

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TRANSLASYONEL TIP BAKIŞ AÇISI İLE
CANDIDA ALBICANS VE *CANDIDA
DUBLINIENSIS*' İN TANISI VE AYIRICI
TANISINDA BİYOLOJİK GÖSTERGE OLARAK
TÜRE ÖZGÜ YAĞ ASİDİ METİL ESTER
ARAŞTIRMASI**

Cansu AKGÜL KAYA

**TRANSLASYONEL TIP
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR—2019

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2015970146

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

**TRANSLASYONEL TIP BAKIŞ AÇISI İLE
CANDIDA ALBICANS VE *CANDIDA
DUBLINIENSIS*' İN TANISI VE AYIRICI
TANISINDA BİYOLOJİK GÖSTERGE
OLARAK TÜRE ÖZGÜ YAĞ ASİDİ METİL
ESTER ARAŞTIRMASI**

**TRANSLASYONEL TIP
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

CANSU AKGÜL KAYA

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. A. Hüseyin BASKIN

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2015970146

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Translasyonel Tıp Anabilim Dalı,
Translasyonel Tıp Yüksek Lisans programı öğrencisi Cansu AKGÜL KAYA
**'TRANSLASYONEL TIP BAKIŞ AÇISI İLE CANDIDA ALBICANS VE CANDIDA
DUBLINIENSIS' İN TANISI VE AYIRICI TANISINDA BİYOLOJİK GÖSTERGE
OLARAK TÜRE ÖZGÜ YAĞ ASİDİ METİL ESTER ARAŞTIRMASI'** konulu Yüksek
Lisans tezini 27/09/2019 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. Hüseyin BASKIN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü,

Translasyonel Tıp Anabilim Dalı

BAŞKAN



Prof. Dr. Serhan SAKARYA
Adnan Menderes Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Enfeksiyon Hastalıkları ve
Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
ÜYE



Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem ERESEN
YAZICIOĞLU
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Translasyonel Tıp Anabilim Dalı
ÜYE

Doç. Dr. Barçın ÖZTÜRK
Adnan Menderes Üniversitesi
Tıp Fakültesi Enfeksiyon
Hastalıkları ve Klinik
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Mustafa GÜVENÇER
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Translasyonel Tıp Anabilim Dalı
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
GRAFİKLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ÖZET.....	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
1.1 Problemin Tanımı ve Önemi	5
1.2 Araştırmanın Amacı	6
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 Translasyonel Tıp Tanımı ve Amacı	7
2.2 Candida Türleri ve Neden Olduğu Enfeksiyonların Tanımı	11
2.2.1 Candida Türlerinin Oportünist Patojene Dönüşmesinin Nedenleri.....	12
2.2.2. <i>Candida albicans</i> ve <i>Candida dubliniensis</i> Taksonomisi ve İlişkisi	13
2.2.3 <i>Candida dubliniensis spp.</i> ’ in Keşfi ve <i>Candida albicans</i> ile İlişkisi	15
2.2.4. <i>Candida dubliniensis sp.nov.</i> Özellikleri	16
2.3. Biyofilm Oluşumu.....	19
2.3.1. Biyofilm Morfolojisi ve Mimarisi	20
2.3.2. Biyofilm Oluşumunu ve Mimarisini Etkileyen Faktörler	23
2.3.2.2. Substrat	23
2.3.2.3. Besinler.....	23
2.3.2.4. Tür Çeşitliliği	23
2.3.2.5. Mikrobiyal Birliktelikler	24
2.3.3. <i>Candida dubliniensis</i> ’ in BiyofilmYapısı	24
2.4. Candida Antifungal Tedavisi ve İlaç Direncinin Ortaya Çıkışı	26
2.4.1 <i>Candida albicans</i> ve <i>Candida dubliniensis</i> Antifungal Direnç Mekanizmaları.....	27
2.5. <i>Candida albicans</i> ve <i>Candida dubliniensis</i> ’in Karşılaştırmalı Virülens Analizi	30
2.6. <i>Candida albicans</i> ve <i>Candida dubliniensis</i> Enfeksiyonlarının Klinik Önemi.	34

2.7. Mikrobiyal Tanımlama Sistemi	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Araştırmanın Tipi	39
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	39
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	39
3.4. Çalışma Materyali.....	39
3.4.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar	39
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	39
3.6. Veri Toplama Araçları.....	40
3.6.1. Sarf Malzemeleri	40
3.6.2. Çalışmada Kullanılan Yöntemler	43
3.6.2.1. Mayaların Üretilmesi.....	43
3.6.2.2. Mikro Dilüsyon Yöntemi İle Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ve Sub-MİK Mikro Dilüsyon Plakalarının Hazırlanması ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	44
3.6.2.3 Antifungal Etkisinde Biyofilm Oluşumunun Değerlendirmesi.....	45
3.6.2.4 Gaz Kromatografisi İle Yağ Asidi Profillerinin Analizi	46
3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi	49
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	49
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	49
3.10. Etik Kurul Onayı	49
4. BULGULAR	50
4.1. EUCAST Mikro Dilüsyon Analizi Bulguları	50
4.2. Biyofilm Değerlendirme Analizi Bulguları	51
4.3. Gaz Kromatografisi İle Yağ Asidi Profillerinin Analizi	56
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
7. KAYNAKLAR.....	69
8. EKLER	84
8.1. EK-1 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul İzni	84
8.2. ARBİS Özgeçmişi	86

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeleri	40
Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	41
Tablo 3: Çalışmada Kullanılan Cihazlar.	43
Tablo 4: Crush S ve arkadaşlarının “biyofilm formasyon aktivitelerini Değerlendirme Ölçeği.....	45
Tablo 5: Gaz Kromatografisi İle Yağ Asidi Profillerinin Analizinde Kullanılan Ayıraçlar(Sherlock,2012).....	47
Tablo 6: <i>C.albicans ATCC 10231</i> ve <i>C.dublınıensis CD36</i> Suşlarının Amfoterisin Biyofilm Dereceleri	53
Tablo 7: <i>C.dublınıensis CD36</i> Suşunun Yağ Asidi Analizi Sonucu	58
Tablo 8: <i>C.albicans ATCC 12031</i> Suşunun Yağ Asidi Analizi Sonucu	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: <i>Candida dubliniensis</i> CD36 Köklendirilmemiş Filogenetik Komşu-Birleştirme Ağacı	16
Şekil 2: Klamidospor Üretimini Gösteren Işık Mikrografı.....	18
Şekil 3: <i>Candida albicans</i> Biyofilminin Floresan Mikroskobu Görüntüsü.....	21
Şekil 4: Biyofilm Gelişim Evreleri	22
Şekil 5: <i>Candida dubliniensis</i> NCPF 3949 Biyofilminin SEM Görüntüleri.....	25
Şekil 6: Gaz Kromatografisi ile Yağ AsidiProfillerininBelirlenmesi.....	46
Şekil 7: Gaz Kromatografisi Yönteminin “MIDI calibration mix for YST28 database” Sonucu.....	56
Şekil 8: Gaz Kromatografi Yönteminin “YST28 kütüphanesinin kalibrasyonu” Sonucu	57
Şekil 9: Gaz Kromatografisi Analizi İle <i>C.dubliniensis</i> CD36 Suşuna Ait Kromotografi.....	58
Şekil 10: Gaz Kromatografisi Analizi İle <i>Calbicans</i> ATCC 10231 Suşuna Ait Kromotografi.....	59

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: *C.albicans* ATCC 10231 suşunun amfoterisin B etkisinde biyofilm oluşumu.....52

Grafik 2: *C.dubliniensis* CD36 suşunun amfoterisin B antifungalı etkisinde biyofilm oluşumu.53



KISALTMALAR

AIDS.....	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Edinilmiş Bağımsızlık Eksikliği Sendromu)
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C.dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
AMP B.....	Amfoterisin B
EUCAST.....	European Committee on Antimicrobial Susceptibility
FDA.....	Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Yönetimi)
NIH.....	"National Institutes of Health" (Ulusal Sağlık Enstitüleri)
TLO.....	TelOmere Gen Ailesi
HIV.....	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (Human Immunodeficiency Virus)
MIS.....	Mikrobiyal Tanımlama Sistemi
SI.....	Benzerlik indeksi
EP.....	Ekzopolisakkarit
mM.....	Milimolar
MİK.....	Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
SDA.....	Saburooat Dekstrozo Agar
PBS.....	"Phosphate Buffered Saline"
OD.....	Optik Dansite
SS.....	Standart Sapma
FAME.....	Yağ Asidi Metil Ester (Fatty Acid Methyl Ester)
GC.....	Gaz Kromatografisi
HPLC.....	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
RHE.....	"Reconstruction Human Epithelial" Modeli
ECL.....	Eş Değer Zincir Uzunluğu

TEŞEKKÜR

Desteğini ve sabrını bu zorlu süreçte benden esirgemeyen başta sevgili eşim Ersun KAYA olmak üzere yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma sonsuz şükranlarımı sunarım.



**TRANSLASYONEL TIP BAKIŞ AÇIŞI İLE ANTİFUNGAL AJANLARIN
ETKİSİNDEKİ *CANDIDA ALBICANS* VE *CANDIDA DUBLINIENSIS*' İN TANISI ve
AYIRICI TANISINDA BİYOLOJİK GÖSTERGE OLARAK TÜRE ÖZGÜ YAĞ ASİDİ
METİL ESTER ARAŞTIRMASI**

Cansu AKGÜL KAYA

akgul.cansu@gmail.com

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Translasyonel Tıp Anabilim Dalı-
İzmir

ÖZET

Giriş: *Candida* türleri konak savunma sisteminin zayıflaması durumunda 'fırsatçı patojen' olarak davranarak 'kandidazis' olarak adlandırılan enfeksiyonlara neden olurlar. Fenotipik ve genotipik açıdan birbirine oldukça benzer olmasından dolayı *Candida albicans* (*Calbicans*) ve *Candida dubliniensis* (*C.dubliniensis*) türlerinin tanı ve ayırıcı tanıları zorluklar yaşanır. *Candida albicans* ve *Candida dubliniensis* türlerinin antifungallere karşı direnç – duyarlılık şekilleri farklılık gösterebildiği için, ayırıcı tanıları özellikle immün yetmezlikli hastalarda önem kazanır. *C.dubliniensis*' in birçok izolatının antifungallere karşı duyarlı olmasına rağmen 'multidrug transporter genleri' eksprese ederek direnç geliştirebilmektedir. MIDI Sherlock Mikrobiyal tanımlama sistemi, türe özgü olan mikrobiyal yağ asidi metil esterlerini (FAME) gaz kromatografisi (GC) cihazı ile analiz ederek mikroorganizmaların identifikasyonunu sağlar.

Amaç: *Calbicans* ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 standart suşlarının amfoterisin B antifungaline karşı 'Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu' (MİK) değerlerinin belirlenmesi, antifungal etkisinde biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi ve yağ asidi profillerinin belirlenmesidir.

Yöntem: *Candida albicans* ATCC10231 ve *Candida dubliniensis* CD36 standart suşlarından analiz için hazır 'hücresel yağ asitleri' elde edildi. Amfoterisin B antifungalinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerlerini belirlemek için Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) sıvı mikro dilüsyon yöntemi kullanıldı. Antifungal etkisindeki suşların biyofilm değerlendirmesi kristal viyole boyama yöntemi ile yapıldı.

Bulgular: *C.albicans* ATCC 10231 suşu için amfoterisin B MİK yoğunluğu 64 µg/ml olarak belirlendi. *C.dubliniensis* CD36 suşu için amfoterisin B MİK yoğunluğu 64 µg/ml olarak belirlendi. Antifungale maruz bırakılmayan *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 suşlarının biyofilm oluşturduğu saptandı. Suşların amfoterisin B MİK konsantrasyonlarında da biyofilm oluşturduğu görüldü. *C.dubliniensis* CD36 suşunun *C.albicans* ATCC 10231 suşuna göre yüzeye daha güçlü adere olduğu tespit edildi. Amfoterisin B antifungalinin MİK ve sub-MİK konsantrasyonları *C.dubliniensis* CD36 suşunun biyofilm oluşumunda inhibisyona yol açarken, MİK yoğunluğu *C.albicans* ATCC 10231 suşunda anlamlı bir inhibisyona neden olmadığı belirlendi ve sub-MİK yoğunluklarında biyofilm oluşumunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi. *C.albicans* ATCC 10231 suşuna spesifik iki, *C.dubliniensis* CD36 suşuna spesifik bir referans pik olduğu belirlendi. Bir tanesi dallanma özelliği farklı olan toplam altı ortak yağ asidi referans piki elde edildi.

Sonuç: *C.dubliniensis* CD36 ve *C.albicans* ATCC 10231 suşlarının amfoterisin B antifungal için MİK yoğunlukları aynı olmasına rağmen *C.dubliniensis* CD36 suşunun yüzeye daha güçlü adere olduğu tespit edilmiştir. *C.dubliniensis*CD36 suşu yüzeye daha güçlü adere olmasına karşın, amfoterisin B antifungalinin inhibisyon etkisinin *C.albicans* ATCC 10231 suşuna göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar gösteriyor ki, morfolojik ve genotipik olarak birbirine benzer olan suşlarla yapılan analizlerde elde edilebilecek türe özgü tanı belirteçleri, enfeksiyonun tanısının konulmasında ve seyrinin izlenmesinde son derece önemlidir.

Anahtar Sözcükler: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK), Yağ Asidi Profilleri

**SPECIES-SPECIFIC FATTY ACID METHYL ESTER RESEARCH AS A
BIOLOGICAL INDICATOR IN THE DIAGNOSIS AND DIFFERENTIAL DIAGNOSIS
OF *CANDIDA ALBICANS* AND *CANDIDA DUBLINIENSIS* WITH THE
TRASLATIONAL MEDICINE PERSPECTIVE**

Cansu AKGÜL KAYA

akgul.cansu@gmail.com

Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of
Translational Medicine- Izmir

ABSTRACT

Introduction and Purpose: *Candida* species may act as an opportunistic pathogen in case of weakening of the host defense system and cause infections called as candidiasis. Because of the similar phenotypic and genotypic aspects, *Candida albicans* (*C.albicans*) and *Candida dubliniensis* (*C.dubliniensis*) have difficulties in the diagnosis and differential diagnosis. Since *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* species differ in their resistance to antifungals, their differential diagnosis is particularly important in immunodeficient patients. Although many isolates of *C. dubliniensis* are sensitive to antifungals, they can develop resistance by expressing multidrug transporter genes. The MIDI Sherlock Microbial Identification System provides the identification of microorganisms by analyzing species-specific microbial fatty acid methyl esters (FAME) with gas chromatography(GC).

Objective: Determination of 'Minimum Inhibition Concentration' (MIC) values of fluconazole and amphotericin B antifungals of *C.albicans* ATCC 10231 and *C.dubliniensis* CD36 standard strains, evaluation of biofilm formation under antifungal effect and determination of fatty acid profiles.

Method: *Candida albicans* ATCC10231 and *Candida dubliniensis* CD36 standard strains were prepared for analysis of cellular fatty acids. To determine the Minimum Inhibition Concentration (MIC) values of amphotericin B antifungals, European Antimicrobial Susceptibility Test Committee (EUCAST) liquid micro dilution method was used. Biofilm evaluation of strains under antifungal effect was performed by crystal violet staining method.

Results: The amphotericin B MIC concentration for *C.albicans ATCC 10231* strain was 64 µg / ml. Amphotericin B MIC concentration for *C.dubliniensis CD36* strain 64 µg / ml. It was determined that *C. albicans ATCC 10231* and *C. dubliniensis CD36* strains which were not exposed to antifungal were biofilm. The strains were also found to produce biofilm at amphotericin B MIC concentrations. *C.dubliniensis CD36* was found to be more potent to the surface than *C.albicans ATCC 10231*. MIC and sub-MIC concentrations of amphotericin B antifungal lead to inhibition of the biofilm formation of *C.dubliniensis CD36* strain, while MIC concentration was determined not to cause a significant inhibition of *C.albicans ATCC 10231* strain, and biofilm formation was significantly increased at sub-MIC concentrations. It was identified that there were two reference peaks specific for *C.albicans ATCC 10231* strain and a specific reference peak for *C.dubliniensis CD36* strain. A total of six common fatty acid reference peaks were obtained, one of which had different branching properties.

Conclusion: Although MIC concentrations of *C.dubliniensis CD36* and *C.albicans ATCC 10231* were the same for amphotericin B antifungal, *C.dubliniensis CD36* was found to be more potent to the surface. Although *C. dubliniensis CD36* was more strongly adherent to the surface, it was found that the inhibition effect of amphotericin B antifungal was higher than that of *C.albicans ATCC 10231*. The results show that species-specific diagnostic markers that can be obtained in the analysis of strains that are morphologically and genotypically similar to each other are extremely important in diagnosing and monitoring the course of the infection.

Key Words: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Fatty Acid Profiles

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 Problemin Tanımı ve Önemi

Yeni teknolojiler ve ileri laboratuvar tekniklerinin yardımı, daha fazla araştırma yapmaya ve insan hayatını iyileştiren pratik uygulamaları bulmaya teşvik eder. Translasyonel Tıp'ın, laboratuvardan hasta yatağına, hasta yatağından laboratuvara ('from benchside to bedside— from bedside to benchside') sloganıyla benimsediği felsefe ile temel amaç, klinisyenin hasta başındaki sorunlarına katkıda bulunmaktır (Lama J ve ark, 2014).

Candida türleri sağlıklı bireyler için genellikle zararsızdır. Fakat konak savunma sisteminin zayıflaması durumunda 'fırsatçı patojen' olarak davranarak 'kandidazis' olarak adlandırılan sistemik ve yüzeysel enfeksiyonlara neden olmaktadır (Moran GP ve ark, 2012).

Fenotipik ve genotipik açıdan birbirine oldukça benzer olan iki *Candida* türü *Candida albicans* ve *Candida dubliniensis* rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında morfolojik farklılıklara dayanan analizler ile tanımlanır. Tıbbi mikoloji laboratuvarlarında *C.albicans* ve *C.dubliniensis*' in tanısında kullanılan iki 'altın standart' test vardır. Bu testler germ tüpü üretimi ve klamidospore üretimine dayanır. *C.albicans* ve *C.dubliniensis* türlerinin her ikisi de bu altın standart testlerine pozitif sonuç verir (Sullivan DJ ve ark, 1995).

Coleman ve arkadaşları, *Candida dubliniensis* (*C.dubliniensis*) birçok izolatinin flukonazol ve amfoterisin B antifungallerine karşı duyarlı olmasına rağmen 'multidrug transporter genlerini' eksprese ederek direnç geliştirebildiklerini ortaya koymuştur (Coleman DC ve ark, 2010).

MIDI Sherlock Mikrobiyal Tanımlama Sistemi, mikrobiyal yağ asidi metil esterlerin (FAME) gaz kromatografisi (GC) cihazı ile analizine dayanan tam otomatik ve analitik bir sistemdir. Mikrobiyal yağ asidi profillerinin türe özgü olması, analiz edilecek örneğin yağ asidi profillerinin kütüphanede tanımlı olan yağ asidi profilleri ile

karşılaştırılması ve benzerlik endeksinin (SI) belirlenmesi ile mikroorganizmaların identifikasyonunu sağlar (**Sasser M, 2001**). Gaz kromatografisi yazılımında mayaların ‘yağ asidi dizilimleri’ ile ilgili iki kütüphane (YSTCLN ve YST28) bulunmaktadır (**Sherlock Manual,2012**).

Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının direnç gelişimine neden olması Candida enfeksiyonlarının yaygınlaşmasına neden olmaktadır. Direnç gelişiminin evresini belirlemek amacıyla antifungal etkisindeki *C.albicans* ve *C.dubliniensis* suşlarının, konak savunma sisteminde oluşturması beklenen immün yanıtın ‘yağ asidi profili’ düzeyinde karşılaştırılması ve sorgulanması; enfeksiyonun tanı ve tedavisinin hızlı ve doğru uygulanması açısından son derece önemlidir.

1.2 Araştırmanın Amacı

Bu yüksek lisans tez araştırmasında, sağlık bilimlerinde çok disiplinli bir araştırma-geliştirme (Ar-Ge) alanı olan “Translasyonel Tıp” (laboratuvardan hasta yatağına, hasta yatağından laboratuvara- “from benchside to bedside-from bedside to benchside”) kavramına uygun şekilde, “klinikyenin hasta başındaki sorunlarına katkıda bulunmak” temel amaç olarak belirlenmiştir. Bu yüksek lisans tez çalışması *Candida dubliniensis* (*C.dubliniensis*)’ in tanısı ve ayırıcı tanısında yağ asidi değerlendirilmesine dayanan yeni bir alan başlatılması amaçlanmaktadır.

Araştırmanın temel yöntemi, “Food and Drug Administration” (FDA, FDA onayı: 50(k) Number: kO52485) onaylı hızlı ve özgün bir yağ asidi tanımlamasını esas alan ve mikrobiyal identifikasyon sistemi olan “MIDI Sherlock Mikrobiyal Tanımlama Sistemi” ve (Microbial ID, Newark, DE) “Gas Chromatography” (GC, Gaz Kromatografisi) cihazı ile yağ asitlerinin ayırımıdır. Yüksek lisans tez çalışmasının basamakları aşağıdaki şekilde belirlenmiştir.

- 1) *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 standart suşlarının amfoterisin B antifungaline karşı ‘Minimum İnhibisyon Konsatrasyonu’ (MİK) değerlerinin belirlenmesidir.
- 2) Antifungal etkisinde biyofilm oluşumunun değerlendirilmesidir.
- 3) Yağ asidi profillerinin belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Translasyonel Tıp Tanımı ve Amacı

Translasyonel Tıp, araştırmacıların hasta başında karşılaşılan sorunları çözmeye isteğini tanımlayan ve gün geçtikçe daha fazla kullanılan yeni nesil bir terimdir. Bu istek, bilimsel finansman kuruluşları ("National Institutes of Health", NIH), düzenleyici makamlar ("Food And Drug Administration" FDA), araştırmacılar ve hekim, hemşire gibi hasta bakımını sağlayan sağlık personelleri tarafından ilgi görerek, giderek daha fazla kullanılmaya başlanmıştır. Translasyonel Tıp' ın, bir Araştırma-Geliştirme (Ar-Ge) çalışmasında klinik öncesi (temel) ve klinik aşamalar arasındaki iş birliğinin iyileştirilmesini sağlayacak bir çözüm olduğu düşünülmektedir (**CenterWatch**, <http://www.centerwatch.com/patient/drugs/druglist.html>). Deney tüpü analizleri, hayvan deneyleri, ve erken insan denemeleri, yeni keşfedilen bir bileşiğin veya cihazın etkinliğini ve güvenilirliğini tam olarak yansıtamaz Bu hedef ancak translasyonel araştırmalar ile standart, tekrarlanabilir ve güvenilir bilimsel yöntemlerin geliştirilmesi ve desteklenmesi sonucunda gerçekleştirilebilir. Bu, temel olarak biyolojik belirteçlerin gelişimi ve değerlendirilmesi, biyoistatistik yöntemleri, akıllı (personel hatasını minimuma indiren) ve hızlandırılmış erken insan çalışmalarının tasarımı ve diğer özellikler arasındaki karar algoritmaları ile ilgilidir (**Marincola FM,2007**). Bu nedenle "Tıpta Translasyonel Bilim" adını alır (**Wehling,2008**).

Translasyonel tıp, temel ve klinik sahada çalışan bilim insanları arasında çift yönlü bilgi akışını destekleyerek, yeni biyoteknolojik süreçleri optimize ederek ve terapötik kavramların klinik uygulamalarda iyileşmesini hedefleyerek; hastaların yaşam kalitesini artırma konusunda önemli bir rol oynamaktadır (**Wang XD, 2011**). Translasyonel Tıp, insan hastalıklarının mekanizmalarını ve tedavi sürecini anlama, klinik araştırma ve uygulama potansiyeli olarak tanımlanabilir (**Aoki KR,2006**). Translasyonel Tıp, klinik öncesi araştırmalardan klinik uygulamalara geçişi, bilim insanları arasındaki iletişimi hızlandırmayı, sağlık hizmetlerinin keşfedilmesini ve geliştirilmesini hedefler. Ayrıca moleküler mekanizmalar, klinik sorular ve deneyim ile ilgili süreçlerle de ilgilenerek yeni görüşlere odaklanır. Hastaya spesifik biyobelirteçleri, hastalığın patogenezi ve tedavisi arasındaki mekanizmalarını anlamak için klinik ve translasyonel tıp verilerini kullanır. Klinik semptomları

hafifletebilmek ve yaşam kalitesini arttırabilmek için en uygun yöntemlerin belirlenmesini sağlar. Bu sürece bağlı olarak, klinik öncesi çalışmalarla seçilen ilaçların etkinliği ve güvenilirliği, klinik deneme aşamasında translasyonel tıp yaklaşımıyla uygulanabilir ve terapötik yaklaşımlara dönüştürülebilir **(Aoki KR,2006)**. Bu yaklaşımın benimsenmesi ile hastalığa özgü moleküler mekanizmaların anlaşılması ve önleyici, kişiselleştirilmiş ilaçların geliştirilmesini kolaylaştıran bilgiler elde edinilebilir **(Abraham E ve ark, 2012)**.

