

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KLİNİK MATERYALLERDEN İZOLE EDİLEN  
*CANDIDA ALBICANS* SUŞLARINDA *SAP* GENLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. MURADIYE YARAR**

**TEZ DANIŞMANI  
DOÇ. DR. NURAL CEVAHİR**

**DENİZLİ - 2014**

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KLİNİK MATERYALLERDEN İZOLE EDİLEN  
*CANDIDA ALBICANS* SUŞLARINDA *SAP* GENLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. MURADIYE YARAR**

**TEZ DANIŞMANI  
DOÇ. DR. NURAL CEVAHİR**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 14.05.2012 tarih ve 04 sayılı 2012 TPF016 nolu kararı ile desteklenmiştir.

**DENİZLİ - 2014**

Doç. Dr. Nural CEVAHİR danışmanlığında Dr. Muradiye YARAR tarafından yapılan “Klinik Materyallerden İzole Edilen *Candida albicans* suşlarında *SAP* Genlerinin Araştırılması” başlıklı tez çalışması 28.04.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN Prof. Dr. İlknur KALELİ

ÜYE Doç. Dr. Nural CEVAHİR

ÜYE Doç. Dr. Melek DEMİR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.  
14/07/2014

Prof. Dr. Hasan Herken  
Pamukkale Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Dekanı

## TEŞEKKÜR

Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. İlknur KALELİ başta olmak üzere, gerek uzmanlık eğitimim gerekse tez çalışmam süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Nural CEVAHİR'e; asistanlığım süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Çağrı ERGİN'e, Doç. Dr. Melek DEMİR'e, Yrd. Doç. Dr. Mustafa ŞENGÜL'e, Yrd. Doç. Dr. Ergun METE'ye ve Yrd. Doç. Dr. Server YAĞCI'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan sayın hocam Prof. Dr. Mehmet ZENCİR'e ve arkadaşım Ar. Gör. Dr. Utku UZUN'a teşekkür ederim.

Eğitimim süresince beraber mutlulukla çalıştığım, tez çalışmam boyunca yardım ve desteklerini her zaman gördüğüm ve güzel dostluklarını daima anımsayacağım şimdi uzman olmuş ve halen asistan olan arkadaşlarım, Uzm. Dr. Fatma OZANSOY'a, Uzm. Dr. Osman ACAR'a, Uzm. Dr. M.Uğur ÇİTİL'e, Uzm. Dr. Mustafa KULA'ya, Ar. Gör. Dr. Sedef Z. ÖNER'e ve Ar. Gör. Dr. Levent AKSOY'a, bölümümüzün tüm laboratuvar çalışanlarına ve personeline teşekkür ederim.

Yaşamımın her alanında sevgi, ilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, biricik annem ve daima kalbimde yaşayacak olan canım babama; her zaman yanımda olan, eşim Dr. Volkan YARAR'a; en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Muradiye YARAR  
Denizli-2014

## İÇİNDEKİLER

Sayfa No

|                                       |      |
|---------------------------------------|------|
| ONAY SAYFASI .....                    | III  |
| TEŞEKKÜR .....                        | IV   |
| İÇİNDEKİLER .....                     | V    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....         | VI   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                  | VII  |
| TABLolar DİZİNİ .....                 | VIII |
| ÖZET.....                             | IX   |
| İNGİLİZCE ÖZET .....                  | XI   |
| GİRİŞ .....                           | 1    |
| GENEL BİLGİLER .....                  | 3    |
| CANDIDA TÜRLERİ .....                 | 3    |
| Tarihçe.....                          | 3    |
| Genel Özellikleri.....                | 3    |
| Epidemiyoloji ve Klinik Önemi.....    | 5    |
| Patogenez ve Virülans Faktörleri..... | 7    |
| Laboratuvar Tanısı.....               | 15   |
| GEREÇ VE YÖNTEM.....                  | 20   |
| BULGULAR .....                        | 32   |
| TARTIŞMA .....                        | 44   |
| SONUÇLAR .....                        | 53   |
| KAYNAKLAR .....                       | 55   |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- AIDS:** Acquired Immunodeficiency Syndrome  
**ALS:** Agglutinin Like Sequence  
**bç:** Baz Çifti  
**BIGGY agar:** Bismuth Glucose Glycine Yeast Agar  
**dNTP:** Deoksiribonükleozid Trifosfat  
**EMB agar:** Eosine Methylen Blue Agar  
**HIV:** Human Immunodeficiency Virus  
**IgA:** İmmünglobulin A  
**IgG:** İmmünglobulin G  
**ITS:** Internal Transcribed Spacer  
**kDA:** Kilo Dalton  
**KKBKI agar:** Kongo Kırmızılı Beyin-Kalp İnfüzyon Agar  
**KOH:** Potasyum Hidroksit  
**OD:** Optik Dansite  
**PAS:** Periodik Asit-Schiff  
**PCR:** Polymerase Chain Reaction  
**RFLP:** Restriction Fragment Length Polymorphism  
**RT-PCR:** Revers Transcriptase-Polymerase Chain Reaction  
**SAP:** Salgısal Asit Proteinaz  
**SB:** Sabouraud Buyyon  
**SDA:** Sabouraud Dekstroz Agar  
**SDB:** Sabouraud Dekstroz Broth  
**SVK:** Santral Venöz Katater  
**SSAA:** Sığır Serum Albumin Agar  
**Taq:** Thermus Aquaticus  
**TBE:** Tris-Borik Asit-EDTA  
**YEPD:** Yeast Extract Peptone Dekstrose

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|   | <b>Sayfa No</b> |
|---|-----------------|
| <b>Şekil 1</b> <i>C. albicans</i> suşlarında klamidospore oluşumu görüntüsü.....  | 21              |
| <b>Şekil 2</b> Tüp aderans yöntemi ile biyofilm araştırılması.....  | 22              |
| <b>Şekil 3</b> Kongo kırmızılı beyin kalp infüzyon agardaki biyofilm pozitif ve negatif<br><i>C. albicans</i> suşlarının görüntüsü..... | 23              |
| <b>Şekil 4</b> Modifiye mikroplate yöntemi ile biyofilm görüntüsü.....  | 25              |
| <b>Şekil 5</b> Asit proteinaz pozitif ve negatif kökenlerin sığır serum albüminli<br>agardaki görüntüsü.....                            | 26              |
| <b>Şekil 6</b> <i>C. albicans</i> suşlarında, <i>SAP 1-5</i> gen bölgelerine ait PCR jel görüntüleri...                                 | 40              |
| <b>Şekil 7</b> <i>C. albicans</i> suşlarında, <i>SAP 6-10</i> gen bölgelerine ait PCR jel görüntüleri.                                  | 41              |

## TABLolar DİZİNİ

|  | Sayfa No |
|--|----------|
| <b>Tablo.1</b> PCR' da kullanılan özgül primerler.....   | 28       |
| <b>Tablo.2</b> <i>C. albicans</i> suşlarının izole edildikleri klinik örneklerle göre dağılımı.....  | 32       |
| <b>Tablo.3</b> <i>C. albicans</i> suşlarının izole edildikleri kliniklere göre dağılımı.....   | 33       |
| <b>Tablo.4</b> <i>C. albicans</i> suşlarında virülans faktörlerinin pozitifliğine göre örneklerin dağılımı .....                                       | 35       |
| <b>Tablo.5</b> <i>C. albicans</i> suşlarında mikropate yöntemi ile biyofilm aktivitesi sonuçları .....   | 36       |
| <b>Tablo.6</b> <i>C. albicans</i> suşlarında modifiye tüp aderans yöntemi ile biyofilm aktivitesi sonuçları .....                                      | 37       |
| <b>Tablo.7</b> <i>C. albicans</i> suşlarında Kongo kırmızılı beyin kalp infüzyon (KKBKI) agar yöntemi ile biyofilm aktivitesi sonuçları .....          | 37       |
| <b>Tablo.8</b> <i>C. albicans</i> suşlarının asit proteinaz aktivite sonuçları.....  | 38       |
| <b>Tablo.9</b> <i>C. albicans</i> suşlarında biyofilm ve asit proteinaz aktivitesi varlığının <i>SAP</i> genlerinin varlığı ile karşılaştırılması..... | 42       |
| <b>Tablo.10</b> Her üç yöntem ile biyofilm pozitif bulunan suşlarda, <i>SAP4</i> geninin varlığının karşılaştırılması.....                             | 43       |



## ÖZET

### Klinik Materyallerden İzole Edilen *Candida albicans* Suşlarında SAP

#### Genlerinin Araştırılması

Dr. Muradiye YARAR

*Candida* türleri; normal flora üyesi olmakla birlikte, fırsatçı patojenler olarak çevresel ve bireysel koşulların konak aleyhine geliştiği durumlarda, hafif yüzeysel enfeksiyonlardan ağır sistemik enfeksiyonlara kadar çeşitli klinik tablolara yol açabilmektedirler. *Candida* enfeksiyonlarının patogeneğinde konak savunma sisteminin yanı sıra, patojene ait çeşitli virülans faktörleri de rol almaktadır. *Candida* türlerine ait virülans faktörleri arasında; hif oluşumu, toksinlerin salınımı, fenotipik ve genotipik değişim gösterebilmeleri, dimorfizm, adezinler, asit proteinaz gibi enzimlerin üretimi ve biyofilm oluşturması sayılabilir. *Candida* türleri içerisinde en sık izole edilen tür *C. albicans* türüdür. Bu çalışmada laboratuvarımızdaki çeşitli klinik örneklerden izole edilen *C. albicans* suşlarında, biyofilm oluşumu ve proteinaz aktivitesinin fenotipik yöntemlerle araştırılması, aynı zamanda genotipik yöntemle SAP genlerinin varlığının ortaya konması ve bu virülans faktörleriyle SAP genleri arasındaki bağlantının incelenmesi amaçlanmıştır. Ocak 2012-Ocak 2013 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş ve *C. albicans* olarak tanımlanmış 140 *C. albicans* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Suşlardaki biyofilm oluşumunun araştırılmasında modifiye tüp aderans, Kongo kırmızılı beyin kalp infüzyon agar (KKBKI) ve modifiye mikroplate yöntemi kullanılmıştır. *Candida* suşlarının salgısal asit proteinaz aktivitelerini saptamak için %1'lik sığır serum albumin agar (SSAA) kullanılmıştır. *SAP1-10* genlerinin varlığı PCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmaya alınan 140 *C. albicans* suşunda, KKBKI agar yöntemiyle %51.4 oranında, modifiye tüp aderans yöntemiyle %63.6 oranında ve modifiye mikroplate yöntemiyle %87.9 oranında biyofilm varlığı saptanmıştır. SSAA ile suşların %92.9'unda asit proteinaz aktivitesi varlığı saptanmıştır. *C. albicans* suşlarında PCR yöntemiyle ise %65 oranında *SAP1*, %82.9 oranında *SAP2*, %77.9 oranında *SAP3*, %79.3 oranında *SAP4*, %13.6 oranında *SAP5*, %81.4 oranında *SAP6*, %82.9 oranında *SAP7*, %40 oranında *SAP8*, %38.6 oranında *SAP9* ve %36.4 oranında *SAP10* varlığı saptanmıştır. Toplam 4 suşta (%2.8) tüm

*SAP* genlerinin varlığı aynı anda izlenmiştir. 10 suşta ise (%7.1) hiçbir *SAP* genine rastlanmamıştır. Bu çalışmada en sık *SAP1,2,3,4,6* ve *SAP7* genlerine rastlanmıştır. *Candida* suşlarının virülans faktörlerinin ve ilgili virülans genlerinin belirlenmesinin, *Candida* türleri ile oluşan enfeksiyonların patogenezini açıklamada önemli katkılar sağlayacağı kanısındayız.

