZT tüp standı	Isolab	S.089.03.012	PZT
18	Gliserol	Carlo Erba Reagents	-	Suşların stoklanması

19	Agaroz	Applichem	A2114,0500	Agaroz jel elektroforezi
20	50X Tris Asetat-EDTA Tamponu (TAE)	Thermo Scientific	LSG-B49	Agaroz jel elektroforezi
21	0,2 ml PCR tüpleri	Thermo Scientific	LSG-AB0620	PZT
22	Filtreli 10 µl pipet uçları	Thermo Scientific	MBP-2139	RNA izolasyonu, cDNA sentezi, PZT
23	Filtreli 100 µl pipet uçları	Thermo Scientific	MBP-2065	RNA izolasyonu, cDNA sentezi, PZT
24	Filtreli 1000 µl pipet uçları	Thermo Scientific	MBP-2279	RNA izolasyonu, cDNA sentezi, PZT
25	Filtresiz 10 µl pipet uçları	Thermo Scientific	MBP-3500-05-11	RNA izolasyonu, cDNA sentezi, PZT
26	Filtresiz 100 µl pipet uçları	T.Finnpipette	FP-94300220	RNA izolasyonu, cDNA sentezi, PZT
27	Filtresiz 1000 µl pipet uçları	T.Finnpipette	FP-94300120	RNA izolasyonu, cDNA sentezi, PZT
28	RNA izolasyon kiti	YeaStar	ZRC 185537	RNA izolasyonu
29	cDNA sentez kiti	Thermo Scientific	LSG-K1622	cDNA sentezi
30	PCR kiti	Nanaohelix	T500N	PZT
31	Primer dizileri	Genmar	-	PZT
32	50 bp DNA Ladder	Thermo Scientific	LSG-SM0371	PZT
33	SafeView	ABM	G108	Agaroz jel elektroforezi
34	IsoFreeze PCR rack	SSIBio	5640-T4S	PZT
35	100 Well Freezer Tube rack	SSIBio	5540-00S	PZT
36	Pudrasız eldiven	-	-	Tüm işlemler
37	Nitril eldiven	-	-	Tüm işlemler
38	Etüv	Memmert		İnkübasyon

39	Otoklav	Hirayama	HV-85	Besiyeri hazırlama, sterilizasyon
40	McFarland	Biomerieux	IDNO12764	Yoğunluk tespiti
41	Orbital çalkalamalı inkübatör	Stuart	S1500	Besiyerine ekili suşların inkübasyonu
42	Vorteks	Stuart	SA8	Homojenizasyon
43	Mikrosantrifüj	Hettich	Mikro 120	cDNA, PZT
44	-80°C derin dondurucu	Thermo Scientific	Model 702	Örneklerin saklanması
45	-20°C derin dondurucu	Ariston	-	Malzemelerin ve örneklerin saklanması
46	+4°C derin dondurucu	Indesit	-	Malzemelerin saklanması
47	Hassas terazi	Sartorius	-	Kimyasalların tartılması
48	Soğutmalı santrifüj	Heraeus	Labofuge 400R	RNA izolasyonu
49	Pipet seti	Thermo Finnpiptette	4700410	RNA izolasyonu, cDNA sentezi, PZT
50	Nanodrop 2000	Thermo Scientific	G118	DNA miktarının belirlenmesi
51	Thermal cycler	Techne	TC-412	PZT
52	Elektroforez tankı	Thermo Scientific	OWL-B2	Agaroz jel elektroforezi
53	Güç kaynağı	Thermo Scientific	EC 3000 XL	Agaroz jel elektroforezi
54	Jel görüntüleme sistemi	Vilber Lourmant	-	Agaroz jel elektroforezi
55	Mikrodalga fırın	Roda	RD-7017PA	Agaroz jel elektroforezi
56	pH strip	Macharey Nagel	921-10	Besiyerinin pH tayini

3.6.1. Hazırlanan Besiyerleri

3.6.1.1. Sabouraud Dekstroz (%2) Agar (SDA) ve Sabouraud Dekstroz (%4) Agar (SDA)

Ticari olarak sağlanan besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. Toz içerik 65 g tartıldı ve 1 L distile suda eritildi. 121°C’de, 1.2 atm basıncında 15 dakika steril edildi. 50°C’ye kadar soğuyan besiyeri steril petrilere 20 ml olacak şekilde döküldü ve soğumaya bırakıldı. Soğuyan petrilere parafilm ile kapatılarak kullanılacağı güne kadar +4°C’de tutuldu.

3.6.1.2. “Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) Broth”

Ticari olarak sağlanan besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. Toz içerik 50 g tartıldı ve 1 L distile suda eritildi. 121°C’de, 1.2 atm basıncında 15 dakika steril edildi. 50°C’ye kadar soğuyan besiyeri steril petrilere 20 ml olacak şekilde döküldü ve soğumaya bırakıldı. Soğuyan petrilere parafilm ile kapatılarak kullanılacağı güne kadar +4°C’de tutuldu.

3.6.1.3. Beyin Kalp İnfüzyon Buyyonu (BHI)

Ticari olarak sağlanan besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. Toz içerik 18.5 g tartıldı ve otoklavlanabilen cam kapaklı şişeye alınarak distile su ile 500 ml’ye tamamlandı. 121°C’de, 1.2 atm basıncında 15 dakika steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra besiyeri soğumaya bırakıldı. Besiyeri soğuduktan sonra kullanılacağı güne kadar +4°C’de tutuldu.

3.6.1.4. %50 Beyin Kalp İnfüzyon Buyyonu

Ticari olarak sağlanan besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı. 500 ml besiyeri hazırlamak için; 500 ml otoklavlanabilen cam şişeye 18.5 g tartılan besiyeri konuldu, üzerine 250 ml distile su ile 250 ml gliserol eklendi. 500 ml’ye tamamlanan ortam 121°C’de, 1.2 atm basıncında 15 dakika steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra besiyeri soğumaya bırakıldı. Besiyeri soğuduktan sonra kullanılacağı güne kadar +4°C’de tutuldu.

3.6.2. Candida Suşları

01.01.2015-31.12.2015 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji Laboratuvarı’nda kan kültürü ve oral kavite örneklerinden soyutlanan toplam 60 adet *C. albicans* suşu çalışmaya alındı. Plak yönteminde ve PZT yönteminde pozitif kontrol olarak *C.*

albicans ATCC 90028 suşu, plak yönteminde negatif kontrol olarak ise daha önceki çalışmalarımızda plak yöntemi ile fosfolipaz aktivitesi negatif olarak saptanan bir *C. albicans* suşu (1519 nolu suş) kullanıldı. *C. albicans* suşları çimlenme borusu deneyi, mısır unu tween 80 agar ve CHROMagar Candida besiyerlerindeki görünüm ve morfolojileri ile API 20C AUX karbonhidrat asimilasyon testleri kullanılarak identifiye edildi. Soyutlanan suşlar %50 gliserollü beyin kalp infüzyon sıvı besiyerinde stoklanarak -80°C'de saklandı. Daha sonra tüm suşlar aynı anda açıldı, SDA'ya pasajlanarak canlandırıldı. Suşlar aynı anda CHROMagar Candida besiyerine de pasajlanarak saf kültür oldukları kontrol edildikten sonra fosfolipaz aktivitesi araştırıldı.

3.6.2.1. *C. albicans* ATCC ("American Type Culture Collection") 90028 Suşu

Liyofilize halde bulunan *C. albicans* ATCC 90028 (MediMark Europe, France) suşu %50 gliserollü beyin kalp infüzyon buyyonu ile sulandırıldı ve 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra vortekslendi. SDA'ya öze yardımı ile ekimi gerçekleştirildi, hem petri hem tüp 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İki günün sonunda petrilere üreme gözlemlendi. Üreyen kolonilerden %50 gliserollü beyin kalp infüzyon buyyona ekimleri gerçekleştirildi ve deneyde kullanılacağı zamana kadar -80°C'de saklandı.

3.6.3. Fosfolipaz Aktivitesinin Yumurta Sarılı Besiyerinde Plak Yöntemi ile Araştırılması

Bu amaçla Samaranayake ve ark. (213) tarafından modifiye edilen Price ve ark.'nın (214) plak yöntemi uygulandı. Besiyeri olarak 0.005 M kalsiyum klorür (CaCl_2), 1 M sodyum klorür (NaCl) ve %8 steril yumurta sarısı eklenmiş Sabouraud dekstrozu agar (SDA) kullanıldı.

Besiyerinin hazırlanışı;

- Kalsiyum klorür, sodyum klorür ve SDA içeren besiyerinden 100 ml hazırlandı.
- Yumurta sodyum hipoklorit ile bir diş fırçası yardımıyla fırçalandıktan sonra distile su ile iyice yıkandı.
- Yumurtanın sarısı beyazından ayrılarak 50 ml'lik falkona konuldu ve +4°C'de 2500 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, pelletin üzerine steril distile su eklenerek hacmi 8 ml'ye tamamlandı.

- Kalsiyum klorür ve sodyum klorür içeren SDA'lı besiyerinden 92 ml çekildi, üzerine hazırlanan 8 ml yumurta süspansiyonu eklendi ve eşit miktarda sitrik asit ile disodyum hidrojen fosfat eklenerek ortamın pH'sının 4.3 olması sağlandı.

Stok *C. albicans* suşları SDA besiyerine pasajlanarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Üreyen kolonilerden steril distile su kullanılarak McFarland 1'e uygun bulanıklıkta *Candida* süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlardan bir plakta dört örnek olacak şekilde 10'ar µl inoküle edildi. Plaklar 45°C'de nemli bir ortamda dört gün bekletildi. Dört gün sonra koloniler ve koloni çevresinde oluşan presipitasyon zonları kör olarak iki kişi tarafından ölçülerek presipitasyon aktivitesini gösteren Pz değerleri hesaplandı.

$$\text{Pz değeri} = \frac{\text{Koloni çapı}}{\text{Presipitasyon zonu çapı}}$$

Pz değeri 1.00'a eşit ise suş fosfolipaz negatif olarak değerlendirilirken; bu değer 1.00'dan küçük ise suş fosfolipaz pozitif olarak kabul edildi.

3.6.4. Fosfolipaz Aktivitesinin Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PZT) ile Belirlenmesi

C. albicans suşlarının fosfolipaz genlerinin ekspresyon profillerini incelemek amacı ile total RNA izolasyonu yapıldı. Suşların üretilmesi amacı ile Samaranayake ve ark.'nın *PLB1* geninin ekspresyonu açısından Pz değeri ile paralellik gösterdiği saptanan “yeast extract peptone dextrose broth” (YPD) besiyeri kullanıldı (215,216).

3.6.4.1. RNA İzolasyonu

C. albicans suşları YPD besiyerinde 16 saat 37°C ve 150 rpm'de inkübe edildi. Inkübasyon işleminden sonra her bir suş 1:50 oranında taze YPD besiyeri ile seyreltilti. Her bir suşa ait seyreltilmiş kültürlerden 1 ml alınarak cam tüplere konuldu ve Mc Farland eşeline göre süspansiyon yoğunluğunun 0.5 olması sağlandı ve RNA izolasyon basamağına geçildi.

YeaStar RNA kit (Zymo Research, R1002) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda izolasyon işlemine geçildi. 1.5 ml kültür (1.5×10^7 hücre) 500 x g'de 2 dakika santrifüjlenerek çökelti oluşturuldu. Süpernatant dikkatlice atıldı. Pellete 80 µl YR “digestion” tamponu ve 5 µl zimolaz enzimi eklendi. Çökelti tekrarlanan pipetlemelerle

yavaşça karıştırıldı. Süspansiyon 37°C’de 60 dakika inkübe edildi. Daha sonra 160 µl YR lizis tamponu eklendi ve vortekslenerek (Stuart) karıştırıldı. Süspansiyon mikrosantrifüjde (Hettich) 7000rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant toplama tübü içerisindeki spin kolonuna transfer edildi ve 14000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Sonrasında 200 µl RNA yıkama tamponu kolona eklendi ve 14000 rpm’de 1 dakika boyunca yıkama işlemi gerçekleştirilmesi için santrifüj edildi. Bu yıkama basamağı bir kez daha tekrarlandı. Spin kolon, toplama tübünden dikkatlice çıkarılarak yeni 1,5 ml’lik RNaz içermeyen ependorfa aktarıldı. Kolon membranına doğrudan 60 µl DNaz/RNaz içermeyen su eklendi. 14000rpm’de 30 saniye santrifüj edilerek RNA elde edildi.

Total RNA miktarları Nanodrop 2000 Thermo Scientific G118 ile ölçüldü, 0.1-5 ng/µl aralığında olanlar cDNA sentezi için kullanılması amacıyla -80°C’ye kaldırıldı.

3.6.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

İzolasyon sonucunda elde edilen RNA ürünleri, RevertAid First Strand kiti (Thermo Scientific, K1622) kullanılarak ters transkripsiyon yöntemi ile komplementer DNA’ya (cDNA) çevrildi. Pozitif kontrol olarak ATCC 90028 ve hasta suşlarının cDNA sentezi yapıldı.

Karışım, son hacim 20 µl olacak şekilde hazırlandı. Her bir örnek için 3 µl RNA kullanıldı. RNA’ya 1 µl “random hexamer primer” (100 µM) eklendi ve karışım DNaz/RNaz içermeyen su ile 12 µl’ye tamamlandı. Karışım 70°C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra 4 µl 5x “reaction buffer”, 1 µl RiboLock RNase inhibitörü (20U/ µl), 2 µl 10 mM dNTP karışımı ve 1 µl RevertAid RT enzimi (200U/ µl) eklendi. Karışım sırasıyla 25°C’de 10 dakika, 42°C’de 60 dakika, 70°C’de 10 dakika inkübe edildi.

Tepkime sonunda elde edilen cDNA ürünleri, polimeraz zincir tepkimesinde kalıp olarak kullanılabilecek kadar -80°C’de saklandı.

3.6.4.3 PZT Uygulaması

Çalışmaya alınan *C. albicans* suşlarında, fosfolipaz genleri olan *PLB1* ve *PLC1*’in ekspresyon düzeylerinin araştırılması amacıyla korunmuş bölgelere özgün sentezlenmiş öncüller kullanıldı (215,216,217). Bu öncüllerin NCBI veri tabanından *C. albicans* için tanımlanan fosfolipaz *BL*, *CL* ve *ACT1* gen bölgeleri ile BLAST programı kullanılarak kontrolleri yapıldı. Bu öncüller Tablo 4’ de görülmektedir;

Tablo 4. RT-PZT' de kullanılan “forward” ve “reverse” öncüller

Gen	Öncül	Dizi (5'-3')	Gen Bankası Erişim No	PZT ürün büyüklüğü (bp)
<i>PLB1</i>	<i>PLB1F</i> <i>PLB1R</i>	CAACGAAGCGGTGTTGTCTA TCACCAACGAAGTCCCATCT	-	311
<i>PLC1</i>	<i>PLC1F</i> <i>PLC1R</i>	TTGTTACCGGAATGTCAAA CCCATTGAACATCTTGAGCA	Y13975	902
<i>ACT1</i>	<i>ACT1F</i> <i>ACT1R</i>	ACCGAAGCTCCAATGAATCCAAAATCC GTTTGGTCAATACCAGCAGCTTCCAAA	X16377	515

İnternal mRNA kontrolü olarak *C. albicans*'ın bir ‘house keeping’ geni olan *ACT1* geni kullanıldı (217).

Tepkimeler, toplam hacim 50 µl olacak şekilde hazırlandı. Tepkimeler sırasında kullanılan malzemeler ve konsantrasyonları ile amplifikasyon koşulları aşağıda belirtilmiştir (Tablo 5,6,7).

Araştırmamız öncesinde *PLB1*, *PLC1* ve *ACT1* öncül setlerinin birarada çalışıldığı multipleks PZT ile yapılan preliminar çalışmalarda, standardizasyon ve jelde görüntülenen bantların kantitasyonlarında sorunlar ile karşılaşılması nedeni ile *PLB1* ve *PLC1* öncülleri ile internal kontrol geni olan *ACT1* geni öncüllerinin kullanıldığı iki ayrı RT-PZT çalışması gerçekleştirildi.

Tablo 5. Fosfolipaz B1 PZT'sinde kullanılan malzemelerin konsantrasyonları ve hacimleri

	Hacim (1X)
10x Tampon	5 µl
dNTP karışımı (10mM)	2 µl
<i>PLB1F</i> (10pmol/µl)	2 µl
<i>PLB1R</i> (10pmol/µl)	2 µl
<i>ACT1F</i> (10pmol/µl)	2 µl
<i>ACT1R</i> (10pmol/µl)	2 µl
5x TuneUp solüsyon	1 µl
HelixAmp Taq Polimeraz (5U/µl)	0.25 µl
cDNA	8 µl
Nükleaz içermeyen steril distile su	25.75 µl
Toplam hacim	50 µl

Tablo 6. Fosfolipaz C1 PZT'sinde kullanılan malzemelerin konsantrasyonları ve hacimleri

	Hacim (1X)
10x Tampon	5 µl
dNTP karışımı (10mM)	2 µl
<i>PLC1F</i> (10pmol/µl)	2 µl
<i>PLC1R</i> (10pmol/µl)	2 µl
<i>ACT1F</i> (10pmol/µl)	2 µl
<i>ACT1R</i> (10pmol/µl)	2 µl
5x TuneUp solüsyon	1 µl
HelixAmp Taq Polimeraz (5U/µl)	0.25 µl
cDNA	8 µl
Nükleaz içermeyen steril distile su	25.75 µl
Toplam hacim	50 µl

Tablo 7. Fosfolipaz B1 ve C1 PZT amplifikasyon koşulları

	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	94°C	5 dakika	1
Denatürasyon	95°C	40 saniye	30
Bağlanma	55 °C	60 saniye	30
Uzama	72 °C	1 dakika	30
Son uzama	72 °C	7 dakika	1

3.6.4.4. Agaroz Jel Elektroforezi

PZT ürünlerinin görüntülenebilmesi için 1X Tris asetat-EDTA tamponu (TAE) ile %1,5'luk agaroz jel hazırlandı. 100 ml 1X TAE tamponu (ThermoScientific) içerisine 1,5 g agaroz (Applichem) tartılarak konuldu. Karışım mikrodalga fırında (RODA) eritildikten sonra 5 ml SafeView jel görüntüleme boyası (ABM) eklendi. Elektroforez tankının kalıbına taraklar yerleştirildi ve hazırlanan karışım elektroforez tankının kalıbına döküldü (Thermo Scientific). Jel donduktan sonra tank, 1X TAE tamponu ile dolduruldu ve taraklar jelden dikkatlice çıkarıldı.

Jeldeki her bir kuyucuğa 1 µl yükleme boyası ve 5 µl PZT ürünü karıştırılarak yüklendi. Çalışılan örneklerdeki bant büyüklüklerinin karşılaştırılabilmesi için “DNA Ladder” (Thermo Scientific) kullanıldı. Jele yüklenen örnekler, 110 Volt'ta 60 dakika yürütüldü. Sonuçlar, transilluminatörde (Vielber Lourmat), Infinity Capt yazılımı kullanılarak görüntülendi.

3.6.4.5. RT-PZT Ürünlerinin Kantitasyonu

Sonuçlar ultraviyole transilluminatörde (Vielber Lourmat) görüntülendi. *PLB1* için 311 baz çiftlik, *PLC1* için 902 baz çiftlik ve *ACT1* için 515 baz çiftlik bant görüntüleri elde edildi. Jel görüntülerinin kantitasyonu “Quatity One Software Biorad” programı kullanılarak yapıldı. Daha sonra *PLB1* ve *PLC1* genleri için elde edilen bant kalınlıkları, internal kontrol olarak kullanılan *ACT1* geni ile karşılaştırılıp normalizasyonları yapıldı ve grafikleri çizildi. Buna ek olarak, her suş *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırıldı ve bu suş bir kabul edilerek normalizasyonları yapıldı, grafiklendirildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Tablo 8. Araştırma planı ve takvimi

Literatür tarama	Ocak 2015-Aralık 2015
Etik kurul onayı	Eylül 2015
Örneklerin toplanması	Ocak 2015-Aralık 2015
TÜBİTAK proje başvurusu ve kabulü	Ocak 2016-Haziran 2016
Sarf malzemelerin alınımı	Haziran 2016- Şubat 2017
Kültür ve moleküler yöntemlerin uygulanması	Şubat 2017- Haziran 2018
Sonuçların değerlendirilmesi ve tez yazımı	Haziran 2018- Mart 2019
Tez savunması	24 Haziran 2019

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Kan kültürü ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* suşları için plak yöntemi ile belirlenen fosfolipaz olumluluk oranları χ^2 testi, her iki grubun ortalama Pz değerleri ise Mann Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı (SPSS versiyon 22.0).