Ulusal Sağlık Enstitüleri' ne ("National Institutes of Health",NIH) göre translasyonel araştırmalar, hastalığın tedavisi ve önlenmesi için bilimsel araştırma yöntemlerine dayanarak oluşturulan fikir, öngörü ve keşifleri uygulama sürecidir **(Fontana J ve ark, 2012)**. NIH' e göre translasyonel araştırmaların iki alanı vardır. Bunlardan ilki, laboratuvar ve klinik öncesi çalışmalarda araştırma sırasında ortaya çıkan keşiflerin, insan üzerinde denenmesi ve çalışmaların geliştirilmesi sürecidir. İkinci alan ise, en iyi uygulamaların toplum tarafından daha fazla benimsenmesini sağlamaya yönelik araştırmalardır. Hastalıkları tedavi etmeye ve önlemeye yönelik stratejilerin maliyetleri de translasyonel tıbbın üzerinde durduğu bir diğer önemli konudur **(Anderle P ve ark, 2017)**.

Translasyonel araştırmaları tanımlayan alanlar ve hedefler aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- ☐ Klinik olarak ilgili biyobelirteçlerin tanımlanması ve validasyonu için ilaç geliştirme kılavuzlarının oluşturulması,
- ☐ Yeni bulgular veya yeni strateji prensipleri geliştirmek amacıyla yapılan deneysel, insan dışı ve klinik olmayan çalışmalar,
- ☐ Tedavilerin geliştirilmesine biyolojik olarak temel sağlayan klinik araştırmalar,
- ☐ Terapötiklerin insan biyolojisi üzerindeki etkilerini tanımlayan temel bilim çalışmaları **(Mankoff S ve ark, 2004)**.

Translasyonel araştırma kapsamında yapılacak herhangi bir çalışma belirtilen amaçlara uygun olarak başlatılmalıdır. Translasyonel araştırmalar, klinikte yeni teknolojiler icat etmeye veya hastalık hakkında kritik bir keşif yapmaya odaklanmaz; laboratuvardan ve hayvan deneylerinden elde edilen verilerle ortaya atılan hipotezleri

test eder ve bu testlerden elde edilen verileri klinik araştırmalarda kullanılabilecek forma getirir (**Littman BH ve ark, 2007**).

Translasyonel tıp araştırmaları, yeni keşifleri, hastalığı tanımlanma sürecinin etkinliğini arttıran gelişmeleri, alternatif hipotezlerin tanımlanmasını, halk sağlığını iyileştirmek için yeni görüş ve bilgilerin klinik uygulamalara aktarılmasını sağlayan çok disiplini bir ağı temsil eder.

Translasyonel araştırmaların önündeki engeller şu şekilde sıralanabilir;

- ☐ Finansman eksikliği,
- ☐ Yüksek maliyetler,
- ☐ Yetersiz örnek,
- ☐ Yavaş alınan sonuçlar,
- ☐ Çıkar çatışması,
- ☐ Yasal düzenleme yükleri,
- ☐ Mahremiyet hakkı,
- ☐ Yetersiz alt yapı,
- ☐ Nitelikli ve istekli araştırmacı eksikliği,
- ☐ Uyumsuz veri tabanları,
- ☐ Yetersiz teşvik,
- ☐ Kongre ve halk desteği eksikliği (**Cohen J ve ark,2005**).

Bu engellerin ortadan kaldırılması için aşağıdaki stratejiler göz önünde bulundurulabilir;

- ☐ Akademinin translasyonel araştırmalar konusunda yetenekli ve eğitimli araştırmacılar yetiştirebileceği, sektörün translasyonel araştırmalara destek olabileceği akademi-sanayi ortaklığını optimize etmek,
- ☐ Gereksiz yükleri azaltarak ve etkinliği arttırarak klinik araştırma maliyetlerini azaltmak,
- ☐ Biyomedikal araştırmalara kamu desteği sağlamak,
- ☐ Alternatif kaynakları değerlendirmek (**Littman BH ve ark,2007**).

Bu süreç laboratuvarıdan hasta yatağına-hasta yatağından laboratuvara ("from benchside to bedside- from bedside to bench side") olarak özetlenebilir (**Lama J ve ark, 2014; Littman BH ve ark, 2007**).

Translasyonel araştırmalar, mikrobiyal toplulukların varlığını belirlemek ve karakterize etmek, insan vucudunda kolonize olduğu bölgeleri belirlemek ve insan sağlığı açısından önemini değerlendirebilmek amacıyla ‘omik’ yaklaşımlarını kullanmaktadır. Genomik, proteomik, metabolomik gibi alanları kapsayan bu yaklaşım, enfeksiyona neden olan patojenin ve enfekte ettiği konakta gerçekleşen moleküler ve hücresel süreçlerin tanımlanmasına olanak sağlar. Bu durum translasyonel araştırmalar kapsamında, patojen/konak arasındaki etkileşimlerden elde edilen verilerin bir araya getirilerek, klinikte tedavi edici/önleyici olarak kullanılmasına olanak tanır **(Fontana J ve ark, 2012)**.

Transplantasyon, kemoterapi, İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü(HIV, “Human Immunodeficiency Virus”) enfeksiyonu, kortikosteroid veya immünosüpresif ajanların kullanımı gibi risk faktörlerine sahip hasta sayısının artması invaziv enfeksiyon insidansında artışa neden olmaktadır **(Cornely OA,2011)**. Hasta ve hastalık yönetiminin iyi bir şekilde uygulanabilmesi basit, hızlı, ucuz ve sağlam tanımlama yöntemlerini gerektirir **(Cuenca-Estrella M,2011)**. Bir enfeksiyona tanı koyulması; klinik bulgular, hastadan alınan örneklerden organizma elde edilmesi ya da elde edilen organizmanın histopatolojik tespiti ile sınırlıdır. Fungal enfeksiyonların konvansiyonel mikolojik ve histopatolojik teknikler kullanılarak doğru bir şekilde tespit edilebilmesi, uygulanan bu yöntemlerin suboptimal duyarlılığı nedeniyle zaman alıcı ve zordur. Fakat translasyonel araştırmalar ile antikor, hücre duvarı bileşenleri ve mantar-spesifik nükleik asit testleri ile non-invaziv tanı deneylerinin geliştirilmesi mümkün hale gelmiştir **(Hoenigi M ve ark,2012)**. Bu nedenle translasyonel tıp temel olarak, yeni biyobelirteçleri tanımlamak için omik bilimleri ve biyoinformatik araçları kullanır **(Shahzad A ve ark 2012)**.

Translasyonel tıpta iyileşme sağlamak için farklı düzeylerde değişikliklerin yapılması gerekmektedir. Akademi, sanayi ve politika arasındaki iletişim geliştirilmeli ve entegrasyonu sağlanmalıdır. Temel bilimlerle ilgilenen bilim insanlarının, pratik uygulamalarda gerçeğe neyin gerekli olduğu ve hangi risklerle karşılaşabileceği konusundaki farkındalıkları arttırılmalıdır **(Bornstein SR ve ark, 2011)**. Translasyonel araştırmaların, farklı yetkinlikler gerektiren karmaşık ve multidisipliner faaliyet ağı göz önüne alındığında ekip çalışması çok önemli bir konu haline gelmektedir. Bu nedenle

benzer zorluk seviyelerinde işbirliği yapan ortakların başarılarının mevcut sistemle değerlendirilmesi zorlu bir hal alır. Translasyonel araştırmalarla ilgilenen bilim insanlarının kalitesini değerlendirmek için farklı değerlendirme modelleri uygulanmalıdır. Translasyonel tıbbın başarısı, küçük bir çalışma grubunun bilimsel ve klinik başarılarıyla değil, yeni tedaviler geliştirmek için eğitimsel, finansal, etik, sosyal, düzenleyici, yasal, bilimsel faaliyetlerin etkin entegrasyonu ile ilgilidir **(Keramaris NC ve ark,2008)**. Tıbbi bir ürünün bilimsel gelişim süreci hakkında stratejik ve girişimci bir anlayışla bu alanda çalışmak isteyen insanların 3 genel öğrenme hedefi üzerinde durması gerekir. İlk hedef, gerekli teknik ve bilimsel bilgiyi sağlamaya odaklanır. İkinci hedef, keşif ve geliştirme sürecinin her aşamasında bilimsel bulguları eleştirel olarak değerlendirebilmektir. Üçüncü hedef ise, stratejik planlamada gerekli adımları ve kararları almak için gerekli becerileri geliştirmektir **(Anderle P ve ark, 2017)**.

2.2 Candida Türleri ve Neden Olduğu Enfeksiyonların Tanımı

Mantarlar, insanlarda enfeksiyona neden olan önemli etkenlerden biridir. Özellikle Candida türüne ait mayalar en önemli patojen mantarlar arasında yer alır. Çoğu Candida türü bulunduğumuz çevrede mevcuttur. Çevremizde bulunan Candida türüne ait mayalardan yalnızca bir düzine kadarı insan vücudunda kolonize olmayı başarabilir. *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* ve *Candida guilliermondii* türleri insan vücudunda kolonize olmayı başararak enfeksiyona neden olabilir **(Moran GP ve ark,2012)**.

Candida türleri, sağlıklı bireyler için genellikle zararsızdır. Bu türe ait mayalar, doğumdan hemen sonra bebeğin oral boşluğuna, barsak yoluna ve vajinasına yerleşir. Sağlıklı ve yetişkin bireylerin derilerinde ve mukozal florasında kolonize olur. İnsan ile komensal bir birliktelik sergileyen Candida türleri uygun koşulları bulduğunda vücutta aşırı çoğalarak enfeksiyona neden olur. Konak savunma sisteminin herhangi bir şekilde tehlikeye girmesi sonucu, şartlara bağlı olarak aşırı üreyebilmeleri ve şiddetli enfeksiyonlara neden olabilme potansiyeline sahip olmalarından dolayı Candida türleri **“oportünist (fırsatçı)”** patojen olarak tanımlanır.

Candida türleri, ciltteki yüzeysel enfeksiyonlar aracılığıyla, oral boşluk ve mukozal membranın epitel hücrelerine tutunarak, konak hücrelerine girer ve kan yolu ile böbrek, karaciğer ve beyin gibi hayati organları enfekte etmek üzere vücuda dağılır. Candida türlerinin neden olduğu bu sistemik enfeksiyon çeşidi "**kandidazis**" olarak adlandırılır. *C.albicans* en patojenik maya türlerinden biri olarak kabul edilir ve epidemiyolojik çalışmaların çoğunda yüzeysel ve sistemik enfeksiyonların en yaygın nedeni olarak gösterilir. Diğer Candida türleri de kandidazis formları ile ilişkilidir ve her türün dağılımı, coğrafi bölge, hasta topluluğu ve antifungal ilaca maruziyete bağlı olarak değişebilir **(Moran GP ve ark,2012)**.

1995 yılında İrlanda, Dublin'de orofarengeal kandidazisli HIV ile enfekte bireylerde yeni bir Candida türü tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *Candida dubliniensis* (*C.dubliniensis*) olarak adlandırılan bu türün *C.albicans* ile yakından ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur. *C.albicans* ve *C.dubliniensis* tanısı rutin laboratuvarlarda, morfoloji ve biyokimyasal özelliklere dayanan testler ile yapılmaktadır. Birbirleri ile yakından ilişkili olan bu iki Candida türüne genetik karakterizasyonu yapılmadan tanı koyulması, yanlış tanı ve tedavi uygulamalarına neden olabilir **(Sullivan DJ ve ark, 1995)**.

C.dubliniensis, *C.albicans*'a spesifik olan hif ve klamidospore üretme yeteneği de dahil olmak üzere birçok fenotipik özelliği paylaşmaktadır. Filogenetik çalışmalar *C.dubliniensis* ve *C.albicans*'ın yakından ilişkili olduğuna ve klinik örneklerde iki türün ayrımının yapılmasının genellikle zor olduğuna işaret eder **(Moran GP ve ark, 2012)**.

2.2.1 Candida Türlerinin Oportünist Patojene Dönüşmesinin Nedenleri

Kandidazis'e neden olabilecek birçok öncül faktör vardır. Bunlar aşağıda belirtilen şekilde sıralanabilir;

- İmmün Baskılanma: HIV enfeksiyonu, antikanser terapisi ve immünosüpresyon (immün sistemi baskılayıcı) ilaçlarla tedavi, immün sistemin baskılanmasına neden olur **(Schorling SR ve ark,2000)**.

- Kateterizasyon: Kateter, maya hücrelerinin adezyonu (tutunması) için stabil bir ortam sağlar ve maya hücrelerinin dokuya ve kan damarlarına doğrudan inokülasyonuna neden olur **(Nicastri E ve ark,2001)**.
- Prematüre Doğum: Erken doğum olgunlaşmamış immün sisteme neden olur **(Challacombe SJ,1994)**.
- Aşırı Yaşlılık: 65 yaş ve üzeri bireylerde geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, normal bakteriyel floranın ve immün sistemin bozulmasına neden olur **(ChallacombeSJ,1994)**.
- Kortikosteroid Kullanımı: Yerel bağışıklık tepkisinin bozulmasına neden olur **(İnal AS ve ark,2013)**.
- Gastrointestinal Cerrahi: Maya hücrelerinin doğrudan kan dolaşımına inokülasyonuna neden olur **(Vincent JL ve ark,1998)**.
- Candida türlerinin öncelikli kolonizasyonu: Çoğu kandidazis vakasında, hastanın normal florasından endojen olarak izole edilebilirler **(Sullivan ve ark, 2005; Jordan RP ve ark,2014)**.

2.2.2. *Candida albicans* ve *Candida dubliniensis* Taksonomisi ve İlişkisi

C.albicans ve *C.dubliniensis*' e ait taksonomik bilgi aşağıdaki gibidir;

- Phylum: *Deuteromycota*
- Sınıf: *Blastomycetes*
- Takım: *Cryptococcales*
- Aile: *Cryptococcaceae*
- Genus: *Candida*
- Species: *Candida albicans* ve *Candida dubliniensis* **(Yücel A ve ark,1999)**.

Fungal taksonomi, fenotipik ve morfolojik özelliklere dayanmasından dolayı sınıflandırma yaparken bazı sorunlara neden olur. Çok sayıda ortak fenotipik ve morfolojik özelliğe sahip olan mantarların türlere ayrılabilmesi genetik karakterizasyon ile mümkün olabilir **(Check,1994)**. *Candida* cinsine ait türler, seksüel eksikliklerinden dolayı klasik olarak biyokimyasal reaksiyonlar ve morfolojik özellikler temelinde tanımlanmaktadır. Fakat substrat asimilasyonu, hücre duvarı bileşimi ve

hücre dışı proteolitik enzimlerin üretimi gibi fenotipik parametreler, *C.albicans* gibi bazı türlerde belirsiz ölçülerde farklılık gösterebilir. Bu nedenle tür kavramı belli bir dereceye kadar belirsizdir. Bu durum Candida türlerinin sınıflandırılmasında çok fazla karışıklığa neden olmaktadır **(Williamson ve ark,1986: Ghannoumetal,1990)**.

Hastanın öyküsü ve klinik bulguları, klinik tanıya yönelik önemli ipuçları vermektedir. Lezyon bölgesinden numune alınması (balgam, kan, omurilik sıvısı vb.) mantar enfeksiyonuna sahip hastaların belirlenmesi adına çok önemli bir adımdır. Etiyolojik teşhis, yüksek kalitede örnek eldesi, kültür enkübasyonu (24°C, 26°C, 37°C), kontaminasyondan kaçınma, mikoloji alanında mesleki eğitim ve biyolojik olarak güvenli laboratuvar koşullarının oluşturulması da dahil olmak üzere birçok bilgi ve el becerisi gerektiren işlem içerir **(Lama J ve ark, 2014)**.

Tıbbi mikoloji laboratuvarlarında, *C.albicans*'ın tanımlanması için yıllardır kullanılan iki 'altın standart test' vardır. Bunlar, *C.albicans* serumda inkübe edildiği zaman germ tüpü (hifal gelişimin ilk aşaması) üretmesi ve belirli besin maddelerinden yoksun ortamda kültüre edildiği zaman gözlenen klamidospor (fonksiyonu bilinmeyen kalın duvarlı refreakter sporlar) oluşumudur. Yakın zamana kadar, *C.albicans* germ tüpü ve klamidospor ürettiği bilinen tek türdü. Fakat 1995 yılında Sullivan ve arkadaşları, HIV ile enfekte bireylerin ağız boşluğunda, aynı morfolojik özelliklere sahip, yeni ve *C.albicans* ile yakından ilişkili yeni bir tür keşfetmiştir '*Candida dubliniensis*'. **(Sullivan DJ ve ark, 1995)**.

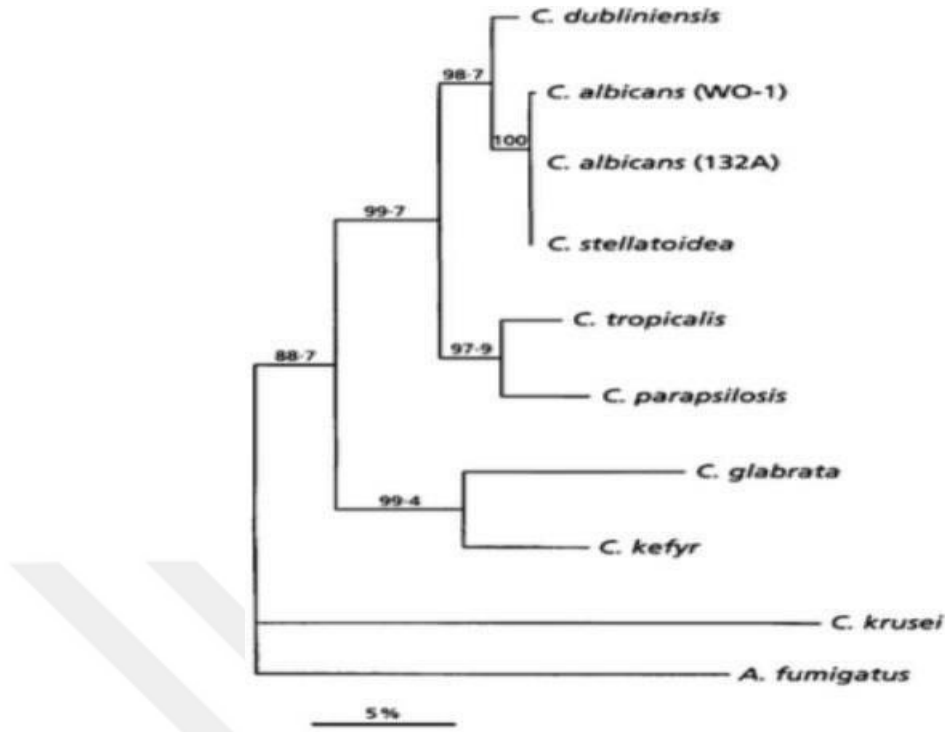
Candida türleri arasında ayırım yapabilmek ve epidemiyolojik araştırmalarda bir tür içerisindeki suşları ayırt etmek kesinlikle çok önemli ve yararlıdır **(Ruhnke M, 2006)**. Ayırım yapmak özellikle,

- (1) Enfeksiyon kaynağının izlenmesi,
- (2) Tekrarlayan enfeksiyonlarda, enfeksiyonun orijinal suştan mı yoksa yeni bir suş ile mi tekrar enfekte olduğunun belirlenmesi,
- (3) Klinik bir örnekte, birden fazla suşun olup olmadığının belirlenmesi gibi tedavi seyrini etkileyebilecek önemli bir etkiye sahiptir **(Sullivan D ve ark, 2011)**.

2.2.3 *Candida dubliniensis* spp.' in Keşfi ve *Candida albicans* ile ilişkisi

Atipik *Candida* izolatları ilk olarak 1995 yılında Dublin, İrlanda' da tanımlanmıştır. Atipik *Candida* izolatları Mart 1991-Eylül 1992 tarihleri arasında Dublin Diş Hastanesi'ne başvuran tekrarlayan oral adezyon vakası tanısı konulmuş 60 HIV ile enfekte, üç HIV negatif bireyin oral bölgesinden izole edilmiştir. Elde edilen tüm izolatlar germ tüpü testinde pozitif sonuç vermiş ve üçlü veya bitişik çiftler halinde düzenlenmiş bol miktarda klamidospore oluşturmuşlardır. Elde edilen sonuçlara göre izolatların ilk olarak *Candida albicans* serotip A olduğu düşünülse de, izolatların alışılmamış 'karbonhidrat asimilasyon profiline' sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Sullivan DJ ve ark,1995).

Dokuz atipik *Candida* izolatının büyük ribozomal alt ünite genlerine ait V3 değişken bölgesinden alınan 500 bp'lık bir kısım sekanslanarak, karşılaştırılmıştır (Şekil1). Dokuz atipik *Candida* izolatının diğer *Candida* türlerinden önemli derecede farklı ve homojen kümelenme oluşturmamasından dolayı *C.albicans* ve *Candida stellotoidea* (*C.stellotoidea*) türleri ile daha yakından ilişkili olduğu düşünülmüştür. *C.albicans*' a spesifik olan 27A probu ile dokuz atipik *Candida* izolatına ait beş farklı oligonukleotid ve ökaryot mikrosatellit tekrar sekansları elde edilerek genomik DNA Parmak İzi Yöntemi ("DNA Fingerprint") ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda atipik *Candida* izolatlarının *C.albicans* ve *C.stellotoidea* türlerinden farklı bir genomik organizasyona sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Sonuç olarak *C.albicans*' a çok benzer fakat farklı karbonhidrat asimilasyon profili ve genomik organizasyona sahip yeni bir fungal patojen türü olan "*CANDIDA DUBLINIENSIS*" tanımlamıştır (Sullivan DJ ve ark,1995).



Şekil 1: *C.dubliniensis* CD36 Köklendirilmemiş Filogenetik Komşu-Birleştirme Ağacı: Büyük ribozomal genlerinin V3 bölgesindeki 500 bp'lik bölümünün hizalanması ile elde edilmiştir. Ölçek çizgisi, nükleotid sekansındaki %5'lik farkı temsil eder. Düğümelerde yer alan sayılar, önyükleme(bootstrap) analizi ile elde edilmiş olup rastgele oluşturulan düzenlemenin 1000 ağaçta meydana gelme yüzdesini gösterir (Sullivan DJ ve ark,1995).

2.2.4. *Candida dubliniensis* sp. nov. Özellikleri

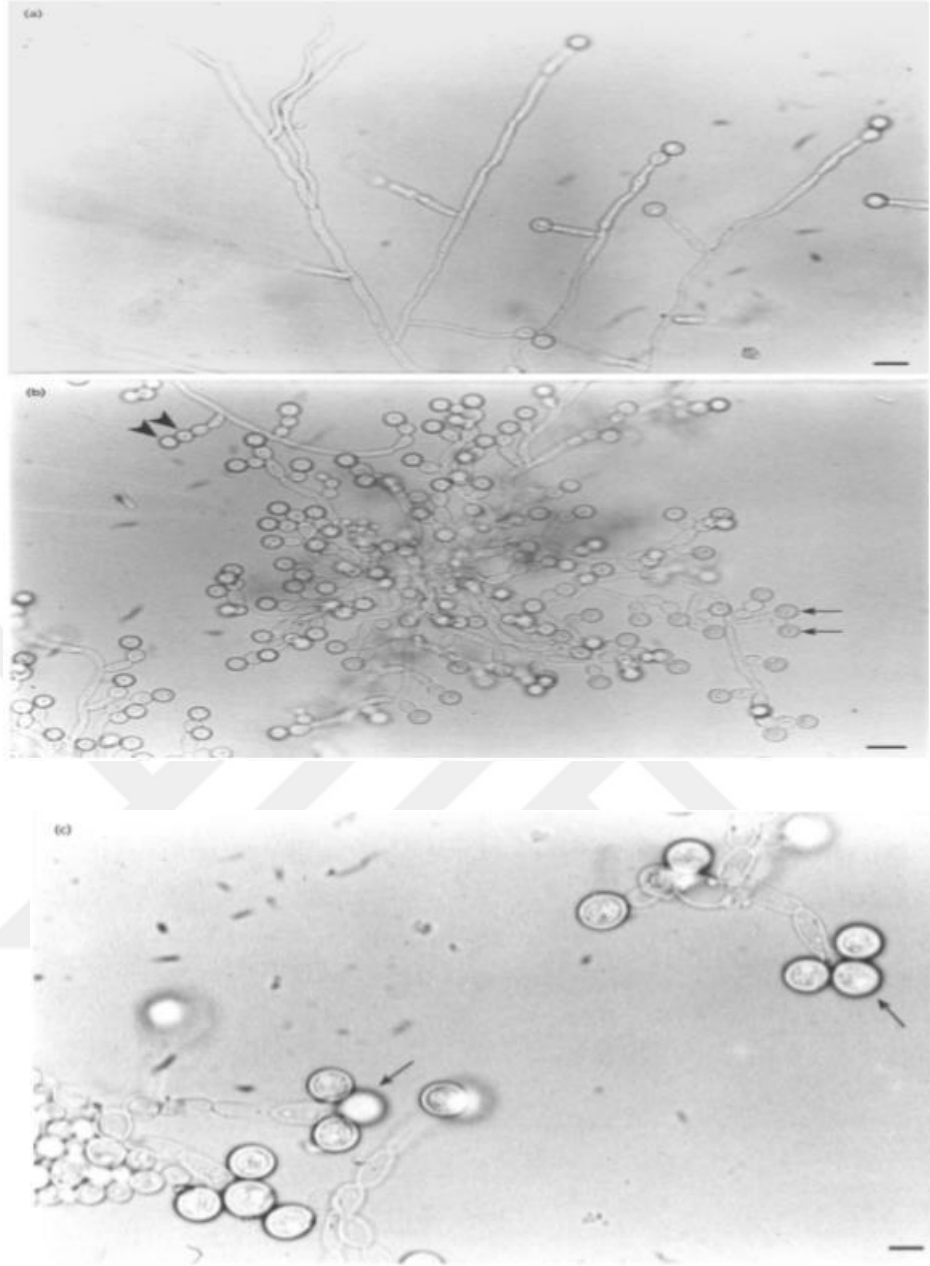
Candida dubliniensis (dubliniensis: Dublin, İrlanda' nın başkenti)

- Oval veya küresel blastosporlardan oluşan bir mayadır (3—7µm x 3—14µm).
- Sabouraud dekstroza agarda krem-renkli koloniler, patates dekstroza agarda ise krem-beyaz koloniler halinde, yuvarlak, konveks biçimde üremektedirler.
- RAT agar veya mısır unu Tween 80 agar üzerinde, 25-27°C'de, 48-72 saat arasında, septada unilateral, multilateral ve bilateral dalları olan ve bol miktarda refraktif pseudohif (ve birkaç gerçek hif) ve kalın duvarlı klamidiospor üretirler (Şeki2).