**Anahtar Kelimeler:** *C. albicans*, *SAP*, biyofilm, asit proteinaz

## SUMMARY

### **Investigation of *SAP* genes in *Candida albicans* strains isolated from clinical materials**

Dr. Muradiye Yarar

Although *Candida* species are a member of the normal flora, they may lead to various clinical conditions as mild superficial infections, and severe systemic infections as opportunistic pathogens when environmental and individual conditions hinder the host. Various virulence factors of the pathogen also play a role in the pathogenesis of *Candida* infections beside the defense system of the host. The virulence factors of *Candida* species include hypha formation, toxin release, display of phenotypical and genotypical changes, dimorphism, adhesins, production of enzymes like acid proteinase and biofilm formation. *C. albicans* is the most frequently isolated *Candida* species. In this study, it was aimed to investigate biofilm formation and proteinase activity using phenotypical methods in *C. albicans* strains isolated from various clinical samples in our laboratory, in addition to demonstrating the presence of *SAP* genes using genotypical methods, and to investigate the correlation between these virulence factors and *SAP* genes. A total of 140 *C. albicans* strains, which were isolated from various clinical samples in the Microbiology Laboratory of Pamukkale University Medical School Research and Training Center between January 2012 and January 2013, were included in the study. The modified tube adherence, the Congo red brain heart infusion agar (CRBHI) and the modified microplate method were used for the investigation of biofilm formation. 1% bovine serum albumin agar (BSAA) was used to investigate the secretory acid proteinase activities of *Candida* strains. The presence of *SAP1-10* genes was investigated using the PCR method. In 140 *C. albicans* strains included in the study, the presence of biofilm was detected at a rate of 51.4% with the CRBHI agar method, at a rate of 63.6% with the modified tube adherence method and 87.9% with the modified microplate method. Acid proteinase was detected in 92.9% of the strains with BSAA. *SAP1* was detected at a rate of 65%, *SAP 2* at a rate of %82.9, *SAP3* at a rate of %77.9, *SAP4* at a rate of %79.3, *SAP5* at a rate of %13.6, *SAP6* at a rate of %81.4, *SAP7* at a rate of %82.9, *SAP8* at a rate of %40, *SAP9* at a rate of %38.6, and *SAP10* at a rate of %36.4 in *C. albicans* strains using the PCR method. The presence of all

*SAP* genes was observed concurrently in a total of 4 strains (2.8%). In this study, *SAP1*, 2, 3, 4, 6 and 7 genes were detected most frequently. We consider that determination of the virulence factors and related virulence genes in *Candida* species will significantly contribute to explaining the pathogenesis of the infections developing with *Candida* species.

**Key words:** *C.albicans*, *SAP*, biofilm, acid proteinase

## GİRİŞ

*Candida* türleri; cansız yüzeylerde, birçok hayvan ve insanın deri ve mukozasında yaşayan fırsatçı patojenler olup özellikle hastanede yatan immun sistemi zayıf hastalarda yüzeysel ve derin mikozlara yol açarlar. Normal flora elemanı olan mantarlar, birçok klinik örnekte üremeleri nedeniyle, zaman zaman gereksiz tedavilere yol açmaktadırlar (1).

Yenidoğan ve yetişkin yoğun bakım ünitelerinde genel durumu bozuk olan hastaların daha fazla izlenmesi, geniş spektrumlu ve çoklu antibiyotik kullanımının artması, büyük cerrahi girişimlerin ve yapay protez kullanımının yaygınlaşması sonucu fungal enfeksiyonlarda artış görülmüş ve fırsatçı patojenler arasında en önemli yeri mantarlar almıştır (2).

İmmünesupresiflerde en sık ve en önemli fungal patojenlerin mayalar olduğu; bunlar arasında da en sık *Candida* cinsine rastlanıldığı bilinmektedir (3). Son yıllarda hastane kaynaklı dolaşım sistemi enfeksiyonları arasında kandidemi insidansının beş kat arttığı ve *Candida* türlerinin en sık saptanan dördüncü etken olduğu belirtilmektedir (3, 4).

Genellikle konakta, *Candida* enfeksiyonlarına karşı doğal direnç görülmektedir. Konak hücre hasarını *Candida* türlerinin virülans faktörleri ve savunma mekanizmaları aracılığıyla verilen konak immun yanıtı belirlemektedir (5). Bağışıklığı yenmek için türe ve kökene bağlı bazı faktörler birlikte rol oynamaktadırlar. Patojenite kriterleri denilen bu faktörler *Candida* türlerinin virülansını belirlemektedir (6, 7).

Yapılan araştırmalarda *Candida* enfeksiyonlarında proteaz, esteraz, fosfolipaz ve slime üretimi gibi virülans faktörleri araştırmacıların dikkatini çekmiştir (8). Bunlardan en önemlilerinin, konak hücre ile yapay yüzeylere adezyon için gerekli olan slime faktör ve epitelyum hücrelerine girerek derin dokulara ilerlemede rol oynayan proteinaz enzimleri olduğu ileri sürülmektedir (9).

Enfeksiyonların patogenezi için birçok invitro test geliştirilmiş ve hayvan modellerinde oluşturulan enfeksiyonlar ile virülans faktörlerinin önemi ortaya konmuştur. Böylece tedavi için yeni alternatifler geliştirilmeye başlanmıştır (10).

Bu çalışmada laboratuvarımızdaki çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarında, slime faktör ve proteinaz aktivitesinin fenotipik yöntemlerle araştırılması, pozitif bulunan suşlarda *SAP* genlerinin varlığının ortaya konması ve bu virülans faktörleriyle *SAP* genleri arasındaki bağlantının incelenmesi amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### *CANDIDA* TÜRLERİ

#### Tarihçe

Ağızdaki pamukçuk lezyonları M.Ö. dördüncü yüzyıldan beri bilinmektedir ve bu lezyonların akciğerlerde invaziv olarak yerleşebildiğini de Rosen von Rosenstein 1771'de göstermiştir. Almanya'da Bernhard Rudolph Conrad von Langenbeck, 1800'lü yılların başında tifo nedeniyle ölen bir hastanın özefagus mukozasından soyutladığı organizmayı parazit olarak tanımlamış ve bu etkenin tifo ile ilişkili olduğunu düşünmüştür. Emil Berg ise 1841'de pamukçuğun mantarlara bağlı olarak meydana geldiğini ortaya koymuştur. Gruby bir yıl sonra Langenbeck'in soyutladığı bu organizmanın *Sporotrichum* türü olduğunu bildirmiş, 1842'de de Berg tarafından deneysel olarak oral aft modeli oluşturularak bu konudaki ilk ve en önemli adım atılmıştır. Robin 1847 yılında mantarı *Oidium albicans* olarak adlandırmış, ardından Frank ve Wilkinson, ağızdaki lezyonun genital organlarda da bulunabileceğini ortaya koymuştur. Hansen bu mantarı *Monilia* olarak 1888'de sınıflandırmıştır. Bundan iki yıl sonra Zopf *Monilia albicans* adını vermiştir. Roth Berkhout 1920'li yılların başında pamukçuk etkeni olan bu mikroorganizmanın bir *Monilia* türü olmadığını bildirerek jenerik ismi olarak *Candida*'yı önermiştir. Antibiyotiklerin 1940'lı yıllardan itibaren kullanımının yaygınlaşması ile *Candida* enfeksiyonlarının sıklığının arttığı görülmüş ve konuyla ilgili çalışmalara ağırlık verilmiştir (11, 12).

#### Genel Özellikler

Ökaryot, klorofilsiz, absorpsiyonla beslenen mikroorganizmalar olan mantarlar genellikle yuvarlak ya da oval şekillidirler. Sert hücre duvarları kitin ve selüloz içerir. Tek ya da çok hücreli olup genellikle birden fazla nükleusları bulunur. Tomurcuklanarak ürerler ve çekirdekleri mayozla bölünür. Morfolojileri maya veya küf formundadır (13).

Berlin'de 1987'de 14. Ulusal Botanik Kongresi'nde, Dixon ve Fromling tarafından yapılan mantar sınıflamasına göre *Candida* türleri, *Deuteromyces* sınıfı içindeki üç takımdan birisi olan *Cryptococcales* takımında yer almıştır. Bu takımda

*Candida* ile birlikte *Cryptococcus*, *Trichosporum* ve *Pityrosporum* cinsleri de bulunmaktadır (13).

*Candida* türleri ince duvarlı, oval, kapsülsüz, hareketsiz, Gram-pozitif, 1-3 x 4-6 µm boyutlarında, lateral tomurcuklanma (blastospor) ile aseksüel olarak üreyen fakültatif anaerob mayalardır. Maya formu dışında, kültür ve dokularda yalancı hif veya gerçek hif oluşturabilirler. Yalancı hifler tomurcuklanma sırasında meydana gelen uzantının ana hücreden ayrılmaması sonucu gelişir. Yeni hücre ana hücreye bağlı kalarak uzar ve filamentöz bir yapı oluşturur. Gerçek hifler ise maya hücrelerinden veya hifin bir dalından oluşabilir; boğumlanma göstermez, apikal uzantı tarzında, bölmeli ve düzgün kenarlıdır (13, 14). Türlerin çoğu yalancı hif oluşturur. *Candida albicans* ve çok seyrek izole edilen *Candida dubliniensis* ve *Candida norvegensis* türleri gerçek hif oluşturma özelliğine sahiptir (14, 15).