Kan kültür ve oral kavite *C. albicans* izolatları için yumurta sarılı agar besiyeri kullanılarak yapılan plak yöntemi ile belirlenen Pz değerleri ile RT-PZT sonucunda elde edilen *PLBI* ve *PLCI* ekspresyon değerleri Mann Whitney U ve *t* test yöntemleri kullanılarak karşılaştırıldı (SPSS versiyon 22.0).

Bunun yanında, genlerin ekspresyonu ile fenotipik plak yöntemi ile saptanan fosfolipaz pozitifliği arasında % uyum hesaplandı. Ayrıca Pz değerleri ile fosfolipaz genlerinin ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyon, Spearman korelasyon testi ile incelendi (SPSS versiyon 22.0).

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışma ile ilgili sınırlamalara tartışma kısmında değinilmiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 10.09.2015 tarih ve 2242-GOA protokol numaralı 2015/21-24 karar numarası ile onaylanmıştır. Onay belgesi, EK-1,2,3’de belirtilmiştir.

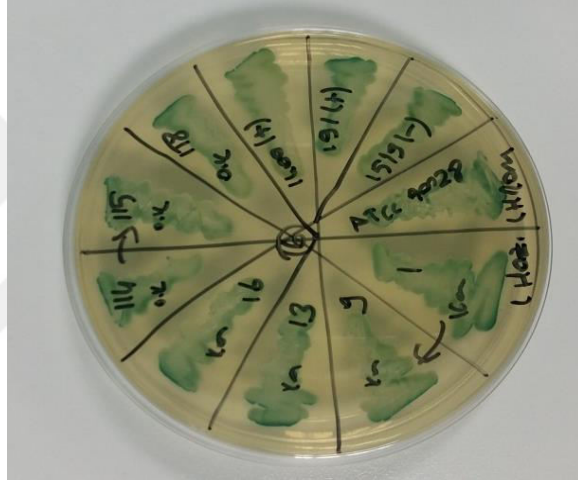


4. BULGULAR

4.1. Kültür Yönteminin Bulguları

Otuz oral kavite ve 30 kan kültüründen soyutlanan ve çimlenme borusu deneyi, mısır unu tween 80 agar ve CHROMagar Candida besiyerlerindeki görünüm ve morfolojileri ile API 20C AUX karbonhidrat asimilasyon testleri kullanılarak *Candida albicans* olarak tanımlanmış suşların fosfolipaz aktiviteleri yumurta sarılı agar kullanılarak plak yöntemi ile çalışıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

İlk olarak suşlar stokdan SDA besiyerine pasajlanırken aynı anda CHROMagar Candida besiyerine de pasajlanarak saf kültür oldukları kontrol edildikten sonra fosfolipaz aktivitesi araştırıldı (Şekil 7).

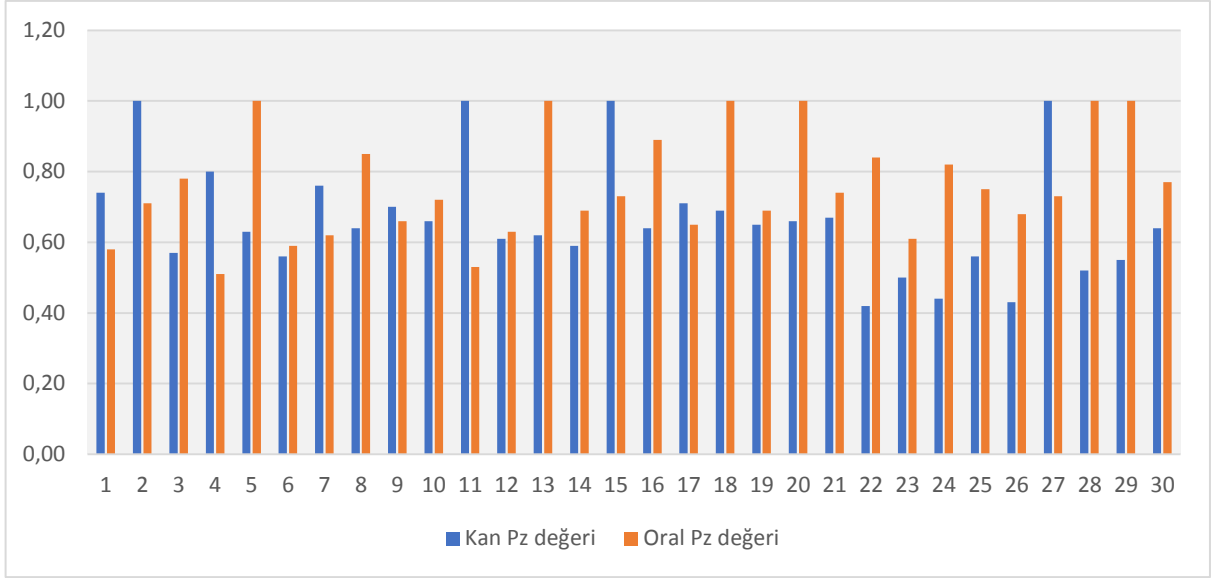


Şekil 7. Çalışmaya alınan bazı *C. albicans* suşlarının CHROMagar Candida besiyerindeki görünimleri

Kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* suşlarının yumurta sarılı agar kullanılarak plak yöntemi ile belirlenen Pz değerleri Tablo 9 ve Şekil 8’de gösterildi.

Tablo 9. Kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* suşlarının plak yöntemi ile belirlenen Pz değerleri

Kan	Pz değeri	Oral kavite	Pz değeri
Örnek Numarası		Örnek Numarası	
1	0.74	2	0.58
9	1.0	3	0.71
13	0.57	4	0.78
16	0.8	14	0.51
45	0.63	15	1.0
50	0.56	20	0.59
54	0.76	26	0.62
57	0.64	36	0.85
62	0.7	43	0.66
65	0.66	46	0.72
67	1.0	47	0.53
75	0.61	48	0.63
77	0.62	53	1.0
78	0.59	58	0.69
79	1.0	59	0.73
80	0.64	60	0.89
82	0.71	61	0.65
83	0.69	66	1.0
85	0.65	71	0.69
87	0.66	73	1.0
88	0.67	74	0.74
89	0.42	76	0.84
93	0.50	86	0.61
94	0.44	91	0.82
96	0.56	97	0.75
98	0.43	100	0.68
102	1.0	104	0.73
103	0.52	105	1.0
106	0.55	114	1.0
107	0.64	115	0.77
Pozitif ve negatif kontroller			
ATCC 90028	0.51	ATCC 90028	0.51
1400 (+)	0.48	1400	0.59
191 (+)	0.61	19	0.68
1519 (-)	1.0	1519 (-)	1.0



Şekil 8. Oral kavite ve kan örneklerinden soyutlanan her suş için belirlenen Pz değerleri

Fosfolipaz aktivitesi saptanan ve saptanmayan *C. albicans* suşlarının yumurta sarılı SDA'da oluşturdukları koloni ve etrafındaki presipitasyon zonlarının görünümü Şekil 9'da gösterildi.



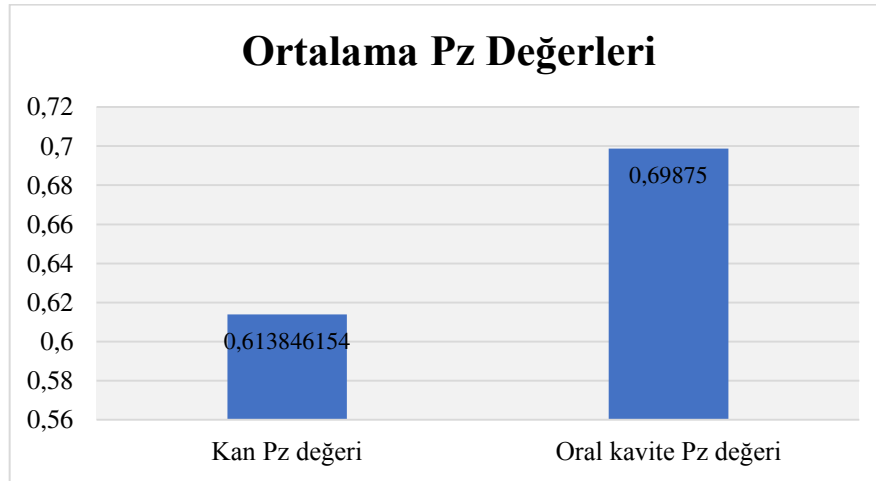
Şekil 9. Çalışmaya alınan üç fosfolipaz olumlu, bir olumsuz (sol alt) *C. albicans* suşunun yumurta sarılı agarda koloni ve presipitasyon zonlarının görünümü

Plak yöntemi ile kan kültürlerinden soyutlanan suşların 26'sında (%86.7), oral kavite örneklerinden elde edilen kökenlerin 24'ünde (%80.0) fosfolipaz aktivitesi saptandı (Tablo 10). Gruplar arasında fosfolipaz olumluluk oranları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmedi ($\chi^2=0.48$; $p=0.49$). Genel olarak kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan tüm suşların fosfolipaz olumluluk oranı %83.3 olarak belirlendi.

Tablo 10. Çalışmaya alınan kan ve oral kavite örneklerinden elde edilen *C. albicans* suşlarının fosfolipaz sonuçları

<i>C. albicans</i>	Çalışılan suş sayısı (n)	Pozitif suş sayısı (n) ve oranı (%)	Negatif suş sayısı (n) ve oranı (%)
Kan	30	26 (86.7)	4 (13.4)
Oral kavite	30	24 (80.0)	6 (20.0)

Oral kaviteden soyutlanan *C. albicans* suşlarının ortalama Pz değeri 0.6988 ± 0.9910 iken; kan kültüründen soyutlanan suşlarda bu değer 0.6138 ± 0.9823 'tür (Şekil 10). Kan suşlarının Pz ortalamaları ile oral kavite suşlarının Pz ortalamaları arasında anlamlı bir fark saptandı (Mann Whitney U=173.500; $p=0.007$).



Şekil 10. Kan ve oral kavite örneklerinden elde edilen *C. albicans* suşlarının ortalama Pz değerleri

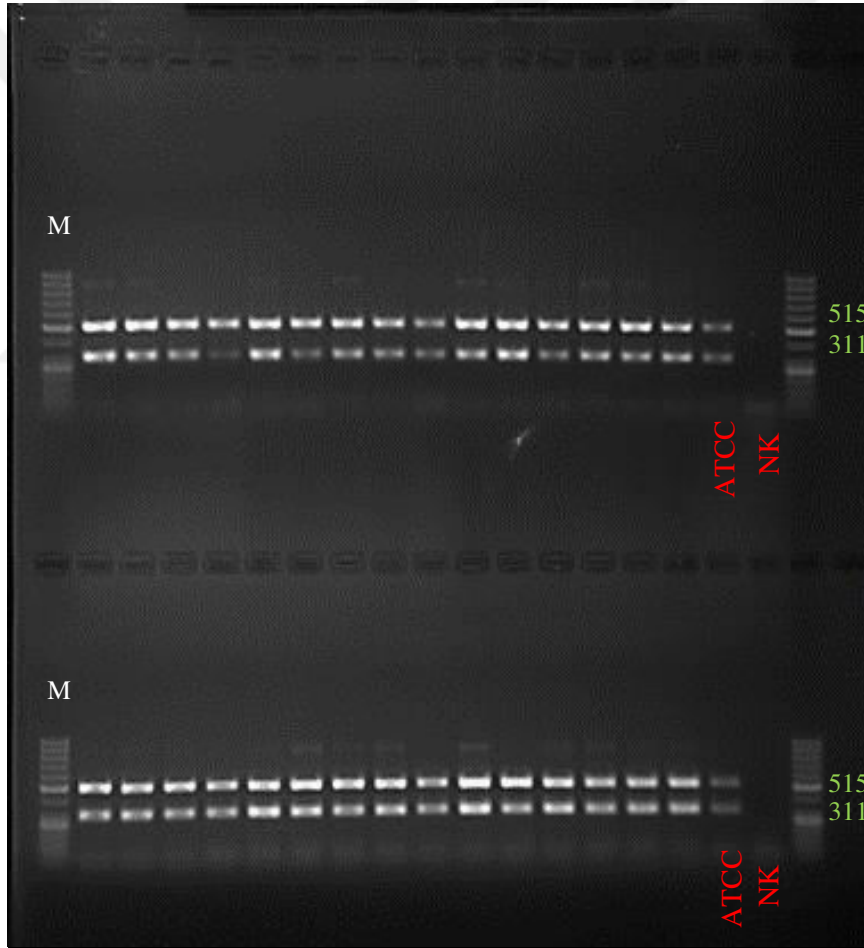
4.2. Moleküler İnceleme

Çalışmada *PLB1*, *PLC1* ve *ACT1* gen ekspresyon düzeyleri RT-PZT yöntemi ile incelendi, elde edilen ürünlerin bant profilleri %1.5'luk agaroz jelde incelendi. Bant profillerinin kantitasyonları, *ACT1* ile normalizasyonu ve *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılmaları yapıldı.

4.2.1. *PLB1* Ekspresyon Düzeyleri

4.2.1.1. Kan Örneklerinden Soyutlanan Suşlar-Kan İzolatları

Kan örneklerinden soyutlanan *C. albicans* suşlarına ait *PLB1* ve *ACT1* genlerine ait bant profillerini gösteren jel görüntüsü Şekil 11'de verilmiştir.

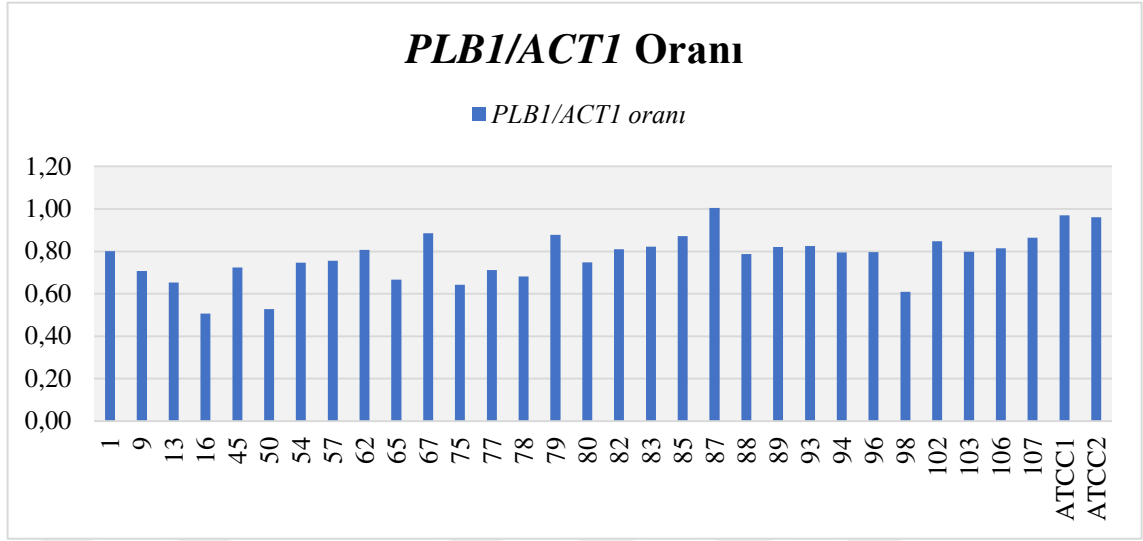


Şekil 11. Kan örneklerinden soyutlanan 30 suşun (üstteki ve alttaki) *PLB1* ve *ACT1* gen öncülleri kullanılarak uygulanan RT-PZT ürünlerinin agaroz jelde 110 V'da 60 dk. yürütüldükten sonra elde edilen görüntüsü. M: Marker (Fermentas SM0371-Generuler 50 bazçiftlik "DNA Ladder"), 515: *ACT1* öncülü, 311: *PLB1* öncülü, ATCC: Pozitif kontrol; 90028 suşu ("American Type Culture Collection"), NK: Negatif kontrol.

Kan örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun tümünde (%100) RT-PZT yöntemi ile *PLBI* ekspresyonu saptandı. Jel görüntüsünden kantitasyonları yapılan suşların *PLBI* ve *ACT1* genleri için belirlenen sayısal değerleri ile *PLBI/ACT1* normalizasyon oranları Tablo 11’de, grafiklendirilmesi ise Şekil 12’de gösterilmiştir.

Tablo 11. Kan örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşuna ait *PLBI/ACT1* normalizasyon oranları

Suş No	Soyutlanan yer	<i>PLBI</i>	<i>ACT1</i>	<i>PLBI/ACT1</i> oranı
1	Kan	1040,94	1298,99	0,80
9	Kan	946,15	1338,42	0,71
13	Kan	783,28	1198,21	0,65
16	Kan	493,71	973,32	0,51
45	Kan	935,78	1293,30	0,72
50	Kan	606,83	1150,09	0,53
54	Kan	816,86	1094,62	0,75
57	Kan	708,02	936,30	0,76
62	Kan	596,74	738,97	0,81
65	Kan	842,32	1263,25	0,67
67	Kan	1036,00	1169,47	0,89
75	Kan	635,75	988,60	0,64
77	Kan	772,67	1085,22	0,71
78	Kan	747,67	1095,69	0,68
79	Kan	796,81	907,51	0,88
80	Kan	877,04	1172,31	0,75
82	Kan	910,85	1123,61	0,81
83	Kan	941,14	1144,96	0,82
85	Kan	908,72	1042,48	0,87
87	Kan	1197,68	1191,48	1,01
88	Kan	1125,23	1429,99	0,79
89	Kan	948,87	1156,93	0,82
93	Kan	1063,25	1288,72	0,83
94	Kan	834,96	1051,30	0,79
96	Kan	1197,53	1505,07	0,80
98	Kan	922,85	1515,81	0,61
102	Kan	1060,00	1250,29	0,85
103	Kan	868,43	1089,34	0,80
106	Kan	851,48	1046,12	0,81
107	Kan	853,81	988,47	0,86
ATCC1	Kan	490,42	505,81	0,97
ATCC2	Kan	444,04	461,86	0,96



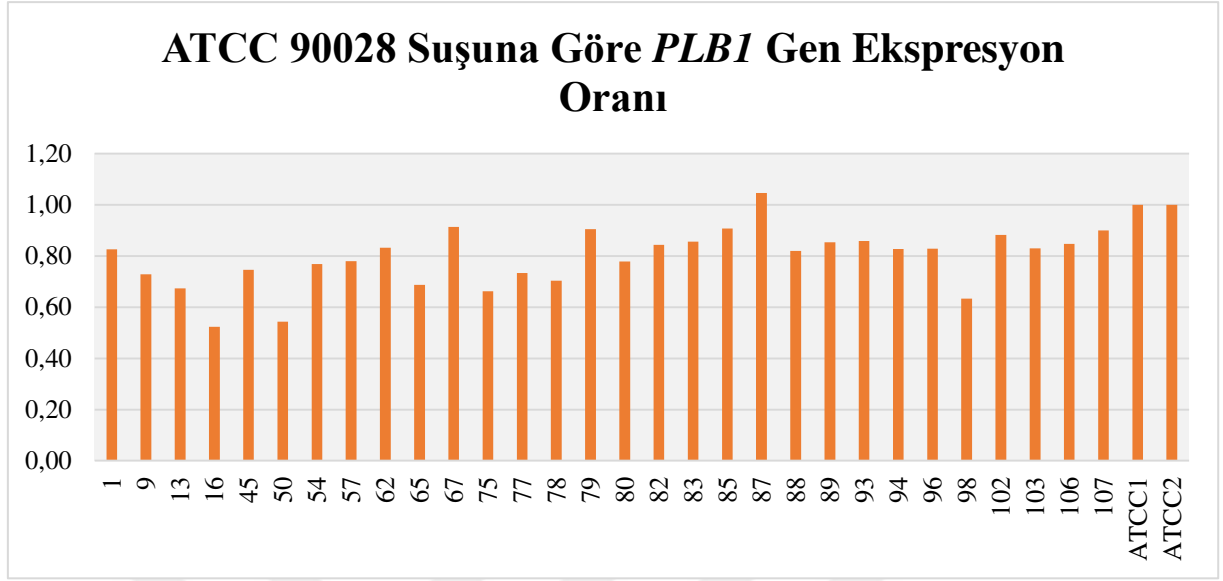
Şekil 12. Kan örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun *ACT1* ile normalizasyon sonrası oluşturulan grafiği

Çalışmaya alınan kan örneklerinde *PLB1* geninin *ACT1* geni ile normalizasyonu sonucunda saptanan *PLB1/ACT1* değeri, kan izolatları için 0.51-1.01 değerleri arasında olup ortalaması 0.76 olarak saptandı.

Her suşun *ACT1* ile normalize edilmiş *PLB1* ekspresyon düzeylerinin *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılması sonucu oluşan değerler Tablo 12’de, bu değerlerden oluşturulan grafik ise Şekil 13’de gösterilmiştir.