- Genellikle klamidosporeler tek süspensör hücre tarafından, tek dallı pseudohif olarak, dallanmış terminal olarak eklenen üçlü veya bitişik çiftler halinde düzenlenmiş olarak üretilir.
- Bir su banyosunda, 37°C'de, taze toplanmış insan serumu içinde iki saat enkübasyon sonucu germ tüpü üretirler. 37°C ve 30°C'de iyi bir üreme sergilerken, 42°C'de üreyemezler.
- Biyokimyasal olarak; galaktoz, glukoz, maltoz, süktroz, mannitol, sorbitol, 2-keto glukonat ve glukozamini asimile edebilirler.
- Biyokimyasal olarak; arabinoz, ksiloz, riboz, sorboze, rhamnose, alfa-metil-D glukosid, sellobioz, laktoz, melibioz, melezitoz, rafinoz, gliserol, eritrol, inositol, glukuronat, DL—laktat, levulinate, glukonat ve potasyum nitrati asimile edemezler.
- Suşlar palatinoz ve trehaloza karşı değişken asimilasyon profilleri sergiler, sikloheksimid varlığında ürerler ve aeskülini hidrolize edemezler (**Sullivan DJ ve ark,1995**).

C. albicans ve *C. dubliniensis* ayırımında aşağıda verilen bilgilere başvurulabilir;

- *C. dubliniensis*' in 45°C' de üreyememe özelliği
- *C. dubliniensis*'in daha fazla miktarda klamidospore üretmesi,
- Karbonhidrat asimilasyon profillerinin farklı olması,
- Germ tüpü testi sonucu pozitifken fakat *Candida albicans* için yapılan PNA FISH testinin negatif olması,
- DNA dizisi veya MALDI-TOF paterni (**Procop GW,2017**).



Şekil 2: Klamidospor Üretimini Gösteren Işık Mikrografı: RAT agarda, 25-27°C'de, 72 saat enkübasyon sonucunda klamidospor üretimini gösteren ışık mikroagrafları. (a)*Candida albicans* 132A suşu tarafından üretilen klamidospor ve pseudohifler (b)*Candida dubliniensis* CD33 izolatına ait bol miktardaki klamidospor üretimi (c) *Candida dubliniensis* CD33 izolatına ait klamidosporların üçlü düzeni. Bitişik olarak düzenlenen klamidosporlar ok başları, terminal çiftler ise oklarla gösterilmiştir. Barlar:(a,b) 10µm, (c) 5µm (Sullivan DJ ve ark, 1995).

2.3. Biyofilm Oluşumu

Mikroorganizmalar doğada serbest (planktonik) halde bulunurken, biyotik veya abiyotik yüzeylere adezyonu sonucunda 'polimikrobiyal biyofilm' formunda görülürler **(Peters BM ve ark,2012)**. Mikroorganizmalardan bazıları birlikte yaşamayı kolaylaştırmak için sinerjistik ilişkiler kurar. Bazı mikroorganizmalar ise rekabetçi (antagonistik) bir yaklaşım sergiler **(Bayrakal V ve ark,2018;Peters BM ve ark,2012)**.

Biyofilm, bakteri ve mantarların polisakkarit açısından zengin hücre dışı matris içine gömülü halde bulunarak oluşturdukları mikrobiyal niş olarak tanımlanır **(Chandra J ve ark,2015)**. Biyofilmler, su kanalları ile birbirine bağlanan ve hücre dışı matris içine gömülü kapsüllenmiş aderent hücre ağından oluşan üç boyutlu mimariye sahip bir yapıdır **(Bachmann ve ark, 2002;Baillie GS ve ark,2000)**. Biyofilmler mikroorganizmanın ürettiği protein, polisakkarit ve DNA' dan oluşurlar **(Bayrakal V ve ark,2018)**.

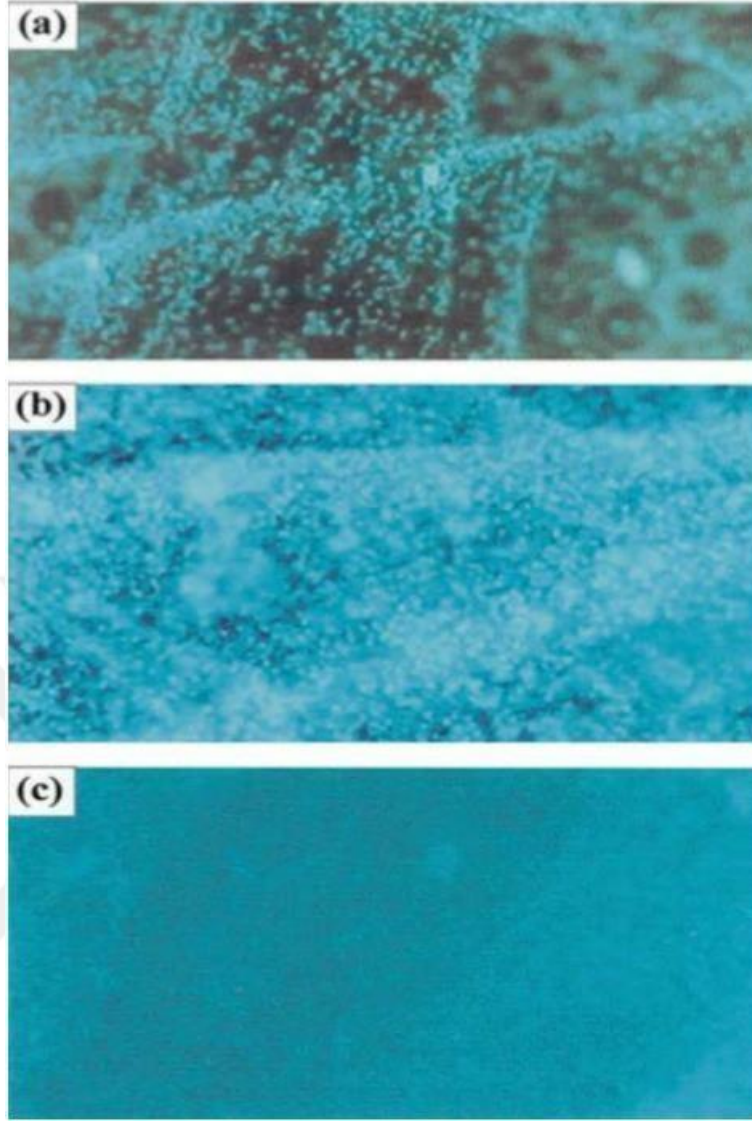
Biyofilm mikroorganizmaya konak bağışıklık sistemi, çevresel stres, besin eksikliği ve besin dengesizliklerine karşı dayanıklılık sağlayarak insan sağlığına zarar vermesine neden olur. Mikroorganizmaların antibiyotik veya antifungallerden korunmasını ve direnç geliştirmesini sağlayarak mikroorganizmaların güvende olmasını ve duyarlılığın azalmasını sağlar **(Costerton JW ve ark, 1987)**. Biyofilm oluşumu üç evrede gerçekleşir. Bu evreler erken evre (0-11 saat), ara evre (12-24 saat), olgunlaşma evresinden (24-48 saat) olarak tanımlanır **(Chandra J. ve ark, 2001)**. Bu nedenle biyofilmler, enfeksiyonların tanı ve tedavi stratejilerini belirlemede büyük önem taşır. Mevcut terapötik uygulamalarda kalıcı olarak vücuda yerleştirilen cihazların (kateter, protez diş, ses protezleri, kontakt lensler vb.) kullanımı, hastane kaynaklı derin doku enfeksiyonları, transplantasyon prosedürleri, immün sistemin baskılanması (anti-kanser tedavisi vb.) ve diğer uzun süreli, yoğun tedavi süreçleri biyofilm oluşumuna katkıda bulunur. **(Donlan RM,2012)**. *In vivo* ve *in vitro* modellemelerin gelişimi Candida biyofilmlerinin, mikroskopik değerlendirilmesi ve gen/protein profilinin belirlenmesine olanak sağlar. *In vivo* modeller, vücut dokuları

üzerinde gelişen biyofilmler için, konak-patojen etkileşimlerini anlamaya yönelik çalışmaların yürütülmesine olanak sağlar **(Chandra J ve ark, 2015)**.

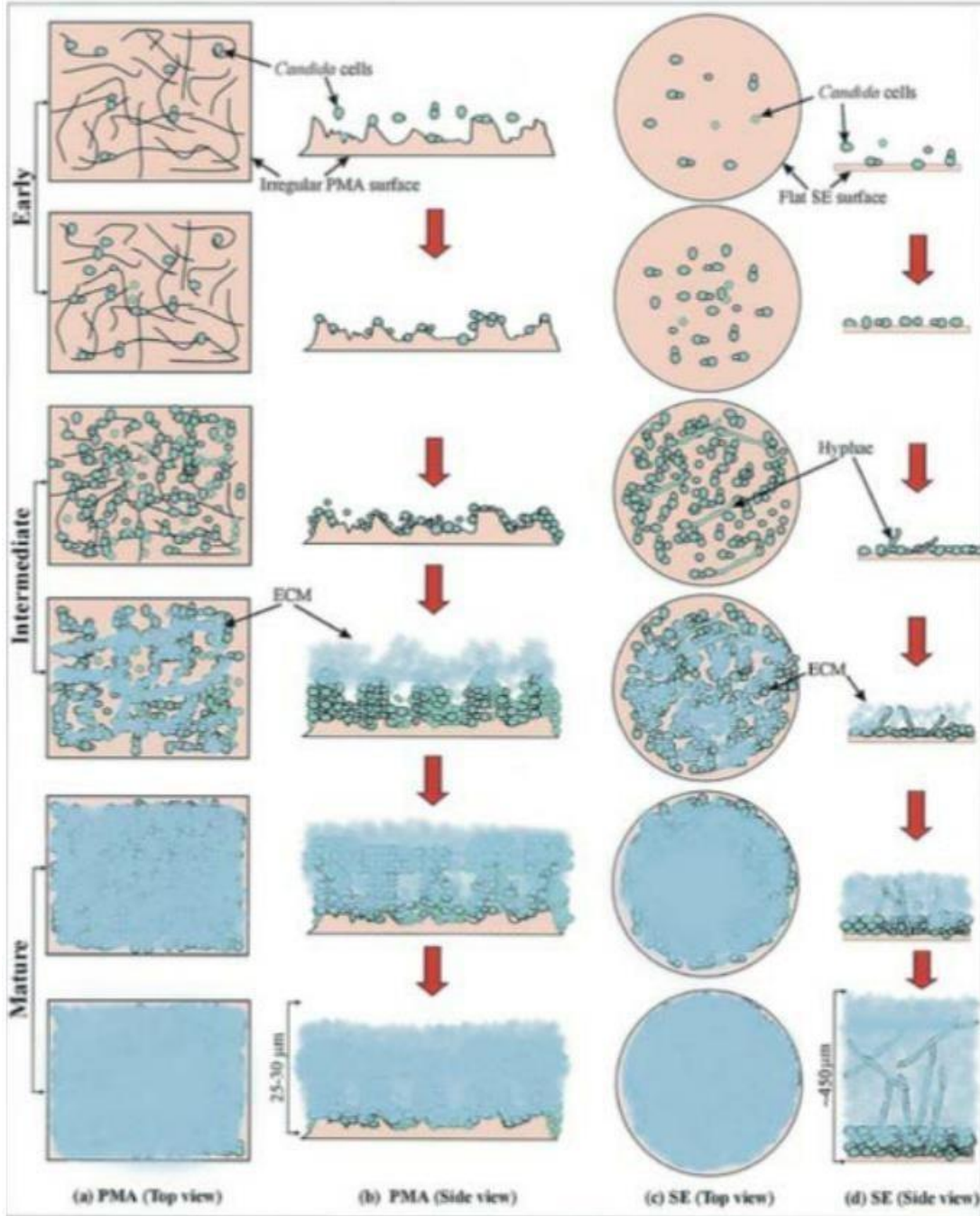
2.3.1. Biyofilm Morfolojisi ve Mimarisi

In vitro olarak oluşturulan *Candida* biyofilmleri, hücre dışı matris içine gömülmüş, polisakkarit açısından zengin maya hücrelerini içerir. *In vivo* veya hastalardan elde edilen örneklerdeki (intravasküler kateter, idrar sondası vb.) biyofilmler ise fibrinojen, ölü hücreler gibi konaktan gelen biyomolekülleri de içerir **(Chandra J ve ark, 2015)**.

Protez şeritler üzerinde *Candida* biyofilmlerinin üç boyutlu mimarisini ve topografisinin karakterize edilmesinin sonucunda, protez şeritlerinde oluşturulan *C.albicans* biyofilmlerinin, yoğun blastospor tabakası ve hücre dışı granüler, polimerik matrise gömülmüş birkaç hifal element floresan mikroskobu ile gösterilmiştir. Floresan mikroskonu ile elde edilen verilere göre, protez şeritlerinde *C.albicans* biyofilminin oluşumunun üç gelişim evresinde ilerlediği gösterilmiştir. Bu evreler; erken evre (0-11 saat), ara evre (12-24 saat) ve olgunlaşma evresi (24-48 saat) olmak üzere üçe ayrılır (Şekil 4). Erken dönemde *C.albicans* hücreleri, ayrı koloniler olarak blastospor (maya) hücresi olarak ürer. Fungal hücreler ara evrede, yüzeyde düzensiz büyüme göstererek kalın izlere dönüşürler ve kolonileri kaplayan ve toplayan hücresiz, polisakkarit açısından zengin ‘bulanık (puslu)’ bir film üretirler. Olgunlaşma evresinde ise ekstraselüler madde miktarı artmaya devam ederek, *C.albicans* kolonilerinin matris içine tamamen gömülmesini sağlar **(Chandra J ve ark, 2011)**.



Şekil 3: *C.albicans* Biyofilminin Floresan Mikroskobu Görüntüsü: Polimetilmetakrilat şeritlerinde *C.albicans* biyofilmine ait gelişim evreleri; 72 saatlik süre içerisinde (a)erken evre, (b)ara evre, (c)olgunlaşma evresi. Büyütme X10 (**Chandra ve ark, 2001**).



Şekil 4: Biyofilm Gelişim Evreleri: *C. albicans*'ta biyofilm gelişiminin şematik gösterimi. (a ve b) Polimetilmetakrilat (PMA) şeritleri üzerinde üretilen biyofilm. (c ve d) Silikon elastomer (SE) disklerinde üretilen biyofilm. a ve c üstten görülen alt tabakayı temsil ederken, c ve d sırasıyla PMA şeridinin ve SE diskinin yanlarından görünümü gösterir. ECM, hücre dışı malzeme (**Chandra ve ark,2001**).

2.3.2. Biyofilm Oluşumunu ve Mimarisini Etkileyen Faktörler

Biyofilm oluşumu; sıvı akışı, substrat, besin, tür çeşitliliği, konak reseptörleri ve mikrobiyal birliktelikler gibi çeşitli konak-Candida türevli değişkenlerden etkilenir (Chandra J ve ark, 2015).

2.3.2.1. Sıvı Akışı

Sıvı akışı gibi fizyolojik koşullar, enfeksiyon bölgesinde oluşan biyofilmlerin önemli modülatörlerindendir. Çünkü sıvı akışı, besinlerin değişimi ve yapısal bütünlüğünü etkileyebilir. Tükürük, kan ve idrar gibi sıvıların akışını taklit edebilmek, fungal biyofilmleri değerlendirebilmek açısından büyük önem taşır (Busscher HJ ve ark, 1997).

2.3.2.2. Substrat

Hawser ve arkadaşlarının 1994 yılında yaptığı çalışmada, farklı substratların Candida biyofilmlerinin mimarisi, morfolojisi, kalınlığı ve oluşum yeteneği üzerindeki rolü gösterilmiştir. Çeşitli kateter materyallerinin değerlendirilmesi sonucunda, *C.albicans* polivinil klorid ile karşılaştırıldığında, lateks ve elastomer üzerinde biyofilm oluşumunu arttırdığını, poliüretan veya %100 silikon üzerinde biyofilm oluşumunu azalttığı ortaya koyulmuştur (Hawser SP ve ark, 1994).

2.3.2.3. Besinler

Şekerler ve lipidler gibi üreme ortamında bulunan besin maddeleri Candida biyofilm oluşturma yeteneğinin önemli belirleyicilerindedir. 500 milimolar (mM) galaktoz ve 50 mM glukoz içeren ortamda *C.albicans* biyofilmlerinin üretimi, 48 saat sonra maksimuma ulaşır ve azalır (Hawser SP ve ark, 1994).

2.3.2.4. Tür Çeşitliliği

Biyofilm oluşturma yeteneği Candida türleri arasında büyük ölçüde farklılık gösterebilir (Holmes AR ve ark,1995). Hawser ve Douglas, 15 farklı *C.albicans* izolatında biyofilm oluşumunu karşılaştırarak, patojenite ile ilgili bazı bağlantılar bildirmişlerdir. Daha az patojenik olan *C.parapsilosis*, *C.pseudotropicalis* ve *C.glabrata* izolatlarının daha patojenik olan *C.albicans'* a göre daha az biyofilm oluşturduğunu ortaya koymuşlardır (Hawser SP ve ark, 1994). Ayrıca *C.albicans* biyofilmleri ekzopolisakkarit ve hif açısından yoğun blastospor tabakasından

oluşurken, *C.parapsilosis* biyofilmleri yalnızca kümelenmiş blastosporlardan oluşan ve *C.albicans* biyofilminden daha az hacme sahip olan biyofilm oluşturmuştur (**Kuhn DM ve ark, 2002**). Yapılan bir araştırmada, biyofilm oluşturma yeteneğinin, yapı ve matris kompozisyonlarının türe bağlı olduğunu göstermektedir. Genel olarak *C.albicans*, diğer türlere göre niceliksel olarak daha büyük, niteliksel olarak daha karmaşık biyofilmler üretmektedir. Candida biyofilmlerini morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde analiz edebilmek için, yeni araç ve teknikler geliştirilmiştir. Bu yeni gelişmeler, fungal biyofilmler ile ilgili hastalıkların daha iyi yönetilmesine olanak sağlayacaktır. Bu durum mantar-mantar ve mantar-bakteri birlikteliklerinin (karışık kültür)biyofilm ortamını etkilediği ve bu etkileşimlerin mikrobiyal topluluklardaki (mikrobiyom, bakteriyom vb.)rolünü anlama ihtiyacının olduğuna işaret etmektedir(**Chandra J ve ark, 2015**).

2.3.2.5. Mikrobiyal Birliktelikler

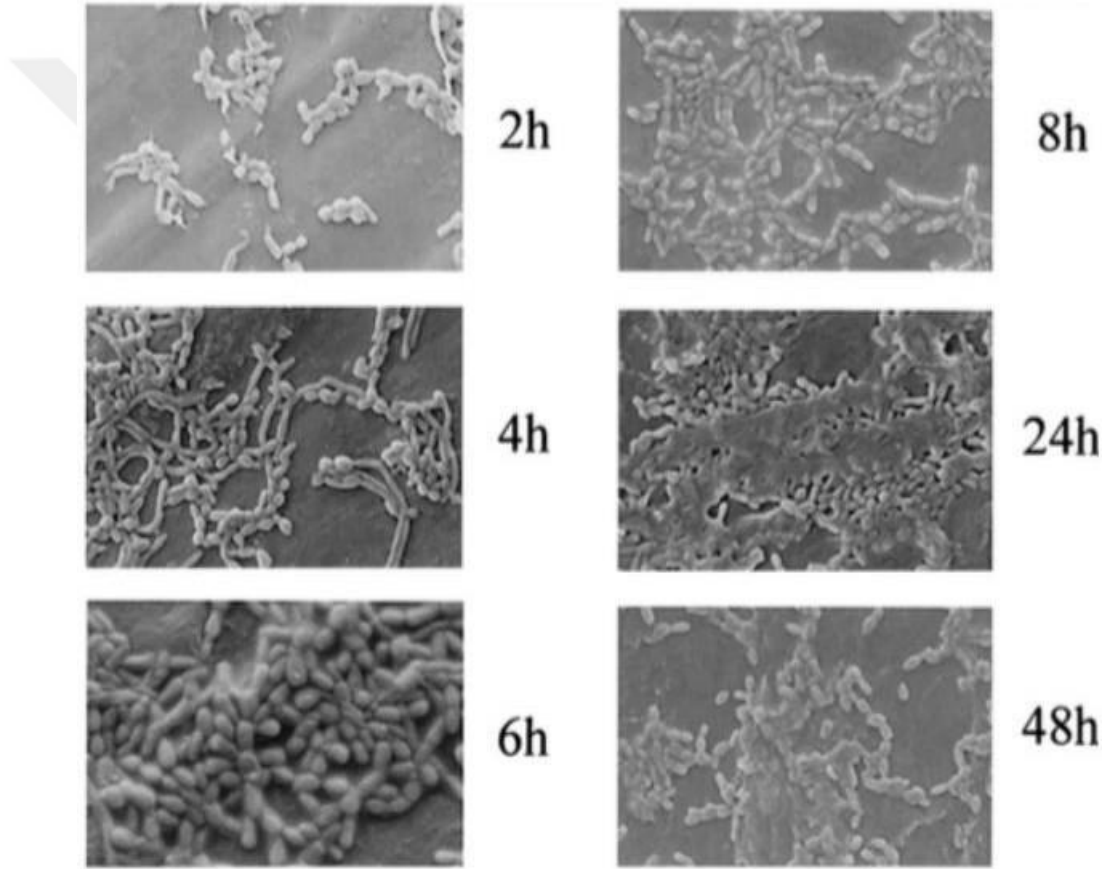
Candidaların biyofilm oluşturma yeteneği, başka Candida türlerinin varlığından veya farklı bakteriyel birlikteliklerden etkilenir. Lif (fiber) ve üroepitelyal hücreler üzerinde, Candida biyofilm oluşturma yeteneği *Lactobacillus* varlığından etkilenir (**Reid G ve ark,1995**).

2.3.3. Candida dubliniensis' in Biyofilm Yapısı

C. dubliniensis, insan immün yetmezlik virüsü ile enfekte olmuş orofaringeal kandidazisli hastalarda enfeksiyona neden olan, *C.albicans* ile yakından ilişkili fırsatçı patojen bir mayadır (**Moran GP ve ark,2012**). Biyofilmlerdeki mayalar, normal laboratuvar koşullarında üretilen planktonik mayalara göre önemli derecede farklı özelliklere sahiptir. *C.dubliniensis* biyofilm oluşumu adezyonla başlar, 24-48 saatlik bir zaman diliminde üreme, proliferasyon ve olgunlaşma evreleri ile devam eder. Olgun *C.dubliniensis* biyofilmleri, ekzopolimerik materyal içine gömülü maya ve hifal elementlerden oluşan yoğun bir ağdan meydana gelir. *C.dubliniensis* biyofilmleri heterojen ve dallanan su kanalları ile mikrokolonilerden oluşan bir mimariye sahiptir. Sekiz farklı klinik izolata ait planktonik hücrelerinin, amfoterisin B antifungal duyarlılığı sesil *C.dubliniensis* ile karşılaştırıldığında, sesil mayaların artan bir direnç gösterdiği ortaya konulmuştur. Antimikrobiyal ajana karşı belirgin şekilde

artan direnç ve konak savunma sisteminden korunma, biyofilm oluşumunun neden olduğu iki klinik sonuçtur (**Ramage G ve ark, 2001**).