*Candida* türleri çevresel saprofit olarak bulunan 150'den fazla türü mevcuttur. Bunların %65'inden fazlası 37°C'de üreyememektedir. Bu nedenle *Candida*'ların çok az bir kısmı insanlarda kommensal olarak bulunup enfeksiyona neden olmaktadır. *Candida albicans* en sık soyutlanan tür olmakla birlikte *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida kefyr*, *Candida dubliniensis* sıklıkla saptanan türlerdir. Nadiren soyutlananlar ise *Candida famata*, *Candida utilis*, *Candida inconspicua*, *Candida lipolytica*, *Candida rugosa*, *Candida viswanathi*, *Candida haemulonii*, *Candida norvegensis*, *Candida catenulata*, *Candida intermedia*, *Candida lambica* ve *Candida zeylanoides*'tir (14).

*Candida* türleri Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) ve kanlı agarda, oda ısısında (22-26°C'de) ve 37°C'de kolayca üreyebilirler. Kültür için alınan örnekler hem 26°C'de hem de 37°C'de ayrı ayrı inkübe edildiğinde 37°C'de ürememe saprofitliği ortaya koyan bir özelliktir. Patojen *Candida* türlerinin çoğu hem 26 °C hem de 37°C'de ürerler. Ürettikleri ortamda neme ihtiyaç duyarlar (%30-40). Üreyebilmeleri için en iyi pH 4.5-5 arasında olmakla birlikte pH 3-7.5 aralığında da üreyebilirler. Oda ısısında ve SDA besiyerinde 24-48 saatte krem renkli, opak, düzgün yüzeyli, 1-2 mm çapta, tipik maya kokusu olan, S tipi koloniler oluştururlar. *Candida* kolonileri, S formundan R formuna kendiliğinden dönüşebilir. R tipi kolonilerin oluşumu daha çok miçellerin miktarının artması ile ilgilidir. *C. albicans*



bazen ilk izolasyonda SDA'da buruşuk koloniler oluşturabilir. Bunlar alt kültürlerde S tipi kolonilere dönüşebilmektedir. *C. albicans* kanlı agarda kenarlarında yıldızsı uzantıları olan koloniler oluşturur (12, 13).

Ökaryotik yapıda olan *Candida* türleri; hücre duvarı, sitoplazmik membran, sitoplazma, mitokondri, 80S yapısında ribozom, endoplazmik retikulum, golgi cisimciği ve membran ile çevrili nükleustan oluşur. Bu yapının önemli bir bileşeni olan çok katlı hücre duvarı, değişen ozmotik basınca karşı hücrenin şeklini korumasını sağlayan konak hücreleriyle ilişkide bulunan dinamik bir yapı olup; hücre kuru ağırlığının %30'unu oluşturmaktadır. *Candida* türlerinin hücre duvarı, karbonhidratlar (%80-90), proteinler (%5-15) ve lipidler (%2-5)' den oluşur. Karbonhidratların %20-35' ini mannopteinler, %50-65' ini  $\beta$  glukan ve %0.6-10' unu kitin oluşturur. En dışta konak hücreye adezyonu sağlayan protein tabakası bulunur. Bu tabaka N-asetil glukozaminidaz ve asit fosfataz gibi enzimler içerir. Mannopteinlerdeki farklılıklar *Candida* türlerinin ayrılmasında kullanılır. Ancak, aralarında çapraz reaksiyon görülebilmektedir. Hücre membranı, hücrenin çevreyle kimyasal madde değişimini sağlar. *Candida* türlerinin hücre duvarında bulunan lipidler sterol esterleri (zimosterol), serbest sterol (ergosterol), trigliseritler ve fosfolipitlerden oluşmaktadır (15, 16). Hücre yapısındaki mitokondrileri diğer ökaryot hücrelere benzemekle birlikte hücre başına düşen mitokondri miktarı respiratuvar aktiviteye bağlı olarak değişmektedir. *Candida* türlerinin sitoplazmasında, içerisinde hidrolitik enzimlerin, iyonların ve metabolitlerin bulunduğu vakuoller yer alır (15).

### **Epidemiyoloji**

*Candida* türlerinden biri olan *C. albicans* insanda ağız, boğaz, gastrointestinal sistem gibi mukoza normal florasında bulunmakla birlikte patojen olarak tüm vücut bölgelerinden izole edilebilmektedir. *C. albicans* doğada memelilerden başka bitkilerde, toprak ve suda da bulunabilirler. Diğer türlerden *C. parapsilosis* insan derisinin normal florasında, memelilerde, ayrıca zeytin, çay, bira, salatalık, meyve suları ve su gibi insan dışı çeşitli kaynaklarda; *C. tropicalis*, memelilerde, su, meyve, ekmek mayası, organik maddelerce zengin topraklarda; *C. glabrata* su ve toprakta; *C. guilliermondii* ve *C. krusei* bitkiler, su ve toprakta bulunabilmektedir (17).

*Candida* türlerinin bazıları insan vücudunun belirli bölgelerinde yerleşme eğilimi gösterirler; Örneğin *C. parapsilosis*'in deri ve dış kulakta; *C. tropicalis*'in ağız çevresi, tırnak, bağırsak, deri ve dış kulakta; *C. glabrata*'nın ağız ve bağırsakta; *C. guilliermondii*'nin deride daha sık izole edildiği bildirilmiştir (18).

Nozokomiyal mantar enfeksiyonları sıralamasında fungemiler ikinci sırada yer almaktadır (19). İtalya'da yapılan bir çalışmada, kandidemili olgulardan %40 oranında *C. albicans*, %23 oranında *C. parapsilosis*, %8 oranında *C. tropicalis*, %15 oranında *C. glabrata*, %13 oranında diğer türler izole edilmiştir (20).

Son yıllarda kandidemi için risk faktörleri sıklıkla araştırılmıştır. Bazı araştırmacılar yüksek oranda santral venöz kateter (SVK) kullanımını risk faktörü olarak bildirirken, bazıları ise çok yönlü analizler ile yaş ve yoğun bakım ünitesinde kalış süresini önemli risk faktörleri olarak saptamıştır (21, 22). Tayvan'da yapılan başka bir çalışmada, kandidemi olgularında altta yatan hastalıklar arasında en sık kanser ve diyabetes mellitus saptanmış, risk faktörleri geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, SVK kullanımı ve *Candida* kolonizasyonu olarak belirlenmiştir (23). Amerika, Avrupa, Kanada ve Latin Amerika'da 1997-1999 yılları arasında, 71 tıp merkezi kapsamında yapılan çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin %55'ini *C. albicans*, %15'ini *C. parapsilosis*, %25'ini *C. glabrata*, %9'unu *C. tropicalis*, %6'sını diğer *Candida* türlerinin oluşturduğu bildirilmiştir (24). Avrupa'da yapılan diğer bir çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türleri %53 *C. albicans*, %21 *C. parapsilosis*, %12 *C. glabrata*, %6 *C. tropicalis*, %2 *C. famata*, %1 *C. krusei* ve %1 *C. inconspicua* olarak saptanmıştır (25).

### **Klinik Önemi**

*Candida* türleri hafif yüzeysel enfeksiyondan, ağır sistemik enfeksiyona kadar çeşitli klinik tablolara yol açarlar. Normal flora içeren bölgelerde fizyolojik koşulların değişmesi, hormonal dengenin bozulması, immun sistemi baskılayan ilaçların kullanılması, kanser veya AIDS gibi immun yetmezliğe yol açan hastalıklar *Candida* enfeksiyonlarının ortaya çıkışını kolaylaştırmaktadırlar (26, 27).

Cilt florasında özellikle nemli kat yerlerinde daha çok *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* ve daha az sıklıkta *C. tropicalis* ve *C. krusei*'ye ve ender olarak *C.*

*albicans*'a rastlanır. Sıkı giyinmek ve lokal antibiyotik kullanımı kolonizasyonu artırır (26, 27).

Gastrointestinal sistem florasındaki *Candida* türleri üzerine diyet, bakteri florası ve laktik asitin denetleyici etkisi vardır. Sağlıklı kişilerde ağızda %30, jejunum ve ileumda %55 ve gaitada %65 oranında kolonizasyona rastlanır (28). Ağız florasında %75 *C. albicans*, %8 *C. tropicalis*, %6 *C. krusei* ve %2-6 *C. glabrata* görülür. Bozulmuş ağız hijyeni, diş protezi uygulanması, sigara içilmesi gibi durumlarda ve diabetiklerde sayılarında artış görülür. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin uzun süre kullanılması da gastrointestinal kolonizasyonu arttırmaktadır. Anorektal ve dışkı florasında *Candida* türlerinin %50'si *C. albicans*, %20'si ise *C. tropicalis* ve *C. glabrata*'dır. (26-28).

Sağlıklı kadınların %5-30'unda vajinal flora üyesi olarak *Candida* türlerine rastlanır, fakat gebelik ve oral kontraseptif kullanımı gibi faktörler ile bu oran değişir (26). Vajinitlerin üçte birinde etken olup, erişkin kadınların %75'inin yaşamları boyunca en az bir kere vajinal *Candida* enfeksiyonu geçirdiği bilinmektedir (29).

AIDS hastalarında *Candida* enfeksiyonları morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir. Prototipik belirtisi mukokutanöz kandidiazistir. Bu grupta, *Candida* türlerine bağlı %41.8 oranında orofarınjit ve %9.4 özefajit görülmektedir. Ayrıca *Candida* vajiniti de önemli bir problemdir. İnvaziv veya hematogen dissemine kandidiazis nadir olmakla birlikte nötrojeni ve/veya intravenöz kateter varlığında ortaya çıkabilir (1). İmmün yetmezliği olanlarda topikal mikozların kullanımı sonucunda genellikle hematogen enfeksiyonlar gelişmektedir. Nozokomiyal sepsis olgularında hematogen kandidoz sıklığı yaklaşık %6-15'dir (30, 31). Risk faktörlerinin 1980'li yıllarda değişmesiyle hematogen kandidoz sıklığı belirgin olarak artmıştır. Yetişkinlerde *C. albicans* damar içi ya da peritoneal kateterle, *C. tropicalis* bunlara ek olarak genitoüriner sistem kaynaklı enfeksiyonla, *C. parapsilosis* ise hiperalimentasyon sıvıları ve damar içi basınç monitörleriyle salgınlara neden olmaktadır (32).

### **Patogenez ve Virülans Faktörleri**

Floradaki mantarlar genellikle önce sayıları artarak kolonizasyon ve daha sonra buna bağlı olarak enfeksiyon meydana getirirler. Yüzeysel mikozlarda, deri

veya mukozanın bütünlüğünün bozulduğu yerlerden yalancı hifleri ile doku içine giren *Candida* tomurcuklanarak oluşturduğu blastokonidyumlarıyla dokuya yayılır. Derin veya sistemik mikozlarda ise genellikle önce gastrointestinal sistem kolonizasyonu meydana gelir, sonra mukozayı geçerek kana ulaşır. Fagositik etkinlik yetersizse hemen hemen her organ ve sisteme yerleşebilir (33).