Tablo 12. Kan örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen değerler

Suş No	Soyutlanan yer	ATCC 90028 suşuna göre <i>PLB1</i> gen ekspresyon oranı
1	Kan	0,83
9	Kan	0,73
13	Kan	0,67
16	Kan	0,52
45	Kan	0,75
50	Kan	0,54
54	Kan	0,77
57	Kan	0,78
62	Kan	0,83
65	Kan	0,69
67	Kan	0,91
75	Kan	0,66
77	Kan	0,73
78	Kan	0,70
79	Kan	0,91
80	Kan	0,78
82	Kan	0,84
83	Kan	0,86
85	Kan	0,91
87	Kan	1,05
88	Kan	0,82
89	Kan	0,85
93	Kan	0,86
94	Kan	0,83
96	Kan	0,83
98	Kan	0,63
102	Kan	0,88
103	Kan	0,83
106	Kan	0,85
107	Kan	0,90
ATCC1	Kan	1
ATCC2	Kan	1



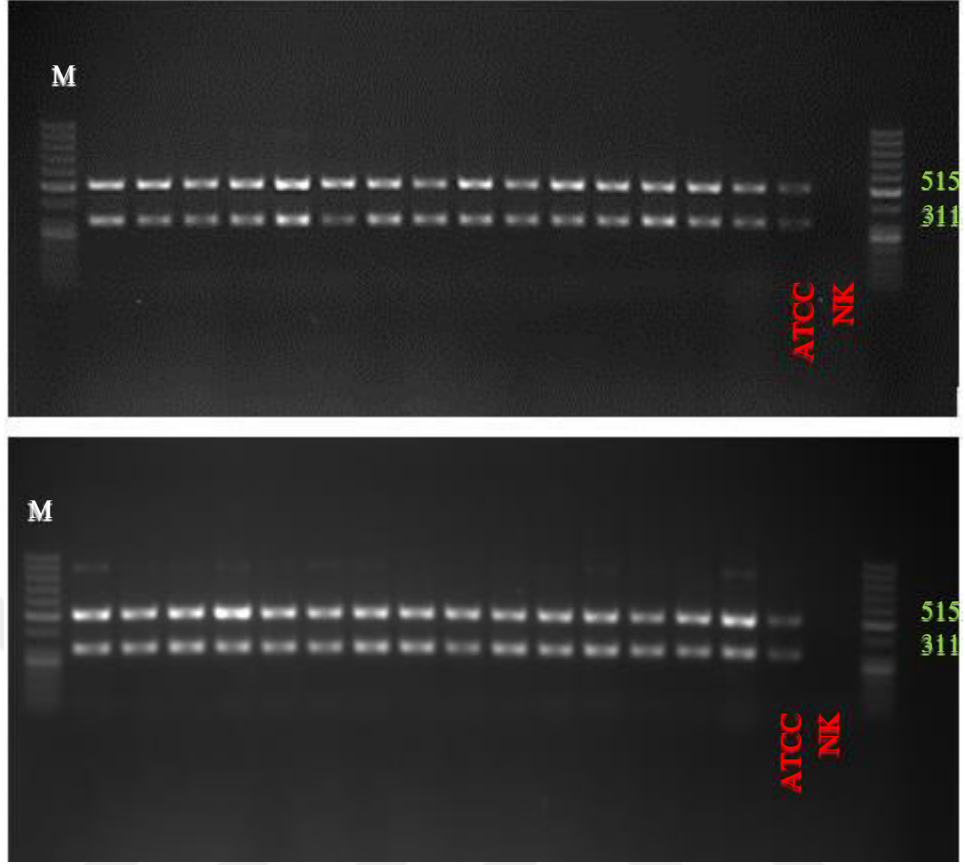
Şekil 13. Kan örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun *PLB1* ekspresyonu açısından *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen grafik

Çalışılmış her suş için normalize edilen *PLB1* sonuçlarının ATCC 90028 ile karşılaştırılması sonucuna göre;

- Suşların *PLB1* ekspresyon oranları değerlendirildiğinde; kan izolatlarında ATCC suşuna göre 0.52-1.05 kat daha fazla *PLB1* ekspresyonu gözlenmiştir.

4.2.1.2. Oral Kavite Örneklerinden Soyutlanan Suşlar- Oral Kavite İzolatları

Oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* suşlarına ait *PLB1* ve *ACT1* genlerine ait bant profillerini gösteren jel görüntüsü Şekil 14’de verilmiştir.

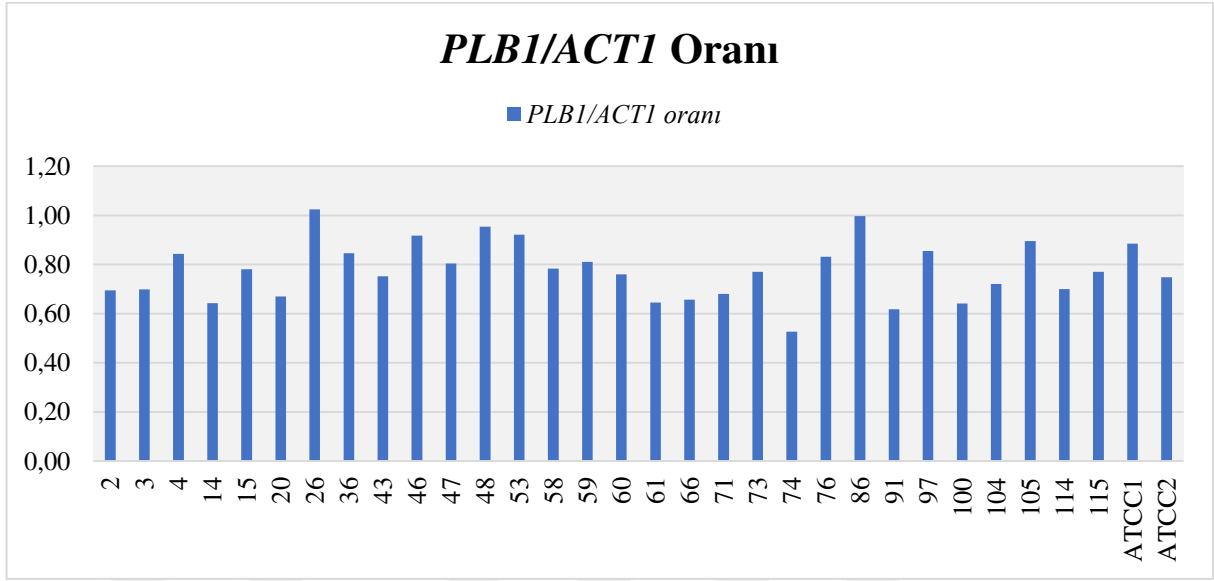


Şekil 14. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 suşun (üstteki ve alttaki) *PLB1* ve *ACT1* gen öncülleri kullanılarak uygulanan RT-PZT ürünlerinin agaroz jelde 110 V'da 60 dk. yürütüldükten sonra elde edilen görüntüleri. M: Marker (Fermentas SM0371-Generuler 50 bazçiftlik “DNA Ladder”), 515: *ACT1* öncülü, 311: *PLB1* öncülü, ATCC: Pozitif kontrol; 90028 suşu (“American Type Culture Collection”), NK: Negatif kontrol.

Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun tümünde (%100) RT-PZT yöntemi ile *PLB1* ekspresyonu saptandı. Jel görüntüsünden kantitasyonları yapılan suşların *PLB1* ve *ACT1* genleri için belirlenen sayısal değerleri ile *PLB1/ACT1* normalizasyon oranları Tablo 13’de, grafiklendirilmesi ise Şekil 15’de gösterilmiştir.

Tablo 13. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşuna ait *PLB1/ACT1* normalizasyon oranları

Suş No	Soyutlanan yer	<i>PLB1</i>	<i>ACT1</i>	<i>PLB1/ACT1</i> oranı
2	Oral kavite	824,23	1186,06	0,69
3	Oral kavite	809,23	1158,08	0,70
4	Oral kavite	1003,21	1189,14	0,84
14	Oral kavite	920,90	1433,68	0,64
15	Oral kavite	919,24	1177,96	0,78
20	Oral kavite	780,87	1164,80	0,67
26	Oral kavite	1086,24	1060,40	1,02
36	Oral kavite	939,73	1110,65	0,85
43	Oral kavite	786,18	1044,44	0,75
46	Oral kavite	891,19	970,48	0,92
47	Oral kavite	910,87	1133,21	0,80
48	Oral kavite	942,06	987,41	0,95
53	Oral kavite	753,67	817,60	0,92
58	Oral kavite	712,50	908,86	0,78
59	Oral kavite	859,23	1059,71	0,81
60	Oral kavite	554,10	729,00	0,76
61	Oral kavite	504,65	781,13	0,65
66	Oral kavite	457,48	695,98	0,66
71	Oral kavite	556,47	817,49	0,68
73	Oral kavite	796,44	1034,15	0,77
74	Oral kavite	391,19	741,88	0,53
76	Oral kavite	615,18	739,75	0,83
86	Oral kavite	560,48	562,21	1,00
91	Oral kavite	521,19	843,67	0,62
97	Oral kavite	495,06	579,08	0,85
100	Oral kavite	520,70	810,88	0,64
104	Oral kavite	492,68	683,22	0,72
105	Oral kavite	612,11	683,87	0,90
114	Oral kavite	468,87	669,41	0,70
115	Oral kavite	383,91	498,16	0,77
ATCC1	Oral kavite	396,56	448,22	0,88
ATCC2	Oral kavite	230,66	308,44	0,75



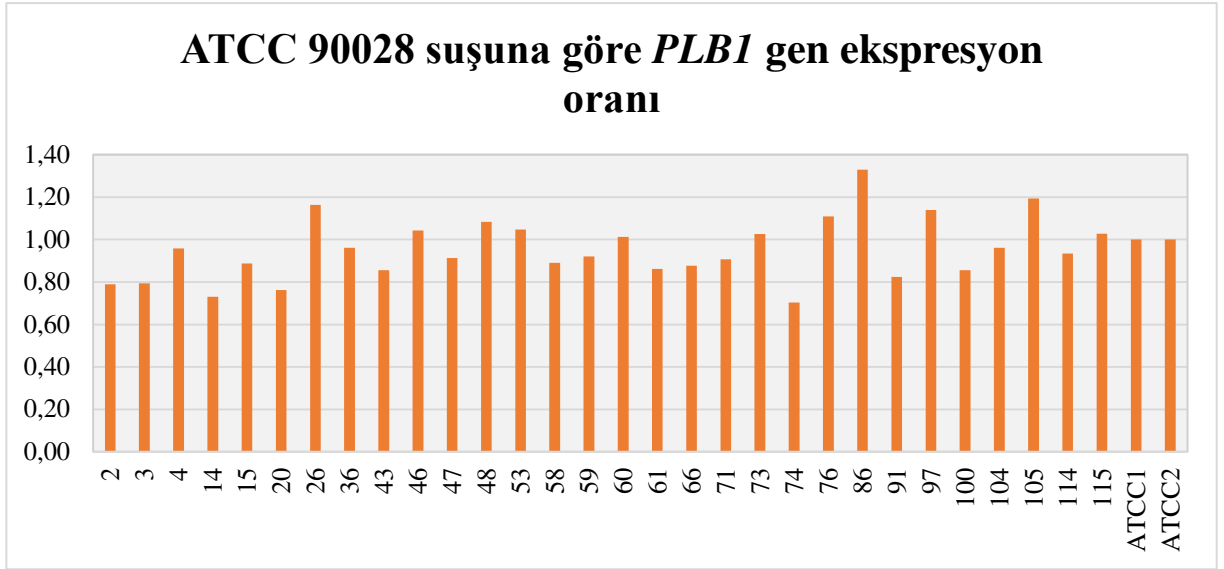
Şekil 15. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun *ACT1* ile normalizasyon sonrası oluşturulan grafiği

Çalışmaya alınan oral kavite örneklerinde *PLB1* geninin *ACT1* geni ile normalizasyonu sonucunda saptanan *PLB1/ACT1* değeri oral kavite izolatları için 0.53-1.02 değerleri arasında olup, ortalaması 0.77'dir.

Her bir suşun *ACT1* ile normalize edilmiş *PLB1* ekspresyon düzeylerinin *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılıp oranlanması sonucu oluşan değerler Tablo 14'de, bu değerlerden oluşturulan grafik ise Şekil 16'da gösterilmiştir.

Tablo 14. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun, *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen değerler

Suş No	Soyutlanan yer	ATCC 90028 suşuna göre <i>PLB1</i> gen ekspresyon oranı
2	Oral kavite	0,79
3	Oral kavite	0,79
4	Oral kavite	0,96
14	Oral kavite	0,73
15	Oral kavite	0,89
20	Oral kavite	0,76
26	Oral kavite	1,16
36	Oral kavite	0,96
43	Oral kavite	0,86
46	Oral kavite	1,04
47	Oral kavite	0,91
48	Oral kavite	1,08
53	Oral kavite	1,05
58	Oral kavite	0,89
59	Oral kavite	0,92
60	Oral kavite	1,01
61	Oral kavite	0,86
66	Oral kavite	0,88
71	Oral kavite	0,91
73	Oral kavite	1,03
74	Oral kavite	0,70
76	Oral kavite	1,11
86	Oral kavite	1,33
91	Oral kavite	0,82
97	Oral kavite	1,14
100	Oral kavite	0,86
104	Oral kavite	0,96
105	Oral kavite	1,19
114	Oral kavite	0,93
115	Oral kavite	1,03
ATCC1	Oral kavite	1
ATCC2	Oral kavite	1



Şekil 16. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun *PLB1* ekspresyonu açısından *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen grafik

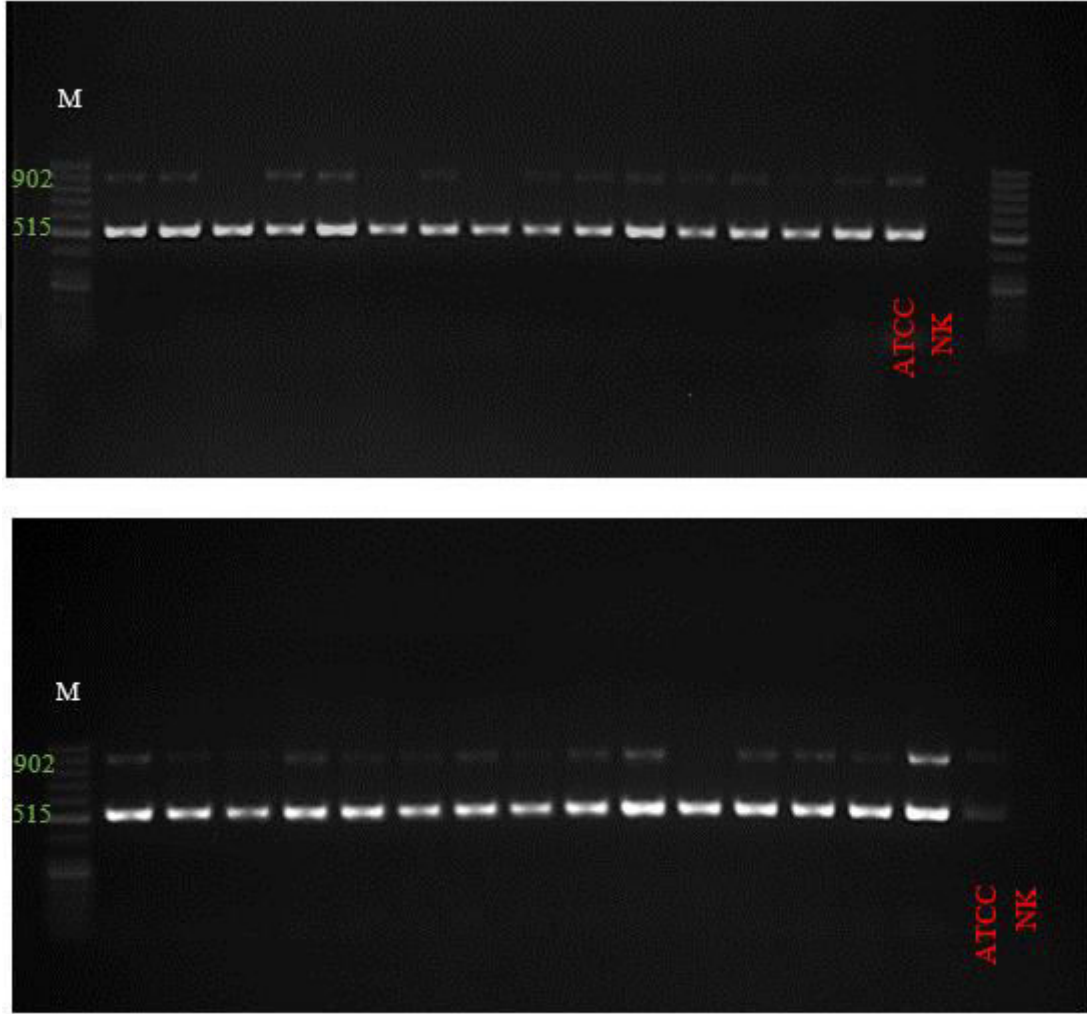
Çalışılmış her suş için normalize edilen *PLB1* sonuçlarının ATCC 90028 ile karşılaştırılması sonucuna göre;

- ✓ Oral kaviteden soyutlanan izolatlar ATCC suşuna göre 0.70-1.33 kat daha fazla *PLB1* ekspresyonu göstermiştir.
- ✓ Kan ve oral kavite izolatları arasında *PLB1* ekspresyon düzeyi açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($t=-0.307$; $p=0.760$).

4.2.2. *PLC1* Ekspresyon Düzeyleri

4.2.2.1. Kan Örneklerinden Soyutlanan Suşlar-Kan İzolatları

Kan örneklerinden soyutlanan *C. albicans* suşlarına ait *PLC1* ve *ACT1* genlerine ait bant profillerini gösteren jel görüntüsü Şekil 17.'de verilmiştir.



Şekil 17. Kan örneklerinden soyutlanan 30 suşun (üstteki ve alttaki) *PLC1* ve *ACT1* gen öncülleri kullanılarak uygulanan RT-PZT ürünlerinin agaroz jelde 110V'da 60 dk. yürütüldükten sonra elde edilen görüntüleri. M: Marker (Fermentas SM0371-Generuler 50 bazçiftlik "DNA Ladder"), 515: *ACT1* öncülü, 902: *PLC1* öncülü, ATCC: Pozitif kontrol; 90028 suşu ("American Type Culture Collection"), NK: Negatif kontrol.

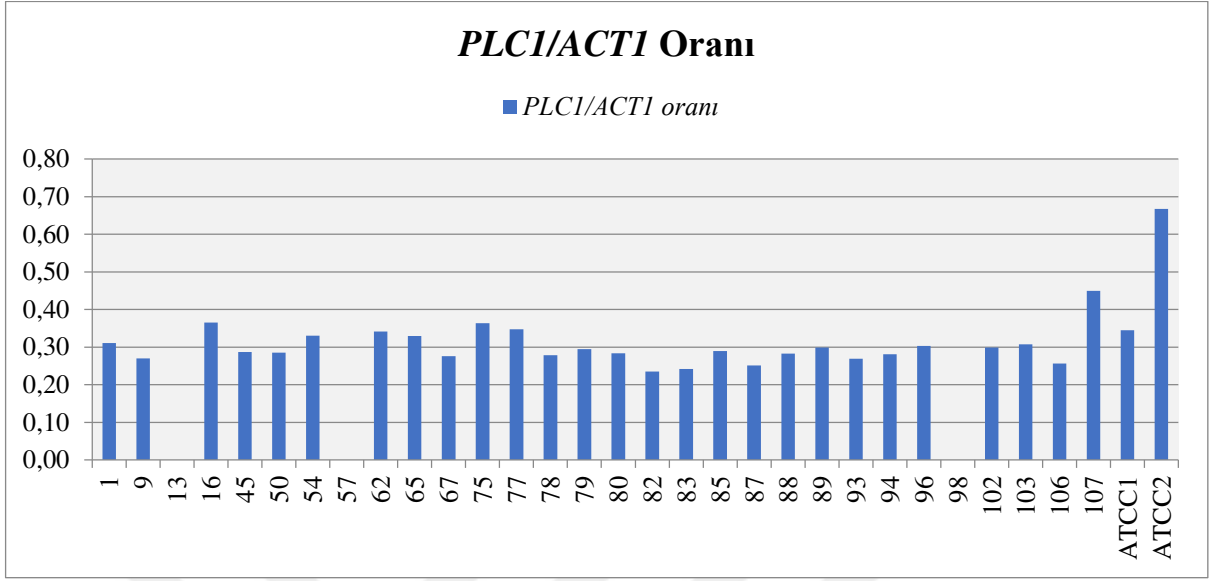
RT-PZT yöntemi ile kan örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun 27'sinde (%90) *PLC1* ekspresyonu saptandı. Jel görüntüsünden kantitasyonları yapılan suşların *PLC1*

ve *ACT1* genleri için belirlenen sayısal değerleri ile *PLC1/ACT1* normalizasyon oranları Tablo 15’de, grafiklendirilmesi ise Şekil 18’de gösterilmiştir.