Biyofilm oluşturma koşullarına serum eklendiği zaman *C.dubliniensis*' in adezyon seviyesi önemli ölçüde artar. En iyi tanımlanan ilk etki 30' uncu dakikada gözlemlenmiştir. 4-24 saat sonra, serum pelletinin varlığı ve yokluğu durumunda biyofilm oluşumunda çok küçük bir fark gözlemlenir fakat farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**Ramage G ve ark, 2001**).



Şekil 5: *C.dubliniensis* NCPF 3949 Biyofilminin SEM Görüntüleri: PMMA disklerinde çeşitli zaman aralıklarında (2,4,6,8,24 ve 48 saat) *C.dubliniensis* NCPF 3949 biyofilm oluşumunun SEM görüntüleri (**Ramage G ve ark, 2001**).

2.4. Candida Antifungal Tedavisi ve İlaç Direncinin Ortaya Çıkışı

Candida enfeksiyonların insidansı; HIV ile enfekte kişiler, AIDS hastaları, katı organ/kemik iliği transplant alıcıları, kanser hastaları gibi immün sistemi baskılanmış bireylerin sayısındaki artışa bağlı olarak son otuz yılda önemli ölçüde artmıştır. 1980'lerin son yarısı ve 1990 yıllarında, HIV ile enfekte hastalarda orofaringeal kandidazisin tedavisi için özellikle flukonazol olmak üzere profilaktik azol tedavisinin yaygın kullanımı, özellikle *C.albicans* gibi antifungal ilaca dirençli Candida suşlarının daha sık ortaya çıkması ile sonuçlanmıştır (**Pfaller MA ve ark,2004; Hazen KC, 1995**). O günden bu yana, antifungal ilaçlarla uzun süre tedavi alan diğer hastalarda da antifungal direnci bildirilmektedir. Ayrıca bu durum *Candida glabrata* (*C. glabrata*), *Candida krusei* (*C.krusei*) ve *Candida lusitanae* (*C.lusitanae*) gibi doğal olarak azaltılmış duyarlılığa sahip veya antifungal ilaçlara dirençli Candida türlerinin ortaya çıkmasına da neden olmaktadır. Antifungal ilaç direnci, özellikle antifungal tedavi veya profilaktik tedavi almayan hastalar başta olmak üzere, çoğu klinik Candida izolatu için önemli bir sorun değildir (**Sanglard D ve ark, 1999**). Tıbben önemli olan Candida türlerinde; azol, polien, ekinokandin ve daha az ölçüde 5-flucytosine karşı gelişen direnç, Candida türlerinin belirli antifungal ilaç sınıflarına karşı kullandıkları en önemli ve en yaygın moleküler direnç mekanizmalarıdır (örneğin: çoklu ilaç akış proteinlerinin aşırı ekspresyonu ve ilaç hedef proteinlerini kodlayan genlerdeki nokta mutasyonları ve diğer mutasyonlar) (**Florent M ve ark, 2009**). Bugüne kadar yapılan çalışmalar, hem bu türler arasında hem de yakın akrabası *C.albicans* ile arasındaki direnç mekanizmalarında bazı önemli farklılıklar bildirilmesine rağmen, bu özelliğin *C.dubliniensis* için de geçerli olduğunu göstermektedir (**Coleman DC ve ark, 2010**).

C.albicans ve *C.dubliniensis* türlerini tanımlarken antifungal direnci konusunun üzerinde durulması oldukça uygundur (**Coleman DC ve ark,2010**). Bunun yanında *C.dubliniensis*'in prevalansını bölgesel veya ulusal laboratuvarlarda, epidemiyolojik dalgalanmaları incelemek için çalışmalara dahil edilmesi de mantıklıdır (**Sullivan DJ ve ark, 2005**). Candida biyofilmlerinin, azol ve poliyenler de dahil olmak üzere yaygın olarak kullanılan antifungallere dirençli olduğu belgelenmiştir (**Baillie GS ve ark, 1998; Kalya AV ve ark,1995**).

Chandra ve arkadaşları, protez akrilik üzerinde oluşturulan *Candida* biyofilmlerinin antifungal duyarlılığını *in vitro* olarak değerlendirmiş ve *C.albicans* biyofilmlerinin amfoterisin B, flukonazol, nistatin ve klorheksidine karşı direnç gösterdiklerini belirlemiştir **(Chandra J ve ark, 2001)**. Bunun aksine planktonik olarak üreyen *C.albicans*' ın bu antifungal ajanlara karşı duyarlı olduğu, mikrotitre plaklarında oluşturulan *C.albicans* ve *C.dubliniensis* biyofilmlerinin benzer direnç profillerine sahip olduğu bildirilmiştir **(Ramage G ve ark,2001)**.

Biyofilm içindeki mayalar, planktonik mayalara göre antifungal tedaviye karşı daha dirençlidir. Caspofungin, mantar hücre duvarının ana yapısal bileşeni olan 1,3-beta-D-glukan sentezini inhibe eden, lipopeptid yapıda, fungisidal ve suda çözünebilen yarı sentetik bir ekinokandindir. 1,3-beta-glukan *C.albicans* hücre duvarının temel bileşenidir ve ağırlığının %60' ını oluşturur. Bu moleküller, hücre duvarındaki diğer makromoleküllerin (kitin, mannoprotein vb.) eklenmesi için bir yapı iskelesi görevi görür ve hücreye güçlü fiziksel özellikler sağlar. Caspofungin klinik olarak önemli olan *Candida* ve *Aspergillus* türlerine ve flukonazole karşı direnç gösteren *Candida* izolatlarına karşı aktiftir. Fungal hücre duvarı biyofilm oluşumu ve gelişiminde kritik kabul edilen yapısal olaylar ve adezyonda rol aldığı için, mantar hücre duvarı biyosentezinde rol oynayan önemli bir yapıyı hedefleyen bu maddenin *C.albicans* biyofilmlerine karşı etkili olabileceği düşünülmektedir **(Bachmann SP ve ark, 2002)**.

2.4.1 *Candida albicans* ve *Candida dubliniensis* Antifungal Direnç Mekanizmaları

Antifungal ilaçlar fungal enfeksiyon tedavisinde kullanılan anahtar faktördür. Yaygın olarak, allylaminler (terbinafin, naftifin, butenafin vb.), imidazoller (flukonazol, katokonazol, bifonazol vb.) veya ikisinin bir karışımı (ketofonazol, naftifin) ve hatta bazı steroidler (triamsinolon asetonid, ekonazol, mikonazol nitrat) kullanılır. Antifungal etki spektrumu ve aktivitesi, ilacın doğrudan patojenik fungusa uygulanması ile koloninin bulunduğu bölgedeki inhibisyon bölgesinin boyutunu gözlemleyerek ve karşılaştırılarak belirlenir. Mantar kaynaklı enfeksiyonlara karşı antifungalin aktivite ve etki spektrumunu değerlendirmek suretiyle *in vitro* çalışmalar yapmak son derece faydalıdır **(Lama J ve ark,2014)**.

Çeşitli modellerin geliştirilmesi ile *C.albicans*'ın biyofilm direnç mekanizmalarının ayrıntılı değerlendirilmesi ve anlaşılması sağlanmıştır. Bu yöntemler arasında membran sterollerindeki değişiklikler, fonksiyonel ve transkripsiyonel seviyedeki membran lokalize ilaç akışlı pompa deneyleri ve biyofilm yoluyla azalmış veya sınırlandırılmış ilaç penetrasyonu içeren ilaç hedef değişikliklerinin incelenmesi yer alır **(Chandra J ve ark,2015)**.

Candida dubliniensis klinik izolatlarının büyük çoğunluğu flukonazol, ketokonazol, itrakonazol ve vorikonazol de dahil olmak üzere, yaygın olarak kullanılan azol ilaçlarına karşı duyarlıdır **(Salgado-Parreño FJ ve ark, 2006)**. Fakat *in vitro* ortamda flukonazole karşı ilaç direnci indükleyebilirler. Bu nedenle, flukonazol profilaksisinin sık kullanımı, *C.dubliniensis*'in patojen rolünde ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır **(Ramage G ve ark, 2001)**.

Antifungal direnci sağlayan mekanizmalar;

- “ATP Binding Casette”(ABC),
- “Major Facilitator Superfamilies” (MFS)’ nin ilaç akış pompalarını kodlayan genlerin transkripsiyonel aktivasyonu, hedef enzimlerin aşırı ekspresyonu veya mutasyonudur.

Azoller en yaygın kullanılan antifungal ilaçlardır. Flukonazol, ketokonazol, klotrimazol, mikonazol, itrakonazol en yaygın kullanılanlardan bazılarıdır. Flukonazol, *Candida* tedavisinde kullanılan en yaygın antifungaldir. Bu ilaçlara karşı gelişen direnç antifungal ile tedavinin önündeki en önemli zorluklardan biridir. Bu ilaçların kronik ve irrasyonel kullanımı, azollere karşı direnç gelişiminin nedenlerindendir. Azollerin etki mekanizması, genellikle lanosterol 14-alfa-sterol demetilaz (DM) adlı enzimi inhibe ederek, mantar hücre duvarının parçalanmasına dayanır. Bu enzim, heme kofaktör azol bağlanma bölgesine sahip olan sitokrom P450 enzimidir ve lanosterolün ergosterole dönüşümüne aracılık ederek ergosterolün biyosentezinde rol oynar. Bu enzimin azol ile inhibe edilmesi, toksik ürün olan 14-alfa-metil-3,6-diol birikimine yol açar. Bu toksik ürünün birikimi, fungal plazma zarındaki ergosterol içeriğinin azalmasına neden olur ve mantar hücre zarının bütünlüğünün bozulmasına

yol açar. Hedef enzimdeki herhangi bir değişiklik ilaç direncinin gelişimine neden olabilir. Azollerin, lanosterol 14-alfa-sterol demetilaz enzimine karşı afinite değişimi; azollerin enzime bağlanmasında azalmaya neden olabilir. ERG11 geninin aşırı ekspresyonu, ergosterol sentezinin artmasına neden olarak, 14-alfa-sterol demetilaz' ın hücresel içeriğinin artmasına neden olabilir. Hücre duvarı veya zarındaki herhangi bir değişiklik de azollerin alımında değişime neden olabilir. Plazma zarının fosfolipid veya sterol içeriğindeki herhangi bir değişiklik ilacın zara penetrasyonunu azaltabilir. Azollerin aşırı ifade edilen akış sistemlerinden dışarı pompalamak, azollerin hücre içi konsantrasyonunu azaltabilir **(Krishnasamy L ve ark, 2018)**.

Candida enfeksiyonlarının tedavisinde en yaygın olarak kullanılan polienler amfoterisin B ve nistatindir. Polienlerin etki mekanizması, ergosterol ile etkileşime girerek fungusun sitoplazmik zarını tahrip etmeye dayanır. Ergosterol, mantar hücre zarının bütünlüğünü sağlayan ve zara bağlı enzimlerin işleyişi için esas olan bir yapıdır. Polienler hücre zarında gözenekler oluşturur. Bu gözenekler hücrenin potasyum ve magnezyum iyon dengesinin bozulmasına neden olarak proton gradyanının tahribatına neden olur. Bu bozulma mantar hücresinin ölümüyle sonuçlanır. Polienler ergosterole karşı yüksek afiniteye sahiptir. Polienlere karşı direnç gelişiminin ana nedenlerinden biri, ergosterol seviyesinde düşüşe yol açan ergosterol sentezinin inhibisyonu ve ergosterolün diğer biyosentetik öncüllerle yer değiştirmesi ve buna bağlı olarak sterol fosfolipit oranındaki değişmedir. Hücrenin büyüme evresinin de polienlere karşı direnç gelişiminde etkili olduğu bulunmuştur. Hücre çeperinin daha yüksek oranda sentezlendiği ve parçalandığı log fazında, amfoterisin B'nin hücre zarına daha fazla oranda etkileşir **(Krishnasamy L ve ark, 2018)**.

Sterol kompozisyonundaki değişiklikler antifungal direncine bağlıdır. Biyofilmin membran sterollerinin izolasyonunu içeren bir çalışmada, total membran sterollerini biyofilm ve planktonik hücrelerden izole edilerek, gaz kromatografisi ile analiz edilmesi sonucunda, ara ve olgun evredeki ergosterol seviyesinin, erken evredeki *C.albicans* biyofimlerine göre %41-50 oranında azaldığı gösterilir. Bu sonuçlar *C.albicans* biyofilm oluşumu sırasında sterol seviyesinin modüle edildiğini ve modülasyonun faza özgü bir şekilde ilaç direncine katkıda bulunabileceğini gösterir

(Chandra J ve ark, 2001). Flukonazole karşı dirençli izolatlar, bu ilaç ile yoğun olarak tedavi edilmiş, özellikle HIV ile enfekte olmuş hastaların bulunduğu merkezlerden bildirilmiştir. Ayrıca, flukonazole karşı duyarlı *C.dubliniensis* izolatlarının *in vitro* koşullarda ve artan konsantrasyonlarda flukonazole maruz kalması sonucunda, flukonazole dirençli, kararlı fenotiplere sahip türevlerin oluşmasına yol açar (MİK: 16—64 µg/ml). *C.dubliniensis*'in *in vitro* ortamda hızla flukonazol direnci geliştirebilme kabiliyeti, bu türün 1990'lı yıllarda HIV ile enfekte olmuş hastalarda seçilimine ve ortaya çıkmasına neden olmuş olabileceğini düşündürmektedir. Bununla beraber, epidemiyolojik veriler bunu desteklememektedir, verilere göre her iki tür de benzer flukonazol direnç insidansına sahiptir (Moran GP ve ark, 1997).

2.5. *Candida albicans* ve *Candida dubliniensis*'in Karşılaştırmalı Virülens Analizi

Mukozal epitel, patojen olma potansiyeline sahip çevresel mikroorganizmaları karşılayan birincil hücre katmanı olduğu için konak savunma sisteminde merkezi bir öneme sahiptir. Diğer komensal mikroorganizmalar ise, epitel dokunun korunması ve immün düzenlenme için mukozal yüzeyde düzenli olarak bulunarak, zararsız koloniler oluştururlar. Her iki mikroorganizma türünde de epitel hücrelerle etkileşim olur. Bazıları bir arada bulunabilirken (komensal), bazıları dokuda hasara yol açar (patojen). Bariyer fonksiyonu, komensal mikroorganizmalardan korunmak için yeterli olsa da, patojenlere karşı korumada yetersizdir. Oral epitelyum hücreleri, çeşitli savunma molekülleri salgılayabilir ve submukozal membrandaki patojenleri temizleyebilmek için miyeloid hücrelerini aktive ederek, inflamatuvar yanıtı düzenleyebilir (Backhed F ve ark, 2003).

Epitelyal doku etkileşimleri ve penetrasyon, enfeksiyona neden olan ajanların patojenitelerini anlamak için merkezi faktörlerdir. Test protokollerinde genel olarak hayvan veya hayvan hücre kültürü, enfeksiyon *in vivo* modellemesini oluşturmak için kullanılır. Bu yaklaşım, insana özgü özelliklerin sınırlı olmasından dolayı, insanda gözlemlenebilecek patolojik süreçlerin göz ardı edilmesine neden olur. İlgili fonksiyonların ve mikrobik tepkilerin *in vivo* olarak çalışılmasına olanak sağlayacak insan hücre hatlarının kullanılması, bu neden dolayı istenilmektedir. Komensal olarak kolonize olabilen veya direkt immünopatolojiye neden olabilen *Candida* türleri için,

patojenin virölens özellikleri ve konak savunma mekanizması arasındaki etkileşimler son derece önemlidir. Candida'ların insanda enfeksiyona neden olan en yaygın fungus olduğu düşünülürse, *in vivo* olarak paralellik sağlayan ve fizyolojik fonksiyonları incelemeye olanak tanıyan mukozal kandidazis modelleri oldukça faydalıdır **(Schaller M ve ark, 2007)**.

Sistemik ve mukozal enfeksiyon modellerinde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda iki türün enfeksiyona neden olma kabiliyetleri arasında belirgin bir farklılık olduğunu ve *C.albicans*'ın, *C.dubliniensis*'e göre daha patojen olduğunu ortaya koyulmuştur **(Koga-Ito CY ve ark, 2010)**.

Candida türlerinin komensal flora ile uyum içinde bulunması ve buna rağmen konak eksiklikleri sonucunda enfeksiyona neden olan fırsatçı patojenler olmaları, virölans faktörlerin tanımlanmasını zorlaştırmaktadır. En patojenik Candida türü olmasından dolayı *C.albicans* patogeneze açısından en çok çalışılan türdür. En sık rastlanan *C.albicans* virölens faktörleri arasında; adezin Hwp1**(Staab F ve ark, 1999)**, Als ailesi **(Hoyer L,2001)**, hücre dışı enzimler salgılanan aspartil proteinaz (Sap) ailesi**(Naglik JR ve ark, 2003)**, fosfolipazlar **(Niewerth M ve ark, 2001)** ve en önemli faktör olan maya ve filamentli hifal büyüme formu **(Sudbery P ve ark, 2004)** arasında geçiş yapabilmesi yer alır. Her iki form da virölans için gereklidir. Hif formu adezyon, invazyon ve biyofilm oluşumunda önemli role sahipken, maya formu yayılma ve konak yüzeyine ilk kolonizasyon açısından önemlidir **(Finkel jS ve ark,2010)**.

C.dubliniensis, *C.albicans* dışında hif üretebilen tek Candida türüdür **(Sullivan DJ ve ark, 1995)**. İki türün yakından ilişkili olması ve fenotipik olarak birbirlerine çok benzemeleri, *C.albicans* ve *C.dubliniensis* kolonizasyonu ve insanda neden hastalık etkini olduklarını ilk bakışta anlamayı oldukça güçleştirir.

C.dubliniensis'e ait 29, *C.albicans*'a ait 168 spesifik gen tanımlanmıştır. *C.dubliniensis* genomunda Hyr1 ve Als3 hücre yüzey proteinleri ve salgılanan aspartil proteinaz familyasının iki üyesi(Sap5, Sap6) gibi hif spesifik virölens faktörleri yoktur ve iyi bir şekilde karakterize edilmiş epitelyal adezin olan Hwp1 oldukça farklıdır **(Moran GP ve ark, 2004; Jackson AP ve ark, 2009)**. Hwp1 sadece hifal formda eksprese edilir, konağın transglüteminaz enzimleri için bir substrat görevi yapar ve

böylece konak ile mantar hücresi arasında çok güçlü bir kovalent bağın oluşmasına neden olur **(Dwivedi P ve ark, 2011)**. Hyr1'in nötrofil öldürücü aktivitesine karşı direnç kazandırır **(Luo G ve ark, 2010)**. Als3 ise konak hücrelerine adezyon ve demir-bağlama aktivitesine sahiptir **(Phan QT ve ark, 2007)**. Sap'lar *C.albicans*'ın farklı hücre ve koloni morfolojileri sergilemesini sağlayan, tersine çevrilebilir fenotipik dönüşüme neden olur **(Naglik JR ve ark, 2003)**. İki tür arasındaki gen ailesi büyüklüğündeki en büyük fark, TelOmere(TLO) ilişkili ailededir. *C.albicans*' ta TLO gen ailesine ait 14 gen bulunurken *C.dubliniensis*'de yalnızca 2 gen bulunur **(Jackson AP ve ark,2009)**.

C.albicans ve *C.dubliniensis* arasındaki en önemli farklardan biri de çevresel stresi tolere edebilme kapasitelerinin farklılığıdır (termal, ozmotik ve oksidatif stres). 45°C'deki karşılaştırmalı üreme testi, iki tür arasında ayırım yapmak için kullanılan yaygın bir tanı testidir **(Pinjon E ve ark, 1998)**. *C.dubliniensis*, termal strese daha güçlü bir yanıt verirken, oksidatif ve ozmotik strese karşı çok zayıf bir transkripsiyon ile cevap verir. *C.dubliniensis*' in çevresel strese toleransını arttıran genleri tanımlamak için *C.albicans* kütüphanesinin kullanıldığı çalışmalar yapılsa da oksidatif ve termal duyarlılığı tanımlayabilecek bir gen bulunamamıştır **(Enjalbert B ve ark, 2009)**. *Candida albicans*' ın en önemli ve en iyi çalışmaların yapıldığı virülens faktörü, maya ve filamentöz üreme formları arasındaki dönüşümdür (dimorfizm), bu özelliği *C.dubliniensis* ile paylaşır. *C.dubliniensis* germ tüpü ve gerçek hifleri üretebilir buna rağmen *in vivo* ve *in vitro* koşullarda *C.albicans*'a göre daha az etkilidir. *C.albicans*'ın virülansında dimorfizmin önemi düşünüldüğünde, *C.dubliniensis*'in maya-hif dönüşüm kabiliyetinin daha zayıf olduğu öne sürülmüştür **(O'Connor L ve ark, 2010)**. Bunu destekleyen kanıtlar murin sistemik enfeksiyon modeli **(Vilela MMS ve ark, 2002)** ve neonatal orogastrik enfeksiyon modeli ile elde edilmiştir. Neonatal orogastrik enfeksiyon modelinde, enfekte hayvanların mide ve böbekleri yalnızca *C.dubliniensis* maya hücrelerini bulunurken, *C.albicans*'ın hem maya hem de hifal formuna rastlanmıştır. "Reconstituted Epithelial Infection" (RHE) yüzeysel enfeksiyon modelinde ise *C.albicans* hem maya hem de hif formunda üreyerek, dokuda büyük hasara neden olmuştur. Bunun aksine RHE modelinde, *C.dubliniensis* sadece maya formunda üreyerek ve dokuda sınırlı invazyon ve hasara neden olmuştur **(Stokes C ve ark, 2007)**.

C.dubliniensis'in en çarpıcı özelliği, insan normal flora bileşeni ve sistemik enfeksiyon etkeni olarak düşük insidansa sahip olmasıdır. Bunun nedenleri kesinlikle araştırmaya değerdir. *C.albicans* ile karşılaştırıldığında *C.dubliniensis*' in zayıf patojenitesine neyin neden olduğunu belirlemek, kandidal patogeneze olan anlayışımızı geliştirecektir. Bu nedenle devam eden *C.dubliniensis* genom sekanslama projesi ve devam eden transkriptomik ve proteomik çalışmalar, iki türün nasıl enfeksiyona neden olduğunu ve bu kardeş türlerde virölansın nasıl evrimleştiğini anlamamızı büyük ölçüde kolaylaştıracaktır. Fakat hala bu testlerin yapılması için gereken zaman ve maliyetin, mikoloji laboratuvarları için gerekli olup olmadığı tartışılmaktadır **(Sullivan DJ ve ark,2005)**.



2.6. *Candida albicans* ve *Candida dubliniensis* Enfeksiyonlarının Klinik Önemi

Filogenetik çalışmalar, *C.dubliniensis* ve *C.albicans*'ın yakından ilişkili olduğu ve klinik örneklerde iki türün ayrımının yapılmasının genellikle zor olduğu gösterir (McManus BA ve ark, 2008). İki türe ait epidemiyolojik veriler, türlerin yakından ilişkili olduğunu gösterse de *C.albicans*'ın *C.dubliniensis*'e göre daha yaygın olduğunu da göstermektedir. Özellikle sistemik enfeksiyonların analizlerinde *Calbicans* >%50 oranında bulunurken *C.dubliniensis* %2-3 oranında tespit edilmiştir (Kibbler CC ve ark, 2003).

Klinik örneklerden *C.dubliniensis*' i tanımlamaya yönelik harcanan çabalara rağmen, bu türün prevelans değerlendirmesi eksiktir. Çok çeşitli yöntemler ile çeşitli epidemiyolojik çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Fakat bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar standart değildir, değişiklik gösterir. *C.dubliniensis* ilk olarak İrlanda'da, HIV ile enfekte olmuş bireylerin ve AIDS hastalarının oral boşluklarından izole edilmiştir (Sullivan DJ ve ark, 1995).