Dermis ya da kan dolaşımına geçen *Candida* türlerine karşı polimorfonükleer lökositler savunmaya katılırlar. Monosit ve eozinofiller fagositozda rol alırlar. Ayrıca doku makrofajları ve retikuloendotelyal hücreler de *Candida* türlerini öldürebilirler (27). Fagositlerin *Candida* türlerini öldürmelerindeki başlıca mekanizmalar; myeloperoksidaz, hidrojen peroksit ve süperoksit anyon sistemleri olup kimotripsin benzeri katyonik proteinler üretilip membran geçirgenliğini artırarak da etki ederler. Isıya duyarlı ve dirençli opsoninler de *Candida* türlerinin fagositozunu kolaylaştırırlar (27, 34).

Floradaki bakteriler, besin maddelerini hızla tüketip toksik maddeler üreterek *Candida* türlerinin çoğalmasını engellerler (26). *Candida* türlerine karşı humoral ve hücrel bağışıklık gelişir, fakat hücrel bağışıklığın rolü daha fazladır. Yüzeysel deri enfeksiyonlarında hücrel bağışıklığın, sistemik enfeksiyonlarda ise doğal direncin yanında humoral bağışıklığın öne çıktığı söylenebilir (27, 35).

*Candida* enfeksiyonlarının patogenezindeki majör virulans faktörleri konak epitel ve endotel hücrelerine adezyon, germ tüp oluşumu ve proteinaz üretimidir. Ayrıca fosfolipaz sekresyonu, toksin üretimi, fenotip değişimi, hücre duvarı ve yüzey değişimi, hidrofobisite gibi faktörler de virulans ve patogeneizde rol almaktadır (1, 9).

#### ***Adezyon (konak hücre yüzeyine tutunma)***

Hücre duvarı, mannan ve protein komponentleri ile epitele yapışma invazyonda önemlidir (36). Diğer yüzey karbonhidrat yapıları olan beta glukoz ve kitine karşılık; konakta bunların bağlanabileceği fukoz, N-asetilglukozamin ve siyalik asit bulunur (5). *C. albicans* aderansı en fazla olan türdür (7). Karbon kaynağı olarak yüksek konsantrasyonda şeker (özellikle galaktoz) içeren ortamda üreyen *C. albicans* kökenlerinin epitelyuma daha iyi bağlandığı ve daha virulan olduğu gösterilmiştir (37).

### ***Hücre duvarı, yüzey değişimi ve hidrofobisite***

Maya hücre duvarının virülanstaki en önemli rolü, adezyon basamağında olmaktadır (10). Yapılan moleküler çalışmalarda, epitelyum ve endotele bağlanmada rol alan ligandın *C. albicans*'ın yüzeyindeki hücre duvarı moleküllerinden mannoprotein olduğu anlaşılmıştır (38). Antijen olarak konağa sunulan mannoprotein immunomodülatör etkilidir. *C. albicans*'ın germ tüp oluşumu döneminde hücre yüzey hidrofobisitesi değişir, plastik yüzeylere ve epitelyuma bağlanma yeteneği artar (9). *C. albicans* yüzey özelliklerine göre iki gruba ayrılır. Birinci grup, yüksek şeker konsantrasyonu ile yüzey kompozisyonunu değiştirebilir ve karbonhidrattan zengin diyetle beslenenlerde oral kandidoz gelişmesi bu şekilde açıklanabilir. İkinci grup, yüzeyini değiştirme özelliğini kaybetmiştir ve patojenik potansiyelleri çok düşüktür (34).

### ***Germ tüp - hif oluşumu (dimorfizm)***

*Candida* türlerinde aktif semptomatik enfeksiyon, hif şekilleri ile ilişkilidir (39). Miselyum (küf) üreterek çoğalabildiği bilinen tek tür *C. albicans*'tır (39). Hifler uzarken ortamdaki topoğrafik değişikliklere göre yön değiştirebilmektedir. Tigmotropizm adı verilen bu olay, in vitro koşullarda *C. albicans*'ın yapay membranlarda üremesi sırasında gözlenmiştir. Membranda minör bir açıklık veya por oluştuğunda hif, uzadığı yönü değiştirerek bu porlara yönelmektedir. Tigmotropizmin, hifin lokal yaralara invazyonunda rol alan bir faktör olabileceği düşünülmektedir (40). Hif şeklinin maya şekline göre dokuya elli kez daha fazla yapışması ve plastik yüzeylere tutunmayı sağlayan fibriler bir tabaka oluşturması *Candida* türlerinin patogeneze ve virülanstaki rolünü göstermektedir. Tomurcuklu hücreden germ tüpe geçişte hücre yüzey bileşiminde değişiklikler meydana gelir ve çeşitli adezinler oluşur (1, 39). Nötrofiller *C. albicans* blastosporlarını germ tüp ve uzun hiflere göre daha iyi fagosite eder (5). Bazı araştırmacılar, enfeksiyon geliştirebilme açısından iki şeklin de patojenite de önemli olduğunu vurgulamışlardır. Dimorfizmin biyofilm oluşumundaki önemini incelemek için yapılan bir çalışmada, maya formunun (iç tabaka) yüzeye yapışmada önemli olduğu, hif formunun (dış tabaka) da kalınlık sağladığı bildirilmiştir (7).

### ***Toksinler***

*C. albicans* maya fazında, hemolizin ve endotoksin benzeri maddeler üretir. Glikoprotein yapıdaki toksinler ve kandidoksin yüksek molekül ağırlıklıdır. Glikoprotein yapıdaki toksinler; glikoz, mannoz gibi karbonhidratlar ve protein içerir. Iwata ve arkadaşları tarafından virulan bir *C. albicans* kökeninden izole edilen kandidoksinin hücre öldürücü ve enfeksiyon arttırıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca kandidoksin üreten bir *C. albicans* kökeninde düşük molekül ağırlıklı toksinler saptanmış bunların da altı çeşidinin olduğu gösterilmiştir (10).

### ***Fenotipik değişim***

*C. albicans* suşlarından bazıları fenotipik değişimle özgül sentetik besiyerinde farklı görünümde koloniler meydana getirirler. Yapılan bir çalışmada invaziv enfeksiyona sebep olanların, kommensal kökenlere göre daha sık fenotipik değişiklik yaptığı ve invazyon için optimal fenotipi seçtiği sonucuna varılmıştır (42).

### ***Slime faktör ve biyofilm oluşturma***

Slime faktör ilk kez 1982'de Christensen tarafından tanımlanmıştır (43). *Candida* türleri tarafından da oluşturulan slime; visköz, ekstrasellüler bir madde olup, mikroorganizmanın plastik yüzeylere yapışması ve prostetik materyallere kolonizasyonunda görevlidir (44). Tıbbi gereçlerin implantasyonunu takiben öncelikle; tükürük, mukus, serum veya kan gibi vücut sıvılarındaki çeşitli makromoleküller (fibrinojen, fibronektin, kollajen ve laminin gibi) yüzey üzerinde birikerek hazırlayıcı bir film tabaka oluştururlar. Mikroorganizmalar genellikle bu film tabakasına tutunurlar. İlk adezyon geri dönüşümlü ve gevşek olup ekzopolimer üretimi ile sıkı bir tutunmaya dönüşür. Ekzopolimerler, makromoleküllerin oluşturduğu katmanı saran slime (glikokaliks) tabakasını oluşturur. Slime tabakası içinde çoğalan mikroorganizmalar ekstrasellüler matriks salgılamaya devam ederek kalın bir biyofilm tabakasına yol açarlar (41). Olgun biyofilmin yaklaşık %15'i hücrelerden ve %85'i matriks materyalinden oluşur (46). Matriks yapısında; karbonhidrat, protein, heksozamin, fosfor ve uronik asit bulunur ve oranları türe göre değişir (47). Nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında *Candida* türlerinin sıklığı artmaktadır ve çoğunlukla bu enfeksiyonlardan, implante gereçler sorumlu olup

gerecin yüzeyinde biyofilm saptanmaktadır (45). Farklı *Candida* türlerinin, hatta farklı *C. albicans* suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri de farklıdır. Ortamdaki artmış glukoz miktarı biyofilm oluşumunu hızlandırmaktadır. Hafif akımın olduğu ortamlarda (dolaşım ve üriner sistem gibi) statik ortamlara göre biyofilm oluşumu daha fazladır. Yüzeyin kimyasal yapısı da biyofilm oluşum hızını etkilemektedir ve polivinilklorüre oranla lateks yüzeylerde daha fazla görülürken, poliüretan ve %100 silikonda ise azalmış olarak saptanmıştır (45). Biyofilm, mikroorganizmanın implante gereçlere yapışıp çoğalarak, sürekli bir enfeksiyon kaynağı olmasına sebep olur. Biyofilm tabakasının mikroorganizmayı opsonizasyon, fagositoz ve kemotaksis gibi vücudun savunma mekanizmalarından koruduğu bildirilmiştir (48). En önemli özelliklerinden biri de antifungal ajanlara direnç gelişimine sebep olmasıdır (45).

### ***Agglutinin Like Sequence (ALS) Ailesi Proteinleri***

*C. albicans* gen ailesi içinde enzimatik aktivitesi olmayan tek gen ailesi ALS ailesidir. İmmunohistokimyasal boyamalar ALS proteinlerinin *C. albicans*'ın hücre duvarında lokalize olduğunu göstermiştir. ALS genleri ilk olarak *C. albicans*'da tanımlanmıştır ve bu gen ailesinde 9 gen olduğu gösterilmiştir; fakat ALS3 ve ALS8'in aynı gen olduğu daha sonra yapılan çalışmalarda gösterildiğinden ALS8 bu gen ailesinden çıkarılmıştır. ALS1,ALS2,ALS4,ALS5 ve ALS9 kromozom 6'da bulunurken; ALS6 ve ALS7 kromozom 3'de, ALS3 kromozom R'de bulunur (49).

*C. albicans*'da hem ALS1p hem de ALS5p (ALA1p) proteinlerinin adezin işlevinin olduğu gösterilmiştir. Bu genler tarafından kodlanan proteinlerin ikisi, ALS5p ve ALS1p, *Saccharomyces cerevisiae*'nın insan hücrelerine ve ekstrasellüler matriks komponentlerine adezyonuna aracı olabilmektedir. ALS5p, ekstrasellüler matriks proteinleriyle kaplanmış substratlara ve insanda bukkal epitelyum hücrelerine ve hücrelerin biraraya toplanmasında adezyonun başlangıcına yardımcı olur (50).