Tablo 15. Kan örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşuna ait *PLC1/ACT1* normalizasyon oranları

Suş No	Soyutlanan yer	<i>PLC1</i>	<i>ACT1</i>	<i>PLC1/ACT1</i> oranı
1	Kan	370,82	1194,05	0,31
9	Kan	395,84	1467,34	0,27
13	Kan	*	1259,42	*
16	Kan	447,19	1223,89	0,37
45	Kan	455,60	1584,71	0,29
50	Kan	307,10	1077,43	0,29
54	Kan	368,77	1116,00	0,33
57	Kan	*	1114,04	*
62	Kan	335,37	982,11	0,34
65	Kan	350,82	1063,69	0,33
67	Kan	355,15	1286,28	0,28
75	Kan	323,74	891,09	0,36
77	Kan	342,95	986,45	0,35
78	Kan	266,42	955,00	0,28
79	Kan	295,57	1003,89	0,29
80	Kan	355,86	1255,61	0,28
82	Kan	256,22	1087,94	0,24
83	Kan	233,70	964,08	0,24
85	Kan	372,15	1284,71	0,29
87	Kan	304,78	1214,48	0,25
88	Kan	300,93	1062,99	0,28
89	Kan	355,23	1188,55	0,30
93	Kan	290,01	1076,51	0,27
94	Kan	361,99	1285,67	0,28
96	Kan	471,15	1554,08	0,30
98	Kan	*	1297,41	*
102	Kan	408,84	1366,29	0,30
103	Kan	382,15	1242,58	0,31
106	Kan	308,90	1205,55	0,26
107	Kan	701,66	1561,72	0,45
ATCC1	Kan	349,35	1011,88	0,35
ATCC2	Kan	251,73	377,21	0,67

**PLC1* ekspresyonu saptanmadı.



Şekil 18. Kan örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun *ACT1* ile normalizasyon sonrası oluşturulan grafiği

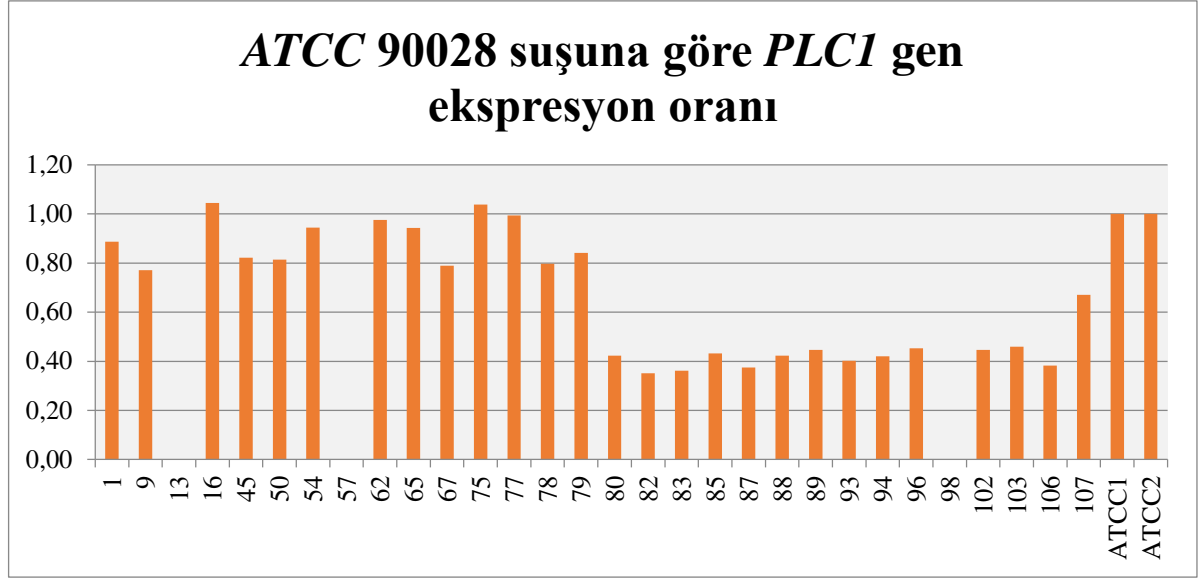
Çalışmaya alınan kan örneklerinde *PLC1* geninin *ACT1* geni ile normalizasyonu sonucunda saptanan *PLC1/ACT1* değeri kan izolatları için 0.24-0.45 değerleri arasında olup, ortalaması 0.30'dur.

Her suşun *ACT1* ile normalize edilmiş *PLC1* ekspresyon düzeylerinin *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılıp oranlanması sonucu elde edilen değerler Tablo 16'da, bu değerlerden oluşturulan grafik ise Şekil 19'da gösterilmiştir.

Tablo 16. Kan örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen değerler

Suş No	Soyutlanan yer	ATCC 90028 suşuna göre <i>PLC1</i> gen ekspresyon oranı
1	Kan	0,89
9	Kan	0,77
13	Kan	*
16	Kan	1,04
45	Kan	0,82
50	Kan	0,81
54	Kan	0,94
57	Kan	*
62	Kan	0,98
65	Kan	0,94
67	Kan	0,79
75	Kan	1,04
77	Kan	0,99
78	Kan	0,80
79	Kan	0,84
80	Kan	0,42
82	Kan	0,35
83	Kan	0,36
85	Kan	0,43
87	Kan	0,37
88	Kan	0,42
89	Kan	0,45
93	Kan	0,40
94	Kan	0,42
96	Kan	0,45
98	Kan	*
102	Kan	0,45
103	Kan	0,46
106	Kan	0,38
107	Kan	0,67
ATCC1	Kan	1
ATCC2	Kan	1

**PLC1* ekspresyonu saptanmadı.



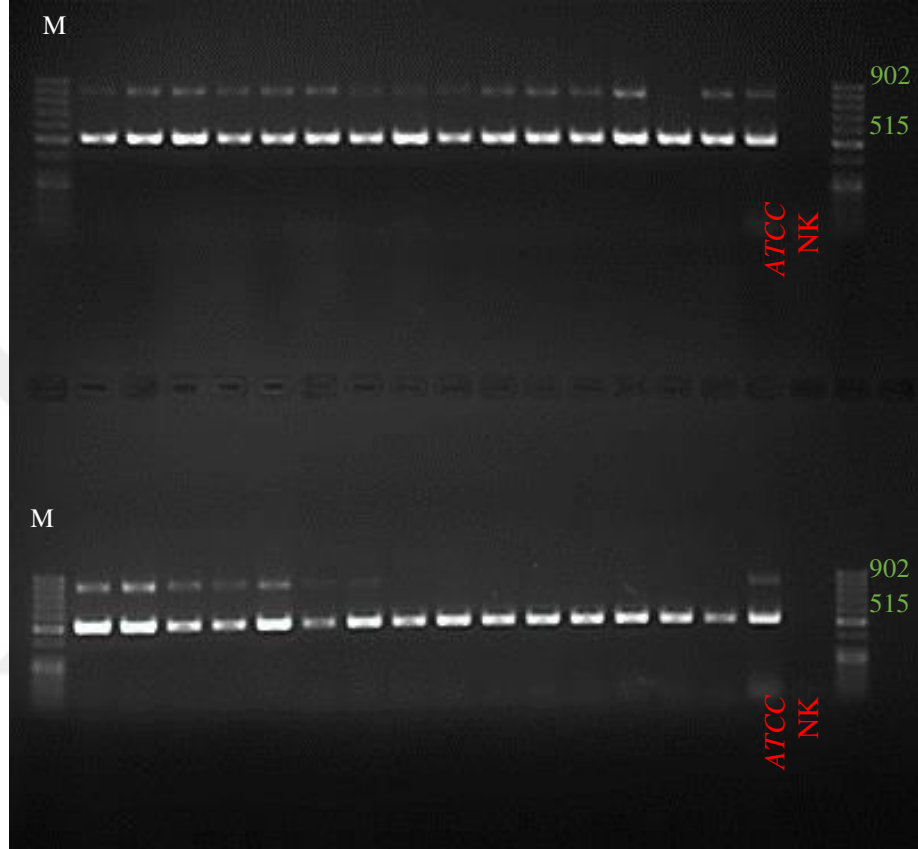
Şekil 19. Kan örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun *PLC1* ekspresyonu açısından *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen grafik

Çalışılmış her suş için normalize edilen *PLC1* sonuçlarının ATCC 90028 ile karşılaştırılması sonucuna göre;

- Kan izolatu suşların *PLC1* ekspresyonu ATCC suşuna göre 0.35-1.04 kat daha fazladır.

4.2.2.2. Oral Kavite Örneklerinden Soyutlanan Suşlar-Oral Kavite İzolatları

Oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* suşlarına ait *PLC1* ve *ACT1* genlerine ait bant profillerini gösteren jel görüntüsü Şekil 20’de verilmiştir.



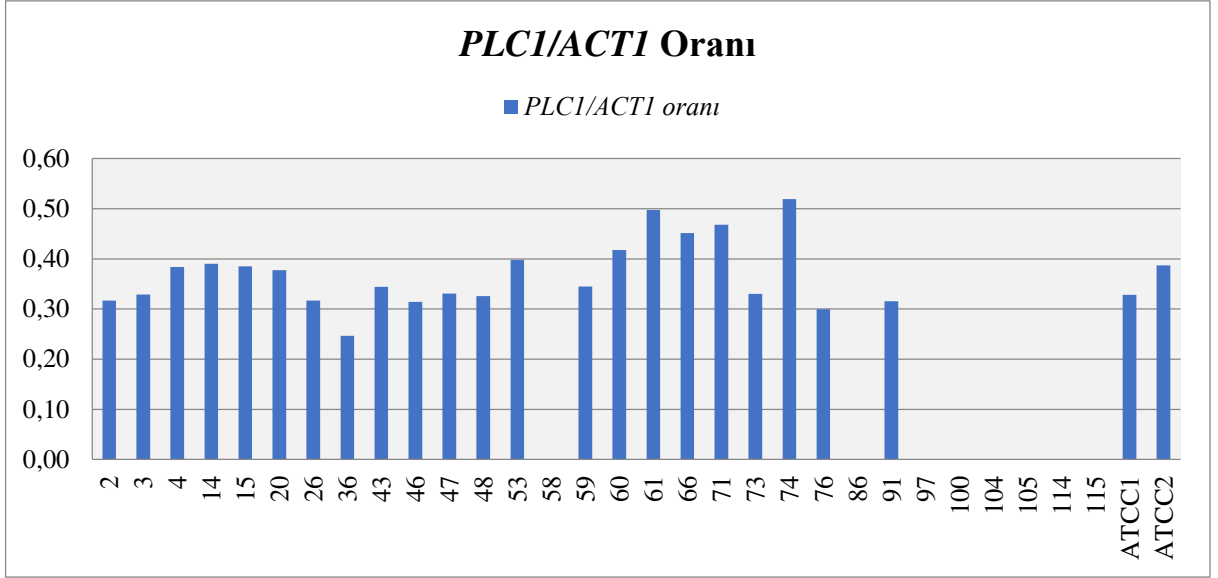
Şekil 20. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 suşun (üstteki ve alttaki) *PLC1* ve *ACT1* gen öncülleri kullanılarak uygulanan RT-PZT ürünlerinin agaroz jelde 110 V’da 60 dk. yürütüldükten sonra elde edilen görüntüsü. M: Marker (Fermentas SM0371-Generuler 50 bazçiftlik “DNA Ladder”), 515: *ACT1* primeri, 902: *PLC1* primeri, ATCC: Pozitif kontrol; 90028 suşu (“American Type Culture Collection”), NK: Negatif kontrol.

Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun 22’sinde (%73.3) RT-PZT yöntemi ile *PLC1* ekspresyonu saptandı. Jel görüntüsünden yapılan kantitasyon sonucunda çalışmaya alınan suşların *PLC1* ve *ACT1* genleri için saptanan sayısal değerler ile *PLC1/ACT1* normalizasyon oranları Tablo 17’de, grafiklendirilmesi ise Şekil 21’de gösterilmiştir.

Tablo 17. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşuna ait *PLC1/ACT1* normalizasyon oranları

Suş No	Soyutlanan yer	<i>PLC1</i>	<i>ACT1</i>	<i>PLC1/ACT1</i> oranı
2	Oral kavite	363,58	1147,07	0,32
3	Oral kavite	484,12	1472,30	0,33
4	Oral kavite	514,58	1340,45	0,38
14	Oral kavite	425,47	1090,69	0,39
15	Oral kavite	462,45	1201,13	0,39
20	Oral kavite	481,20	1274,26	0,38
26	Oral kavite	386,81	1220,48	0,32
36	Oral kavite	373,28	1513,23	0,25
43	Oral kavite	359,89	1045,44	0,34
46	Oral kavite	433,84	1379,25	0,31
47	Oral kavite	444,96	1346,15	0,33
48	Oral kavite	396,69	1217,16	0,33
53	Oral kavite	567,74	1427,85	0,40
58	Oral kavite	*	1363,27	*
59	Oral kavite	421,74	1223,77	0,34
60	Oral kavite	689,30	1651,62	0,42
61	Oral kavite	873,06	1754,19	0,50
66	Oral kavite	531,05	1176,61	0,45
71	Oral kavite	468,94	1001,36	0,47
73	Oral kavite	567,09	1717,74	0,33
74	Oral kavite	403,44	776,91	0,52
76	Oral kavite	409,37	1367,35	0,30
86	Oral kavite	*	990,69	*
91	Oral kavite	389,10	1234,13	0,32
97	Oral kavite	*	1153,70	*
100	Oral kavite	*	1273,18	*
104	Oral kavite	*	1143,95	*
105	Oral kavite	*	1360,66	*
114	Oral kavite	*	1047,30	*
115	Oral kavite	*	731,97	*
ATCC1	Oral kavite	354,85	1081,78	0,33
ATCC2	Oral kavite	381,04	984,50	0,39

**PLC1* ekspresyonu saptanmadı.



Şekil 21. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun *ACT1* ile normalizasyon sonrası oluşturulan grafiği

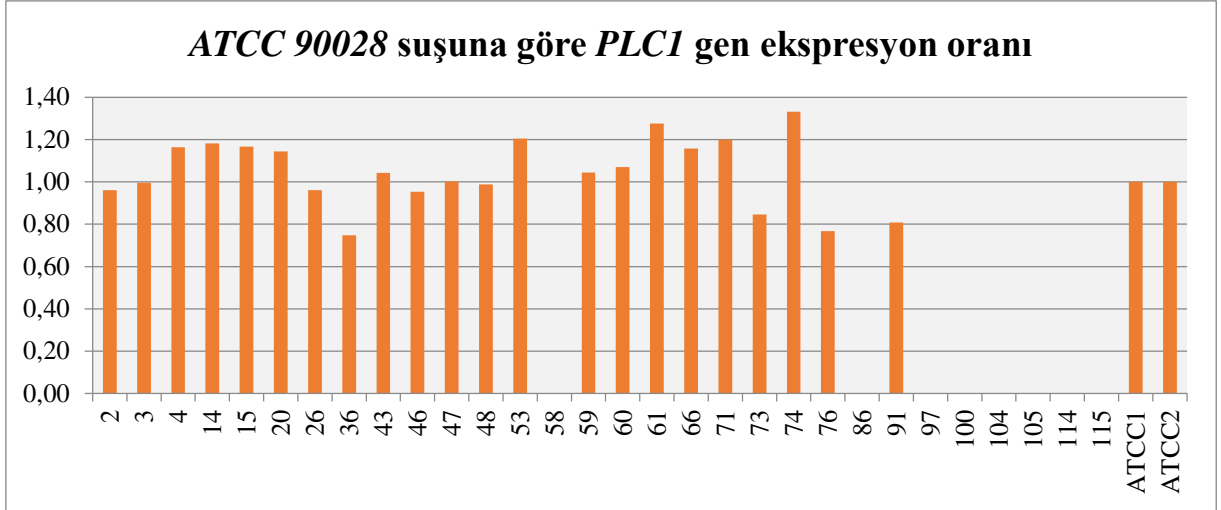
Çalışmaya alınan oral kavite örneklerinde *PLC1* geninin *ACT1* geni ile normalizasyonu sonucunda saptanan *PLC1/ACT1* değeri oral kavite izolatları için 0.25-0.52 değerleri arasında olup, ortalaması 0.37'dir.

Her suşun *ACT1* ile normalize edilmiş *PLC1* ekspresyon düzeylerinin *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılıp oranlanması sonucu oluşan değerler Tablo 18'de, bu değerlerden oluşturulan grafik ise Şekil 22'de gösterilmiştir.

Tablo 18. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen değerler

Suş No	Soyutlanan yer	ATCC 90028 suşuna göre <i>PLC1</i> gen ekspresyon oranı
2	Oral kavite	0,96
3	Oral kavite	1,00
4	Oral kavite	1,16
14	Oral kavite	1,18
15	Oral kavite	1,17
20	Oral kavite	1,14
26	Oral kavite	0,96
36	Oral kavite	0,75
43	Oral kavite	1,04
46	Oral kavite	0,95
47	Oral kavite	1,00
48	Oral kavite	0,99
53	Oral kavite	1,20
58	Oral kavite	*
59	Oral kavite	1,04
60	Oral kavite	1,07
61	Oral kavite	1,28
66	Oral kavite	1,16
71	Oral kavite	1,20
73	Oral kavite	0,85
74	Oral kavite	1,33
76	Oral kavite	0,77
86	Oral kavite	*
91	Oral kavite	0,81
97	Oral kavite	*
100	Oral kavite	*
104	Oral kavite	*
105	Oral kavite	*
114	Oral kavite	*
115	Oral kavite	*
ATCC1	Oral kavite	1
ATCC2	Oral kavite	1

**PLC1* ekspresyonu saptanmadı.



Şekil 22. Oral kavite örneklerinden soyutlanan 30 *C. albicans* suşunun *PLC1* ekspresyonu açısından *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılması ile elde edilen grafik

Çalışılmış her suş için normalize edilen *PLC1* sonuçlarının ATCC 90028 ile karşılaştırılması sonucuna göre;

- Suşların *PLC1* ekspresyon oranları değerlendirildiğinde oral kavite izolatlarında ATCC suşuna göre 0.75-1.33 kat *PLC1* ekspresyonu gözlenmiştir.
- ✓ İstatiksel olarak incelendiğinde, *PLC1* ekspresyon düzeyi oral kavite izolatlarında, kan izolatlarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Mann Whitney U=103.500; p=0.000).
- ✓ RT-PZT ile belirlenen *PLB1* ekspresyonunun fenotipik plak yöntemi ile %100, *PLC1* ekspresyonunun ise %71.6 uyumlu olduğu saptandı.
- ✓ Pz değerleri ile *PLB1* ve *PLC1* ekspresyon değerleri arasında korelasyon gözlenmedi (sırasıyla p=0.602; p=0.241).

5. TARTIŞMA

Fungal patojenler, deri ve mukozal enfeksiyonlardan hayatı tehdit edebilecek sistemik enfeksiyonlara kadar geniş bir aralıkta çeşitli hastalık tablolarına neden olabilmektedir. *Candida* türlerinin neden olduğu sistemik hastalıklardaki ölüm oranının %40'tan fazla olduğu bildirilmiştir (218,219,220,221). Bu türler arasında *C. albicans* morfolojik değişimler, canlı ve cansız ortamda üreyebilme özelliği ve virulans faktörlerinin çokluğundan dolayı en çok hastalığa neden olan etken olarak görülmektedir (222).

Kandidoz tablosu, konak ve maya ile ilişkili faktörlerin etkileşimi sonucu oluşmaktadır. *Candida* türleri, adezyon, mukoz membranlar ve organlara kolonizasyon, genotipik ve fenotipik varyasyonlar, 39°C ve 42°C'de üreyebilme, ekzoenzimleri ile konak savunmasından kaçarak enfeksiyonu başlatabilme özellikleri nedeniyle geniş çapta hastalık oluşturma potansiyeli göstermektedir (223). *Candida* türlerinin virulans faktörlerinden üzerinde en çok çalışılan enzimlerden biri olan fosfolipaz enzimi; hücre membranlarının yapısını ve bütünlüğünü bozarak lipidlerin serbest kalması ile mantarın konak hücreye girişini sağlar. Bunun yanında bu enzimler, *C. albicans* hücrelerinin konak hücre membranlarına adhere olarak epitel hücrelerine penetrasyonu ve ardından enfeksiyonu başlatmaktadır. Bu nedenle *C. albicans* için önemli bir virulans faktörü kabul edilen fosfolipaz enziminin varlığının araştırılması patogeneizde büyük önem taşımaktadır.