HIV ile enfekte olmuş popülasyonlardaki bireylerin ağız boşluğundan alınan *C.dubliniensis* izolatlarına ait prevelans, epidemiyolojik çalışmalar sonucunda %1.5-32 arasında olduğu belirlenmiştir. HIV ile enfekte olmamış sağlıklı bireylerin oral boşluklarından elde edilen *C.dubliniensis* prevelansı ile ilgili de bir anlaşmazlık söz konusudur. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda, bu gruptaki bireylerde ya hiç ya da çok düşük seviyede *C.dubliniensis* saptanmıştır (Faggi E ve ark, 2005).

Sağlıklı bireylerde de *C.dubliniensis*'in neden olduğu enfeksiyonlar gözlemlenerek, diyabet hastası olan bireylerde *C.dubliniensis* prevelansının daha yüksek oranda olduğu bulunmuştur (Willis AM ve ark, 2000). Güney Afrikada yapılan bir çalışmada, sağlıklı bireylerin oral boşluğundaki *C. dubliniensis* prevelansı HIV ile enfekte olmuş bireylere göre daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla %14, %9). Aynı çalışmada, siyah bireylerin ağız boşluğunda *C.dubliniensis* bulunmazken, HIV ile enfekte siyah bireylerde %1.5 oranında bulunmuştur (Blignaut E ve ark, 2003).

Oral enfeksiyonlar ile ilişkilendirilmesine rağmen *C.dubliniensis* vücuttaki diğer anatomik bölgelerde de tanımlanabilir. Bu tür vakalarda prevelans, ağız boşluğundakine kıyasla daha düşüktür. *C.albicans* vulvovajinal kandidoza neden olan en önemli etiyolojik ajan iken, *C.dubliniensis* bu tarz vakaların çok küçük bir kısmında tanımlanabilmiştir.

C.dubliniensis'in neden olduğu artan kandidemi vakalarına rağmen, epidemiyolojik çalışmalarda nadiren tanımlanır ve dünya genelinde incelenen maya pozitif kan kültürlerinin çok küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Suudi arabistanda yapılan bir çalışmada, kandidemi vakalarının 2/12 (%16.7)' sinin *C.dubliniensis* kaynaklı olduğu ortaya koyulmuştur **(Fotedar R ve ark,2003)**.

C.dubliniensis'in kan kültürlerindeki prevelansı çok düşük olmasına rağmen, enfeksiyon başladıktan sonra hastanın ölümüne dahi neden olabilir. *C.albicans* ve *C.dubliniensis* arasındaki ayrımı tanımlamak için veriler, geliştirilmiş karbonhidrat asimilasyon testlerinin veri tabanları ve bitki ekstraktları ile takviye edilen ortamlarda morfolojik farklılıklara dayanan analizler sonucunda elde edilmiştir **(Pincus DH, 1999)** rneğin, *C.dubliniensis* staib agar **(Staib P ve ark, 1999)** , pals agar **(Al- Mosaid A ve ark, 2003)** veya tobacco agarda **(Khan ZU ve ark, 2004)** retilirse, oluşturduğu pseudohif ve klamidospor yapısından kaynaklanan kaba koloni dokusuyla kolayca ayırt edilebilir. Aynı ortamda *C.albicans* kolonileri pürüzsüzdür ve sadece blatosporlardan oluşur. Bu ayırıcı tanıya rağmen, enkübasyon sresinin 96 saati bulmasından dolayı iki türün ayrımı rutin laboratuvarlarda kolaylıkla yapılamaz. Bu nedenle *Cdubliniensis*'i tanımlamaya yönelik testler genellikle moleküler temelli yöntemlere dayanan testlerle yapılmalıdır. *C.albicans* ve *C.dubliniensis*'i ayırabilmek için, son zamanlarda immnokromotografik testlerin de kullanıldığı bildirilmiştir **(Sullivan DJ ve ark, 2005; Sullivan DJ ve ark,2004)**.

2.7. Mikrobiyal Tanımlama Sistemi

Candida dubliniensis, genellikle *Candida albicans* ile karışık kültür halinde bulunur. Fakat, *Candida* primer kültürleri, CHROMagar'da koloni rengini değiştirdiği için tanımlama yapmak zordur. *C. dubliniensis*, CHROMagarda koyu yeşil koloniler halinde gözlenirken, *C.albicans* açık yeşil koloniler halinde gözlenir **(Schoofs A ve ark, 1997)**. 53 *C.dubliniensis* izolatının sadece 30' unun primer kültüründe tipik koyu yeşil renk oluşturduğu, *C.albicans* kolonilerinin ise CHROMagarda yeşilin her tonunu oluşturabileceği bildirilmiştir. Bu bulgular, *Candida* kolonilerinin CHROMagar üzerinde oluşturduğu rengin *C.dubliniensis* tanımlamasında güvenilir olmadığını göstermektedir **(Tintelnot K ve ark, 2000)**.

Belirlenen yağ asidi profilleri, sistemde tanımlı olan ve türe özgü yağ asidi profilleri ile oluşturulan kütüphane ile karşılaştırılarak benzerlik yüzdesi ile mikroorganizmanın identifikasyonu yapılır. Sistem, 9-20 karbon atomu içeren uzun zincirli yağ asitlerini analiz ederek mikroorganizmaların türe özgü olan yağ asidi metil esterlerini (FAME) tanımlar ve ölçer. Pikler, sistem tarafından otomatik olarak adlandırılır ve sayısal değeri belirlenir. Veri tabanı kütüphanesi yağ asidi kompozisyonlarını ve izolatların FAME profillerini iyi karakterize edilmiş suşlar ile karşılaştırmak için kullanılır. Kütüphane, izolatın olası türünü ve izolat profilinin veri tabanındaki diğer türlerle arasındaki korelasyon derecesini açıklayabilir. *C.albicans* ve *C.dubliniensis* kütüphanesi FAME profillerinin çalışma dosyası, mayaların genel FAME profili tanımına uygun bulunmuştur. Profiller birbirine çok benzediği için, MIS yazılımı ile değerlendirilen FAME miktarı ve frekansındaki farklılıklar, bu iki tür arasında ayırım yapılmasını sağlar. Mayalardaki lipit içeriğinin değişkenliği, büyük ölçüde büyüme şekline bağlıdır. Kullanılan kültür ortamının farklı kaynaklardan alınması, MIS'in doğruluğunu bozabileceği gösterilmiştir. Karşılaştırılabilir sonuçlar sağlayabilmek için, MIS talimatları birbirlerine çok yakından bağlıdır.

Kütüphane araştırma raporunda, test edilen her bir izolat için tespit edilen hücresel yağ asidi içerik oranı için, Sherlock MIS yazılımı ve bileşen analizi ile benzerlik indeksi (SI) değeri hesaplanır. SI, test edilen örneğin yağ asidi bileşiminin, kütüphane oluşturmak için kullanılan suşların ortalama yağ asidi bileşimine ne kadar yakın olduğunu ifade eden sayıdır. Örneklerin yağ asidi kompozisyonu ile kütüphane kayıtlarının tam eşleşmesi sonucu oluşan ortalama SI değeri 1.0 olarak belirlenir. Seçim aralığı azalan benzerlik olarak rapor edilir ve eşleşmemiş izolatlar tanımlanamadığını gösterir. MIS kılavuzuna göre, 0.5 veya daha yüksek bir SI değerine sahip suşlar veya birinci ve ikinci seçim arasında 0.1'lik bir ayrılma, kütüphane karşılaştırmasının iyi olduğunu gösterir **(Peltroche-Llacsahuanga H ve ark, 2000)**.

Mikrobiyal tanımlama sistemi (MIS: Microbial ID, Inc., Newark, DE. USA), bakterilere, mikobakterlere ve çevresel ve klinik kaynaklardan elde edilen funguslara ait, özdeş yağ asidi profillerine dayanan, iyi bilinen tam otomatik gaz kromatografi sistemidir **(Crist AE ve ark, 1996)**. Bu sistem, bir alev iyonlaştırma dedektörlü gaz kromatografi ünitesi, otomatik örnekleyici, entegratör ve bilgisayar içerir. Bu sistem, yağ asidi metil esterleri (FAME), dimetil asetiller (DMA) ve aldehitler de (ALDE) dahil olmak üzere 140'dan fazla, farklı, türe özgü bilinmeyen bileşiği ayırt edebilir **(Teng LJ ve ark, 2004)**.

Önceki çalışmalar, mayaların sadece %68-75'inin MIS tarafından, tür seviyesinde doğru olarak tanımlandığı göstermektedir. Crist ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptığı bir çalışmadan elde edilen veriler, Mikrobiyal Tanımlama Sistemi'nin (MIS), *C.krusei*, *C.kefyr* ve *C.guilliermondii* türlerini %100 oranda doğru tanımladığını göstermiştir. Diğer taraftan, *C.albicans* izolatlarının %79.2'si, *C.glabrata*'nın %64.1'i, *C.tropicalis*'in %19.0'u ve *C.parapsilosis* izolatlarının %75.7'si kromatografi yöntemi ile doğru tanımlanmıştır **(Crist AE ve ark, 1996)**. En sık yanlış tanımlanan maya, *Saccharomyces cerevisiae* olarak tanımlanan *C.glabrata*'dır **(Crist ve ark, 1996; Peltroche—Llacsahuanga ve ark,2000; Neppelenbroek KH ve ark,2013)**.

C.albicans ve *C.dubliniensis* türlerine ait FAME kromatografi profilleri çok benzer olmasına rağmen, FAME frekansı ve miktarı farklılık gösterir. *C.dubliniensis* türü, klinik örneklerde yeterince bildirilmemiştir. Çünkü şu anda kullanılan izolasyon ve tanımlama teknikleri *C.dubliniensis*'i tanımlayamamaktadır. Bazı yeni ticaret sistemleri tarafından, *C.dubliniensis* veri tabanlarına dahil edilerek, etkinliklerini değerlendirmek amacıyla daha fazla çalışma yapılmıştır. Herhangi bir tek başına uygulanan fenotipik test yönteminin, *C. albicans* ve *C.dubliniensis* türlerinin ayrımındaki etkinliği kanıtlanmamış olsa da, birlikte kullanılan iki veya daha fazla fenotipik yöntem, ayırıcı tanımlamada önemli olabilir. *C.albicans* ve *C.dubliniensis* ayrımında doğru ve güvenilir ayrımı yapabilecek hızlı, tek ve uygun bir teknik henüz geliştirilmemiştir **(Campanha NH ve ark, 2005)**.

Gaz kromatografisi yazılımında mayaların “yağ asidi dizilimleri” ilgili kütüphaneler; 20 türden oluşan YSTCLN ve 136'sı *Candida* türleri olmak üzere 196 türden oluşan YST28 kütüphaneleridir **(Sherlock Manual, 2012)**. MIS'in YST28 kütüphanesi, özellikle çevresel türlerin tanımlanması için oluşturulmuştur ve bu nedenle biyoteknolojik süreçlerde kullanılmaktadır. MIS sistemi, YSTCLN kütüphanesi kullanarak da izolatlar hızlı bir şekilde tanımlanabilir. Fakat yakın tarihli bir raporda YSTCLIN kütüphanesinin iyileştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Klinik açıdan önemli *Candida albicans* ile yakın ilişkili tür olan *Candida dubliniensis* son versiyona dahil edilmemiştir **(Peltroche—Llacsahuanga ve ark,2000)**.

Yüksek lisans tez çalışmasının amacı ise *C.albicans* ATCC 10231 ve *C. dubliniensis* CD36 suşlarının amfoterisin B antifungaline karşı 'Minimum İnhibisyon Konsatrasyonu' (MİK) değerlerinin belirlenmesi, antifungal etkisinde biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi ve yağ asidi profillerinin belirlenmesidir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu yüksek lisans bitirme tezi, deneysel tipte bir araştırma olarak yapılmıştır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Tez araştırması ile ilgili ana çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 4044 No'lu Laboratuvar' da yapılmıştır. Tez araştırması ile ilgili literatür çalışmaları ve etik kurul formu hazırlığı 9 Mayıs 2016- Şubat 2019 tarihleri arasında, tezin deneysel çalışmaları Nisan 2019- Ağustos 2019 tarihleri arasında, tez yazımı Temmuz 2019-Eylül 2019 tarihleri arasında yapılmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Bu araştırmanın örneklemini *Calbicans ATCC 10231* ve *C.dubliniensis CD 36* maya suşlarıdır.

3.4. Çalışma Materyali

3.4.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar

Tez çalışmasında, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 4044 No'lu laboratuvarda koleksiyon suşu olarak bulunan *Candida albicans ATCC 10231* ve *Candida dubliniensis CD36* maya suşları kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı Değişken: *Candida albicans ATCC 10231* ve *Candida dubliniensis CD36* standart suşlarının biyofilm oluşumundaki farklılık olarak belirlendi.

Bağımsız Değişken: Amfoterisin B antifungalinin Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu etkileri olarak belirlendi.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Sarf Malzemeleri

Tablo 1: Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeleri

Tezde Kullanılan Sarf Malzemeleri	Kullanım Amacı	Marka-LOT Numarası
Petri Kabı	Maya Kültürü İçin Besiyeri Hazırlama	Corning-5081042
Steril Öze	Maya Toplama ve Pasajlama	3k-20180101
Mavi Uçlu Pipet	Antifungal Duyarlılık Testi	
Sarı Uçlu Pipet	Antifungal Duyarlılık Testi	
96 Kuyucuklu Mikrodilüsyon Plağı	Antifungal Duyarlılık Testi	4A2016-1
Eppendorf	Antifungal Duyarlılık Testi	
pH Strip	Antifungal Duyarlılık Testi	Macherey-Nagel-10C366
Falkon Tüpü	Antifungal Duyarlılık Testi	02440194
Spanç	Tüm Uygulamalarda	Yüce-651920181204
Eldiven	Tüm Uygulamalarda	Dolphin-228046963

Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Tezde Kullanılan Kimyasallar	Kullanım Amacı	Marka-LOT Numarası
Nutrient Broth	Maya Kültürü	AppliChem-C403061
Sabouraud Dekstroz Agar	Maya Kültürü	AppliChem-C503241
Sodyum Hidroksit	Gaz Kromatografisi ile Yağ Asidi Analizi	Sigma-30K0229
Amfoterisin B	Antifungal Duyarlılık Testi	Bristol-Myers Squibb-310942700
DMSO	Antifungal Duyarlılık Testi	7F009834
Kristal Viyole	Biyofilm Değerlendirmesi	Riedel-de Haen-83550
Etanol	Biyofilm Değerlendirmesi	
PBS	Biyofilm Değerlendirmesi	Sigma-119K8219
Distile Su	Gaz Kromatografisi ile Yağ Asidi Analizi	Nüve Distile Su Cihazı ile Elde Edildi.
Hidroklorik Asit	Gaz Kromatografisi ile Yağ Asidi Analizi	
Matanol (HPLC grade)	Gaz Kromatografisi ile Yağ Asidi Analizi	Riedel-de Haen-93260
Methyl tert-butyl ether (HPLC grade)	Gaz Kromatografisi ile Yağ Asidi Analizi	
Hexan	Gaz Kromatografisi ile Yağ Asidi Analizi	

PBS	Biyofilm Değerlendirmesi	Sigma-119K8219
Distile Su	Gaz Kromatografisi ile Yağ Asidi Analizi	Nüve Distile Su Cihazı ile Elde Edildi.
Hidroklorik Asit	Gaz Kromatografisi ile Yağ Asidi Analizi	
Matanol (HPLC grade)	Gaz Kromatografisi ile Yağ Asidi Analizi	Riedel-de Haen-93260
Methyl tert-butyl ether (HPLC grade)	Gaz Kromatografisi ile Yağ Asidi Analizi	
Hexan	Gaz Kromatografisi ile Yağ Asidi Analizi	

Tablo 3: Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Tezde Kullanılan Cihazlar	Kullanım Amacı	Marka- Sicil No
Airstream Max Class II BSC (ULPA Filter)	Biyolojik Örneklerin Hazırlanması ve İşlenmesi	Esco-253.3.5/11/264387
-80 Soğutucu	Biyolojik Örneklerin Uzun Süre Stoklanması	New Brunswick Scientific U410
+ 4 Buzdolabı	Biyolojik Örneklerin Kısa Süre Stoklanması	Ariston
Etüv	Biyolojik Örneklerin Enkübe Edilmesi	Nüve-Z14.K25 142

Su Banyosu	Biyolojik Örneklerin Hazırlanması ve İşlenmesi	Nüve-Z14.K25 085
Turbidimetre	Antifungal Duyarlılık Testi	Biosan- DEN-1B
Vorteks	Antifungal Duyarlılık Testi	BOECO-AA031528
Otoklav	Çalışmada Kullanılan Malzemelerin Sterilizasyonu ve Besiyerlerinin Hazırlanması	Nüve- Z14 K25 077
Hassas Terazi	Çalışmada Kullanılan Tozların Tartılması	Radwag – as 220.R2
Spektrofotometre	Sonuçların Değerlendirilmesi	Thermo Scientific-MULTISKAN FC
Distile Su Cihazı	Çalışmada Kullanılan Suyun Sağlanması	Nüve-Z14.K25 090

3.6.2. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

Bu tez çalışmasında yapılan deneyler, *in vitro* deneyler olarak gerçekleştirildi. *In vitro* deneyler, antifungal duyarlılık testi, kristal viyole boyama yöntemi ile biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi ve gaz kromatografisi ile yağ asidi analizini kapsamaktadır.

3.6.2.1 Mayaların Üretilmesi

-80°C'de stok halinde bulunan *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida dubliniensis* CD36 maya suşları çözdürülerek, Nutrient Broth'da (AppliChem-C403061) 18 saat 37°C'de kültüre edildi. Üremenin gözlenmesinden sonra *C.albicans* ve *C.dubliniensis* suşları Sabouraud Dekstrozu Agar (SDA) (AppliChem-C503241) besiyerine pasajlanarak 37°C'de, 18-24saat enkübe (Nüve- Z14.K 25 142) edildi (SherlockManual,2012).

3.6.2.2. Mikro Dilüsyon Yöntemi İle Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) ve Sub-MİK Değerlerinin Belirlenmesi

SDA'da 18 saat kültüre edilen *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 suşları için flukonazol ve amfoterisin B antifungallerinin MİK ve Sub-MİK değerlerini belirlemek amacıyla "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" ("Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi"-EUCAST) sıvı mikro dilüsyon yöntemi kullanıldı. Mikro dilüsyon duyarlılık testi yapılmadan önce medyum, antifungal stok solüsyonları ve maya inokulumları hazırlandı (**Arendrup MC ve ark,2012; Alastruey-Izquierdo A ve ark,2015**). EUCAST yöntemi, medyum olarak nutrient broth kullanımı için modifiye edildi.

Medyum: Ortam olarak Nutrient Broth kullanıldı.

Antifungal Ajan: Antifungal ajan olarak amfoterisin B kullanıldı. Amfoterisin B stok solüsyonu dimetil sülfoksit (DMSO) ile çalışma konsantrasyonunun iki katı olacak şekilde hazırlandı. Stok solüsyonları -20°C'de dondurulup, saklandı (**Arendrup MC et.al 2012**).

İnokulumun Hazırlanması: İnokulum süspansiyonu, 18 saat SDA'da kültüre edilen petri kabından mayaların steril öze ile toplanmasıyla hazırlandı. Toplanan mayalar 3 ml steril Nutrient Broth'da suspense edildi. İnokulum McFarland 0.5 değerinde göre turbidimetre (Biosan;DEB-1B) ile ayarlandı. Son inokulum 0.5×10^5 ile 2.5×10^5 cfu/ml olacak 1/10 sulandırılarak hazırlandı (**Arendrup MC et.al2012**).

Mikro Dilüsyon Platelerinin Hazırlanması ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi

96 kuyucuklu, düz tabanlı mikro dilüsyon plateleri kullanıldı. Kuyucuklara eşit hacimde Nutrient Broth besiyeri dağıtıldı. Amfoterisin B antifungalinin çalışma solüsyonlarından seri dilüsyon yapılarak kuyucuklara eklendi. Turbidimetre ile 0.5×10^5 ile 2.5×10^5 cfu/ml olacak şekilde hazırlan maya süspansiyonu eşit hacimlerde eklendi. Plateler 37°C'de,18 saat enkübe edildi. Enkübasyon sonunda platler 540 nm'de spektrofotometrik (Thermo Scientific;253.3.6/13/150888) olarak değerlendirilerek MİKdeğerleribelirlendi. Kör (zemin) okuma değeri, geri kalan kuyucukların okuma değerinden çıkarıldı.

MİK değeri, antifungal içermeyen kontrol kuyucuklarına göre ≥ 90 inhibisyona yol açan en düşük konsantrasyon olarak belirlendi (ArendrupMCet.al2012).

3.6.2.3 Antifungal Etkisinde Biyofilm Oluşumunun Değerlendirmesi

C.albicans ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 maya suşlarının biyofilm değerlendirilmesi, antifungallerin MİK değerlerinin belirlendiği platelerde kristal viyole boyama yöntemi uygulanarak yapıldı. Platelerdeki içerik boşaltılarak, tutunamayan mayaları uzaklaştırmak için plate üç kez "Phosphate Buffered Saline" ("PBS") ile yıkandı. Yıkama sonrasında amfoterisin B ile çalışılan pletin her bir kuyucuğa eşit miktarda %0.4'lük (Jin Y ve ark,2003), flukonazol ile çalışılan pletin her bir kuyucuğuna %1'lik kristal viyole boyası dağıtıldı (Feoktistova M. ve ark, 2016). Amfoterisin B pleyti 45, f lukonazol pleyti 15 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. Bağlanmayan kristal viyole boyasını uzaklaştırmak için üç kez PBS ile yıkandı. Mayaların oluşturduğu olası biyofilm yapısına bağlanan kristal viyole boyasının serbest kalması için %95'lik etanolden eşit miktarda kuyucuklara dağıtılarak amfoterisin B pleyti 45 dakika, flukonazol pleyti 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Plateler 540 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirildi (O'Toole GA ve ark,1998; Henriques M ve ark,2006). Elde edilen absorbans değerlerinin için ortalama $\pm$ Standart Sapma(SS) değerleri hesaplandı. Absorbans değeri besiyeri kontrolün absorbans değerinin iki katı olan pleyt kuyucukları "biyofilm pozitif" kabul edildi (Bayrakal V ve ark,2009).

Crushi S ve arkadaşlarının "biyofilm formasyon aktivitelerini değerlendirme ölçeğine" göre, biyofilm oluşumunun skorlaması yapıldı (Crushi S ve ark, 2012; Çalı A ve ark,2018)(Tablo 4).

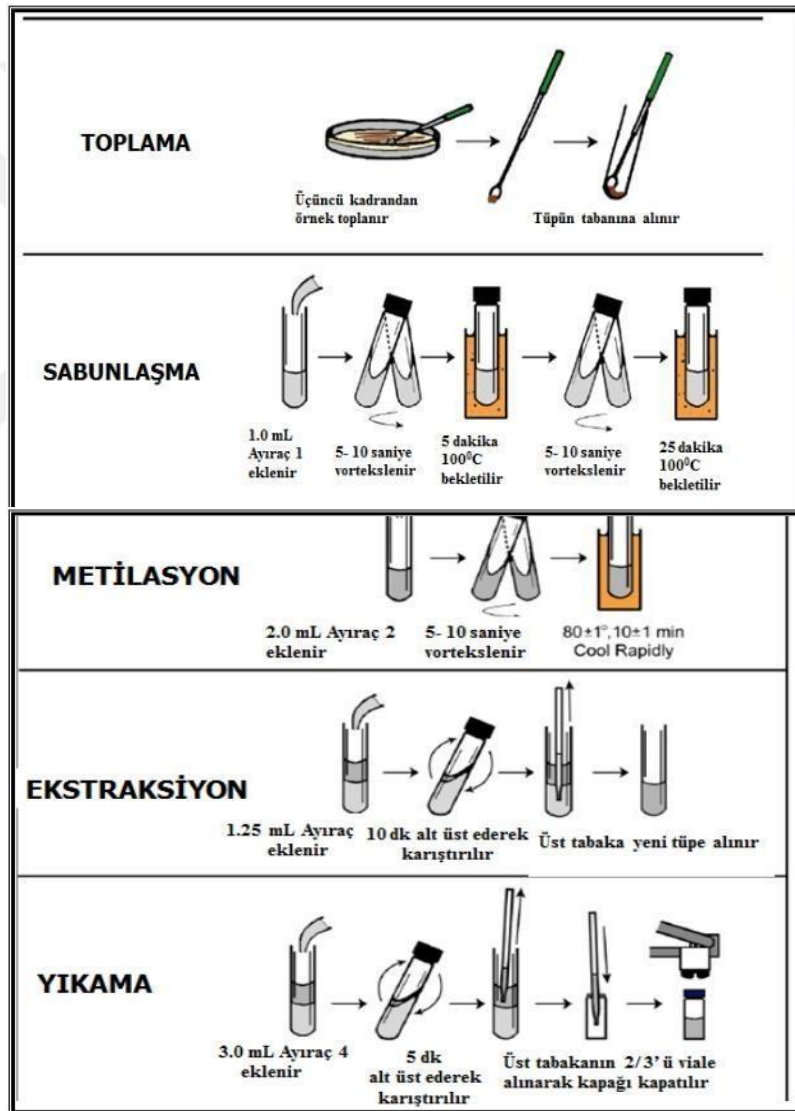
Tablo 4: Crushi S ve arkadaşlarının "biyofilm formasyon aktivitelerini değerlendirme ölçeği(Crushi S ve ark, 2012; Çalı A ve ark,2018).