ALS1, adezyon için önemli olduğu kadar hif gelişimi için de önemlidir. İn vitro ALS1 ekspresyonu kültür ortamının içeriği tarafından düzenlenir ve ALS3 hif spesifiktir. Ancak Zaho ve ark. (50) ALS1/ALS1 ve ALS3/ALS3 mutant suşların doğrudan karşılaştırdıkları çalışmalarında ALS3p'nin daha güçlü bir adezin olduğu sonucuna varmışlardır.

*ALS* genleri içerisinde *ALS6* ve *ALS7* aile içindeki diğer genlerle benzerliği en az olanlardır, bunlardan da *ALS7* en az benzeyendir. *ALS1* benzeri tekrarlayan dizileri kodlayan genler ise *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* ve *ALS4*'dür (51).

### **Salgısal Asit Proteinaz Enzimi (SAP)**

Salgısal Asit Proteinaz (*SAP*) üretimi ilk kez Staib tarafından 1965 yılında *C. albicans* kökenlerinde saptanmıştır. Kromotografik yöntemlerle saflaştırılan enzim çok sayıda aspartik asit rezidüleri içerdiği için 1993 yılında American Society for Microbiology tarafından salgısal aspartik proteinaz adı ile kabul edilmiştir (52). Ayrıca pepstatin A ile inhibe olduğu için karboksil proteinaz, asit pH'da (pH:2,4-4) aktivasyon göstermeleri nedeniyle asit proteinaz adı ile de anılmaktadır (52, 53). *C. albicans*'ın yanı sıra *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. rugosa*, *C. lusitaniae*, *C. lipolytica* gibi diğer bazı *Candida* türlerinin amonyum içermeyen, azot kaynağı olarak sadece protein içeren besiyerlerinde üretildiklerinde proteinaz enzimi salgıladıklarını saptanmıştır (54).

*C. albicans* suşlarında, 1991 yılından itibaren *SAP* ailesini kodlayan birçok gen tanımlanmıştır (55, 56). *SAP* enziminin; molekül ağırlıkları 42-49 kDa arasında değişen, primer dizilimleri, izoelektrik noktaları ve biyokimyasal özellikleri farklı izoenzimlere sahip olduğu anlaşılmıştır (9). Salgısal asit proteinaz enzimi glikoprotein yapısında olup, amino (N) ucunda triptofan, karboksil (C) ucunda lösin bulunan ve çok miktarda aspartik asit rezidüleri içeren bir polipeptid zincirine sahiptir (57).

Günümüzde, *C. albicans* türünde 10 farklı *SAP* geni (*SAP1-10*) saptanmıştır. Diğer *Candida* türlerinde de homolog genler tanımlanmıştır (53, 58, 59). *C. dubliniensis*'de 7 *SAP* geni tanımlanmış ve bu genlerin *C. albicans*'la yakın gen benzerliği bulunduğu belirlenmiştir. *C. dubliniensis*'in sebep olduğu mukozal enfeksiyonlarda *SAP*'ın önemli olduğu bildirilmiştir (60). *C. tropicalis* türünde ise 4 farklı *SAP* geni (*SAP1-4*) tanımlanmıştır ve *SaptIp* enzimi in vitro olarak en çok üretilen enzimdir, diğer enzimler ise sadece *Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* ile saptanabilmiş ve çok düşük miktarda bulunmuştur (58). *C. parapsilosis* tarafından da salgılanan iki aspartil proteinaz izole edilmiştir (58, 61).



*SAP* geninin maya-hif dimorfizmi ve fenotipik değişim ile ilgili olduğu ortaya konulmuştur. Örneğin; *SAP1*, *SAP2*, *SAP3* izoformları sadece maya formunda, *SAP4*, *SAP5*, *SAP6*'nın nötral pH'da hifal formda, *SAP9*, *SAP10*'nun her iki formda bağımsız bulunduğu; *SAP1*'in *C. albicans*'ın opak fenotipinde, *SAP2* ve 3'ün ise hem opak hem de beyaz fenotipte üretildiği belirtilmiştir (6). *SAP* genleri ile ilgili çalışmalarında en çok *SAP2* geni üzerinde durulmuştur. İnsan epidermis modelinde *SAP1* ve 2'nin üretiminin invazyonda, *SAP8*'in penetrasyonda, *SAP6*'nın hifal uzamada gerekli olduğu saptanmıştır (53).

Aspartik proteinaz in-vitro pepstatin A ile inhibe edilmektedir. Bununla birlikte, *C. albicans* türünde HIV-1 proteazı peptidomimetiklerin de *SAP* üretimi ve *SAP* genlerinin indüklenmesinde kayba yol açtığı gösterilmiştir (62).

Yapılan deneyler salgısal proteinazın hücre içinde biriktirilmediğini, sentezlendikten hemen sonra salındığını göstermiştir. Enzim sekresyonu, besiyeri azot kaynağı olarak sadece protein içerdiğinde yüksek; amino asit veya amonyum tuzları içerdiğinde ise düşüktür (57).

*SAP* genlerinin ekspresyonu sıcaklıkla da ilişkili bulunmuştur. *SAP7* ekspresyonuna laboratuvar standartlarında rastlanmazken, *SAP8* 25°C'de, *SAP2* ürünleri 30-37°C'de tanımlayıcı besiyerinde saptanmıştır. Enzimin 45°C'de denatüre olduğu görülmüştür (60, 63).

Salgısal asit proteinazın geniş bir substrat özgüllüğüne sahip olduğu gösterilmiştir. *Candida* proteinazı, keratin, albumin, hemoglobin, kazein ve kollajeni parçalama yeteneğindedir. *Candida* proteinazlarının insan IgG1, IgA1, IgA2 ve mukoz membranların major Ig'i olan salgısal IgA'yı parçalama yeteneğinde olduğu ve bu parçalanmanın genellikle ağır zincirde olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra muhtemel hedefler arasında  $\alpha 2$  makroglobulin, koagülasyon faktör X ve anjiotensinojen de yer almaktadır (53, 60).

### ***SAP Enziminin Virülanstaki Rolü***

*SAP* aktivitesinin asidik pH ile sınırlanması, bu enzimin virülanstaki rolünde kuşku yaratmıştır. Vajina ortamı *SAP*'in indüklenmesi ve ekspresyonu için çok uygundur. Enzim izoformlarının nötral pH'da da aktif olması lokal asidik ortamın gerekliliği fikrini ortadan kaldırmıştır (6, 9).

Salgısal asit proteinazın virülans faktör olarak değerlendirildiği çalışmalar genellikle *C. albicans* kökenleri kullanılarak yapılmış ve yapılan çeşitli çalışmalarda proteinaz enzimi üretmeyen kökenlerin üretenlere oranla virülanslarının düşük olduğu, zayıf patojen oldukları ya da patojen olmadıkları gösterilmiştir (64).

Bununla birlikte, yapılan birçok çalışma *C. albicans* kökenlerinin proteinaz aktivitesiyle, deneysel sistemik hayvan enfeksiyonlarında öldürücü etkisi arasındaki bağlantıyı açıklamayı amaçlamıştır. Genetik açıdan akraba olmayan *C. albicans* kökenlerini kullanarak yapılan bir çalışmada, proteolitik olan ve proteolitik olmayan kökenlerin farelerdeki öldürücü etkileri arasındaki fark incelenmiş ve proteolitik olan kökenlerin diğerlerine oranla daha öldürücü olduğu gösterilmiştir (65). Yapılan başka bir çalışmada, proteinaz üreten *C. albicans* C9 kökeninin enjekte edildiği farelerin 21 güne kadar %100'ünün öldüğü, bununla beraber nitroz asit ile mutant hale dönüştürülen proteinaz üretmeyen C9M1 kökeni ile enjekte edilen farelerde 22 güne kadar ölüm olmadığı, 23-30. günler arasında 1 farenin öldüğünü saptanmıştır (66). Başka bir çalışmada, *C. tropicalis Sapt1p* geninin de fare ölüm oranında bir rolü olduğu gösterilmiştir (58).

Edison ve ark (67), düşük seviyede ekstrasellüler proteinaz üreten MY1049 kökeni ile wild tip MY1044'ü karşılaştırmış, MY1049 kökeninin kültür ortamında daha yavaş ürediğini ve toplam proteinaz aktivitesinin daha düşük olduğunu göstermişlerdir. İnhibitörlerin her iki kökene etkileri arasında ise önemli bir farklılık bulunmamıştır.

*Candida albicans* türlerinde, proteinaz üretimi ile konak dokuya adhere olabilmeye yeteneği arasındaki korelasyon birçok çalışmada gösterilmiştir. Örneğin; Ghannoum ve Elteen (68) yaptıkları bir çalışmada, yüksek proteolitik aktivite gösteren *C. albicans* kökenlerinin insan yanak epitel hücrelerine kolayca adhere olabildiklerini, *C. albicans* kökenleri ile yaptıkları diğer bir çalışmalarında ise; yüksek proteolitik aktivite gösteren kökenlerin yüksek adherans değerlerine sahip olduğunu göstermişlerdir.

*Candida* enfeksiyonu boyunca, hastaların serumlarında *Anti-SAP* antikorları yüksek titrelere saptanmaktadır. Ayrıca vajinitli farelerde ve kandidiyazlı murin modellerinde, *Anti-SAP* antikorlarının koruyucu etkisi gösterilmiştir. *SAP1-6*'ya karşı spesifik antikorlar ile yapılan bir çalışmada, enfeksiyonun devam ettiği sürece *SAP*

enzimi pozitif saptanmıştır. Sistemik *C. albicans* enfeksiyonu sebebiyle ölmüş immünkompromize hastaların organlarında da *SAP* antijeninin varlığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, insan ve deney hayvanlarındaki sistemik *Candida* enfeksiyonlarına bağlı lezyonlarda immünohistokimyasal yöntemlerle *SAP* antijeni saptanmıştır (64).

Çeşitli klinik ve deneysel bulgular, proteinaz enziminin *Candida* vajinitinin patogeneğinde önemli bir virülans faktörü olduğunu desteklemektedir. Kılınç ve ark (69) yaptıkları bir çalışmada, vulvovajinal kandidozlu hastaların tümünde florometrik yöntem ile proteinaz aktivitesi saptamışlardır. *SAP-2* izoenziminin vajinitlerde önemli rol oynadığı açıkça gösterilmiştir. Yapılan birçok çalışmada, aktif vajinitli hastalardan izole edilen *C. albicans* kökenlerinin aspartil proteinaz aktivitesi taşıyıcılardan daha yüksek bulunmuştur (70, 71).