Kandidal fosfolipazı belirlemek için, Odds ve Abbott, basit bir yöntem geliştirmiş ve biyokimyasal bir yöntem ile *C. albicans* suşlarında intrasellüler fosfolipaz A ve lizofosfolipaz aktivitelerini göstermiştir. Bu yöntem, fosfotidilkolin (PC), lizofosfotidikoline hidrolize olması ilkesine dayanmakta olup, fazla sayıda örnek ile çalışılmasına olanak vermediği ve çok zaman alıcı olduğu için kullanışlı olmamıştır (224). Price ve ark. bu olumsuz özellikleri ortadan kaldıracak plak yöntemini geliştirmiştir. Özellikle fosfotidilkolin ve fosfatidiletanolamin fosfolipitlerini içeren yumurta sarısını Sabouraud dekstroza agar besiyerine eklemiştir. Fosfolipaz pozitif *Candida* izolatları, bu ortamda sınırları belli, koloni etrafında beyaz presipitasyon zonu oluşturur. Bu zon yumurta sarısında bulunan fosfolipitlerin, fosfolipaz enzimi ile yağ asitlerinin serbest kalarak kalsiyum ile kompleks oluşturmasından kaynaklanmaktadır (214,225). Bu yöntem, *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans* gibi fosfolipaz aktivitesine sahip funguslar için kullanılan bir yöntem olmuştur. Düşük fosfolipaz aktivitesi gösteren fungal izolatlar için plak yöntemi yeterli olmayıp,

fosfolipaz enzimini kodlayan genlerden yoksun suşların varlığı da söz konusu olduğundan çalışmalar moleküler yöntemler ile desteklenmelidir.

Çalışmamızda bu bilgiler ışığında kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* suşlarının fosfolipaz aktivitesi yumurta sarılı agarın kullanıldığı plak yöntemi ile incelenmiş, daha sonra moleküler olarak RT-PZT yöntemi ile fosfolipaz enzimini kodlayan gen bölgeleri araştırılmıştır.

Candida türleri kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan dördüncü etken olarak rapor edilmiştir (226). YBÜ'lerde yatan hastalarda görülen fungal enfeksiyonlardan yoğun olarak *Candida* türlerinin sorumlu olduğu ve önemli sağlık hizmeti giderlerine neden olduğu bilinmektedir (218,227,228). On beş *Candida* türünün insanlar için önemli patojenler olduğu, rapor edilen invaziv kandidoz vakalarının %90'ından *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. tropicalis* türlerinin sorumlu olduğu bildirilmiştir (229,230). İntravenöz kateter takılan hastaların %40'ında gizli kandideminin geliştiği ve bu hastalarda görülen mortalite oranının %41 olduğu belirtilmiştir (231). Kandidemi vakalarında en sık izole edilen dördüncü patojen olması nedeni ile *C. albicans*'ın virulans faktörlerinden biri olan fosfolipaz aktivitesi ile ilgili yoğun araştırmalar söz konusudur (232). Fosfolipaz enzimi konak hücre membranlarında bulunan fosfolipit yapılarını parçalayarak penetrasyon, adezyon ve bu sürecin takibinde patogeneze yardımcı olan önemli bir virulans faktörüdür (215,216). *Candida* türleri açısından büyük önem taşıyan fosfolipaz enzimleri, fosfolipit molekülünde kestiği bağa göre adlandırılmakta olup; fosfolipaz B, fosfolipit ve lizofosfolipit moleküllerinin 1. ve 2. pozisyonundaki yağ asitlerini serbest bırakır, serbest kalan yağ asitlerini lizofosfolipitlere aktararak fosfolipit üretir. Fosfolipaz C ise fosfotidilkolindeki karbon-fosfat bağlarını hidrolize eder, hücre içi sinyal iletimini regüle eden serbest fosforilkolin ve diaçilgliserol (DAG) oluşumunu sağlar (78,79).

Çalışmamızda 30 kan kökenli *C. albicans* suşunun %86.7'sinde fosfolipaz aktivitesi saptanmış, Pz değerleri 0.42-1.00 arasında, Pz ortalaması ise 0.6138 ± 0.9823 olarak bulunmuştur.

Mattei ve ark., 153 kan örneğinden 120'sinde *C. albicans* soyutlamış ve bu suşların %78'inde fosfolipaz aktivitesi saptamış olup, Pz değerlerini 0.48-1.00 arasında, Pz ortalamalarını ise 0.79 olarak belirlemiştir (233). Tay ve ark. yaptıkları bir çalışmada 15 kan kökenli *C. albicans* suşunun %73.3'ünde fosfolipaz aktivitesi belirlemiş, Pz ortalamalarını da

0.805±0.201 olarak saptamıştır (234). De Luca ve ark. genel cerrahi, YBÜ, onkoloji ve gastroenteroloji birimlerinde sıklıkla kateter ile ilişkili kandidemi olgularının görüldüğünü belirtmiş ve bu birimlerden aldıkları kan örneklerinde en sık izole edilen türün *C. albicans* olduğunu (%48) ve bu suşların tümünde (%100) fosfolipaz aktivitesi saptandığını bildirmiştir (235). Atalay ve ark.'nın araştırmasında YBÜ, tıbbi bakım üniteleri ve ameliyathanelerden elde edilen 50 *Candida* izolatının %34'ünün *C. albicans* olduğu ve bu suşların %88.2'sinde fosfolipaz aktivitesi görüldüğü belirtilmiştir (236).

Mohan ve ark. YBÜ, diyaliz ve onkoloji servislerinden elde ettikleri 114 *Candida* izolatından 37'sinin *C. albicans* olduğunu ve bu suşların %32.45'inin fosfolipaz aktivitesi gösterdiğini bildirmiştir. Suşların Pz değerleri 0.23-1.00 arasında, Pz ortalamaları ise 0.66±0.34 bulunmuştur (237). Gökçe ve ark. tarafından Marmara Üniversitesi Hastanesi'nde gerçekleştirilen kandidemi çalışmasında kan örneklerinden izole edilen 68 *C. albicans* suşunun 41'inde (%60.3) fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır (238). Vieira de Melo ve ark. kandidemi vakalarından soyutladıkları suşların %34.3'ünün *C. albicans* olduğunu ve bu suşların tümünün (%100) fosfolipaz aktivitesi gösterdiğini saptamıştır (239).

Çerikçioğlu ve ark.'nın yenidoğanlarda yaptıkları bir çalışmada *Candida* kolonizasyonunun uzun süre devamlılığında güçlü hidrolitik enzimlerinin bulunmasının yenidoğan bebeklerde kandideminin gelişimini tetiklediği gösterilmiştir. Altmışbeş kolonize yenidoğandan alınan kan örneklerinin sonucuna göre, rektal kökenli *C. albicans* kaynaklı kandidemi olgusunun %6.2 oranında görüldüğü ve bu suşlarda fosfolipaz aktivitesinin saptandığı (Pz değeri 0.70-0.79) bildirilmiştir (240). Pandey ve ark. yenidoğan servisinin de dahil olduğu YBÜ'de yatan hastalardan elde ettikleri kan örneklerinden soyutlanan 79 *Candida* izolatından 16'sının (%68.75) *C. albicans*, Pz değerlerinin 0.28-1.00 arasında, Pz ortalamasının ise 0.5956±0.3061 olduğunu bildirmiştir (241). Gültekin ve ark. tarafından Adnan Menderes Üniversitesi Hastanesi'nde gerçekleştirilen çalışmadaki kan örneklerinden 46 *Candida* izolatı soyutlanmış, bunların 17'sinin (%37) *C. albicans* olduğu ve bu suşların tümünde fosfolipaz aktivitesi saptandığı, Pz ortalamalarının ise 0.690±0.840 olduğu belirlenmiştir (242). Yücesoy ve Yuluğ'un Dokuz Eylül Üniversitesi'nde yaptıkları bir çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 175 *C. albicans* suşunun 120'sinde (%68.6) fosfolipaz aktivitesi saptanmış, ortalama Pz değeri ise 0.702±0.112 olarak belirtilmiştir (243).

Çalışmamızda kan kökenli suşlar için elde ettiğimiz fosfolipaz olumluluk oranı (%86.7) bazı çalışmalardan yüksek (214,233, 234, 237, 238, 241, 243), bazılarında ise düşüktür (235, 236, 239, 240, 242). Karşılaştırdığımız çalışmalardaki suşların fosfolipaz aktivitelerinin farklı bulunmasının nedeni kateter gibi predispozan faktörlerin varlığına bakılarak çalışma gruplarının oluşturulması, özellikle YBÜ, yenidoğan üniteleri, acil servislerde yatan hasta örneklerinin çalışmaya dahil edilmesi ve gruplardaki hastaların klinik tabloları olabilir. Araştırmamıza alınan suşların soyutlandığı hastaların predispozan faktörleri bilinmemektedir.

Travmatik olaylar, yetersiz oral ve protez hijyeni, ağız kuruluğu, sistemik hastalıklar, diyabet, immün yetersizlik ve yetersiz beslenme gibi faktörler oral kolonizasyonunun oral kandidoza dönüşümünü etkileyen predispozan faktörlerdir (244). Yapılan çalışmalarda diyabet, kortikosteroid gibi immün sistemi baskılayıcı tedaviler, HIV enfeksiyonu, protez diş kullanımı gibi durumların *C. albicans*'ın oral kolonizasyonunu ya da oral kandidoz oluşumu arasındaki dönüşümü belirleyen faktörler olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda 30 oral kavite kökenli *C. albicans* suşunun 24'ünde (%80) fosfolipaz aktivitesi saptanmış, Pz değerleri 0.51-1.00 arasında, Pz ortalamaları ise 0.6988 ± 0.9910 şeklinde bulunmuştur.

Marcos-Arias ve ark'nın yaptığı bir çalışmada, takma diş kullanan kişilerde protez diş enfeksiyonuna neden olan etkenlerin virulans faktörü olarak fosfolipaz aktivitesi araştırılmıştır. Protez diş enfeksiyonlu hastaların mukoza ve takma dişlerinden elde edilen 152 izolatın 101'ini *C. albicans* suşlarının oluşturduğu ve suşların %97'sinde fosfolipaz aktivitesi gözlemlendiği belirtilmiştir. Çalışmada bu tablolarda en sık etkenin *C. albicans* olduğu ($P=0.0016$) ve bu suşların kommensal suşlara göre daha fazla fosfolipaz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir ($P=0.0213$) (245). Protez diş ve oral protez kullanan kanserli hastalarda yapılan bir diğer çalışmada oral kavite örneklerinden sıklıkla soyutlanan türün *C. albicans* olduğu ve fosfolipaz aktivitesi gösteren suşların sayısının (sırasıyla %85 ve %57.14) kommensal suşlara göre belirgin (%25) olarak yüksek olduğu bulunmuştur. Özellikle takma diş kullanan kişilerden izole edilen suşlarda fosfolipaz üretimi ($p<0.01$) ve adherans yeteneği ($p=0.01$), kommensal suşlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuş, bu durumun oral kandidoz gelişimini tetiklediği düşünülmüştür (246).

Sanita ve ark., oral kandidoz enfeksiyonu olan diyabetik (DH), diyabetik olmayan hastalar (DOH) ve sağlıklı bireylerin (SB) oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* suşlarında sırası ile %59.4, %82.8 ve %67.3'ünde fosfolipaz aktivitesi saptamıştır. Bu

grupların Pz ortalamaları ise sırası ile 0.70-0.99 (0.8632±0.093), 0.67±0.99 (0.8385±0.088) ve 0.71-0.99 (0.9236±0.065) şeklindedir. (247). SB grubu, DOH ve DH gruplarına göre yüksek fosfolipaz aktivitesi göstermiştir (P=0.0250; P<0.001). Diyabet hastalarının kan ve tükürüklerinde glukoz seviyesi yüksek oranda bulunmakta olup, galaktoz ve sukroz konsantrasyonlarının yüksek olduğu ortamlarda *Candida* türlerinin fosfolipaz ekspresyonu baskılanmaktadır (248,249). Bu nedenle bu çalışmada DH grubunun fosfolipaz aktiviteleri, DOH grubuna göre düşük çıkmıştır. Tsang ve ark. tarafından yürütülen bir başka çalışma bu durumu destekler nitelikte olup diyabet hastaları ve kontrol grubundan aldıkları oral kavite suşlarının fosfolipaz ortalamaları sırası ile 0.776±0.050 (0.68-0.89) ve 0.794±0.060 (0.65-0.89) olarak saptanmıştır. Buna karşın kontrol grubundan izole edilen *C. albicans* suşlarının %23.80'i, diyabet hastalarından soyutlanan *C. albicans* suşlarının %36.19'u fosfolipaz aktivitesi göstermiştir (250). Ayrıca enzimatik aktivite ile bukkal epitel hücrelere adherans, biyofilm oluşumu ve protez diş stomatiti arasında pozitif korelasyon olduğu rapor edilmiştir (251).

HIV ve kanser gibi immün sistem baskılayıcı enfeksiyon durumu oral kandidoz gelişimini tetiklemektedir. Kumar ve ark. HIV pozitif ve kanserli hastaların oral mukozalarından izole ettikleri suşlarda %100 oranında fosfolipaz aktivitesi saptamıştır (252). Koga ve ark. da HIV'li olguların oral kavite örneklerini inceledikleri çalışmalarında, HIV ile enfekte olma durumunun suşlarda fosfolipaz üretimini arttırdığını vurgulamıştır (253). Kandidemide olduğu gibi oral kandidoz enfeksiyonunu destekleyen predispozan faktörlerin bulunması fırsatçı *C. albicans*'ın patojen durumuna geçişini hızlandırmakta ve fosfolipaz gibi virulans faktörünün aktivasyonunu arttırmaktadır.

Araştırmamızdaki oral kavite kökenli suşların fosfolipaz aktiviteleri Mothibe ve ark. (246) ile Sanita ve ark. (247) sonuçları ile paralel doğrultuda olup Costa ve ark. (254), Price ve ark. (214), Öksüz ve ark. (255), Yücesoy ve ark.'nın (243) sonuçlarına göre yüksek, Marcos-Arias ve ark. (245), Mandelblat ve ark. (256) ile Kumar ve ark.'nın (252) çalışmalarına göre düşük bulunmuştur. Marcos-Arias ve ark. ile Mandelblat ve ark.'nın çalışmaya aldıkları hastaların predispozan faktörlerinin (protez diş; hemodiyaliz, karın ameliyatı, parenteral beslenme) bulunması ve gruplardaki hasta sayılarının bizimkilere göre fazla olması çalışmaya dahil ettikleri suşlardaki yüksek fosfolipaz aktivitesini açıklayabilir. Kumar ve ark.'nın elde ettiği yüksek fosfolipaz oranı, oral kavite çalışma grubunun fosfolipaz aktivitesini arttırdığı bilinen HIV enfeksiyonlu olgulardan oluşmasından kaynaklanmış

olabilir. Bunun yanında, bizim suşlarımızın sadece kan ve oral kavite izolatlarından oluşması tüm klinik örnek izolatlarıyla çalışan araştırma sonuçlarına göre daha yüksek çıkmasını açıklayabilir.

Çalışmamızda kan örneklerinden izole edilen *C. albicans* suşlarında (%86.7), oral kavite örneklerinden soyutlanan suşlara göre (%80) yüksek fosfolipaz aktivitesi saptanmış, bu oranlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($\chi^2=0.48$, $p=0.49$). Ortalama Pz değeri oral kavite örneklerinde 0.6988 ± 0.9910 iken, kan örneklerinde bu oran 0.6138 ± 0.9823 olup, oral kavite örneklerindeki bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Mann Whitney $U=173.500$; $P=0.007$).

Costa ve ark. oral kavite, kan ve kateter örneklerinden soyutladıkları 59 *C. albicans* suşunun 52'sinde (%55.9), gruplarda sırası ile %77.4, %46.6 ve %15.4 oranında fosfolipaz aktivitesi saptamıştır (254). Price ve ark. kan, yara ve idrar örneklerinden sağladıkları *C. albicans* suşlarında plak yöntemi ile sırasıyla %55, %50 ve %30 oranlarında fosfolipaz aktivitesi bulmuştur. Kan izolatlarının, yara ve idrar suşlarına göre daha fazla fosfolipaz aktivitesi gösterdiği izlenmektedir (214). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, kan izolatları (%86.7), oral kavite kökenlerine (%80) göre daha fazla fosfolipaz pozitifliği göstermiştir.

AIDS'li hastalarda immün sistemin baskılanması ile en sık oral kandidoz görülmekte olup, ağız ve özefagiya tutulumunun birlikteliği sıklıkla izlenmektedir. CD4+ lenfosit sayısı <500 hücre/mm olduğu durumda orofarengeal kandidoz, CD4+ hücre sayısının <100 hücre/mm olduğu zamanlarda ise özefagiya kandidoz görülme sıklığı artmaktadır (257,258).

Costa ve ark.'nın HIV'li bireylerden elde ettikleri 24 oral kavite ve 7 kan izolatında plak yöntemi ile sırasıyla %77.4 ve %46.6 oranlarında fosfolipaz pozitifliği saptanmıştır. Bu çalışmada oral kavite izolatlarındaki fosfolipaz olumluluk oranı, kan ve kateter suşlarına göre anlamlı derecede yüksektir ($p=0.003$). Aynı çalışmada *C. albicans* suşlarının izole edildikleri yer ile fosfolipaz olumlulukları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (254). Ek olarak Öksüz ve ark. ile Kantarcıoğlu-Yücel'in yaptıkları çalışmada da sağlıklı bireylerin farklı anatomik bölgelerinden soyutlanan *C. albicans* suşları ile fosfolipaz aktiviteleri arasında anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir (255,259). Öksüz ve ark. alt solunum yolları, ürogenital bölge, deri, oral kavite ve fekal örneklerden izole ettikleri *C. albicans* suşlarının %53.08'inde fosfolipaz aktivitesi saptanmış, en fazla fosfolipaz aktivitesi gösteren grubun oral kavite (%59) olduğunu belirtmiştir (255). Kantarcıoğlu ve ark.'nın oral kavite, solunum yolu, ürogenital

sistem ve kandan elde ettikleri *C. albicans* suşlarının %93.3'ünde fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır (259). Yücesoy ve ark. solunum yolu örnekleri, oral/dil sürüntüsü, kan/kateter, idrar, yara ve vajinal sıvı örneklerinden soyutladıkları *C. albicans* suşlarının fosfolipaz aktivitelerini incelemişler, gruplarda sırasıyla %61.3 (0.71), %78.6 (0.68), %68.4 (0.74), %66.7 (0.70), %53.3 (0.66) ve %72.7 (0.79) oranında fosfolipaz aktivitesi belirlemişlerdir. Suşların izole edildikleri bölge ile fosfolipaz aktiviteleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($\chi^2=3.6$; $p=0.61$) (243). Bizim çalışmamızda da elde edilen bu araştırmalara benzer şekilde, suşların izole edildikleri yer ile fosfolipaz olumluluk oranları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Mandelblat ve ark. sistemik ve mukozal örneklerden soyutladıkları *C. albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitelerini incelemiş, sistemik örneklerin %100'ünde pozitiflik saptamış olup, Pz değerlerini 0.37-0.86 arasında, ortalamasını ise 0.548 ± 0.1478 şeklinde belirlemiştir. Mukozal kökenlerin %90'ında pozitiflik görülmüş olup, Pz değerleri 0.44-1.00, ortalaması ise 0.629 ± 0.1468 olarak saptanmıştır. Sistemik ve mukozal örneklerin fosfolipaz olumlulukları arasında anlamlı bir fark belirlenmiş ($P=0.039$), sistemik örneklerde daha fazla fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır (256). İbrahim ve ark. tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada kan kültürü ve sağlıklı bireylerin oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* suşlarının fosfolipaz aktiviteleri araştırılmış ve kan kültürü izolatlarının kommensal suşlara göre daha fazla ekstrasellüler fosfolipaz aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir. Aynı çalışmada virulans seviyeleri farklı olan iki *C. albicans* izolatının yeni doğan fare modelinde fosfolipaz salgılama yetenekleri incelenmiş; invazif suşun, invazif olmayan suşa göre daha fazla ekstrasellüler fosfolipaz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (4). Costa ve ark. HIV enfekte bireylerin oral kavite ve YBÜ'de yatan hastaların kateter ve kan örneklerinden soyutladıkları *C. albicans* suşlarının fosfolipaz aktivitelerini araştırmış, oral kavite örneklerinden elde edilen suşların (%77.4), kan (%46.6) ve kateter (%15.4) örneklerinden soyutlananlara göre daha fazla fosfolipaz aktivitesi gösterdiğini saptamıştır ($P=0.003$) (254).