OD Değeri	Adezyon	Biyofilm Derecesi
0D Kontrol> OD MB	Nonadere	0
OD Kontrol< OD MB< 2 OD Kontrol	Zayıf Adere	1
2 OD Kontrol< OD MB< 4 OD Kontrol	Orta Derece Adere	2
4 OD Kontrol< OD MB	Güçlü Adere	3

3.6.2.4 Gaz Kromatografisi İle Yağ Asidi Profillerinin Analizi

Gaz kromatografisi ile yağ asidi profillerinin analizine göre, reagent hazırlama işlemleri çeker ocakda yapılırken, *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida dubliniensis* CD36 suşlarını tanımlama yönteminin tüm işlemleri 4044 No'lu Mikrobiyoloji Laboratuvarında ULPA filtreli, Güvenlik Düzeyi Class II (Airstream-253.3.5/11/264387) olan güvenlik kabininde çalışıldı (Şekil6).

Yağ asiti profillerinin belirlenmesinde kullanılan ayıraçlar hazırlanarak (Tablo 5) maya suşları toplama, sabunlaşma, metilasyon, ekstraksiyon, yıkama ve analiz olmak üzere 6 işlem basamağı uygulandı (Sherlock, 2012)



Şekil 6: Gaz Kromatografisi ile Yağ Asidi Profillerinin Belirlenmesi (Sherlock, 2012; Bayrakal V, 2014)

Tablo 5: Gaz Kromatografisi İle Yağ Asidi Profillerinin Analizinde Kullanılan Ayıraçlar (Sherlock, 2012).

Ayıraç 1 (Sabunlaştırma)	Sodyum Hidroksit (45 g) Metanol (150 ml)- HPLC grade Deiyonize Distile Su (150 ml)
Ayıraç 2 (Metilasyon)	6.00 N Hidroklorik Asit (325 ml) Metanol (275 ml)- HPLC grade
Ayıraç 3 (Ekstraksiyon)	Hexane (200 ml) Methyl tert-butyl ether (200 ml)- HPLC grade
Ayıraç 4 (Yıkama)	Sodyum Hidroksit (10.8 g) Deiyonize Distile Su (900 ml)

Toplama: Sherlock Mikrobiyal Tanımlama Sistemi'nde önerildiği gibi, üremenin görüldüğü kültür plaklarının üçüncü ekim çizgisindeki mayalardan steril bir öze yardımı ile yaklaşık 40 mg canlı maya örneği alınarak vidalı kapaklı deney tüpüne aktarıldı.

Sabunlaşma: Deney tüpüne ayıraç 1' den 1.00 ml eklendi ve 5-10 saniye kadar vorteksenerek, 100°C' deki su banyosunda (Nüve- Z14.K 25 085) 5 dakika bekletildi. Yüksek sıcaklığa maruz kalan mayalar canlılık-enfektif özelliğini yitirerek "Biyogüvenlik Düzeyi 1" örneğe dönüşmüş oldu. Çünkü metanolik baz yağ asitlerini hücre lipidlerinden ayırarak sodyum tuzlarına dönüştürür. Su banyosundan alınan deney tüpleri 5-10 saniye vortekslendi ve 25 dakika 100°C' deki su banyosunda bekletilerek sabunlaşma sağlandı.

Metilasyon: Metilasyon, sodyum tuzları olarak bulunan yağ asitlerini GC analizi için uygun form olan yağ asidi metil esterlere dönüştürmeyi sağlar. Oda ısısında soğutulan deney tüplerine 2.00 mL ayıraç 2'den eklendi. 5-10 saniye vorteksledikten sonra 80°C' de 10 dakika bekletilerek hücresel yağ asitlerinin metilasyonu sağlandı.

Ekstraksiyon: Bu aşamada yağ asidi metil esterlerinin, sıvı-sıvı ekstraksiyon prosedürü ile asidik sulu fazdan organik faza aktarılması sağlandı. Oda ısısında

soğutulan deney tüplerine 1.25 mL ayıraç 3 eklendi ve 10 dakika rotorda karıştırıldı. Bu işlem sonunda deney tüpünde faz ayrımı sağlandı ve üst fazda bulunan yağ asitleri ayrıştırıldı.

Yıkama: Serbest yağ asitlerini organik ekstraktan ayırmak için tüpe seyreltik bir solüsyon olan ayıraç 4'den 3.00 mL eklenerek yıkama işlemi yapıldı ve analiz için hazır "hücresele yağ asitleri" elde edildi.

Analiz: Metillenmiş yağ asitlerinin analizi gaz kromatografi cihazı kullanılarak yapıldı. Türe özgü yağ asitlerinin piklerine ait yüksekliklerinden elde edilen ham kromatografik data, "ChemStation Software" kullanılarak işlemlendi. Bu sistem kalibrasyon örneklerinin başlangıçta ve aralıklarla otomatik olarak çalıştırılmasını sağlar. "Sherlock Software" kullanılarak sonuçlar "Benzerlik Cetveli" (BC, "Similarity Index") esasına göre FDA tarafından onaylanan bir örnek hazırlama-değerlendirme-tanımlama yöntemi gerçekleştirilerek değerlendirildi (**Sherlock, 2012**).

Yağ asitlerinin elde edildiği maya örnekleri ayrıştırmanın ilk basamağından itibaren steril durumdadır ve biyogüvenlik riski taşımazlar. Yağ asiti profillerini tanımlayan kromatografik pikler, tanımlı kütüphane ile karşılaştırıldı ve BC dökümleri ile birlikte identifikasyonu yapıldı.

Sistemin Kontrolü: Cihazın analize başlamaya hazır olup olmadığını ve her on örnekte bir cihazın düzgün çalışıp çalışmadığını kontrol etmek amacıyla üretici firmanın önerdiği kalibrasyon materyali olarak "MID—1300—AA Rapid Calibration Mix for Rapid and Sensi Libraries" kullanıldı (**Sherlock, 2012**).

Pozitif ve Negatif Kontrol: Her tanımlama işleminde üretici firmanın önerdiği gibi pozitif kontrol olarak DSM 1117 *Pseudomonas aeruginosa* suşu ve negatif kontrol olarak ayıraçlar ("reagent blank") kullanıldı (**Sherlock, 2012**).

3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi

TARİH	PLANLANAN ARAŞTIRMA
Mayıs 2016– Ocak2019	Literatür araştırması ve ön hazırlığının yapılması
Ocak 2019 -Şubat 2019	Etik kurul başvurulması
Nisan 2019 – Ağustos 2019	Deneylerin gerçekleştirilmesi
Mayıs 2019- Ağustos 2019	Deney sonuçlarının istatistiksel analize yorumlanması
Temmuz 2019 – Eylül 2019	Yüksek lisans tezinin yazılması ve yüksek lisans tez sunumu

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Amfoterisin B MİK ve Sub-MİK (Bağımsız Değişkenler) etkisinde *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida dubliniensis* CD36 standart suşlarının in vitro deneysel modellemesi ile biyofilm değerlendirme (Bağımlı Değişken) “One-Way ANOVA” yöntemi ile analiz edildi. Biyofilm değerlendirmesinde elde edilen absorabns değerleri ile antifungal uygulaması yapılmayan kontrol değerleri “Tukey’s Multiple Comparison Test” ile karşılaştırıldı.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamızda flukonazol ile çalışmalar, ayrıca apoptoz/nekroz ve nitrik oksit deneyleri, yüksek lisans süresi içinde tamamlanamamasından dolayı tezden çıkarılmıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu’ndan 13.02.2019 tarih ve 4486-GOA protokol numaralı 2019/03-50 kararı ile etik onay alınmıştır. Etik kurul onay formu ekte sunulmuştur.

4. BULGULAR

4.1. EUCAST Mikro Dilüsyon Analizi Bulguları

Amfoterisin B antifungalinin 128-4 µg/ml konsantrasyonlarının etkisinde, *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 suşlarının duyarlılıkları EUCAST yöntemi ile belirlendi.

Amfoterisin B antifungal için *C.albicans* ATCC 10231 suşunun antifungal uygulanmayan kontrol kuyularının OD değeri ortalaması 0.643 ± 0.040 olarak belirlendi. *C.dubliniensis* CD36 için antifungal uygulanmayan kontrol kuyucuklarının OD değeri ise 0.654 ± 0.124 olarak belirlendi. MİK değeri, antifungal uygulanmayan kontrol kuyucuklarına göre ≥ 90 inhibisyona yol açan en düşük konsantrasyon olarak belirlendi.

C.albicans ATCC 10231 suşunun amfoterisin B antifungal için MİK değeri, 64 µg/ml olarak belirlendi. *C.dubliniensis* CD36 suşunun amfoterisin B antifungal için MİK değeri 64 µg/ml olarak belirlendi. Her iki suş da amfoterisin B antifungaline karşı dirençli bulundu.

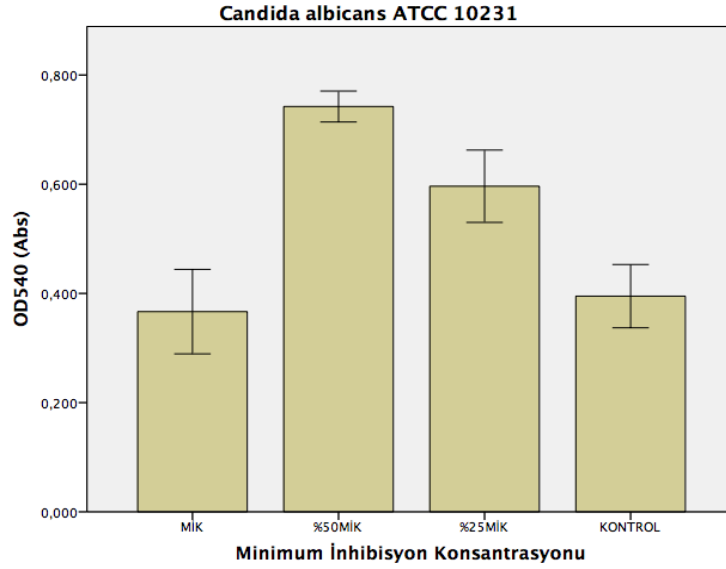
4.2. Biyofilm Değerlendirme Analizi Bulguları

Amfoterisin B antifungalinin MİK konsantrasyonlarının etkisinde, *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 suşlarının biyofilm değerlendirmesi kristal viyole boyama yöntemi ile yapıldı. Kontrol olarak antifungal uygulaması yapılmayan maya süspansiyonu kullanıldı. Biyofilm oluşumu “one way ANOVA” yöntemi ile analiz edildi. Kontrol ile “Tukey’s Multiple Comparison Test” kullanılarak karşılaştırıldı.

Biyofilm değerlendirmesi, $OD_{örnek} \geq 2 OD_{besiyeri}$ koşulunda “biyofilm oluşumu pozitif” olarak değerlendirilerek yapıldı. 540 nm dalgaboyunda spektrofotometre ile yapılan değerlendirme sonucunda amfoterisin B ile çalışılan pleytte $OD_{besiyeri} = 0,141 \pm 0,022$ olarak bulundu. Sonuçlar, OD ortalama $\pm$ SS değerleri temel alınarak belirlendi.

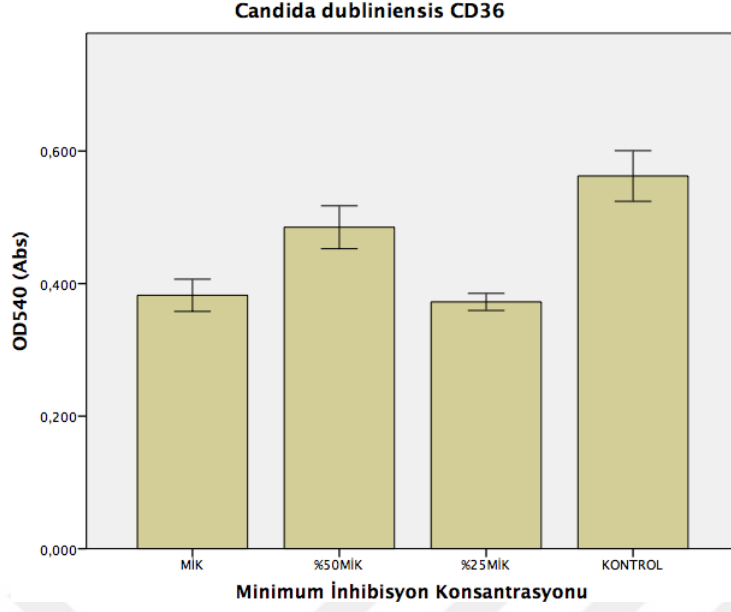
C.albicans ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 suşlarının amfoterisin B MİK konsantrasyonlarının etkisinde biyofilm oluşturduğu saptandı (Tablo 6).

Amfoterisin B antifungal uygulanmayan *C.albicans* ATCC 10231 kontrol suşunun OD_{540} absorbans değeri $0,395 \pm 0,057$ olarak belirlendi ve orta derece biyofilm oluşturduğu saptandı. AmpB MİK yoğunluğu (OD_{540} değeri $0,366 \pm 0,077$) etkisinde biyofilm oluşumundaki azalmanın kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p=0.937$). AmpB MİK yoğunluğunda biyofilm oluşumunun orta derece olduğu belirlendi. AmpB %50-MİK yoğunluğu etkisinde ($0,742 \pm 0,028$) güçlü biyofilm oluşumu saptandı ve biyofilm oluşumunun kontrole göre arttığı belirlendi ($p=0.000$). *C.albicans* ATCC 10231 suşu için AmpB %25-MİK yoğunluğu etkisinde ($0,596 \pm 0,066$) biyofilm oluşumun kontrole göre arttığı belirlendi ($p=0.015$) ve güçlü biyofilm oluşturduğu saptandı (Grafik 1).



Grafik 1: *C.albicans ATCC 10231* suşunun amfoterisin B antifungalı etkisinde biyofilm oluşumu.

Amfoterisin B antifungalı uygulanmayan *C.dubliniensis CD36* kontrol suşunun OD₅₄₀ absorbans değeri 0,562±0,038 olarak belirlendi ve güçlü biyofilm oluşturduğu saptandı (Tablo 6). AmpB MİK yoğunluğu etkisinde orta derece biyofilm oluşurken, (OD₅₄₀ değeri 0,382±0,024) biyofilm oluşumunun kontrole göre azaldığı belirlendi ($p=0.000$). AmpB %50-MİK yoğunluğu etkisinde orta derece biyofilm oluştururken, (0,485±0,032) biyofilm oluşumunun kontrole göre azaldığı belirlendi ($p=0.043$), %25-MİK yoğunluğu etkisinde orta derece biyofilm oluştururken, (0,372±0,012) *C.dubliniensis CD36* suşunun biyofilm oluşumunun kontrole göre azaldığı belirlendi ($p=0.000$) olarak belirlendi. MİK ve %50-MİK AmpB yoğunlukları arasında anlamlı bir farklılık varken ($p<0.01$), MİK ve %25-MİK yoğunlukları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p=0.972$) (Grafik 2).



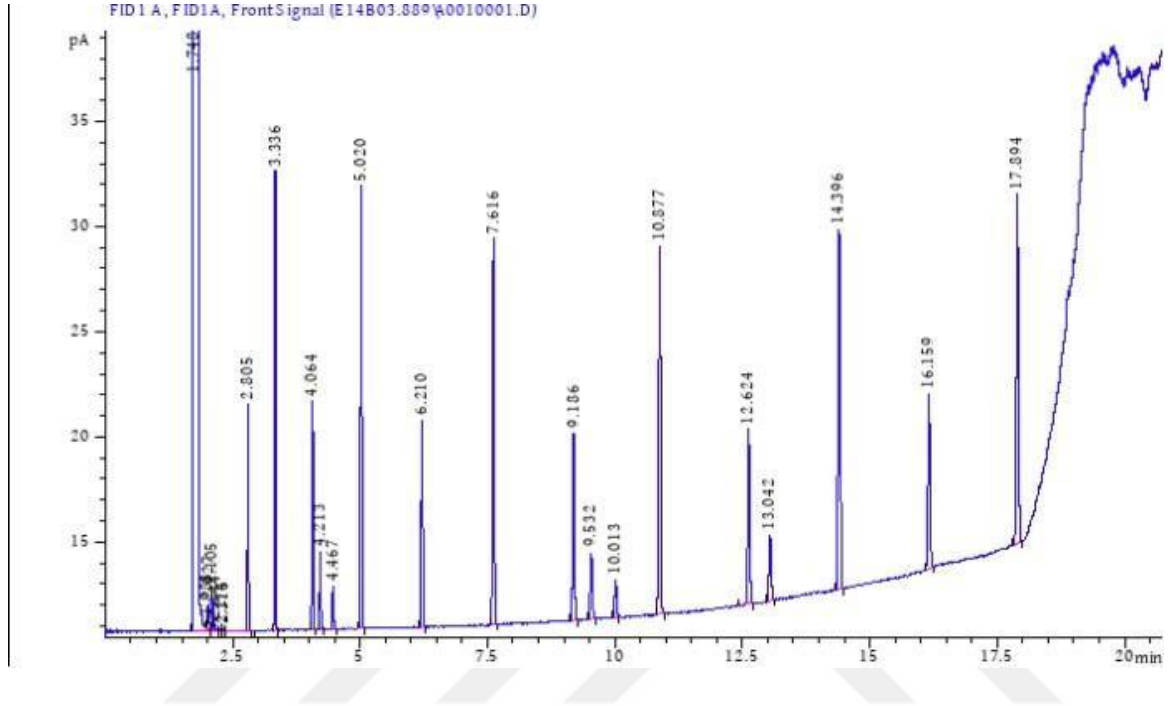
Grafik 2: *C.dubliniensis* CD36 suşunun amfoterisin B antifungalı etkisinde biyofilm oluşumu.

Tablo 6: *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 suşlarının amfoterisin B biyofilm dereceleri

Amfoterisin B	MİK	%50-MİK	%25-MİK	KONTROL
<i>C.albicans</i> ATCC 10231	2	3	3	2
<i>C.dubliniensis</i> CD36	2	2	2	3

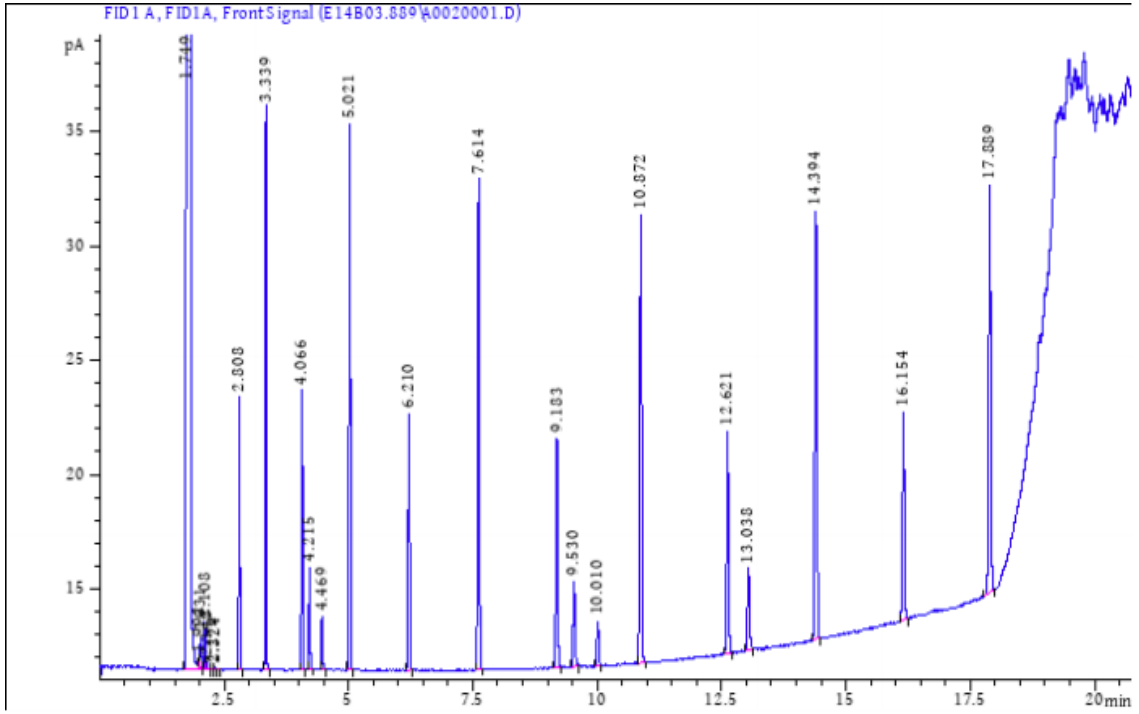
4.3. Gaz Kromatografisi İle Yağ Asidi Profillerinin Analizi

Gaz kromatografisi ile analiz sisteminin kalibrasyonu "MIDI calibration mix for YST28 database" ile yapılarak, sistemin çalışmaya hazır olduğu gösterildi. Benzerlik oranı (SI) = 0.973 olarak belirlendi (Şekil 7).



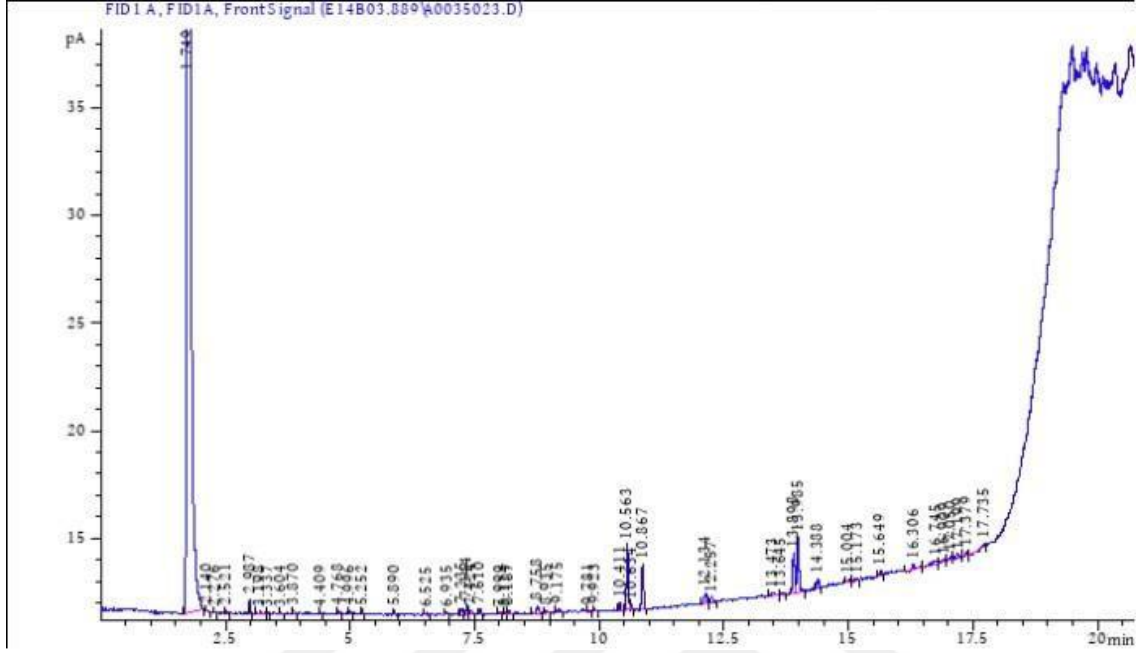
Şekil 7: Gaz Kromatografisi Yönteminin "MIDI calibration mix for YST28 database" Sonucu

Mayaların tanımlanması için kullanılan YST28 kütüphanesinin SYEAST6 yöntemi ile kalibrasyonu sonucu sistemin çalışmaya hazır olduğu gösterildi Benzerlik oranı (SI) = 0.985 olarak belirlendi (Şekil 8).



Şekil 8: Gaz Kromatografisi Yönteminin ‘YST28 kütüphanesinin kalibrasyonu’
Sonucu

C.dubliniensis CD36 suşunun gaz kromatografisi ile analizi sonucunda yedi referans pik elde edilmiştir (Şekil 9).