Deri ve kandan izole edilen *C. parapsilosis* kökenlerinin virülansının karşılaştırıldığı bir çalışmada, kutanöz izolatların hepsinin kan izolatlarının ise bir kısmının salgısal aspartil proteinaz aktivitesi gösterdiği, aynı zamanda deri izolatlarının enzim aktivitesinin kan izolatlarından 4 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada deri izolatlarının fare vajinit modelinde kan izolatlarına oranla daha yüksek vajinopatik olduğu gösterilmiştir (72).

Yapılan çalışmalar çoğunlukla *C.albicans*'a yönelik olmakla birlikte, *C. albicans* dışı *Candida* türlerinin de artışına paralel olarak *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* ve *C. tropicalis* türlerini içeren araştırmalar yapılmış ve patojenik *Candida* türlerinin *SAP* geni taşıdığı ve hücre dışı proteinaz ürettiği belirlenmiştir. *C. kefir*, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. guilliermondii* ise nadiren *SAP* enzimi üretmektedir. *Candida* *SAP* enzimleri ile yapılan geniş kapsamlı genom çalışmalarında bu enzimin *Candida* virülansındaki önemli rolünün detaylı bir şekilde değerlendirilmesine imkan sağlayacağı belirtilmiştir (58).

### **Laboratuvar Tanısı**

*Candida* türlerinin tanısında ilk basamak klinik örneklerden hazırlanan direkt preparatların incelenmesidir. Direkt incelemede boyasız hazırlanan nativ preparat yanında Potasyum Hidroksit (KOH), Gram, Metilen Mavisi, Wright, Giemsa, Kalkoflor Beyazı, Periyodik Asit-Schiff (PAS) ve Methenamin Gümüş Boyası ile

hazırlanan preparatlar incelenebilir. *Candida* türleri dokuda en iyi PAS ve Methenamin Gümüş Boyası ile gösterilebilmektedir (15, 73 , 74).

Hazırlanan direkt preparatlarda tomurcuklanan maya hücreleri, yalancı ve gerçek hiflerin görülmesi enfeksiyon belirteci olarak değerlendirilir (15, 33).

*Candida* türlerinin geleneksel tanımlanması morfolojik ve biyokimyasal özellikleri temel alınarak yapılır. Bu temel morfolojik ve biyokimyasal özellikler:

1. Kolonilerin ilk üretilme besiyerindeki görünümü ve rengi
2. Hücrelerin büyüklüğü ve şekli
3. Hif ve/veya yalancı hif oluşumu
4. Germ tüp oluşturma yeteneği
5. Klamidospor oluşturma yeteneği
6. Karbonhidrat kullanımı
7. Nitrat kullanımı
8. Şeker fermentasyonudur (73).

Klinik örneklerden primer izolasyon için en sık kullanılan besiyeri Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)'dır. Primer izolasyon besiyerlerinin bileşimine bakteri ve hızlı üreyen küfleri baskılayarak seçicilik sağlamak için çeşitli antimikrobikler (sikloheksimid, gentamisin, kloramfenikol vb.) eklenebilir. Uygun besiyerine ekim sonrası plaklar 26°C'de ve 37°C'de inkübe edilirler. Patojen *Candida* türlerinin çoğu 26°C ve 37°C'de birkaç günde ürerken 37°C'de ürememe saprofitliği ortaya koyan bir özelliktir. Genellikle 24 saatte oluşan koloniler 48 saatte daha da belirginleşir; SDA'da beyaz-krem renkli, düzgün yüzeyli, 1-2 mm çapında, karakteristik maya kokusu olan koloniler gözlenir. *C. albicans* koyun kanlı agarda yıldız şeklinde saçaklı kenarları olan koloniler oluşturur (13).

Kültürde üreyen maya kolonilerini tanımlamada ilk yöntem germ tüp testidir. Hızlı sonuç veren, uygulaması kolay ve ucuz olan bu test *C. albicans*'ın diğer *Candida* türlerinden ayrımını sağlayan basit ama çok değerli bir testtir. Germ tüp yapımı için insan, koyun veya dana serumunda 35-37°C'de üç saatlik inkübasyon gereklidir. Germ tüp, blastospordan orjin alan, başlangıç noktasında daralma olmayan ve uzunluğu boyunca hiç kabarıklık yapmayan paralel uzantılar olarak gözlenir. *C. tropicalis*'de hif başlangıçları yapabilir fakat blastokonidyalı daha geniştir ve ana hücreden çıkış noktasında darlık bulunmaktadır. Germ tüp testi,

antifungal tedavi alan ve immun yetmezlikli hastalarda %5 oranında yanlış negatif sonuç vermektedir. *C. albicans* dışında *C. stellatoidea* ve *C. dubliniensis*'de de germ tüp pozitifdir (13, 15, 75).

Mısırunu-tween 80 agar gibi besince fakir ortamlarda maya hücreleri iyi yedek besin depolayan klamidosporeler oluşturur. Bunlar oluşurken hif veya yalancı hifin bir yerinde sitoplazma yoğunlaşır, şişer ve duvarı kalınlaşır. Hiflerin içinde, kenarında veya ucunda gelişebilen, büyük, yuvarlak ve kalın duvarlı bu yapılar, açlığa ve diğer değişik şartlara karşı *Candida* türlerinin canlılığını korumasını sağlarlar (76). Mısırunu-tween 80 agarda mayaların oluşturduğu blastokonidya, gerçek ve yalancı hif, klamidosporelerin yapı ve organizasyonlarına göre tür düzeyinde tanıya gidilmektedir (13). *C. albicans* izolatlarının büyük çoğunluğu (>%90) mısırunu-tween 80 agara ekilip 25°C'de 72 saat inkübe edildikleri zaman yalancı ve gerçek hif ile kümeler halinde yuvarlak blastokonidya oluşturur, hiflerin ucunda da türe özgü karakteristik kalın duvarlı "terminal klamidospore" bulunur. *C. tropicalis*, uzun yalancı hifleri boyunca tek tek veya küçük kümeler yapmış blastokonidyalı oluşturur. *C. glabrata*'da ise küçük oval blastokonidyalı bulunur ancak yalancı hif oluşumu görülmez. *C. krusei*, çapraz kibrit çöpleri şeklinde, ağaç benzeri görünüm veren uzun blastokonidyalı ile yalancı hif oluşturur. *C. parapsilosis*'de kısa yalancı hiflerin çevresinde tek tek veya küçük kümeler yapan blastokonidyalı görülür. Türe özgü özelliği, "dev hücre" denilen iri hiflerin bulunmasıdır (15, 33, 75, 76).

*Candida* türlerini, kromojenik substratlar kullanarak oluşan farklı renk ve morfolojiler ile hızlı ve basit şekilde tanımlamayı sağlayan CHROMagar *Candida*, BIGGY agar, *Candida* ID ve *albicans* ID agar gibi besiyerleri bulunmaktadır (77, 78).

*Candida* türlerinin tanımlanmasında kullanılacak diğer testler karbonhidrat asimilasyon ve fermantasyon testleridir. Asimilasyon, mayaların oksijen varlığında karbon kaynağı olarak spesifik bir karbonhidratı kullanma yeteneklerini ortaya çıkarır. Fermantasyon ise karbonhidratların CO<sub>2</sub> ve etanol üretimiyle sonuçlanan anaerobik kullanımıdır (15, 76). Maya tanımlaması için Wickerham ve Burton'un geliştirdiği klasik asimilasyon ve fermantasyon testleri uzun zaman almaktadır. Daha hızlı sonuç veren "Microscan Yeast Identification

Panel", "Uni-Yeast Tek", "Micro Drop", "Vitek", "API 20 C AUX" gibi hazır ticari sistemler bulunmaktadır. Bunlardan en yaygın kullanılanı karbonhidrat asimilasyon yöntemiyle 48-72 saatte sonuç veren ve geleneksel yöntemlerle %95 benzerlik gösteren "API 20 C AUX" sistemidir (13, 15, 76).

Son yıllarda hasta serumu ve vücut sıvılarında *Candida* türlerine özgül antikor ve antijenler, metabolitleri ve hücre duvarı bileşenlerini saptamaya yönelik testler geliştirilmiştir. Bu testler özel hasta gruplarında kandideminin doğrulanmasında yardımcıdır (15, 73). Kandidoz olgularında antijen ölçümü antikor ölçümüne göre daha yararlıdır (79). Serolojik açıdan antikor tarama testleri kolonizasyon-enfeksiyon ayrımını yapamaması, gözlenen çapraz reaksiyonlar ve özellikle immun yetmezlikli hasta grubunda yeterli antikor yanıtı oluşmaması gibi nedenlerle başarısızdır. Antijen testleri ile mannan, galaktomannan, asit proteaz, enolaz, *C. albicans*'ın ısıya duyarlı antijenleri gibi sitoplazmik antijenler aranmaktadır. Yeterli duyarlılıkta olmayan bu testlerin diğer tanı yöntemleriyle birlikte kullanılması önerilmektedir (33, 74, 78-80).

Çok kısa sürede hayatı tehdit eden klinik tablolara neden olabilen fungal enfeksiyonlarda patojenin en kısa sürede tanımlanıp uygun tedaviye başlanması önemlidir. Daha çok biyokimyasal ve morfolojik fenotipin saptanmasına dayanan tanısal yaklaşımların en önemli dezavantajı deneyimli personel ve zaman gerektirmeleridir. Erken spesifik tanı ve tedavi gereksinimlerine bağlı olarak ön plana çıkan moleküler tanı yöntemleri etyolojik tanıda hız, duyarlılık ve bazı durumlarda da özgüllük artışına neden olmaktadır (81, 82).

Moleküler tanı yöntemleri; klinik örnekte *Candida* varlığının ve türünün saptanmasında, epidemiyolojik tiplendirmede, virulans faktörlerinin belirlenmesinde, antifungal direnç genlerinin araştırılmasında, mutasyon incelemelerinde, sınıflandırma ve filogenetik analizlerde kullanılmaktadır. Bu amaçla hibridizasyon yöntemleri, nükleik asit çoğaltma yöntemleri ve restriksiyon enzim analizi gibi moleküler testler kullanılabilir (83).

Yapılan ilk moleküler tanımlama çalışmaları olan ribozomal DNA tekrar bölgesinin Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analizi ile *Candida* türlerinin farklı büyüklükte bantlar oluşturduğu gösterilmiştir. İşaretlenmiş DNA problemlerinin kullanıldığı Southern Blot yöntemi ile RFLP'nin duyarlılığı artırılmıştır.