Kan kökenli suşlarımız, oral kavite suşlarına göre fosfolipaz olumluluk oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen ($\chi^2=0.48$; $p=0.49$) daha yüksektir. Bu bulgumuz İbrahim ve ark. (4), Mandelblat ve ark. (256) ile paralel doğrultuda olup, Costa ve ark. (254) ile farklılık göstermektedir. Bu farklılık, Costa ve ark.'nın HIV pozitif bireylerin oral kavite örneklerinden soyutlanan suşlarda fosfolipaz aktivitelerini araştırmasından kaynaklanabilir.

HIV ile enfekte bireylerin oral kavite suşlarının daha fazla fosfolipaz ürettiği ve epitel hücrelerine daha fazla adhere olduğu bildirilmiştir (254,256,260).

Günümüzde mantar suşlarında fosfolipaz aktivitesinin saptanması için sadece yumurta sarılı agarın kullanıldığı plak yöntemi yeterli olmamaktadır. Fosfolipaz üreten suşlar, bu ortamda çok iyi ürerken, çok az üreten suşlar plak yöntemi ile saptanamayabilmektedir. Daha hassas ve duyarlı bir yöntem ile, tercihen moleküler düzeyde fosfolipaz varlığının araştırılması gerekmektedir. Bu amaçla çalışmamızda *C. albicans* suşlarında en sık saptanan fosfolipaz enzimlerini kodlayan *PLB1* ve *PLC1* genlerinin varlığı RT- PZT yöntemi ile incelenmiştir (215,216).

Araştırmamız öncesinde *PLB1*, *PLC1* ve *ACT1* öncül setlerinin birarada çalışıldığı multipleks PZT ile yapılan preliminar çalışmalarda, standardizasyon ve jelde görüntülenen bantların kantitasyonlarında sorunlar ile karşılaşılması nedeni ile *PLB1* ve *PLC1* öncülleri ile internal kontrol geni olan *ACT1* geni öncüllerinin kullanıldığı iki ayrı RT-PZT çalışması gerçekleştirildi.

Samaranayake ve ark. plak yöntemi ile HIV pozitif bireylerin oral kavite örneklerinden izole ettikleri *C. albicans* suşların %80'inde fosfolipaz aktivitesi saptamıştır. Ayrıca çalışmada plak yöntemi ile fosfolipaz aktivitesi olumlu ve olumsuz olarak saptanan *C. albicans* suşlarında fosfolipaz üretiminden sorumlu *PLB1* geninin varlığını RT-PZT yöntemi ile araştırmıştır. Plak yöntemi ile fosfolipaz aktivitesi saptanan suşların tümünde *PLB1* ekspresyonu belirlenirken, aynı yöntem ile fosfolipaz aktivitesi göstermeyen suşlarda *PLB1* ekspresyonu gözlenmemiştir (215). Bu durum plak yönteminin fosfolipaz B aktivitesini gösterdiğini doğrulamıştır (261). Çalışmamızda da plak yöntemi ile *PLB1* ekspresyonu arasındaki fenotipik uyum %100 olarak saptanmıştır.

Samaranayake ve ark. yaptıkları başka bir çalışmada, HIV ile enfekte bireylerde oral kavite örneklerinden plak yöntemi ile belirlenen altı fosfolipaz olumlu (PL+) ve altı fosfolipaz olumsuz (PL-) suşlarda *PLB1* ve *PLC1* genlerinin ekspresyon profillerini incelemiş ve fosfolipaz olumsuz suşların *PLB1* ve *PLC1* ekspresyon düzeylerini, fosfolipaz olumlu suşlara göre oldukça düşük bulmuştur. Ayrıca Pz değeri ile *PLB1* ekspresyonları arasında korelasyonun olduğu, fakat *PLC1* ekspresyonları ile bir korelasyon bulunmadığı bildirilmiştir (216).

Bizim çalışmamızda kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan 30'ar *C. albicans* suşunun tümünde (%100) RT-PZT yöntemi ile *PLB1* ekspresyonu gözlenmiştir ancak kan ve oral kavite izolatları arasında *PLB1* ekspresyon düzeyi açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($t=-0.307$; $p=0.760$). *PLC1* ekspresyonu ise kan ve oral kavite suşlarının sırası ile 27'sinde (%90) ve 22'sinde (%73.3) belirlenmiştir. *PLC1* ekspresyon düzeyi oral kavite örneklerinde, kan izolatlarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Mann Whitney U= 103.500; $p=0.000$). Araştırmamızda plak yöntemi ile fosfolipaz olumsuz bulunan suşlarda, RT-PZT yöntemi ile *PLB1* ve *PLC1* ekspresyonu saptanmıştır. Ayrıca Samaranayake ve ark.'nın bulgularından farklı olarak Pz değerleri ile *PLB1* ekspresyon düzeyleri arasında korelasyon olmadığı anlaşılmıştır, bu durum *PLC1* ekspresyon düzeyleri için de geçerlidir (sırasıyla $p=0.602$; $p=0.241$).

PLB1 ekspresyonunun belirli çevresel ve fiziksel faktörler altında, uygun ortam ve pH'da yüksek verimde olduğu bilinmektedir. Ortamda uygun konsantrasyonda karbonhidrat kaynağının olması ve bu besiyerinin optimal pH'sının sağlanması, ortamda serum veya fosfolipit bileşenlerinin olması ve ortamın sıcaklığı *PLB1* ekspresyonunu etkileyen faktörlerdir. Mukherjee ve ark.'nın çalışmasında en uygun *PLB1* ekspresyonu, sıcaklığın 30°C olması sağlanarak, pH'sı 5.9 olan fosfolipit (%2 serum veya 20 µg fosfolipit) içeren Sabouraud dekstroza (%4) buyyon ve pH'sı 6.2 olan YPD (%2) buyyon kullanılarak belirlenmiştir (262). Niewerth, fosfolipaz B ekspresyonunun ortam pH'sının 4.0-5.0 aralığında, fosfolipaz C ekspresyonunun ise en yüksek ortam pH'sının 7.5 olduğu koşullarda sağlandığını bildirmiştir (78). Yöntemimiz açısından kaynak aldığımız Samaranayake ve ark.'nın çalışmasında ise *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1* ekspresyonunun incelenmesi amacıyla Sabouraud dekstroza agar (%2) ve YPD buyyon (%2) ve 37°C'lik inkübasyon kullanılmıştır (216). Çalışmamızda pH'sı 5.6 Sabouraud dekstroza (%4) besiyeri ve pH'sı 6.5 olan YPD buyyon (%2) kullanıldı ve her iki ortam için inkübasyon sıcaklığı 37°C olarak ayarlandı.

C. albicans suşlarının dokuya invazyon sürecinde *PLB1* ve *PLC1* genlerinin ekspresyon profillerinin anlaşılması amacı ile RHOE hücreleri ile yapılan bir çalışmada, patojen inoküle edilmiş dokularda 12, 24 ve 48. saatlerde maya hücrelerinin dokuya invazyonu gösterilmiştir. Çalışmada invazyon esnasında *PLC1* geninin eksprese olduğu fakat *PLB1* geninin eksprese olmadığı saptanmıştır (216). *PLB1* ekspresyonu için suşun bulunduğu besiyerinin serum, fosfolipit içeriği, optimal sıcaklık gibi fiziksel faktörleri ve karbonhidrat gibi çevresel koşullarının önemli olduğu belirtilmiştir. In vitro yapılan çalışmalarda optimal koşullar

sağlanmadığı takdirde *PLB1* ekspresyonu gerçekleşmemektedir (216). Bu durum *PLB1* geni tarafından kodlanan fosfolipaz B1 enziminin enfeksiyon için gerekli esas enzim olduğunu göstermekte olup, *PLB1* geninde oluşabilecek bir hasar ile *C. albicans* suşlarının epitel hücrelerine adherans yeteneğinde azalma gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu durum *PLB1* ekspresyonunun, epitel hücre membran yapılarının parçalanması ve invazyonun başlatılması için gerekli olduğunu göstermektedir (4,89,263).

Naglik ve ark.'ı oral kavite ve vajinal örneklerden soyutladıkları *C. albicans* suşlarında *PLB1* ekspresyonlarını araştırmışlar ve *PLB1* ekspresyonunu sadece oral kavite örneklerinde saptamışlardır. Oral enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen suşların %58'inde, oral taşıyıcı olan hastaların %14'ünde ekspresyon gözlenmiştir. Oral enfeksiyon sırasında gözlenen *PLB1* ekspresyonunun oral taşıyıcılığa göre daha fazla olduğu bulunmuştur ($P \leq 0.001$) (264). Ibrahim ve ark.'ının yaptıkları çalışmada da oral enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen suşlarda gözlenen *PLB1* ekspresyonunun, oral taşıyıcı olan bireylerden elde edilenlere göre daha fazla olduğu belirtilmiştir (4).

Çalışmamızda plak yöntemi ile fosfolipaz negatif dört kan, altı oral kavite izolatu olmak üzere toplam 10 *C. albicans* suşunun tümünde *PLB1* ekspresyonu saptanırken, bunlardan sekizinde *PLC1* ekspresyonu belirlenmiştir. Bu sonuç RT-PZT yönteminin plak yöntemine göre daha duyarlı olması nedeni ile ortaya çıkmış olabilir.

Araştırmamızda fenotipik plak yöntem sonuçları ile genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki uyum incelendiğinde; *PLB1* ekspresyonunun fenotipik plak yöntemi ile %100, *PLC1* ekspresyonunun ise %71.6 oranında uyumlu olduğu saptanmıştır. Chen ve ark. plak yöntemi ile saptanan fosfolipazın, *PLB1* tarafından kodlanan fosfolipaz B enzimi olduğunu belirtmiş olup, bizim bulgularımız da bunu destekler niteliktedir (261).

Bizim suşlarımız üzerinde yapılan bir başka çalışmada, 60 *C. albicans* suşunda RT-PZT yöntemi ile *PLB2* ve *PLD1* genlerinin ekspresyonları incelenmiştir. RT-PZT yöntemi ile çalışılan kan ve oral kavite izolatlarının sırasıyla 29 (%96.7) ve 30 (%100.0)'unda *PLB2* ve 27 (%90.0) ve 21 (%70.0)'inde *PLD1* ekspresyonu belirlenmiştir. *PLB2* ekspresyonu kan izolatlarında oral kavite suşlarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Mann Whitney $U=301.500$; $p=0.043$). *PLD1* ekspresyonu açısından ise her iki grup arasında istatistiksel fark saptanmamıştır (Mann Whitney $U=267.000$; $p=0.732$). *PLB2* ekspresyonunun fenotipik yöntemle %81.7 uyumlu olduğu, *PLD1* ekspresyonunun ise %76.7 uyumlu olduğu

görülmüştür. Pz değerleri ile *PLB2* ve *PLD1* ekspresyon düzeyleri arasında bir korelasyon saptanmamıştır (sırasıyla $p=0.555$; $p=0.096$). Plak yöntemi ile tüm fosfolipaz genlerinin ekspresyonu arasındaki uyum ise %83.3 olarak belirlenmiştir (265).

Günümüze dek *C. albicans* türünde tanımlanan fosfolipaz genleri A, B1, B2, C ve D olup, *PLB1* geni enfeksiyonu başlatmaya yardımcı ve fosfolipaz enzim virulansının en çok çalışılan geni olma özelliğindedir (4,79,89). *PLB1* yoksun *C. albicans* suşları ile farelerde oluşturulan kandidemi modelinde doku invazyonunun azaldığı dolayısı ile farelerde mortalite oranının düştüğü saptanmış, bu açıdan *PLB1* geninin enfeksiyon oluşumu için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır (79,89). *PLC1* geni çeşitli hücresel süreçlerde görev almakta olup, bu gen, glukoz ile stimüle olan fosfoinositid dönüşümü ve plazma membran H^+ -ATPaz enziminin aktivasyonu için gerekmektedir (266). Fosfolipaz C hidrolitik enzim aktivitesi, hücre içi mesaj iletim görevi yapan fosfolipit bağımlı protein kinaz ve inositol fosfolipaz için substrat olan kalmodulin bağımlı enzimleri aktive eden Ca^{+2} iyonlarını stimüle etmektedir (94). *PLC1* mutantlarında yapılan çalışmalarda, yüksek karbonhidrat ve NaCl konsantrasyonlarında ozmotik basınç duyarlılığı, kromozomların yanlış ayrılması ve glukoz içermeyen karbon kaynaklarında büyüme oranlarının azaldığı görülmüştür (267,268). Ayrıca *PLC1* mutantlarında ekstrasellüler glukozun plazma membran H^+ -ATPaz enzimini aktive edemediği ve hücre içi Ca^{+2} sinyal iletiminde başarısız olduğu bildirilmiştir. Kromozomların yanlış ayrımı ve sıcaklık hassasiyeti gibi durumlarda dışarıdan Ca^{+2} iyonlarının eklenmesi ile Ca^{+2} sinyal transdüksiyonunun düzelmesinin *PLC1* ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (266). Plc1 proteinin cAMP ve Ras2 (mitojen aktivite edici protein kinaz) yolağını yönettiği belirlenmiştir (94). Bu durum *PLC1* geninin, maya hücresinde hücresel faaliyetlerinin devam edebilmesi için olması gereken esas gen olduğunu göstermektedir ancak genin *C. albicans* virulansındaki rolü net olarak anlaşılamamıştır. Çalışmamızdaki suşların toplam 49’unda *PLC1* ekspresyonu belirlenmiş olup, fosfolipaz C1’in bu türün virulansı açısından belirli noktalarda rol oynayabileceği düşünülmüştür. Bu açıdan *PLC1* gen ekspresyonunun daha kapsamlı çalışılması, farklı enfeksiyon modellerinde incelenmesi ve virulanstaki rolünün daha detaylıca araştırılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda yumurta sarılı agarın kullanıldığı plak yöntemi ile kan kültürlerinden soyutlanan suşların 26'sında (%86.7), oral kavite örneklerinden elde edilen kökenlerin 24'ünde (%80.0), incelenen toplam 60 *C. albicans* suşunun toplam 50'sinde (%83.3) fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. Kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan suşların, ortalama Pz değerleri sırasıyla ile 0.6138 ± 0.9823 ve 0.6988 ± 0.9910 olup, bu değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmiştir (Mann Whitney U=173.500; P=0.007).

Araştırmamızdaki 30 kan ve 30 oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* suşlarının tümünde (%100) RT-PZT yöntemi ile *PLB1* ekspresyonu gözlenmiştir. Çalışmaya alınan kan örneğinden soyutlanan *C. albicans* suşlarının, *C. albicans* ATCC 90028 kontrol suşuna göre 0.52-1.05; oral kavite örneklerinden elde edilen suşların, kontrol suşuna göre 0.70-1.33 kat *PLB1* ekspresyonu gösterdiği görülmüştür. Kan ve oral kavite izolatları arasında *PLB1* ekspresyon düzeyi açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($t=-0.307$; $p=0.760$).

RT-PZT yöntemi ile çalıştığımız kan ve oral kavite suşlarının sırası ile 27'sinde (%90) ve 22'sinde (%73.3) *PLC1* ekspresyonu belirlenmiştir. Kan izolatları *C. albicans* ATCC 90028 kontrol suşuna göre 0.35-1.04 kat; oral kavite izolatları ise kontrol suşuna göre 0.75-1.33 kat *PLC1* ekspresyon gösterdiği görülmüştür. *PLC1* ekspresyon düzeyi oral kavite örneklerinde, kan izolatlarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Mann Whitney U=103.500; $p=0.000$).

Yumurta sarılı agarın kullanıldığı modifiye plak yöntemi ile belirlenen Pz değerleri ile *PLB1* ve *PLC1* ekspresyon değerleri arasında bir korelasyon saptanmamış (sırasıyla $p=0.602$; $p=0.241$), ancak fenotipik yöntem olan plak yöntemi ile incelenen fosfolipaz sonuçları ile *PLB1* ve *PLC1* genlerinin ekspresyon durumu arasındaki uyum sırasıyla %100 ve %71.6 olarak bulunmuştur.

Araştırmamız kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* suşlarında plak yöntemi ile fosfolipaz aktivitesinin belirlendiği ve aynı suşlarda fosfolipaz enzimlerini kodlayan *PLB1* ve *PLC1* genlerinin RT-PZT yöntemi ile incelendiği bir çalışma olup, bu konuda ulaşılabilen Türkiye'de yapılan ilk çalışma olması nedeni ile önemlidir.

Kaynak taramasında, deney hayvanlarının ağırlıklı olarak oral kavite örneklerinden soyutlanan suşlarda *PLB1* geni ekspresyonunun incelendiği görülmüştür. Araştırmamızda özellikle klinik örneklerden soyutlanan *C. albicans* suşlarında *PLB1* ve *PLC1* genlerinin araştırılmasının literatüre katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.

PLC1 geninin hücresel süreçler için önemli olduğu bilinmekle birlikte patogenezi tam olarak çözilememiştir. Araştırmamızda çalışılan gruplarda %73.3 ve %90.0 oranlarında *PLC1* ekspresyonu saptanmıştır. Bu nedenle *PLC1* geni için yabancı tip ve mutantları ile hayvan modelleri kullanılarak detaylı çalışmalar yapılması ve enfeksiyon sürecine katkısı histopatolojik araştırmalar ile de desteklenerek ortaya çıkarılması gerekmektedir. Ayrıca *PLC1* geninin, *PLB1* geni gibi hangi şartlar altında eksprese olduğunun araştırılması fosfolipaz C enziminin öneminin ve fonksiyonunun anlaşılmasına yardımcı olacaktır.

Çalışmamızda, oral kavite ve kan örneklerinden elde edilen *C. albicans* izolatlarında yüksek oranlarda fosfolipaz aktivitesinin belirlenmesi, bu enzimlerin üretiminin virulansta önemli bir rol oynadığını desteklemekte olup; PLC1 enziminin özellikle oral kavite örneklerinde belirlenmesi nedeni ile bulgularımız doğrultusunda, PLC1 enziminin mukozal enfeksiyonlarda daha önemli rol oynadığı söylenebilir ancak bu konuda daha geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim söz konusudur.

7.KAYNAKLAR

1. Ying S, Chunyang L. Correlation between phospholipase of *Candida albicans* and resistance to fluconazole. *Mycoses*, 2011; 55: 50–55.
2. Mavor AL, Thewes S, Hube B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: Epidemiology, Infection Process and Virulence Attributes. *Current Drug Targets* 2005, 6 (8): 863-874.
3. Martinez JP, Gil ML, Lopez-Ribot JL, Chaffin WL. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *American Society for Microbiology*, 1998; 11(1): 121-141.
4. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler S, Banno Y ve ark. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *C. albicans*. *Infection and Immunity*, 1995; 63 (5): 1993-1998.
5. Ellepola ANB, Joseph BK, Khan ZU. The postantifungal effect and phospholipase production of oral *Candida albicans* from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to subtherapeutic concentrations of chlorhexidine gluconate. *Mycoses*, 2014; 57: 553-559.
6. Calderone RA. Introduction and historical perspectives. *American Society for Microbiology Press*, 2002.; 3-13.
7. Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical mycology*. Churchill Livingstone, Philadelphia 2003.
8. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Fungal classification, structure, and replication. In: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, editors. *Medical microbiology*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier, 2016; 567-573.
9. Carroll KC, Jorgensen JH, Pfaller MA. *Manual of clinical microbiology*. 11th ed. ASM Press, 2015; 1984-2014.
10. Kumamoto CA. Inflammation and gastrointestinal *Candida* colonization. *Curr. Opin. Microbiol*, 2011; 14: 386-391.
11. Lochart SR, Daniels KJ, Zhao R, Wessels D ve ark. Cell biology of mating in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell*, 2003; 1: 49-61.
12. Odds FC. Ecology of *Candida* and epidemiology of candidosis. In: Odds FC, editors. *Candida and Candidosis*. Baillière Tindall, London, 1988; 68-92.
13. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanism. *Landes*

- Bioscience, 2013;119-128.
14. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ ve ark. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2010; 68:278-283.
 15. Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Agnarsson BA, Gottfredsson M. The importance of strain variation in virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*: results of a blinded histopathological study of invasive candidiasis. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2009; 15:576-585.
 16. Calderone R, Clancy CJ. *Candida* and candidiasis. 2th. ASM Press, 2012; 10-25.
 17. Chibana H, Beckerman JL, Magee PT. Fine-resolution physical mapping of genomic diversity in *Candida albicans*. *Genome Res.*, 2010; 10: 1865-1877.
 18. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Pathogenesis of fungal diseases. In: *Medical microbiology*. 6th. St Louis, Mosby & Elsevier, 2008; 679.
 19. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiology Reviews*, 1991; 55:1–20.
 20. Cassone A. Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host. *Curr. Top. Med. Mycol.*, 1989; 3:248–314.
 21. Geoghegan I, Steinberg G, Gurr S. The role of the fungal cell Wall in the infection of plants. *Trends in Microbiology*, 2017.
 22. Elorza MV, Rico H, Sentandreu R. Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J. Gen. Microbiol.*, 1983; 129:1577–1582.
 23. Molano J, Bowers B, Cabib E. Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. *J. Cell Biol.*, 1980; 85:199–212.
 24. Sullivan PA, Chiew Y, Molloy C, Templeton MD ve ark. An analysis of the metabolism and cell wall composition of *Candida albicans* during germ-tube formation. *Can. J. Microbiol.*, 1983; 29:1514–1525.
 25. Latge JP. Tasting the fungal cell Wall. *Cell Microbiol.*, 2010; 12:863.
 26. Kollar R, Reinhold BB, Petrakova E, Yeh H ve ark. Architecture of the yeast cell wall. *J. Biol. Chem.*, 1997.

27. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell Wall. *BioEssays*, 2006; 28:799.
28. Sentandreu R, Martinez JP, Elorza MV ve ark. Relationships between dimorphism, cell wall structure, and surface activities in *Candida albicans*. In: R. Prasad, editors. *Candida albicans: cellular and molecular biology*. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany. 1991; 72-88.
29. Chattaway FW, Holmes MR, Barlow AJE. Cell Wall composition of the mycelial and blastospore forms of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.*, 1968; 51:367–376.
30. Elorza MV, Murgui A, Rico H, Sentandreu R. Formation of a new cell wall by protoplasts of *Candida albicans*: effect of papulacandin B, tunicamycin and nikkomycin. *J. Gen. Microbiol.*, 1987; 133:2315–2325.
31. Munro CA, Gow N. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol Suppl* 1, 2001; 39-41.
32. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol.*, 2010; 36:1-53.
33. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.*, 2007; 20:133-63.
34. Spellberg B, Marr K, Filler SG. *Candida*: What Should Clinicians and Scientists Be Talking About? In: Calderone RA, Clancy CJ, editors. *Candida and Candidiasis*: ASM Press, Washington, DC, 2012; 225- 242.
35. Nicholls S, MacCallum DM, Kaffarnik FA, Selway L ve ark. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol.*, 2011; 48:297-305.
36. Teunissen, AWRH, Steensma HY. The dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast*, 1995; 11: 1001–1013.
37. De Groot PWJ, Bader O, De Boer AD, Weig M ve ark. Adhesins in human fungal pathogens: Glue with plenty of stick. *Eukaryot. Cell*, 2013; 12: 470–481.
38. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ ve ark. The endothelial glycocalyx: Composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.*, 2007; 454: 345–359.

39. Critchley IA, Douglas LJ. Role of glycosides as epithelial cell receptors for *Candida albicans*. Microbiology, 1987; 133: 637–643.
40. Vardar Ünlü G, McSharry C, Douglas LJ. Fucose-specific adhesins on germ tubes of *Candida albicans*. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2006; 20: 55–67.
41. Cauchie M, Desmet S, Lagrou K. *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. Research in Microbiology, 2017.
42. Willaert RG. Adhesins of yeasts: Protein structure and interactions. Journal of Fungi, 2018; 4.
43. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in Microbiology, 2001; 9: 327-335.
44. Alves CT, Wei XQ, Silva S, Azeredo J ve ark. *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. J Infect., 2014;69:396-407.
45. Naglik JR, Moyes DL, Wachtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. Microbes Infect., 2011;13: 963-76.
46. Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, Thewes S ve ark. The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. PLoS Pathog, 2008;4.
47. Fu ve ark. Role of ALS1 in the virulence of *Candida albicans*. 37th. Annual Meeting of the Infectious Disease Society of America, 1999.
48. Tsuchimori N, Sharkey LL, Fonzi WA, French SW ve ark. Reduced adherence of *HWP1*-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. Infect. Immun., 68.2000; 1997–2002.
49. Gale C, Bendel CM, McClellan M, Hauser M ve ark. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, *INT1*. Science, 1998;279: 1355–1358.
50. Kumamoto CA. Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. Nat Rev Microbiol., 2008; 6:667-73.
51. Brand A, Shanks S, Duncan VM, Yang M ve ark. Hyphal orientation of *Candida albicans* is regulated by a calcium-dependent mechanism. Curr Biol., 2007; 17:347-52.

52. Kloda A. Mechanosensitive channel of large conductance. *Int J Biochem Cell Biol.*, 2008; 40:164–169.
53. Booth IR, Edwards MD, Black S ve ark. Mechanosensitive channels in bacteria: signs of closure? *Nature Rev Microbiol.*, 2007;5: 431–440.
54. Brand A, Lee K, Vese V, Gow N. Calcium homeostasis is required for contact-dependent helical and sinusoidal tip growth in *Candida albicans* hyphae. *Mol. Microbiol*, 2009; 71: 1155-1164.
55. Cerdeira CR, Gregorio MC, Vila AM, Barcenas L ve ark. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019; 174: 110-125.
56. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2011; 9:109-118.
57. Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM ve ark. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio.*, 2014; 5.
58. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.*, 2003;6:11-30.
59. Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R ve ark. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun.*, 2004; 72:6023–31.
60. Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M ve ark. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog*, 2010.
61. Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathog*, 2012.
62. Xie Z, Thompson A, Sobue T, Kashleva H ve ark. *Candida albicans* biofilms do not trigger reactive oxygen species and evade neutrophil killing. *J Infect Dis.*, 2012.
63. Sanglard D, Odds FK. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis.*, 2002; 2:73–85.
64. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun* 2003; 71(8):4333–4340.
65. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: revolving the mystery of a gene family. *Microbiology*, 2001; 147: 1997-2005.

66. Hube B, Monod M, Schofield DA, Brown AJ ve ark. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartic proteinases in *Candida albicans*. Mol Microbiol., 1994;14: 87-99.
67. White TC, Miyasaki SH, Agabian, N. Three distinct secreted aspartic proteinases in *Candida albicans*. J Bacteriol, 1995; 175:6126-6133.
68. Monod M, Hube B, Hess D, Sanglard D. Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. Microbiology, 1998; 144:2731-2737.
69. Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard, D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. Mol Microbiol., 1994; 357-368.
70. Ruchel R. Proteinase. In New Strategies in Fungal Disease. 1992;17-31.
71. Hube B. Possible role of proteinases in *Candida* infections. Rev Iberoam Micol., 1998; 15:68-71.
72. Hube B. *Candida albicans* secreted aspartic proteinases. Curr Top Med Mycol., 1996;7: 55-69.
73. Schaller M., Schafer W, Korting HC ve ark. Differential expression of secreted aspartic proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. Mol Microbiol., 1998;29: 605-615.
74. Schaller M, Schackert C, Korting HC, Januschke E ve ark. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. J Invest Dermatol., 2000; 114:712-717.
75. De Bernardis F, Cassone A, Sturtevant J, Calderone R. Expression of *Candida albicans* *SAP1* and *SAP2* in experimental vaginitis. Infect Immun., 1995; 63:1887-1892.
76. Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H ve ark. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. Proc Natl Acad Sci USA, 2000; 97:6102-6107.
77. Borg-von Zepelin M, Beggah S, Boggian K, Sanglard D ve ark. The expression of the secreted aspartic proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. Mol Microbiol, 1998; 28:543-55.
78. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. Mycoses, 2001; 44: 361-367.

79. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. American Society for Microbiology, 2000;13:122-143.
80. Werner H. Untersuchungen über die Lipase-Aktivität bei Hefen und Hefeähnlichen Pilzen. Zentbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hyg. 1. Abt. Orig. A., 2000:113.
81. Costa A, Costa C, Misefari A ve ark. On the enzymatic activity of certain fungi. VII. Phosphatidase activity on media containing sheep's blood of pathogenic strains of *Candida albicans*. Atti Soc. Sci. Fis. Mat. Nat., 1966; 14:93–101.
82. Pugh D, Cawson RA. The cytochemical localization of phospholipase A and lysophospholipase in *Candida albicans*. Sabouraudia, 1975; 13:110–115.
83. Pugh D, Cawson RA. The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. Sabouraudia, 1977; 15:29–35.
84. Costa AL, Costa C, Misefari A ve ark. On the enzymatic activity of certain fungi. VII. Phosphatidase activity on media containing sheep's blood of pathogenic strains of *Candida albicans* (in Italian). Atti Societa Peloritana Di Scienze Fisiche Matematiche, Naturali, 1968;14: 93-101.
85. Price MF, Cawson RA. Phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia, 1977; 15: 179-185.
86. Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. J. Gen. Microbiol., 1985;131: 1217-1221.
87. Goyal S, Khuller G K. Phospholipid composition and subcellular distribution in yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. J. Med. Vet. Mycol., 1992;30: 355-362.
88. Banno Y, Yamada T, Nozawa Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. Sabouraudia, 1985; 23, 47-54.
89. Leidich SD, Ibrahim AS, Fu W. Cloning and disruption of *caPLB1*, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. J. Biol. Chem., 1998; 273, 26078-26086.
90. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol., 1982; 157:105–132.
91. Sugiyama Y, Nakashima S, Mirbod F, Kanoh H ve ark. Molecular cloning of a second phospholipase B gene, *caPLB2* from *Candida albicans*. Med. Mycol., 1999; 37:61–67.

92. Mago N, Khuller GK. Subcellular localisation of enzymes of phospholipid metabolism in *Candida albicans*. J. Med. Vet. Mycol., 1990; 28: 355-362.
93. Bennett DE, McCreary CE, Coleman DC. Genetic characterisation of a phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*. Microbiology, 1998; 144: 55-72.
94. Kunze D, Melzer I, Bennett D, Sanglard D ve ark. Functional analysis of the phospholipase C gene *CaPLC1* and two unusual phospholipase C genes, *CaPLC2* and *CaPL3*, of *Candida albicans*. Microbiology 2005; 151: 3381-3394.
95. McLain N, Dolan JW. Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. Microbiology, 1997; 143: 3521-3526.
96. Exton JH. New developments in phospholipase D. J. Biol. Chem., 1997; 272: 15579–15582.
97. Ella KM, Dolan JW, Qi C, Meier KE. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in expression of phospholipase D. Biochem., 1996; 314: 15–19.
98. Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. Annu. Rev. Microbiol., 1991; 45: 187–218.
99. Kanoh H, Nakashima S, Zhao Y, Sugiyama Y ve ark. Molecular cloning of a gene encoding phospholipase D from the pathogenic and dimorphic fungus, *Candida albicans*. Biochim. Biophys. Acta., 1998; 1398: 359–364.
100. Takahashi M, Banno Y, Nozawa Y. Secreted *Candida albicans* phospholipases: purification and characterisation of two forms of lysophospholipase-transacylase. J. Med. Vet. Mycol., 1991; 29, 193-204.
101. Mirbod F, Banno Y, Ghannoum MA ve ark. Purification and characterisation of lysophospholipasetransacylase (h-LPTA) from a highly virulent strain of *Candida albicans*. Biochim. Biophys. Acta, 1995; 1257, 181-188.
102. Schaller M, Borelli C, Korting H, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. Mycoses, 2005; 48: 365-377.
103. Fu Y, Ibrahim AS, Fonzi W ve ark. Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. Microbiology, 1997; 143: 331–40.
104. Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A ve ark. Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten

- members. Arch Microbiol., 2000; 174: 362–74.
105. Molero G, Diez-Orejas R, Navarro-Garcia F, Monteoliva L ve ark. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity, Internatl. Microbiol., 1998; 1: 95-106.
 106. Mitchell A. Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. Current Opinion in Microbiology, 1998; 1: 687-692.
 107. Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. Annu Rev Microbiol., 1991; 45: 187-218.
 108. Liu H, Styles CA, Fink GR. Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. Science, 1993; 262: 1741-1744.
 109. Zheng X, Wang Y, Wang Y. Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. EMBO J., 2004; 23: 1845-56.
 110. Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, Thewes S ve ark. The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. PLoS Pathog., 2008; 4.
 111. Birse CE, Irwin MY, Fonzi WA. Cloning and characterization of *ECE1*, a gene expressed in association with cell elongation of the dimorphic pathogen *Candida albicans*. Infect Immun., 1993; 61: 3648–3655
 112. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ ve ark. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. Appl Environ Microbiol., 2001; 67: 2982-92.
 113. Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004; 101: 5048-52.
 114. Pomes R. Genetic analysis of *Candida albicans* morphological mutants. J. Gen. Microbiol., 1985; 131: 2107–2113.
 115. Slutsky B, Buffo J, Soll DR. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. Science, 1985; 230: 666–669.
 116. Slutsky B. White–opaque transition: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. J. Bacteriol., 1987; 169: 5579–5588.
 117. Anderson JM. Ultrastructure and antigenicity of the unique cell and pimple of the *Candida albicans* opaque phenotype. J. Bacteriol., 1990; 172: 224–235.
 118. Morrow B. Coordinate regulation of two opaque phase specific genes during white–opaque switching in *Candida albicans*. Infect. Immun., 1993; 61: 1823–1828.

119. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. J Microbiol Immunol Infect, 2003; 36: 223–228.
120. Soll D. High-frequency switching in *Candida albicans* and its relationship to vaginal candidiasis. Am. J. Obstet. Gynecol. ,1988; 158. 997–1001.
121. Kvaal C. Misexpression of the opaque-phase specific gene *PEP1 (SAP1)* in the white phase of *Candida albicans* confers increased in a mouse model of cutaneous infection. Infect. Immun.,1999; 67. 6652–6662.
122. Hazen KC. Cell surface hydrophobicity of medically important fungi, especially *Candida* species. In: Doyle RJ, Rosenberg M, editors. Microbial cell surface hydrophobicity. Washington, DC: ASM Press; 1990; 249–295.
123. Antley PP, Hazen KC. Role of yeast cell growth temperature on *Candida albicans* virulence in mice. Inf. Immun.,1988; 56:2884–2890.
124. Masuoka J, Hazen KC. Cell wall protein mannosylation determines *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. Microbiology, 1997;143:3015-21.
125. Masuoka J. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: Physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. Clin. Microbiol. Rev., 2004; 17:281–310.
126. Hobden C, Teevan C, Jones L, Oshea P. Hydrophobic properties of the cell surface of *Candida albicans*: a role in aggregation. Microbiology, 1995; 141: 1875–1881.
127. Klotz SA. Role of hydrophobic interactions in microbial adhesion to plastics used in medical devices. In: Doyle RJ, Rosenberg M, editors. Microbial cell surface hydrophobicity. Washington, DC: ASM Press, 1990; 107–136.
128. Hazen KC, Hazen BW. Hydrophobic surface protein masking by the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. Inf. Immun., 1992; 60:1499–1508.
129. Chaffin WL, Lopez-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; 62:130–180.
130. Casanova M, Lopez-Ribot JL, Monteagudo C, Llombart BA ve ark. Identification of a 58 kilodalton cell surface fibrinogen- binding mannoprotein from *Candida albicans*. Inf. Immun.,1992; 60:4221–4229.
131. Glee PM, Sundstrom P, Hazen KC. Expression of surface hydrophobic proteins by *Candida albicans* in vivo. Inf. Immun.,1995; 63:1373–1379.

132. Singleton DR, Masuoka J, Hazen KC. Cloning and analysis of a *Candida albicans* gene that affects cell surface hydrophobicity. J. Bacteriol., 2001; 183:3582–3588.
133. Torosantucci A, Romagnoli G, Chiani P, Stringaro A ve ark. *Candida albicans* yeast and germ tube forms interfere differently with human monocyte differentiation into dendriatic cells: a novel dimorphism-dependent mechanism to escape the host immune response. Inf. Immun., 2004; 72: 833–843.
134. Hazen KC, Lay JG, Hazen BW, Fu RC ve ark. Partial biochemical characterization of cell surface hydrophobicity of *Candida albicans*. Inf. Immun., 1990; 58:3469–3476.
135. Panagoda GJ, Ellepol ANB, Samaranayake LP. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. Mycoses, 2001; 44: 29–35.
136. Klotz SA. Surface-active properties of *Candida albicans*. Appl. Environ. Microbiol., 1989; 55: 2119–2122.
137. Singleton DR, Hazen KC. Differential surface localization and temperature dependent expression of the *Candida albicans* CSH1 protein. Microbiology, 2004; 150:285–292.
138. Lopez-Ribot JL, Casanova M, Martinez JP, Sentandreu R. Characterization of cell wall proteins of yeast and hydrophobic mycelial cells of *Candida albicans*. Inf. Immun., 1991; 59:2324–2332.
139. Hazen BW, Hazen KC. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*. Inf. Immun., 1988; 56: 2521–2525.
140. Byers BR, Arceneaux JEL. Microbial iron transport: iron acquisition by pathogenic microorganisms. Metal Ions Biol. Syst., 1998; 35:37–66.
141. Van der Helm D, Winkelmann G. Hydroxamates and polycarboxylates as iron transport agents (siderophores) in fungi. In Winkelmann G, Winge DR, editors. Metal ions in fungi, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y; 1994; 11: 39–98.
142. Winkelmann, G. Kinetics, energetics, and mechanisms of siderophore iron transport in fungi. In: Barton LL, editors. Iron chelation in plants and soil microorganisms. Academic Press, Inc., New York, N.Y; 1993; 219–239.
143. Bairwa G, Jung WH, Kronstad J. Iron acquisition in fungal pathogens of humans. Metallomics, 2017; 9: 215–227.
144. Nenaiff P, Krüger C, Schaller J ve ark. Dermatomycoses: clinical picture and diagnosis.

- In: Mycology. J Dtsch Dermatol Ges., 2014; 12:749-77.
145. Kirkpatrick CH. Chronic mucocutaneous candidiasis. J. Am. Acad. Dermatol., 1994; 31:14–17.
 146. Hancock PJ, Epstein JB, Sadler GR. Oral and dental management related to radiation therapy for head and neck cancer. J. Can. Dent. Assoc., 2003; 69: 585–590.
 147. Gonsalves WC, Wrightson AS, Henry RG. Common oral conditions in older persons. Am. Fam. Physician, 2008; 78:845–852.
 148. Lynch DP. Oral candidiasis. History, classification, and clinical presentation. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 1994; 78:189–193.
 149. Vazquez JA, Sobel JD. Mucosal candidiasis. Infect. Dis. Clin. N. Am., 2002; 16:793–820.
 150. Villar CC, Dongari-Bagtzoglou A. Immune defense mechanisms and immunoenhancement strategies in oropharyngeal candidiasis. Expert Rev. Mol. Med., 2008; 10:29.
 151. Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. *Candida* species adhesion to oral epithelium: factors involved and experimental methodology used. Crit. Rev. Microbiol., 2006; 32:217–226.
 152. Werneck-Silva AL, Prado IB. Role of upper endoscopy in diagnosing opportunistic infections in human immunodeficiency virus-infected patients. World J. Gastroenterol., 2009; 15:1050–1056.
 153. Hurley R, Louvois JD. *Candida* vaginitis. Postgrad. Med., J 1979; 55:645–647.
 154. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. Lancet, 2007; 369: 1961–1971.
 155. Pirotta MV, Garland SM. Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. J. Clin. Microbiol., 2006, 44:3213–3217.
 156. McClelland RS, Richardson BA, Hassan WM, Graham SM ve ark. Prospective study of vaginal bacterial flora and other risk factors for vulvovaginal candidiasis. J. Infect. Dis., 2009; 199: 1883–1890.
 157. Sha BE, Zariffard MR, Wang QJ ve ark. Female genital-tract HIV load correlates inversely with *Lactobacillus* species but positively with bacterial vaginosis and *Mycoplasma hominis*. J. Infect. Dis., 2005; 191:25–32.
 158. Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM ve ark. Risk factors for candidal bloodstream

- infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. Clin. Infect. Dis., 2001; 33:177–186.
159. Kim J, Sudbery P. *C.albicans*, amajor human fungal pathogen. The Journal of Microbiology, 2001; 49:171-177.
 160. McCarty TP, Pappas PG. Invasive candidiasis. J. Infect. Dis. Clin. North Am., 2016; 30. 103–124.
 161. Playford EG. Assessment of clinical risk predictive rules for invasive candidiasis in a prospective multicentre cohort of ICU patients. Intensive Care Med., 2009; 35: 2141–2145.
 162. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J ve ark. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. Int J Antimicrob Agents, 2006;27: 359–366.
 163. Kılıç SŞ. Kronik mukokutanöz kandidiyazis. Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci., 2005; 1:83-87.
 164. Murray P,Rosenthal KS, Pfaller MA. Opportunistic mycoses. In: Murray P,Rosenthal KS, Pfaller MA editors, Medical Microbiolgy. 8th. Philadelphia: Elsevier; 2016:651.
 165. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA.Laboratory diagnosis of fungal disease. In:Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, editors. Medical Microbiology. 8th ed. Philadelphia: Elsevier; 2016.p.585-594.
 166. Ruth Ashbee H. General approaches for direct detection and identification of fungi. In: Carroll KC, Jorgensen JH, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 11th ed.Washington DC, ASM 2015;1965-1983.
 167. Lindsley MD, Snyder JW, Atlas RM ve ark. Reagents, stains and media: mycology. In: Pfaller MA, Jorgensen JH, Carroll KC, editors. Medical Microbiology. 11th ed. Washington DC: ASM Press; 2015.p.1955-1964.
 168. Buschelman B, Jones RN, Pfaller MA ve ark. Colony morphology of *Candida spp.* as a guide to species identification. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 35:89– 91.
 169. Howell SA, Hazen KC, Brandt ME. *Candida*, *Crptococcus* and other yeasts at medical importance. In: Pfaller MA, Jorgensen JH, Carroll KC, editors. Medical Microbiology. 11th ed. Washington DC: ASM Press; 2015.p.1984-2014.