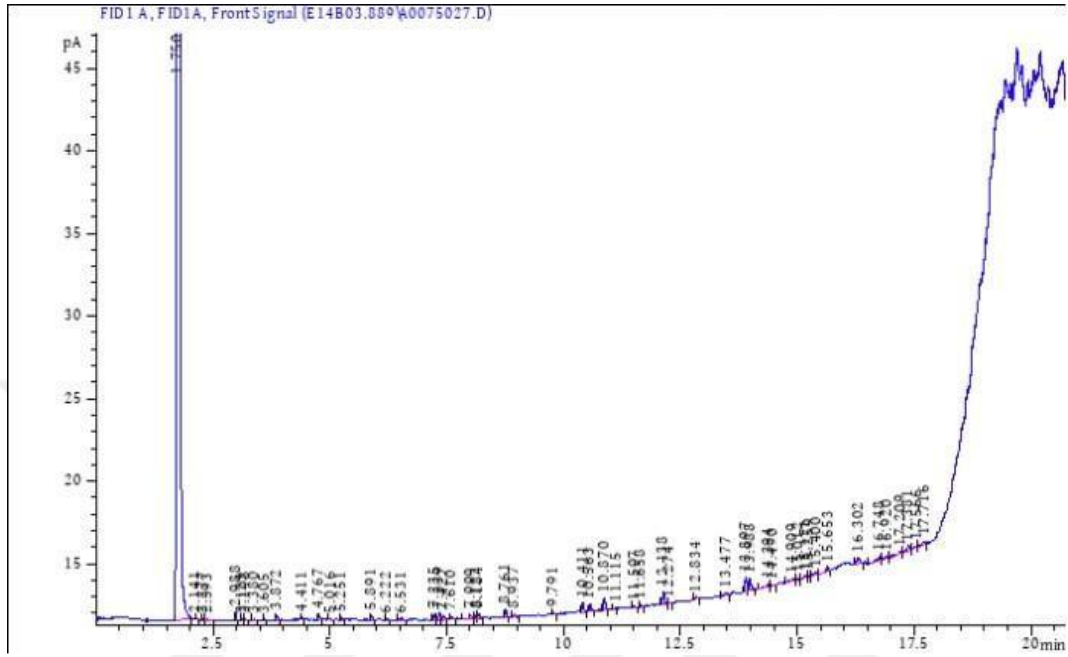
Şekil 9: Gaz Kromatografisi Analizi İle *C.dubliniensis* CD36 suşuna ait kromatografi

C.dubliniensis CD36 suşunun gaz kromatografisi ile analizi sonucunda elde edilen yedi referans pikten bir tanesi *C.dubliniensis* CD36 suşuna özgüdür. *C.dubliniensis* CD36 suşuna spesifik referans yağ asidinin 15 karbondan oluşan ve çift bağ taşımayan (Pik Adı:15:0) kimyasal yapıya sahip olduğu tespit edilmiştir. Yüzde olarak toplam yağ asitlerinin 1.58'ini oluşturmaktadır (Tablo8).

Referans Pik	Pik Adı	Yüzdesi	ECL	RFact	Ar/Ht	Yanıt	Tutunma Süresi
1	10:0	0.58	10.001	1.232	0.039	353	2.337
2	14:0	0.71	13.998	0.973	0.039	1326	7.610
3	15:0	1.58	14.995	0.947	0.049	1260	9.175
4	16:0ANTEISO	2.37	15.727	0.934	0.039	1912	10.411
5	16:0	13.88	15.998	0.930	0.042	11264	10.867
6	17:0ANTEISO	4.19	16.723	0.922	0.048	3435	12.134
7	18:0	3.21	17.998	0.913	0.044	2651	14.388

Tablo 7: *C.dubliniensis* CD36 suşunun yağ asidi analizi sonucu

C.albicans ATCC 10231 suşunun gaz kromatografisi ile analizi sonucunda sekiz referans pik elde edilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10: Gaz Kromatografisi Analizi İle *C.albicans* ATCC 10231 suşuna ait kromatografi

C.albicans ATCC 10231 suşunun gaz kromatografisi ile analizi sonucunda elde edilen sekiz referans pikten iki tanesi *C.albicans* ATCC 10231 suşuna özgüdür. *C.albicans* ATCC 10231 suşuna spesifik referans yağ asitlerinin ilki 12 karbondan oluşan ve çift bağ taşımayan kimyasal yapıdadır (Pik Adı:12:0). Yüzde olarak toplam yağ asitlerinin 1.14'ünü oluşturmaktadır. *C.albicans* ATCC 10231 suşuna ait ikinci referans yağ asidi pikinin ise çift bağ içermeyen on üç karbonlu (Pik Adı:13:0) yapıya sahip olduğu tespit edildi. Yüzde olarak toplam yağ asitlerinin 1.09'unu oluşturduğu belirlendi (Tablo9).

Referans Pik	Pik Adı	Yüzdesi	ECL	RFact	Ar/Ht	Yanıt	Tutunma Süresi
1	10:0ISO	0.86	9.605	1.276	0.023	259	3.123
2	12:0	1.14	11.997	1.066	0.033	410	5.016
3	13:0	1.09	13.007	1.012	0.036	412	6.222
4	14:0	2.63	13.994	0.973	0.035	1035	7.610
5	16:0ANTEISO	7.69	15.724	0.934	0.041	3157	10.411
6	16:0	10.69	15.995	0.930	0.041	4410	10.870
7	17:0ANTEISO	10.56	16.722	0.922	0.044	4395	12.138
8	18:0	3.79	18.000	0.913	0.053	1591	14.394

Tablo 9: *C.albicans* ATCC 10231 suşunun yağ asidi analizi sonucu

C.albicans ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 suşlarına spesifik olarak elde edilen yağ asidi referans piklerinin dışında kalan pikler her iki türde de mevcuttur. Çift bağ içermeyen on karbonlu referans piki *C.albicans* ATCC 10231 suşunda dallanmış zincir halinde (10:0 ISO) bulunurken, *C.dubliniensis* CD36'da da dallanmamış halde (10:0) bulunmaktadır. 16:0 ANTEISO isimli dallanmış yağ asidi her iki türde bulunsa da *C.albicans* ATCC 10231 suşunda(%7.69), *C.dubliniensis* CD36 suşuna (%2.37) göre **3,24 kat daha fazla** bulunmaktadır. 14:0 isimli yağ asidi *C.albicans* ATCC 10231 suşunda(%2.63), *C.dubliniensis* CD36 suşuna (%0.71) göre **3,70 kat daha fazla** bulunmaktadır. 17:0 ANTEISO dallanmış yağ asidi *C.albicans* ATCC 10231 suşunda(%10.56), *C.dubliniensis* CD36 suşuna (%4.19) göre **2.52 kat daha fazla** bulunmaktadır.

5. TARTIŞMA

İnsan ömrünü doğrudan/dolaylı olarak uzatmak ve refah içerisinde yaşama fikri, insanlık tarihinde kültürel ve bilimsel gelişmelerin öncüsü olmuştur. Artan tıbbi tüketim sonucunda, çeşitli hastalıkları tedavi edebilecek veya ortadan kaldıracabilecek ilaçların tasarımı ve geliştirilmesi üzerine yapılan çalışmalar büyük ölçüde artmıştır. Translasyonel Tıp, klinik öncesi araştırmalardan klinik uygulamalara geçişi, bilim insanları arasındaki iletişimi hızlandırmayı, sağlık hizmetlerinin keşfedilmesini ve geliştirilmesini hedefler. Hastalığa spesifik biyobelirteçleri, hastalığın patogenezi ve tedavisi arasındaki mekanizmalarını anlamak için klinik ve translasyonel tıp verilerini kullanır. Klinik semptomları hafifletebilmek ve yaşam kalitesini arttırabilmek için en uygun yöntemlerin belirlenmesini sağlamayı hedefler. Bu sürece bağlı olarak, klinik öncesi çalışmalarla seçilen ilaçların etkinliği ve güvenilirliği, klinik deneme aşamasında translasyonel tıp yaklaşımıyla uygulanabilir ve terapötik yaklaşımlara dönüştürülebilir (Aoki KR, 2006).

Candida türüne ait mayalardan bazıları orofarengeal ve gastrointestinal floranın olağan üyeleri arasında yer alır. Bununla beraber konak savunma sistemi zayıfladığında fırsatçı patojenler haline gelerek enfeksiyona neden olabilirler. Bu enfeksiyonlar cilt ve mukoza zarının yüzeysel enfeksiyonlarından, kan ve organlara kadar uzanan invazif enfeksiyonlara kadar çeşitlilik gösterir. Candida türleri ABD'de hastane kaynaklı kan enfeksiyonlarının en yaygın dördüncü nedenidir. Son 20 yılda Candida türlerinin neden olduğu enfeksiyonlardaki artış, bağışıklık sistemi baskılanmış hasta sayısındaki artış, invaziv medikal prosedürlerin uygulanması ve geniş spektrumlu antifungallerin kullanımındaki artışla ilişkilendirilmektedir (Moran GP ve ark, 2002).

Mayalar da dahil olmak üzere mikroorganizmaların saptanması ve tanımlanması, uygulaması kolay tarama yöntemlerinin varlığına bağlıdır. *C.dubliniensis*'in epidemiyolojik rolünün açıklığa kavuşturulmasındaki en büyük engel, karışık kültürlerde seçici olarak tanımlanmasını sağlayan bir tarama yönteminin bulunmamasıdır (Tintelnot KG ve ark, 2000).

Antifungal duyarlılık testleri standardize edilerek, mikrobiyoloji laboratuvarlarında ‘antibakteriyel’ duyarlılık testleri ile aynı amaçla kullanılmaktadır. Amerikan ve Avrupa standartlarının geliştirilmesinin yanı sıra klinik laboratuvarlarda kullanıma uygun olan ticari sistemler de geliştirilmiştir. Bu sistem ile saptanabilen dirençli suşlar, fungal türlerin antifungal ajanlara karşı direnç mekanizmaları ve moleküler temelin araştırılmasına ve anlaşılmasına olanak sağlamaktadır **(Alastruey-Izquierdo A ve ark,2015)**. Çünkü, benzer morfolojik özellikler sergilemelerinden dolayı zorluk çekilen **(Sullivan D ve ark, 1995)**, *C.albicans* ve *C.dubliniensis* türlerinin tanı ve ayırıcı tanıların identifikasyonu; enfeksiyon kaynağının izlenmesi, tekrarlayan enfeksiyonlarda enfeksiyonun orijinal suştan mı yoksa yeni bir suş ile mi tekrar enfekte olduğunun belirlenmesi ve klinik bir örnekte birden fazla suşun olup olmadığının belirlenmesi gibi tedavi seyrini etkileyebilecek önemli bir etkiye sahiptir**(Sullivan D ve ark,2011)**.

Yüksek lisans tez çalışmasında, *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 suşlarının, amfoterisin B antifungalinin MİK değerleri üç tekrar yapılarak, EUCAST sıvı mikro dilüsyon testi ile değerlendirilmiştir. EUCAST kılavuzunda, *C.albicans* için flukonazol konsantrasyonu $\leq 2\mu\text{g/ml}$ olan suşlar duyarlı, $>4\mu\text{g/ml}$ olan suşlar dirençli olarak değerlendirilir. *C.dubliniensis* flukonazol açısından “tedavi için yetersiz kanıt (IE)” olarak yorumlanır. *C.albicans* amfoterisin B konsantrasyonu $>1\mu\text{g/ml}$ olan suşlar dirençli, $<1\mu\text{g/ml}$ olan suşlar ise duyarlı olarak yorumlanmaktadır. *C.dubliniensis* IE olarak yorumlanır **(EUCAST:Clinical breakpoints for antifungals;www.eucast.org)**.

EUCAST kılavuzunda belirlenen sınır değerlerine göre, laboratuvarımızda koleksiyon suşu olarak bulunan *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 suşlarının amfoterisin B antifungaline karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. ATCC standartlarına göre *C.albicans* ATCC 10231 suşu flukonazol antifungaline karşı direçlidir(<https://www.lgcstandards-atcc.org>).

C.albicans ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 suşlarının flukonazol MİK değerleri CLSI yöntemi ile, *C.albicans* ATCC 10231 suşu için $1\mu\text{g/ml}$, *C.dubliniensis* CD36 suşu için MİK değeri $1\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur **(Garcia-Gomez O ve ark, 2018)**.

C.albicans ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 suşlarının, XTT indirgeme analizi ile adezyon değerlendirilmesi sonucunda, *C.albicans* ATCC 10231 suşu tarafından oluşturulan biyofilmin ilk 8 saat yüksek metabolik aktiviyete sahip olduğu ve 24-48. saatlerde biyofilm olgunlaştıkça yüksek metabolik aktivitesini koruduğu görülmüştür. Aynı enkübasyon süresi boyunca *C.dubliniensis* CD36 suşu maya ve filament formlarının karışımından oluşan bir biyofilm yapısı sergilemiştir. Bu sonuç *C.albicans* ATCC 10231 suşunun *C.dubliniensis* CD36 suşuna göre daha büyük ve karmaşık biyofilmler oluşturduğunu göstermektedir. Bu suşlarla HeLa hücrelerinin enfekte edilmesi sonucunda biyofilm yapısına bakıldığında, her iki *Candida* türünün de daha yüksek derecede adere olduğu görülmüştür. Hifal gelişim *C.albicans* ATCC 10231 suşunda, *C.dubliniensis* CD36 suşuna göre daha fazla olmuştur. *Candida* türlerinin diğer hücrelere ve abiyotik yüzeylere adere olabilmesi tıbbi açıdan bir problem teşkil etmektedir **(Romeo O ve ark,2009)**.

Kolecka ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, *C.dubliniensis* suşunun *C.albicans* suşuna göre yüzeye daha güçlü adere olduğunu gösterilmektedir **(Kolecka A ve ark,2011)**. Tez araştırmasında yapılan biyofilm değerlendirmesinde, amfoterisin B antifungalı uygulanmayan *C.dubliniensis* CD36 suşunun, antifungal uygulanmayan *C.albicans* ATCC 10231 suşuna göre yüzeye daha güçlü adere olduğu belirlenerek, Kolecka ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlar desteklenmiştir. *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD 36 suşlarının amfoterisin B antifungalı MİK ve sub-MİK yoğunlukları etkisinde de biyofilm oluşturdıkları belirlenmiştir. *C.albicans* ATCC 10231 suşu için MİK ve sub-MİK yoğunluklarında biyofilm oluşumunun baskılanmadığı görülmüştür. *C.dubliniensis* CD36 suşunda MİK ve sub-MİK yoğunluklarının biyofilm oluşumunda azalmaya neden olduğu fakat tamamen inhibe etmediği tespit edilmiştir. Ramage ve arkadaşlarının *C.albicans* suşları ile yaptığı çalışmada, amfoterisin B antifungalının yüksek konsantrasyonları da dahil biyofilm yapısını tamamen inhibe etmediği tespit edilmiştir**(Ramage ve ark, 2001)**. Tez çalışmasında, Ramage ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçları destekler nitelikte sonuçlara ulaşılmıştır. Amfoterisin B antifungalının yüksek konsantrasyonların da dahil biyofilm oluşumunun tamamen inhibe edilmediği kristal viyole boyama yöntemi ile tespit edilmiştir.

Candida biyofilmlerinin organizasyonu bulunduğu çevre koşullarına bağlıdır. Enküasyon koşulları, hücre yoğunluğu, mayaların adere olduğu yüzeyin yapısı ve başka mikroorganizmaların varlığı biyofilm içerisindeki hücrelerin morfolojisini etkileyebilir **(Henriques M ve ark, 2006)**. Biyofilm gelişimi, mayaların planktonik bir mikroorganizmayken, biyotik veya abiyotik yüzeye sıkı sıkıya tutunarak bağlı olduğu bir yaşam tarzına geçişle başlar. Biyofilm yapısının en önemli özelliklerinden biri antifungal direncine neden olmasıdır **(O'Toole GA ve ark,1998)**.Biyofilm oluşumunu inhibe edecek antifungalın seçimi ve antifungalın uygulanma konsantrasyonu enfeksiyon tedavisinde kritik bir öneme sahiptir **(Turan H ve ark,2018)**.

Uzun süreli flukonazol tedavisi, klinik *C.dubliniensis* izolatlarında flukonazole karşı MİK değerlerinin kademeli olarak artmasına neden olmaktadır. İlaça sistematik olarak maruz kalması sonucunda flukonazole karşı direnç geliştirdiği gösterilmiştir. *C.dubliniensis*'in *in vitro* flukonazol direncinin indüklenmesi *C.albicans*'da gözlenen ile benzerlik göstermesine rağmen, klinik olarak da bu şekilde gerçekleştirdiği gösterilememiştir**(Rhunke M ve ark,2000)**. *C.dubliniensis* klinik izolatlarının çoğu azollere karşı duyarlı olsa da, azalmış duyarlılık ve direnç gösteren izolatlar da tanımlanmıştır**(Kirkpatrick WR ve ark,1998;Al mosaid ve ark, 2005)**. Bu izolatlar çoğunlukla flukonazol tedavisi almış ve HIV ile enfekte bireylerden izole edilmiştir. Moran ve arkadaşları, *C.dubliniensis*' in flukonazole ardışık olarak maruz kalması sonucunda *in vitro* olarak da ilaca hızlı bir şekilde direnç geliştirme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir **(Moran GP ve ark,1997)**.

Flukonazol tedavisi sırasında farklı *Candida* türleri de izole edilebilmektedir. Sonuçlar, farklı yorumları beraberinde getirmektedir; 1) enfeksiyon tanısında karışık *Candida* kültürleri doğru tanımlanmıyor olabilir, 2) direnç tanısı konulan türden farklı, başka bir türden kaynaklanıyor olabilir, 3) tedavi süresince başka bir *Candida* türüyle enfekte olunuyor olabilir **(Rhunke M ve ark,2000)**.

Candida dubliniensis, genellikle *Candida albicans* ile karışık kültür halinde bulunur. *C. dubliniensis*, CHROMagarda koyu yeşil koloniler halinde gözlenirken, *C. albicans* açık yeşil koloniler halinde gözlemlenir **(Schoofs A ve ark, 1997)**. *C.albicans* kolonilerinin ise CHROMagarda yeşilin her tonunu oluşturabileceği bildirilmiştir. Bu bulgular, *Candida* kolonilerinin CHROMagar üzerinde oluşturduğu rengin *C. dubliniensis* tanımlamasında güvenilir olmadığını gösteriyor olabilir **(Tintelnot K ve ark, 2000)**.

Gaz Kromatografi sistemi standardize edilmiş, tam otomatik bir sistemdir. Şartlandırılmış kolonlar gaz kromatografi cihazını özel kılar. Sistem çalışmaya başlayınca ilk olarak kendini kalibre eder ve her on örnekte bir kalibrasyon işlemini tekrarlar. Eğer sistemde bir hata olursa ve uygun pikler çıkmazsa sistem çalışmayı durdurur. Bu özellik personel kaynaklı hataların ortadan kalkmasını sağlar. Gaz kromatografi analizinde kullanılan biyolojik materyal uygulanan prosedürden dolayı ‘Biyo-Güvenlik Düzeyi 1’ olan örnek haline dönüşür. İncelenen biyolojik örnek tür düzeyinde analiz edilir. Sistem ‘Food and Drug Administration (FDA), ‘Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tarafından onaylıdır **(Sherlock, 2012)**. Gaz kromatografisi yazılımında mayaların yağ asiti dizilimleri ile ilgili 2 kütüphane bulunmaktadır. Bunlar; 20 maya türünü kapsayan YSTCLN kütüphanesi ve 196 türden 136’ sının *Candida* türünün olduğu YST28 kütüphanesidir. **(Sherlock, 2012)**. *C.dubliniensis* bu kütüphanelerde yer almamaktadır **(Peltroche- Llacsahuanga ve ark,2000)**.

Flukonazol etki mekanizması lanosterol 14-alfa-sterol demetilaz (DM) adlı enzimi inhibe ederek, mantar hücre duvarının parçalanmasına dayanır. Amfoterisin B etki mekanizması ise ergosterol ile etkileşime girerek fungusun sitoplazmik zarını tahrip etmeye dayanır **(Krishnasamy L ve ark, 2018)**. Gaz Kromatografi sistemi, mayanın hücre duvarı bulunan ve 9-20 karbon atomu içeren uzun zincirli yağ asitlerini analiz ederek mikroorganizmaların türe özgü olan yağ asidi metil esterlerini (FAME) tanımlar ve ölçer. Pikler, sistem tarafından otomatik olarak adlandırılır ve sayısal değeri belirlenir **(Sherlock, 2012)**.

Etki mekanizması maya hücre duvarı tahribatına dayanan flukonazol ve amfoterisin B antifungallerinin etkinliği, maya hücre duvarında bulunan yağ asitlerine göre identifikasansağlayan gaz kromatografisi ile değerlendirilebilir.

Gaz kromatografi cihazı ile analizleri sonucunda *C.albicans* ATCC 10231 suşuna spesifik iki referans yağ asidi (Pik Adı: 12:0 ; 13:0) piki tanımlanmıştır. *C.dubliniensis* CD36 suşuna spesifik bir referans yağ asidi (Pik Adı: 15:0) piki tanımlanmıştır. Amfoterisin B antifungalinin özellikle *C.dubliniensis* CD36 suşu üzerinde anlamlı bir farklılığa neden olduğu tez çalışması ile gösterilmektedir. Amfoterisin B MİK ve sub-MİK konsantrasyonlarının, *C.dubliniensis* CD36 biyofilmini kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derece inhibe ettiği tespit edilmiştir. Gaz kromatografisi ile *C.dubliniensis* CD36 suşuna spesifik olduğu belirlenen referans pik "15:0", amfoterisin B antifungal ile spesifik olarak etkileşiyor olabilir. *C.dubliniensis* biyofilm oluşumu, biyofilm oluşumuna bağlı olarak direnç gelişimini engelleyebilmek amacıyla *C.dubliniensis* CD36 suşunun hücre duvarında, türe spesifik olarak bulunan referans yağ asidi üzerinde 'molekül-ilaç spesifik' çalışmaların yapılacağı yeni alan çalışmaları tasarlanabilir.

C.albicans ATCC 10231 suşu, amfoterisin B MİK etkisinde biyofilm oluşumunu azaltmıştır. Sub-MİK etkisinde ise kontrole göre anlamlı derecede daha güçlü biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir. Amfoterisin B antifungalinin yüksek konsantrasyonları *C.albicans* ATCC 10231'e spesifik olduğu belirlenen referans pikler "12:0 ;13:0 " ile etkileşiyor olabilir, molekül spesifik bir alan çalışması başlatılabilir.

Tür spesifik referans piklerin dışında kalan referans pikler her iki türde de ortak özelliklerdir. *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 suşlarının sahip olduğu ortak referans pik adları: 14:0, 16:0 ANTEISO, 16:0, 17: ANTEISO, 18:0'dır. *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 türlerinde ortak olduğu belirlenen beş yağ asidi ile 'hücre duvarı tahribatına' dayanan yeni alan çalışmaları tasarlanabilir.

Gaz kromatografisi ile elde edilen pikler mikroorganizmaya özgüdür. Araştırmanın temel amacı, klinik mikoloji laboratuvarlarında maya örneklerinin daha ekonomik bir maliyetle ve daha hızlı tanımlanabilmesini sağlamak ve ilaç-patojen etkileşimlerinin moleköl spesifik olarak araştırılmasına olanak sağlayarak, tür spesifik, etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ışık tutumaktır.

Gaz kromatografisi yazılımında bulunan iki kütüphane YSTCLN ve YST28' in, klinik ve standart *C.dubliniensis* türlerine aityağ asidi profillerini içermemesinden dolayı bu alanda yeni çalışma konuları oluşturulabilir ve klinik/standart *C.dubliniensis* suşlarına ait bir kütüphane çalışması başlatılabilir. Tez çalışmasında, *C. albicans* ATCC 10231 ile kıyaslandığında *C.dubliniensis* CD 36 suşuna spesifik olduğu tespit edilen 15:0 adlı yağ asidinin varlığı, albicans dışı candida türlerinde de araştırılabilir. Aynı araştırma koşulları tez çalışması ile *C.albicans* ATCC 10231 suşuna spesifik olduğu belirlenen 12:0 ve 13:0 adlı yağ asitleri için de oluşturulabilir.

C.albicans ve *C.dubliniensis* türlerine ait klinik izolatların gaz kromatografisi ile analiz edildiği bir çalışmada elde edilen sonuçlarla, tez çalışmasında kullanılan standart *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.dubliniensis* CD36 suşları için elde edilen 14:0, 16:0 ve 18:0 pik sonuçları birbirini destekler niteliktedir **(Peltroche- Llacsahuanga ve ark,2000)**.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Translasyonel Tıp'ta esas hedef, temel bilimlerde kullanılan yöntemler ile ileri teknoloji yöntemlerini bir araya getirerek hastalıkların patogeneze, tanı ve tedavisine karşı etkili yöntemler ortaya koymaktır. Tez çalışmamızda temel bilimlerden mikrobiyoloji bilim dalı "altın standart" (EUCAST) yöntemi ile gelişmiş bir sistem olan gaz kromatografi yöntemi ile yağ asidi analizi bir araya getirilmesi hedeflenmiştir.