1990'ların başından itibaren Polymerase Chain Reaction (PCR) tekniği ile çok az miktardaki DNA çoğaltılıp agaroz jelde görünlenebilmektedir. Bu yöntemle türe özgül DNA ürünlerinin çoğaltılması ve birbirine çok yakın türlerin ayrılabilmesi sağlanmıştır. 2000'li yılların başından itibaren geliştirilen real time (eş-zamanlı) cihazların kullanımıyla 10 pg/ml DNA gösterilebilmekte ve örnekteki fungal yük miktarı belirlenebilmektedir (84).

*Candida* türlerinin tanısında kullanılan PCR testi için hedef bölgeler; ön çoğaltma ve ileri tanımlama için kullanılanlar olarak iki gruba ayrılabilir. Ön çoğaltmada tüm mantarlar için ortak, çok tekrarlı ve ileri derecede korunmuş 18S, 5.8S ve 28S rDNA alt üniteleri veya mitokondri DNA'sı (mDNA) kullanılır. İleri tanımlamada Internal Transcribed Spacer (ITS1,ITS2), sitokrom p-450 lanosterol alfa-demetilaz, aspartik proteinaz, aktin, kitin sentetaz ve ısı şok proteini kodlayan gen bölgeleri hedef olarak kullanılmaktadır. Tür tanısında duyarlılığı arttırmak için; nested PCR ve multipleks PCR teknikleri kullanılmaktadır. PCR ile çoğaltılan ürünler restriksiyon enzim analizi (RFLP), PCR-hibridizasyon ve baz dizi analizi teknikleri kullanılarak tür ayırımına gidilmektedir (83, 85).

## GEREÇ VE YÖNTEM

### *CANDIDA ALBICANS* SUŞLARI

Ocak 2012-Ocak 2013 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi (PAÜ) Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş ve *C. albicans* olarak tanımlanmış 140 suş çalışmaya dahil edilmiştir. Aynı hastadan alınan birden fazla örnekte üreyen izolatlar çalışma dışı bırakılmıştır. Suşlar çalışma yapılıncaya kadar %15'lik gliserollü buyyon içinde -20°C'de saklanmıştır.

### SUŞLARIN TANIMLANMASI

Laboratuvara gelen klinik örnekler rutin olarak kullanılan %5 koyun kanlı agar ve Eosine-Methylen Blue (EMB) agara ekilmiştir. 37°C'de, 24-48 saatlik inkübasyondan sonra kanlı agarda üreyen koloniler, Gram boyaması yapılarak, Gram (+) maya hücresi saptanan kültürler SDA besiyerine pasaj yapılmıştır. Çalışmanın diğer aşamaları için, kullanılacak suşlar saf olarak %15 gliserollü buyyon içeren eppendorflara ekim yapılarak -20°C'de saklanmıştır.

Rutin koyun kanlı agarda üreyen kolonilerden *C. albicans* tanımlanması, suşların germ tüp oluşturmalarına ve mısırunu-tween 80 agarda klamidospore oluşturmalarına göre yapılmıştır. Bu yöntemlerle tanımlanamayan *C. albicans* suşlarının tanımlanması için Vitek2 (bioMerieux, France) ve Phoenix 100 (BD, ABD) cihazlarından yararlanılmıştır. Tüm suşlar PCR'da 5.8S rDNA primerleri kullanılarak kontrol edilmiştir.

### *Germ Tüp Testi*

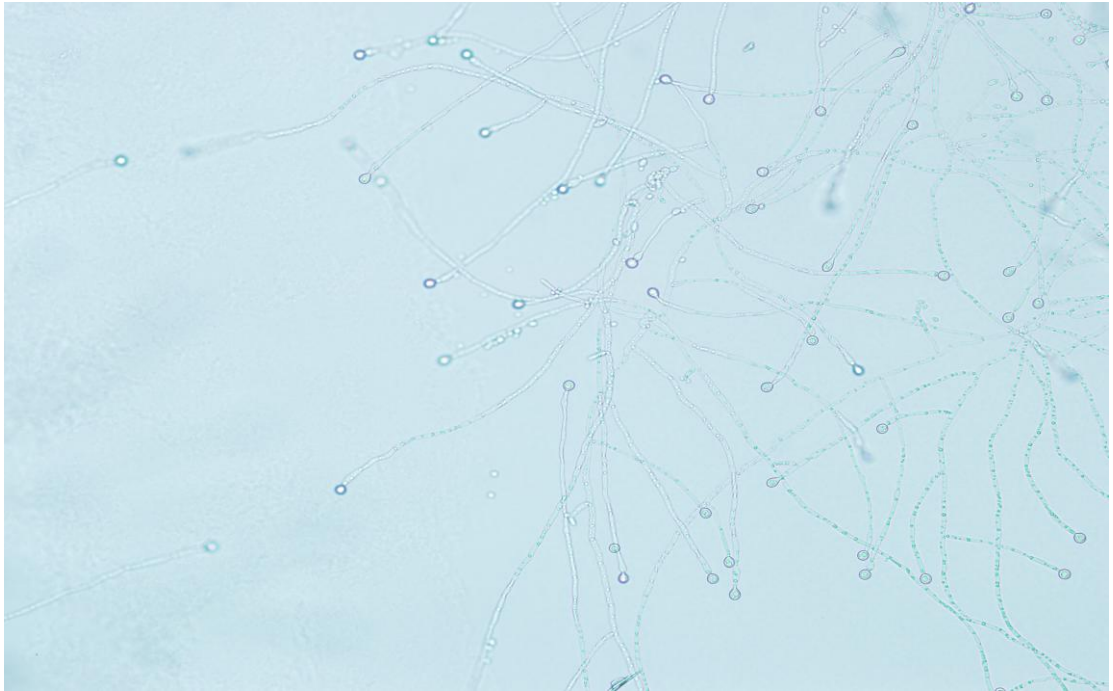
Test edilecek maya kolonisinden öze ile bir miktar alınarak 1 ml plazma içerisinde süspansiyon yapılmıştır ve 37°C'de 2,5-3 saat inkübe edildikten sonra bir damla alınarak lam-lamel arası preparat hazırlanıp ışık mikroskopunda 40x objektifle incelenmiştir. Maya hücresinden çıkan, maya hücresinin yarısı kadar genişlikte, 3-4 katı uzunlukta olup, başlangıç noktasında boğumlanma bulunmayan ve uzunluğu boyunca belirgin kabarıklık göstermeyen filament şeklindeki uzantılar germ tüp



olarak değerlendirilmiştir. Germ tüp oluşturan maya suşları ise *C. albicans* olarak tanımlanmıştır (86).

### ***Klamidospor oluşumunun incelenmesi***

Mısırunu-tween 80 agar plaklarına Dalmau tekniğine uygun olarak ekim yapılmıştır. Bunun için saf maya kolonilerinden iğne uçlu ze ile bir miktar alınarak birbirine paralel olarak besiyerini yırtmadan ve özeyi dibe kadar batırmadan çizgi ekim yapılmıştır. Ekim çizgilerinin üzerine lamel kapatılarak 26°C’de 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda ekimler ışık mikroskopunda diyafram kapalı olarak 10x, 20x ve 40x büyütmede incelenmiştir. Pseudohiflerin uçlarında ve yan dallarında görülen büyük, kalın duvarlı, yuvarlak klamidosporlar ile hif birleşim yerlerindeki blastospor kümeleri görülmesi *C. albicans* lehine değerlendirilmiştir (şekil 1). Çalışmaya dahil edilen kökenler, çalışma anına kadar %15 gliserollü beyin kalp infüzyon buyyon içerisinde – 20°C’de saklanmıştır (87).



**şekil 1.** *C.albicans* suşlarındaki klamidospor oluşumu görüntüsü

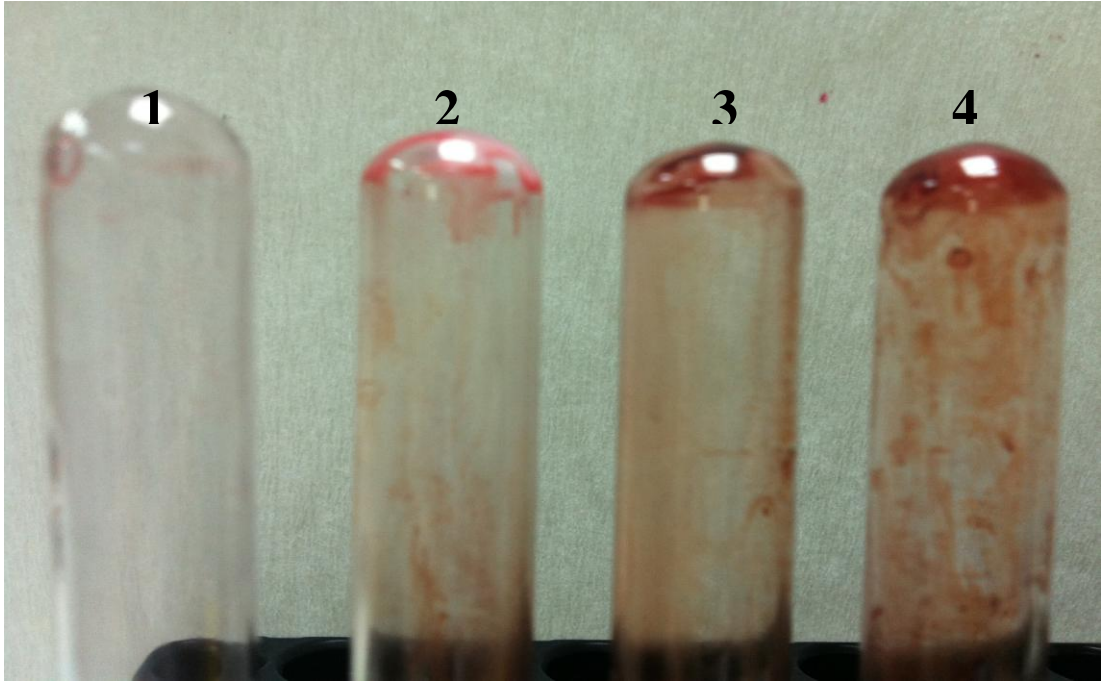
### ***Biyofilm deneyi***

*C. albicans* suşlarında biyofilm araştırılmasında 3 farklı yöntem kullanılmıştır:

- Modifiye tüp aderans yöntemi
- Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon agar yöntemi
- Modifiye mikroplak yöntemi