170. Neppelenbroek KH, Seo RE, Urban VM. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral diseases*; 2014;20; 329-344.
171. Baron EJ. Rapid identification of bacteria and yeast: summary of the National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed guideline. *Clin Infect Dis* 2001; 33:220– 225.
172. Spanu T, Posteraro B, Fiori B ve ark. Direct MALDI-TOF mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2012; 50:176–179.
173. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL ve ark. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1614–1616.
174. Coleman DC, Bennett DE, Sullivan DJ ve ark. Oral *Candida* in HIV infection and AIDS: new perspectives and new approaches. *Crit Rev Microbiol* 1993; 19: 61-82.
175. Santos MAS, el-Adlouni C, Cox AD ve ark. Transfer RNA profiling: a new method for the identification of pathogenic *Candida* species. *Yeast* 1994; 10: 625-636.
176. Miyakawa Y, Mabuchi T, Kagaya K ve ark. Isolation and characterization of a species-specific DNA fragment for detection of *Candida albicans* by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 894-900.
177. Salazar O, Julian MC, Rubia V. Primers based on specific rDNA-ITS sequences for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG 2 subgroups and ecological types, and binucleate *Rhizoctonia*. *Mycol. Res.* 2000;104, 281-285.
178. Lee SB, Taylor JW. Phylogeny of five funguslike protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and evolution* 1992; 9,636-653.
179. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S ve ark. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012; 109, 6241- 6246.
180. Mochon AB, Jin Y, Kayala MA ve ark. Serological profiling of a *Candida albicans* protein microarray reveals permanent host-pathogen interplay and stage-specific responses during candidemia. *PLoS Pathog*, 2010.

181. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M ve ark. The use of mannan antigen and antimannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. Crit Care 2010; 14: 222.
182. Moragues MD, Ortiz N, Iruretagoyena JR ve ark. Evaluation of a new commercial test (*Candida albicans* IFA IgG) for the serodiagnosis of invasive candidiasis. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2004; 22:83–88.
183. Garcia-Ruiz JC, del Carmen Arilla M, Regulez P, Quindos G ve ark. Detection of antibodies to *Candida albicans* germ tubes for diagnosis and therapeutic monitoring of invasive candidiasis in patients with hematologic malignancies. J. Clin. Microbiol., 1997; 35:3284–3287.
184. Zaragoza R, Peman J, Quindos G ve ark. *Candida albicans* germ tube antibody detection in critically ill patients. Clinical significance of the detection of *Candida albicans* germ tube-specific antibodies in critically ill patients. Clin. Microbiol. Infect. 2009; 15:592–595.
185. Peman J, Zaragoza R, Quindos G ve ark. *Candida albicans* germ tube antibody detection in critically ill patients. Clinical factors associated with a *Candida albicans* germ tube antibody positive test in intensive care unit patients. BMC Infect. Dis. 2011; 11:60.
186. Koo S, Bryar JM, Page JH ve ark. Diagnostic performance of the (1-3)-beta-D-glucan assay for invasive fungal disease. Clin Infect Dis 2009; 49:1650–1659.
187. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F ve ark. Beta- D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. Clin Infect Dis 2011; 52:750–770.
188. Fouad AA, Kalkancı A. Deneysel enfeksiyon oluşturulmuş tavşanların kan ve doku örneklerinde bakteriyel ve fungal DNA'nın gösterilmesinde PCR'nin yeterliliği. Mikrobiyol Bul., 2012; 46(4): 649-659.
189. Lau A, Chen S, Sleiman S&Sorrell T. Current status and future perspectives on molecular and serological methods in diagnostic mycology. Future Microbiology, 2009; 4(9):1185-1222.
190. Oliveira K, Haase G, Kurtzman C, Hyldig-Nielsen JJ ve ark. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes. J Clin Microbiol., 2001;39:4138–4141.

191. Rigby S, Procop GW, Haase G, Wilson D ve ark. Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. J Clin Microbiol., 2002; 40:2182–2186.
192. Wilson DA, Joyce MJ, Hall LS, Reller LB ve ark. Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. J Clin Microbiol., 2005; 43:2909– 2912.
193. Klingspor L, Lindback E, Ullberg M, Özenci V. Seven years of clinical experience with the Yeast Traffic Light PNA FISH: Assay performance and possible implications on antifungal therapy. Mycoses, 2018; 61:179-185.
194. Jabra-Rizk MA, Johnson JK, Forrest G, Mankes K ve ark. Prevalence of *Candida dubliniensis* fungemia at a large teaching hospital. Clin Infect Dis., 2005; 41:1064–1067.
195. Halliday CL, Kidd SE, Sorrell TC, Chen CA. Molecular diagnostic methods for invasive fungal disease: the horizon draws nearer? Pathology, 2015; 47:257-269.
196. Schell WA, Benton JL, Smith PB, Poore M ve ark. Evaluation of a digital microfluidic real-time PCR platform to detect DNA of *Candida albicans* in blood. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 2012; 31:2237–2245.
197. Lau A, Halliday C, Chen SC, Playford EG ve ark. Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR. J. Clin. Microbiol., 2010; 48:811–816.
198. Khlif M, Mary C, Sellami H, Sellami A ve ark. Evaluation of nested and real-time PCR assays in the diagnosis of candidaemia. Clin. Microbiol. Infect., 2009; 15:656–661.
199. Metwally L, Fairley DJ, Coyle PV, Hay RJ ve ark. Comparison of serum and whole-blood specimens for the detection of *Candida* DNA in critically ill, non-neutropenic patients. J. Med. Microbiol., 2008; 57:1269–1272.
200. Zhao J, Kong F, Li R, Wang X ve ark. Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. J Clin Microbiol., 2001; 39(6): 2261-6.
201. Kaufman PB, Wu W, Kim D, Cseke LJ. Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1995.

202. Nguyen MH, Wissel MC, Shields RK, Salomoni MA ve ark. Performance of *Candida* real-time polymerase chain reaction, beta-D-glucan assay, and blood cultures in the diagnosis of invasive candidiasis. Clin. Infect. Dis., 2012; 54:1240–1248.
203. Trovato L, Betta P, Romeo MG, Oliveri S. Detection of fungal DNA in lysis-centrifugation blood culture for the diagnosis of invasive candidiasis in neonatal patients. Clin. Microbiol. Infect., 2012; 18:63–65.
204. Arvanitis M, Anagnostou T, Burgwyn Fuchs B. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. Clin Microbiol., Rev 2014; 27: 490–526.
205. Lau A, Chen A, Sorrell T, Carter D ve ark. Development and clinical application of a panfungal assay to detect and identify fungal in tissue specimens. J Clin Microbiol, 2007; 45: 380–5.
206. Rickerts V, Mousset S, Lambrecht E, Tintelnot K ve ark. Comparison of histopathological analysis, culture and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. Clin Infect Dis 2007; 44:1078–83.
207. Babouee B, Goldenberger D, Elzi L, Lardinois D ve ark. Prospective study of a panfungal assay followed by sequencing, for detection of fungal in normally sterile specimens in a clinical setting: a complimentary tool in the diagnosis of invasive fungal disease. Clin Microbiol Infect 2013; 19: E354–7.
208. Lass-Floerl C, Mutschlechner W, Aigner M. Utility of in diagnosis of invasive fungal infections: real-life data from a multicentre study. J Clin Microbiol 2013; 51: 863–8.
209. Lunel FM, Mennink-Kersten MA, Ruegebrink D, van der Lee HA ve ark. Value of *Candida* serum markers in patients with invasive candidiasis after myeloablative chemotherapy. Diagn Microbiol Infect Dis., 2009; 64:408–415.
210. Babady NE, Miranda E, Gilhuley KA. Evaluation of Luminex xTAG fungal analyte-specific reagents for rapid identification of clinically relevant fungi. J Clin Microbiol., 2011; 49:3777–3782.
211. Balada-Llasat JM, LaRue H, Kamboj K, Rigali L ve ark. Detection of yeasts in blood cultures by the Luminex xTAG fungal assay. J Clin Microbiol., 2012; 50:492–494.
212. Aittakorpi A, Kuusela P, Koukila-Kahkola P, Vaara M ve ark. Accurate and rapid identification of *Candida spp.* frequently associated with fungemia by using PCR and the microarray-based Provet Sepsis assay. J Clin Microbiol., 2012; 50:3635–3640.

213. Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity in *Candida* species in vitro. *Sabouraudia*, 1984; 22: 201-207.
214. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *C. albicans*. *Sabouraudia*, 1982; 20: 7-14.
215. Samaranayake YH, Dassanayake RS, Jayatilake JAMS, Cheung BPK. Phospholipase B enzyme is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. *Journal of Medical Microbiology*, 2005;54:583-593.
216. Samaranayake YH, Dassanayake RS, Cheung BPK, Jayatilake JAMS ve ark. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *APMIS*, 2006; 114: 857-866.
217. W Henry K, T Nickels J, D Edlind T. Upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000; 44(10):2693-2700.
218. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, J Berg V ve ark. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited, *Clin Infect Dis.*, 2003;37:1172–7.
219. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ ve ark. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis*, 2003; 37:634–4.
220. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive candidiasis. *N Engl J Med*, 2015; 373: 1445–56.
221. Erwig LP, Gow NAR. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nat Rev Microbiol* 2016;14;163–76.
222. Liliane M, Keunsook KL, Hector M ve ark. *Candida albicans* yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition. *Frontiers in Immunology* 2017; 8:629.
223. Ralciane PM, Érika Bezerra MR, Aécio SB, Denise VD ve ark. Evaluation of virulence factors of *Candida albicans* isolated from HIV-positive individuals using HAART. *Elsevier* 2016; 66: 61–65.
224. Odds F, Abbott A. A simple system for presumptive identification of *Candida albicans* and differentiation of strains within the species. *Sabouraudia* 1980; 18:301–307.
225. MacFarlane MG, Knight BCJG. The biochemistry of bacterial toxins. I. Lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *Biochem. J.* 1941; 35:884–902.

226. Lackner M, Tscherner M, Schaller M, Kuchler K ve ark. Positions and numbers of FKS mutations in *Candida albicans* selectively influence in vitro and in vivo susceptibilities to echinocandin treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014;58: 3626-3635.
227. Fridkin SK, Kaufman D, Edwards JR., Shetty S ve ark. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995–2004. *Pediatr.* 2006;117: 1680–1687.
228. Steinbach WJ. Pediatric Invasive Candidiasis: Epidemiology and Diagnosis in Children. *J. Fungi.* 2016; 2:5.
229. Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 2:4.
230. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ ve ark. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2015; 15:62.
231. Nguyen MH, Peacock JE, Tanner DC, AJ Morris ve ark. Therapeutic approaches in patients with candidemia. Evaluation in a multicenter, prospective, observational study. *Arch Intern Med* 1995; 155: 2429 – 2435.
232. Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S ve ark. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control. *Microbial Pathogenesis* 2018.
233. Mattei AS, Alves SH, Severo CB, Guazzelli LS ve ark. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2013; 46:340-342.
234. Tay ST, Abidin IZ, Hassan H, NG KP. Proteinase, phospholipase, biofilm forming abilities and antifungal susceptibilities of Malaysian *Candida* isolates from blood cultures. *Medical Mycology* 2011; 49:556–560.
235. De Luca C, Guglielminetti M, Ferrario A, Clabro M ve ark. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiologica* 2012; 35: 459-468.
236. Atalay MA, Koc AN, Demir G, Sav H ve ark. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated from blood culture. *Nigerian Journal of Clinical Practice* 2015; 18.

237. Mohan V, Balbal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. Rev Iberoam Micol 2008; 25: 208-210.
238. Gokce G, Cerikçioğlu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. Mycopathologia 2007; 164:265–269.
239. Vieira de Melo AP V, Zuza-Alves DL, Silva-Rocha WP, Souza LB. Virulence factors of *Candida* spp. obtained from blood cultures of patients with candidemia attended at tertiary hospitals in Northeast Brazil. Journal de Mycologie Me´dicale 2008;8.
240. Çerikçioğlu N, İlki A, Bilgen H, Özek E. The relationships between candidemia and candidal colonization and virulence factors of the colonizing strains in preterm infants. The Turkish Journal of Pediatrics 2004; 46: 245-250.
241. Pandey N, Gupta MK, Tilak R. Extracellular hydrolytic enzyme activities of the different *Candida* spp. isolated from the blood of the Intensive Care Unit- admitted patient. Journal of Laboratory Physicians 2018; 10.
242. Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y, Kırdar S ve ark. Investigation of antifungal susceptibilities and some virulence factors of *Candida* strains isolated from blood cultures and genotyping by RAPD-PCR. Mikrobiyol Bul 2011; 45(2): 306-317.
243. Yücesoy M, Yuluğ N. *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. Enfeksiyon Dergisi, 1999; 13(4):569-574.
244. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. J Prosthodont 2011;20: 251-60.
245. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre JM ve ark. Phospholipase and proteinase activities of *Candida* isolates from denture wearers. Mycoses 2009; 54:10-16.
246. Mothibe JV, Patel M. Pathogenic characteristics of *Candida albicans* isolated from oral cavities of denture wearers and cancer patients wearing oral prostheses. Microbial Pathogenesis 2017.
247. Sanita PV, Zago CE, Pavarina AC, Jorge JH ve ark. Enzymatic activity profile of a Brazilian culture collection of *Candida albicans* isolated from diabetics and non-diabetics with oral candidiasis. Mycoses 2014; 57: 351–357.

248. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988; 318: 1315–21.
249. Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia* 1984;22: 201–7.
250. Tsang CSP, Chu FCS, Leung WK, Jin LJ ve ark. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Medical Microbiology* 2007; 56: 1393–1398.
251. Lyon JP, Resende MA. Correlation between adhesion, enzyme production, and susceptibility to fluconazole in *Candida albicans* obtained from denture wearers. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: 632–8.
252. Kumar CPG, Kumar SSJ, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia* 2006; 161: 213-8.
253. Koga-Ito CY, Lyon JP, Vidotto V, Resende MA. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia* 2006; 161: 219-23.
254. Costa CR, Passos XS, Souza LKM, Lucena PA ve ark. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheher, blood and oral cavity. *Revista do Instituto de Medicino Tropical de São Paulo* 2010; 52:139-143.
255. Öksüz S, Sakin İ, Yıldırım M, Gülcan 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: 280-283.
256. Mandelblat M, Frenkel M, Abbey D, Ami RB ve ark. Phenotypic and genotypic characteristics of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal infections. *Mycoses* 2017;1–12.
257. Mosca NG, Rose Hathorn A. HIV positive patients: dental management considerations. *Dental Clinics of North America* 2006; 50(4):635-57.
258. Coogan MM, Greenspan J, Challacombe SJ. Oral lesions in infection with human immunodeficiency virus. *Bulletin of the World Health Organization* 2005; 83:700-706.

259. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 2002; 45:160-5.
260. Mane A, Pawale C, Gaikwad S, Bembalkar S&Risbud A ve ark. Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of *Candida* isolates from HIV-infected individuals. *Medical Mycology*, 2011; 49: 548-551.
261. Chen SCA, Muller M, Zhou JZ, Wright LC ve ark. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? *J Infect Dis* 1997; 175:414-420.
262. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Differential expression of *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) under various environmental and physiological conditions. *Microbiology* 2003; 149: 261–267.
263. Mukherjee PK, Seshan KR, Leidich SD, Chandra J ve ark. Reintroduction of the *PLB1* gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. *Microbiology* 2001;147: 2585–97.
264. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL ve ark. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase b genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *The Journal of Infectious Diseases* 2003; 188:469-79.
265. Coccetti P, Tisi R, Martegani E, Souza Teixeira L ve ark. The PLC1 encoded phospholipase C in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is essential for glucose-induced phosphatidylinositol turnover and activation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1405: 147–154.
266. Flick JS, Thorner J. Genetic and biochemical characterization of a phosphatidylinositol-specific phospholipase C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1993;13: 5861–5876.
267. Payne WE, Fitzgerald-Hayes M. A mutation in *PLC1*, a candidate phosphoinositide-specific phospholipase C gene from *Saccharomyces cerevisiae*, causes aberrant mitotic chromosome segregation. *Mol Cell Biol* 1993;13: 4351–4364.
268. Dereli MD, Buğse T, Gürbüz ED. Kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *Candida albicans* suşlarında *PLB2* ve *PLD1* fosfolipaz genlerinin ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi ile araştırılması. Uluslararası XXXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. Kasım 4-8, 2018, Antalya.

8. EKLER

EK-I

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**

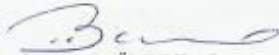
Konu: Karar hk.- 728

14.09.2015

Sayın Prof.Dr.Mine DOLUCA DERELİ,

Kurulumuz tarafından 10.09.2015 tarih ve 2242-GOA protokol numaralı 2015/21-24 karar numarası ile görüşülen "**Kan ve Oral Kavite Örneklerinden Soyutlanan Candida Albicans Suşlarının Fosfolipaz Aktivitelerinin Araştırılması**" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Bana 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

EK-II

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN 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:	2242-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kan ve Oral Kavite Örneklerinden Soyutlanan Candida Albicans Suşlarının Fosfolipaz Aktivitelerinin Araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADU/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Mine DOLUCA DERELİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	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 ☐

EK-III

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2015/20-24	Tarih: 10.09.2015				
	Prof.Dr.Mine DOLUCA DERELİ'nin sorumluluğu olduğu "Kan ve Oral Kavite Örneklerinden Soyutlanan Candida Albicans Suşlarının Fosfolipaz Aktivitelerinin Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, 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 Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Banu</i>
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Reyhan</i>
Prof.Dr.Nejat SAKIOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	<i>katiromadı</i>
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Ece</i>
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEÜ Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Vesile</i>
Prof.Dr.Sevinc ERASLAN	Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Sevinc</i>
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>M. Güneş</i>
Prof.Dr.Ayşe Aydın ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Ayşe</i>
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	<i>Nihal</i>
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	<i>katiromadı</i>
Doç.Dr.Şeyda Seren İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEÜ Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>katiromadı</i>
Doç.Dr.Seila KUZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Seila</i>
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	<i>katiromadı</i>
Üzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEÜ Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	<i>Ahmet</i>
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	DEÜ Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	<i>S.Özkul</i>

ÖZGEÇMİŞ



BUĞSE TUNÇ

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası 35545948654
Doğum Tarihi 13/01/ 1989
İletişim Adresi
Telefon (505) 886 52 21
E-posta busetunc1989@gmail.com
Web Adresi

Eğitim Bilgileri

01 Eylül 2008 – 01 Temmuz 2013 (4 yıl 11 ay)
Lisans, İkinci Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
Diploma Numarası: 2012/04/0525
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 72.18 / 100.0

01 Eylül 2003 – 01 Haziran 2007 (3 yıl 10 ay)
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI - İL MİLLÎ EĞİTİM MÜDÜRLÜKLERİ VE OKULLAR (İLİNDEKİ OKULLAR KARŞIYAKA İLÇESİNDEKİ OKULLAR GAZİ LİSESİ, TÜRKİ)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 85.7 / 100.0

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Haziran 2012 – 01 Ağustos 2012 (3 ay) (Tam Zamanlı)
STAJYER, SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ İZMİR TEPEÇİK SAĞLIK UYGULAM
ARAŞTIRMA MERKEZİ

01 Ekim 2011 – 01 Aralık 2011 (3 ay) (Yarı Zamanlı)
STAJYER, EGE ÜNİVERSİTESİ

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: Orta, Konuşma: Orta)

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

1165136, Kan Ve Oral Kavite Örneklerinden Soyutlanan Candida Albicans Suşlarının Fosfolipaz Aktivitelerinin Araştırılması, 1002 - Hızlı Destek, Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Kabulma/Ayrıma Tarihleri: 01.07.2016 - 13.02.2017, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.07.2016 - 01.07.2017.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0