Flukonazol ve amfoterisin B antifungallerinin hücre duvarı üzerinde değişikliklere neden olması ve gaz kromatografi sisteminin bu farklılıkları analiz edebilmesi önemlidir. Bu sayede flukonazol ve amfoterisin B antifungallerinin *C.albicans* ve *C.dubliniensis* türlerinin tanı ve tedavilerinde nasıl ve hangi dozda kullanılabileceği konusundaki bilginin standardizasyonu sağlanabilir.

İlaç direnci alanında yapılan çalışmaların, klinik izolatlar ile belirlenmesi; enfeksiyonun tanı, tedavi ve takibi için son derece önemlidir. Standart suşlar ile yapılan analizler yetersiz kalmaktadır. Çünkü enfeksiyonun tam anlamıyla anlaşılabilmesi için konak ile patojen arasındaki etkileşimi morfolojik, fizyolojik ve moleküler anlamda ele almak gerekir. Biyofilm yapısının ilaç direncine neden olması, biyofilm oluşturabilen türler üzerinde daha fazla araştırma yapılmasını gerektirir.

Antifungallere karşı direnç geliştirebilen maya türlerinin etkili ve doğru dozda antifungalle tedavi edilmesi gelecekte daha dirençli suşların ortaya çıkmasını engeller. Bu durum mevcut antifungallerin etkinliğinin devamlılığını sağlar. Dirençli türlerin gelişmesi gelecekte enfeksiyon hastalıklarının artmasına ve mevcut tedavi yöntemlerinin yetersiz kalmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Araştırmamızda da tespit edildiği gibi farklı antifungal ilaçların çeşitli konsantrasyonları, patojenler üzerinde farklı etkiler yaratabilir. Bu nedenle hem standart suşlarda hem de klinik örneklerde çalışmalar genişletilerek, etkili tedavi ve ilaç kullanımı adına her mikroorganizma için detaylandırılmalıdır.

Candida enfeksiyonları kaynağı hastaneler (kateterizasyon, cerrahi işlemler) olmak üzere de gelişebilir. Bu nedenle hastane enfeksiyonuna neden olan maya türlerinin ilaç direnci ve biyofilm aktivitelerinin tespit edilmesi son derece önemlidir. Translasyonel Tıp bakış açısıyla yola çıkılmalı "laboratuvardan hasta yatağına- hasta yatağından laboratuvara ("from benchside to bedside- from bedside to bench side")" ve kişiler ile kurumlar arasında iş birlikleri artırılmalıdır.

7.KAYNAKLAR

Abraham E, Marincola FM, Chen Z, Wang X. Clinical and translational medicine: integrative and practical science. Clin Transl Med, 2012;1(1):1-3.

Alastruey-Izquierdo A, Melhem MS, Bonfietti LX, Rodriguez-Tudela JL. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2015;57(19):57-64.

Al-Mosaid, A., Sullivan D.J. Coleman, DC. Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on PalŒs Agar. J Clin Microbiol, 2003;41, 4787–4789.

Al Mosaid, A., Sullivan, D.J., Polacheck, I., Shaheen, F.A., Soliman, O., Al Hedaithy, S., Al Thawad, S., Kabadaya, M. and Coleman, D.C. Novel 5-flucytosine-resistant clade of *Candida dubliniensis* from Saudi Arabia and Egypt Identified by Cd25 Fingerprinting. J. Clin. Microbiol, 2005; 43, 4026–4036.

Anderle P, Do-Huynh U. Educating scientists in translational and entrepreneurial medicine: unmet needs and challenges. TTE, 2017;4(2):1-6.

Aoki KR., Ranoux D., Wissel J. Using translational medicine to understand clinical differences between botulinum toxin formulations. Eur J Neurol, 2006;13(4):10-19.

Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W; EUCAST-AFST. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). Clin Microbiol Infect, 2012 Jul;18(7):E246-7.

- Bachmann SP, Walle KV, Ramage G, Petterson T ve ark. In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother, 2002;46: 3591–6.
- Backhed F, Hornef M. Toll-like receptor 4-mediated signaling by epithelial surfaces: necessity or threat? Microbes Infect, 2003; 5:951–959.
- Baillie GS, Douglas J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. J Antimicrob Chemother, 2000; 46: 397–403.
- Baillie GS, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother, 1998;42:1900–1905.
- Baskin H, Ellermann-Eriksen S, Lovmand J, Mogensen SC. Herpes simplex virus type 2 synergizes with interferon-gamma in the induction of nitric oxide production in mouse macrophages through autocrine secretion of tumour necrosis factor-alpha. J Gen Virol, 1997;78 (1):195-203.
- Baskin H, Yazici Z, Baskin Y, Olgun N. Effects of non toxic doses of acyclovir on nitric oxide and cellular death responses in herpesvirus types 1 and 2 infected hep-2 cells. The New Microbiol, 2005; 28(3):205-213.
- Bayrakal V, Baskin H, Bahar İ. Experimental microenvironment modeling study: quorum sensing and biofilm responses of *Pseudomonas aeruginosa* in different cell lines. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2009;29(3).
- Bayrakal V., Baskin H. “Quorum sensing” ve biyofilm. Sakarya S, editör. Biyofilm Enfeksiyonları. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2018;4-13.

- Bayrakal V. Mikolik asit ve yağ asidi profilleri kullanılarak, aerobik-anaerobik ve mikobakteriyolojik suşların tanı standardizasyonu. İzmir, Dokuz Eylül Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi,2014;1-62.
- Blignaut E, Pujol C, Joly S, Soll DR. Racial distribution of *Candida dubliniensis* colonization among South Africans. *J. Clin. Microbiol*, 2003;41:1838–1842.
- Bornstein SR., Licinio J. Improving the efficacy of translational medicine by optimally integrating health care, academia and industry. *Nat Med* 2011; **17**(12): 1567- 1569.
- Busscher HJ, Geertsema-Doornbusch GI, van der Mei HC. Adhesion to silicone rubber of yeasts and bacteria isolated from voice prostheses: influence of salivary conditioning films. *J Biomed Mater Res*, 1997;34:201– 209.
- Campanha NH1, Neppelenbroek KH, Spolidorio DM, Spolidorio LC, Pavarina AC. Phenotypic methods and commercial systems for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral Dis*, 2005;11(6):392-8.
- CenterWatch. Drugs approved by FDA
[.http://www.centerwatch.com/patient/drugs/druglist.html](http://www.centerwatch.com/patient/drugs/druglist.html),24.04.2019
- Challacombe, S. J. Immunologic aspects of oral candidiasis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol*,1994;78:202–210.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol*, 2001;183:5385– 5394.
- Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, ve ark. Antifungal esistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*, 2001;80:903–908.

- Chandra J, Mukherjee PK. Candida Biofilms: development, architecture, and resistance. Microbiol Spectrum, 2015;3(4):1-14.
- Check WA. Molecular techniques shed light on fungal genetics. ASM News,1994; 60,593-596.
- Cohen JJ., Siegel EK. Academic medical centers and medical research: the challenges ahead. J Am Med Assoc,2005; 294,1367–1372.
- Coleman DC, Moran GP, McManus BA, Sullivan DJ. Mechanisms of antifungal drug resistance in *Candida dubliniensis*. Future Microbiol, 2010; 5(6), 935–949.
- Cornely OA., Aversa F., Cook P., Jones B., Michallet M. Evaluating the role of prophylaxis in the management of invasive fungal infections in patients with hematologic malignancy. Eur J Haematol,2011;87: 289-301.
- Costerton JW., Cheng KJ., Geesey GG., Ladd TI., Nickel JC., Dasgupta M., Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol, 1987;41:435– 464.
- Crist AE Jr, Johnson LM, Burke PJ. Evaluation of the Microbial Identification System for identification of clinically isolated yeasts. J Clin Microbiol, 1996;34: 2408–2410.
- Chusri S, Phatthalung PN, Voravuthikunchai SP. Anti-biofilm Activity of Quercus Infectoria G. Olivier Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Letters in Applied Microbiology 2012; 54: 511-7.
- Cuenca-Estrella M., Bassetti M., Lass-Flörl C., Rácil Z., Richardson M. Detection and investigation of invasive mould disease. J Antimicrob Chemother,2011; 66:15-24.
- Çalı A, Çelik C, Tutar U, Bakıcı MZ. Biofilm formation activities of isolated microorganisms from hospitalized patients. Kocaeli Med J, 2018; 7; 3:82-88.

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 2002;8:881–890.

Dwivedi P, Thompson A, Xie et al Z. Role of Bcr1-activated genes Hwp1 and Hyr1 in *Candida albicans* oral mucosal biofilms and neutrophil evasion. *PLoS One*, 2011; 6(1).

Enjalbert B, Moran GP, Vaughan C, et al. Genome-wide gene expression profiling and a forward genetic screen show that differential expression of the sodium ion transporter *Ena21* contributes to the differential tolerance of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to osmotic stress. *Mol Microbiol*, 2009;72(1):216–228.

Faggi, E, Pini, G., Campisi, E, Martinelli, C. and Difonzo, E. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus infected and non-infected patients and in a yeast culture collection. *Mycoses*, 2005; 48:211–215.

Feoktistova M., Geserick, P., Leverkus M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016. :10.1101;343-346

Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol*, 2010;9:109–118.

Florent M., Noel T., Ruprich-Robert G. Nonsense and missense in *FCY2* and *FCY1* genes are responsible for flucytosine resistance and flucytosine-fluconazole cross-resistance in clinical isolates of *Candida lusitanae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009;53(7), 2982-2990.

Fontana JM, Alexander E, Salvatore M. Translational research in infectious disease: current paradigms and challenges ahead. *Transl Res*, 2012; 159(6): 430–453.

- Fotedar R, Al-Hedaithy SS. *Candida dubliniensis* at a university hospital in Saudi Arabia. *J. Clin. Microbiol*, 2003;41: 1907–1911.
- Garcia GO., Pavon DA., Aldrete EC., Indili RB., Tenorio AF., Tanaca LV., Toledano CA. Synthesis, molecular docking and antimycotic evaluation of some 3-acyl imidazol(1,2- α)pyrimidines. *Molecular*, 2018;23,0.
- Ghannoum MA., Swairjo I., Soll DR. Variation in lipid and sterol contents in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. *J Med Vet Mycol*, 1990; 28,103-115.
- Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun*, 1994; 62:915–921.
- Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev*, 1995; 8(4), 462–478.
- Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*: comparison of biofilm formation in terms of biomass and activity. *Br J Biomed Sci*, 2006; 63(1):5-11.
- Hertel, S., Wolf, A., Basche, S., Viergutz, G., Rupf, S., Hannig, M., & Hannig, C. Initial microbial colonization of enamel in children with different levels of caries activity: An in situ study. *Am J Dent*, 2017;30(3), 171–176.
- Hoening M., Strenger V., Buzina W., Valentin T., Koidl C. European organization for the research and treatment of cancer/mycoses study group (EORTC/MSG) host factors and invasive fungal infections in patients with haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother*, 2012;67: 2029-2033.
- Holmes AR, Cannon RD, Jenkinson HF. Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. *J Ind Microbiol*, 1995;15:208–213.
- Hoyer L. The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 2001;9(4):176–180.

İnal A., Ülçay A., İnfeksiyon Hastalıklarında Kortikosteroid Kullanımı. İç hastalıkları Dergisi,2013;20:13-6

Jackson AP, Gamble JA, Yeomans T, ve ark. Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. Genome Res, 2009;19(12): 2231– 2244.

Jin Y1, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. J Clin Microbiol. 2003 Jul;41(7):2961-7

Jordan RP, Williams DW, Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. Comparative adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells and extracellular matrix proteins. Med Mycol, 2014; 52,:254– 263.

Kalya AV, Ahearn DG. Increased resistance to antifungal antibiotics of *Candida* spp. adhered to silicone. J Ind Microbiol,1995;14:451– 45.

Keramaris NC., Kanakaris NK., Tzioupis C., Kontakis G., Giannoudis PV. Translational research: from benchside to bedside. *Injury* 2008; 39(6): 643-650.

Khan ZU., Ahmad S., Mokaddas E. Chandy R. Tobacco agar, a new medium for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. J Clin Microbiol,2004;42, 4796–4798.

Kibbler CC, Seaton S, Barnes RA. Management and outcome of bloodstream infections due to *Candida* species in England and Wales. J Hosp Infect, 2003;54(1):18–24.

.

Kirkpatrick, W.R., Revankar, S.G., McAtee, R.K., Lopez-Ribot, J.L., Fothergill, A.W., McCarthy, D.I., Sanche, S.E., Cantu, R.A., Rinaldi, M.G. and Patterson, T.F. Detection of *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples from human immunodeficiency virus-infected patients in North America by primary CHROMagar *Candida* screening and susceptibility testing of isolates. *J. Clin. Microbiol*, 1998; **36**, 3007–3012

Koga-Ito CY, Komiyama EY, De Paiva Martins CA, Vasconcellos TC, et al. Experimental systemic virulence of oral *Candida dubliniensis* isolates in comparison with *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. *Mycoses*, 2010; 54:278-285.

Kolecka A, Zarvel M, Hernandez-Barbado R, Bujdakova H. Biofilm formation and adhesive/invasive properties of *Candida dubliniensis* in comparison with *Candida albicans*. *Cent Eur J Biol*, 2011; 6(6):893-901.

Krishnasamy L, Krishnakumar S, Kumaramanickavel G, Saikumar C. Molecular mechanisms of antifungal drug resistance in *Candida* species. *J Clin Diagn Res*, 2018;12(9):1-6.

Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*, 2002;70:878–888.

Lama J, Ran X, Ran Y. Translational medical mycology guides clinical and laboratory practice on fungal diseases. *World J Transl Med*, 2014; 3(1): 31-36.

Littman BH, Mario LD, Plebani M, Marincolás FM. What's next in translational medicine?. *Clin Sci*, 2007;112:217-227.

Luo G, Ibrahim AS, Spellberg B, Nobile CJ, Mitchell AP, Fu Y. *Candida albicans* Hyr1p confers resistance to neutrophil killing and is a potential vaccine target. *J Infect Dis*, 2010;201(11):1718–1728.

Mankoff SP., Brander C., Ferrone S., Marincola FM. Lost in translation: obstacles to translational medicine. J. Transl. Med, 2004; 2,14.

Marincola FM. In support of descriptive studies; relevance to translational research. J Transl Med 2007; 5:21.

McManus A, Coleman DC, Moran GP. Multilocus sequence typing reveals that the population structure of *Candida dubliniensis* is significantly less divergent than that of *Candida albicans*. J Clin Microbiol, 2008;46(2)652–664.

MIS Operating Manual. 125 Sandy Dr. Newark, DE 19713. Sherlock, Microbial Identification System Version 6.2;2012.

Moran G, Stokes C, Thewes S, Hube B, Coleman DC, Sullivan D. Comparative genomics using *Candida albicans* DNA microarrays reveals absence and divergence of virulence-associated genes in *Candida dubliniensis*. Microbiology, 2004;150(10);3363–3382.

Moran GP, Coleman DC, Sullivan DJ. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: why is *C. albicans* more pathogenic?. Int J Microbiol, 2012; (2):205921,1-7.

Moran, G.P., Sullivan, D.J. and Coleman, D.C. (2002) in *Candida* and candidiasis (Calderone, R.A., ed.), pp. 37–53, ASM Press, Washington, DC.

Moran GP, Sullivan DJ, Henman MC *et al.*: Antifungal drug susceptibilities of oral *Candida dubliniensis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected subjects and generation of stable fluconazole-resistant derivatives *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 1997;41(3), 617–623.

- Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003;67(3);400–428.
- Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, Campanha NH. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis*, 2014;20(4):329-44.
- Nicastri E, Petrosillo N, Viale P, Ippolito G. 2001. Catheter-related bloodstream infections in HIV-infected patients. *Ann NY Acad Sci* 946: 274–290.
- Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*, 2001;44(9)10; 361–367.
- O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*, 1998;28(3):449-61.
- O'Connor L, Caplice N, Coleman DC, Sullivan DJ, Moran GP. Differential filamentation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* is governed by nutrient regulation of UME6 expression. *Eukaryotic Cell*, 2010;9(9):1383-1397.
- Peltroche-Llacsahuanga H, Schmidt S, Seibold M, Lütticken R, Haase G. Differentiation between *Candida dubliniensis* and *Candida albicans* by fatty acid methyl ester analysis using gas-liquid chromatography. *J Clin Microbiol*, 2000;38(10):3696-704.
- Peters BM., Jabra-Rizk MA., O'May GA., Costerton JW, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: impact on pathogenesis and human disease. *Clin Microbiol Rev* 2012;25 (1):193-213.

- Pfaller MA, Messer SA, Boyken *et al.*: *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2004;48(3), 201–205.
- Phan QT, Myers CL, Fu Y, Sheppard DC, ve ark. Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *Plos Biol*, 2007;5(3):543-557.
- Pincus, DH., Coleman, DC. Pruitt, WR. Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *J. Clin. Microbiol*, 1999; 37, 3533–3539.
- Pinjon E., Moran GP., Coleman, Sullivan DJ. Azole susceptibility and resistance in *Candida dubliniensis*. *Biochem Soc Transac*, 2005; 33(5): 1210-1214.
- Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*, 1998;36(7):2093–2095.
- Procop GW., Church DL., Hall GS., Janda WM., Koneman EW., Schreckenberger PC., Woods GL. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Seventh Edition. Ankara, Hipokrat Yayınevi, 2017;1394.
- Ramage G, VandeWalle K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001;45:2475-2479.
- Ramage G, Walle KV, Wickes BL, and López-Ribot JL, Biofilm Formation by *Candida dubliniensis* *J Clin Microbiol*, 2001; (39) 9:3234-40.

- Reid G, Tieszer C, Lam D. Influence of lactobacilli on the adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* to fibers and epithelial cells. *J Ind Microbiol*,1995;15:248–253.
- Romeo O., Leo De F., Criseo G. Adherence ability of *Candida africana*: a comparative study with *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Mycoses*,2009;54:57-61.
- Ruhnke M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida albicans* yeasts. *Curr Drug Targets*,2006; 7(4), 495–504.
- Salgado-Parreño FJ, Alcoba-Flórez J, Arias A, Moragues MD, ve ark. *In vitro* activities of voriconazole and five licensed antifungal agents against *Candida dubliniensis*: comparison of CLSI M27-A2, sensititre yeast one, disk diffusion, and Etest methods. *Microb Drug Resist*, 2006;12(4),246–251.
- Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Majcherczyk PA, Bille J. The ATP binding cassette transporter gene *CgCDR1* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*,1999;43(11),2753-276.
- Sasser M. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technical Note;2001.
- Schaller, M., Zakikhany, K., Naglik, J. ve ark. Models of oral and vaginal candidiasis based on in vitro reconstituted human epithelia, *Nat Protoc*, 2007;1(6):2767—2773.
- Schoofs A, Odds FC, Colebunders R, Ieven L, Goossens H. Use of specialised isolation media for recognition and identification of *Candida dubliniensis* isolates from HIV-infected patients. *Eur. J Clin Microbiol Infect Dis*, 1997;16:296–300.
- Schorling, S. R., H. C. Kortinga, M. Froschb, and F. A. Muhlschlegel. The role of *Candida dubliniensis* in oral candidiasis in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Crit Rev Microbiol*,2000; 26:59–68.

- Shahzad A, Cohrs RJ, Shen A, Flörl CL. Human fungal infections: need to improve diagnosis with new biomarkers developed by translational research. *Mol Med Ther*, 2012;1:1.
- Staab F, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. *Sci*, 1999;283(5407);1535– 1538.
- Staib P.,Morschha J. Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. *Mycoses*,1999; 42, 521–524.
- Stokes, Moran GB, Spiering MJ, Cole GT, Coleman DC, Sullivan DJ. Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*, 2007;44(9):920–931.
- Stokes C, Moran GB, Spiering MJ, Cole GT, Coleman DC, Sullivan DJ. Lower filamentation rates of *Candida dubliniensis* contribute to its lower virulence in comparison with *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol*, 2007;44(9):920–931.
- Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, 2004;12(7);317–324.
- Sullivan D, Moran G, Coleman D. Fungal diseases of humans. In: K. Kavanagh,editor. *Fungi biology and applications*. 2nd ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2011. p.171-190.
- Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: ten years on. *FEMS Microbiol Lett*, 2005; 253: 9–17.

- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. *Candida dubliniensis* sp.nov.:phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. Microbiol, 1995;141(7):1507-21.
- Sullivan DJ., Moran GP., Pinjon E., Al-Mosaid A., Stokes C., Vaughan C., Coleman DC. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. FEMS Yeast Res,2004; 4,369–376.
- Teng LJ, Hsueh PR, Liaw SJ, Ho SW, Tsai JC. Genetic detection of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with sporadic diarrhea. J Microbiol Immunol Infect, 2004;37:327–334.
- Tintelnot K, Haase G, Seibold M, Bergmann F, Staemmler M, Franz T, Naumann D. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *C. dubliniensis*. J Clin Microbiol, 2000;38:1599–1608.
- Turan H, Demirbilek M. Biofilm-forming capacity of blood-borne *Candida albicans* strains and effects of antifungal agents. Rev Argent Microbiol, 2018;50(1):62-69.
- Vilela MMS, Kamei K, Sano A, ve ark. Pathogenicity and virulence of *Candida dubliniensis*: comparison with *C. albicans*. Med Mycol, 2002;40(3):249–257.
- Vincent JL.,Anaissie EA.,Bruining H.,Demajo W.,El-Ebiary M., Haber J., Hiramatsu Y.,Nitenberg G.,Nyström PO.,Pittet D.,Rogers T.,Sandven p., Sganga G., Schaller MD.,Solomkin J.Epidemiology, diagnosis and treatment of systemic *Candida* infection in surgicalpatients under intensive care.Intensive CareMed,1998;24:206-216.
- Yücel A, Kantarcıoğlu S. Some important changes in taxonomy of *Candida albicans*. Cerrahpaşa J Med, 1999; 30(3):236-246.
- Wang XD. Role of clinical bioinformatics in the development of network-based Biomarkers. J Clin Bioinforma,2011;1(1):28.

- Wehling M. Translational medicine: science or wishful thinking?. J Transl Med. 2008, 6:31.
- Williamson MI., Samaranayake LP., MacFarlane TW. Biotypes of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates. J Med Vet Mycol, 1986; 24, 81-84.
- Willis, A.M, Coulter W.A, Sullivan DJ, Coleman DC, Hayes JR, Bell PM, Lamey, PJ. Isolation of *Candida dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients. J Oral Pathol Med, 2000; 29: 86–90.
- Xiao, J., Grier, A., Faustoferri, R. C., Alzoubi, S., Gill, A. L., Feng, C., Gill, SR. Association between oral *Candida* and Bacteriome in children with severe ECC. J Dent Res, 2018; 97(13), 1468–1476 22034518790941.
- Xiao, J., Huang, X., Alkhers, N., Alzamil, H., Alzoubi, S., Wu, T. T., Koo, H. *Candida albicans* and early childhood caries: A systematic review and meta-analysis. Caries Res, 2018; 52(1-2), 102–112.

7. EKLER

8.1. EK-1 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul İzni

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Sayın Prof.Dr. A.Hüseyin BASKIN

Araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı aşağıda sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL 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:	4486-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ MÜNFERİT ARAŞTIRMA ☐ ÖÇM ☐ YÜKSEKLİSANS ☒ DOKTORA ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Translasyonel Tıp Bakış Açısı ile Candida Albicans ve Candida Dubliniensis'in Tanısı ve Ayırıcı Tanısında Biyolojik Gösterge Olarak Türe Özgü Yağ Asidi Metil Ester Araştırması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr. A.Hüseyin BASKIN Sağlık Bilimleri Enstitüsü
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

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

Karar No:2019/03-50		Tarih:13.02.2019			
KARAR BİLGİLERİ		Prof.Dr. A.Hüseyin BASKIN'ın sorumlusu olduğu "Translasyonel Tıp Bakış Açısı ile Candida Albicans ve Candida Dubliniensis'in Tanısı ve Ayırıcı Tanısında Biyolojik Gösterge Olarak Türe Özgü Yağ Asidi Metil Ester Araştırması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.			
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Can SEVİNÇ (Başkan)	Göğüs Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları A.D	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sadık Kıvanç METİN (Başkan Yardımcısı)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Arzu GENÇ	Nörolojik Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL	Tıbbi Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Serkan YENER	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGON	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E ☐ H ☒	
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E ☐ H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	

8.2. ARBİS Özgeçmişi

CANSU AKGÜL KAYA

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	49942151128
Doğum Tarihi	01/12/1992
İletişim Adresi	
Telefon	(554) 576 30 17
E-posta	akgul.cansu@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

01 Eylül 2015 - Şu Anda (3 yıl 9 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TRANSLAYONEL TIP ANABİLİM DALI
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.62 / 4.0

01 Haziran 2010 - 01 Eylül 2015 (5 yıl 4 ay)
Lisans, İkinci Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Eylül 2013 - 01 Ocak 2014 (5 ay) (Yarı Zamanlı)
STAJYER, EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

Yabancı Dil Bilgileri

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

TÜRKÇE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