### ***Modifiye Tüp Aderans Yöntemi***

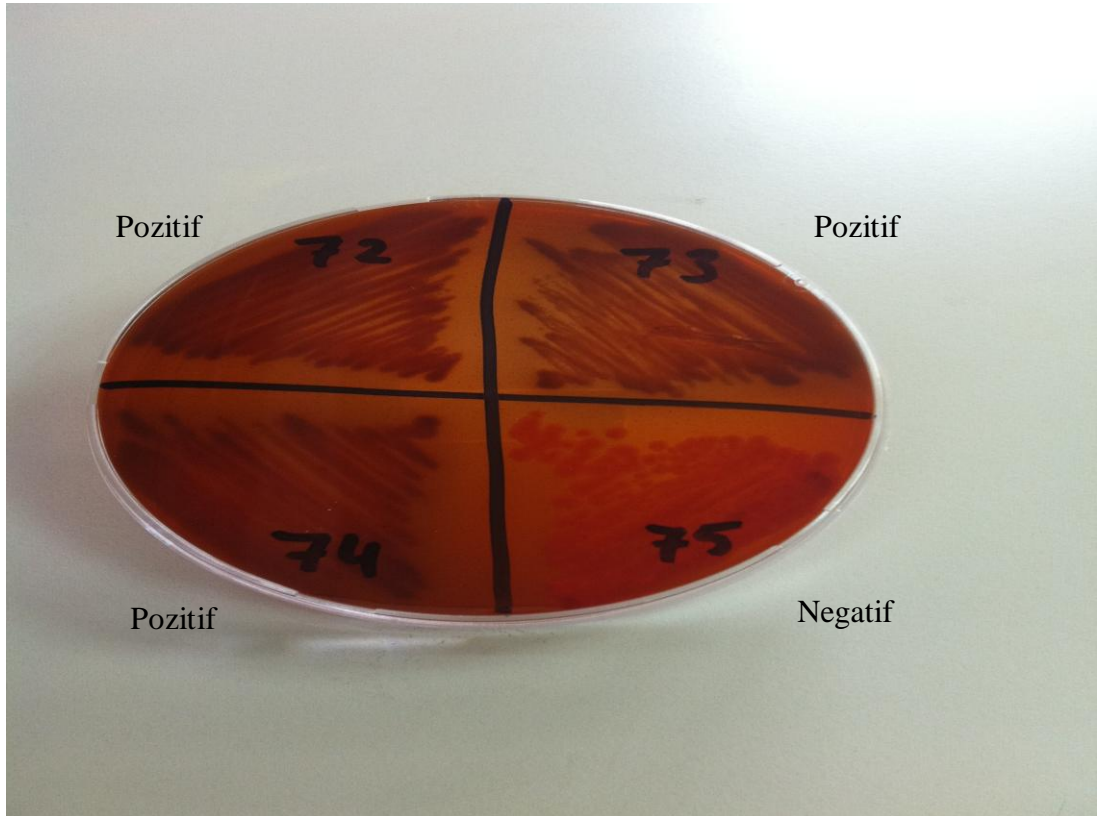
Kanlı besiyerinde canlandırdığımız *C. albicans* suşlarının, SDA'da 24-48 saat inkübasyon sonrası oluşan kolonilerinden bir öze dolusu alınarak, son glukoz konsantrasyonu %8 olan Sabouraud buyyon (SB) içeren 10 ml'lik cam tüplere inoküle edilmiş ve 35°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüplerin içerikleri boşaltılarak iki kez distile su ile yıkanmış, ardından %1'lik safranin eklenip boyama yapıldıktan sonra boşaltılmıştır. Tüpler havada kurutulduktan sonra iç çeperde bulunan renkli bir film tabakasının varlığı biyofilm pozitif olarak değerlendirilmiştir. Oluşan tabakanın kalınlığına göre biyofilm pozitifliği, zayıf pozitif (+), orta pozitif (++) ve kuvvetli pozitif (+++) olarak değerlendirilmiştir (88) (Şekil 2).



**Şekil 2.** Tüp aderans yöntemi ile biyofilm araştırılması. 1. Biyofilm (-) negatif 2. Biyofilm (+) pozitif 3. Biyofilm (++) pozitif 4. Biyofilm (+++) pozitif

### ***Kongo Kırmızılı Beyin-Kalp İnfüzyon Agar Yöntemi***

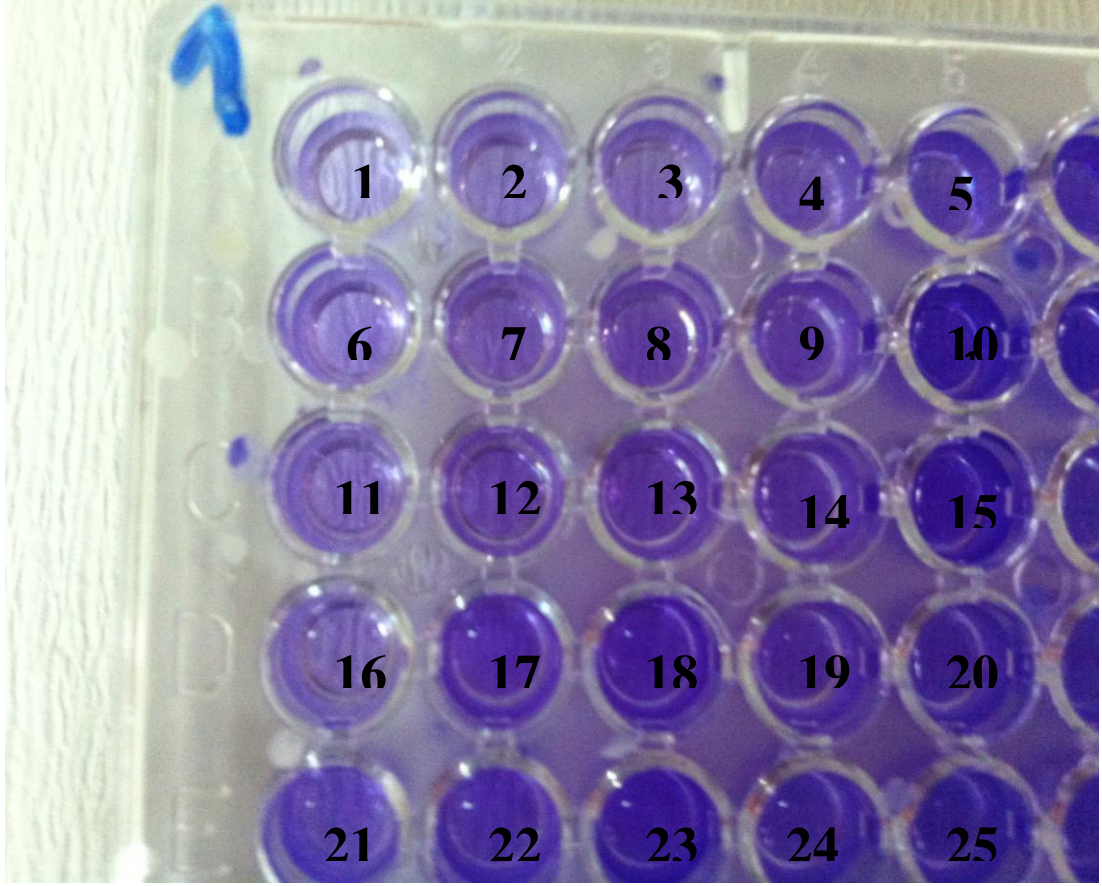
Slime faktör varlığı Kongo kırmızılı beyin kalp infüzyon (KKBKI) agar yöntemi ile incelenmiştir. Besiyeri litrede 80 g glikoz ve 0.8 g Kongo kırmızısı olacak şekilde hazırlanmıştır. Otoklavda steril edildikten sonra, 9 cm'lik petrilere dökülmüştür (89). Sabouraud dekstroz agardaki test edilecek *C. albicans* kökenlerinden bir plakta en fazla dört köken olacak şekilde pasajları yapılmıştır. Pasajlar 35°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Kongo kırmızılı beyin kalp infüzyon agar yönteminde slime varlığı değerlendirilmiştir. Kongo kırmızılı beyin kalp infüzyon agarda inkübasyon süresi sonunda koyu kırmızı-siyah koloni oluşturan *C. albicans*'lar biyofilm pozitif, pembe koloni oluşturanlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir (89, 90) (Şekil 3).



**Şekil 3.** Kongo kırmızılı beyin kalp infüzyon agardaki biyofilm pozitif ve negatif *C. albicans* suşlarının görüntüsü (75 nolu suş negatif; 72, 73,74 nolu suşlar pozitif)

### ***Modifiye Mikroplak Yöntemi***

*C. albicans* suşları SDA'ya pasajlanmış ve 24-48 saatlik inkübasyon sonrası üretilip elde edilen kolonilerden bir öze dolusu alınmıştır. Daha sonra, son glukoz konsantrasyonu %8 olacak şekilde hazırlanmış olan Sabouraud buyyondan (SB) 10 ml içeren tüplere inokule edilmiştir. 35°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra tüpler 5 saniye vortekslenmiş ve SB ile 1/100 oranında sulandırılmıştır. Hazırlanan süspansiyonlardan 200 µl alınarak 96'lık U tabanlı mikroplaklara konulmuştur (her köken için 3 kuyucuk kullanılmıştır). Her plakta kontrol amacıyla 6 kuyucuğa steril besiyeri konulmuştur. Plaklar buharlaşmayı engellemek için parafilmle sarılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kuyucukların içeriği otomatik pipetle aspire edilmiştir. Daha sonra her kuyucuk 4 kez fosfat tampon solüsyonu (PBS, ph 7.2 ) ile yıkanmıştır. Bu basamağın ardından her kuyucuğa %1'lik kristal violet eklenmiştir. Kuyucuklar 15 dk boyunca boyanmış, ardından kristal violet dökülüp, 200 µl etanol aseton (80:20,v/v) eklenmiş ve boya çözdürülmüştür.. Daha sonra kuyucuklar mikro-ELİSA (ELISA Reader, Pasteur Diagnostic, France) otomatik okuyucuda 595 nm dalga boyunda okunmuştur. Bu işlemler her bir kuyucuk için 3 kez tekrarlanmıştır. Biyofilm oluşumu da şu şekilde değerlendirilmiştir:  $OD_{595} < 1$ ; biyofilm oluşturmadı,  $1 < OD_{595} < 2$ ; zayıf biyofilm oluşturdu,  $2 < OD_{595} < 3$ ; orta derece biyofilm oluşturdu,  $OD_{595} > 3$ ; güçlü biyofilm oluşturdu (91) (Şekil 4).



**Şekil 4.** Modifiye mikropate yöntemiyle biyofilm görüntüsü. (1 nolu suş: (-) negatif; 2, 3, 6, 11, 16 nolu suşlar: (+) pozitif; 4, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 19, 21, 22 nolu suşlar: (++) pozitif; 5, 10, 15, 17, 18, 20, 23, 24, 25 nolu suşlar: (+++) pozitif)

#### ***Asit Proteinaz Deneyi***

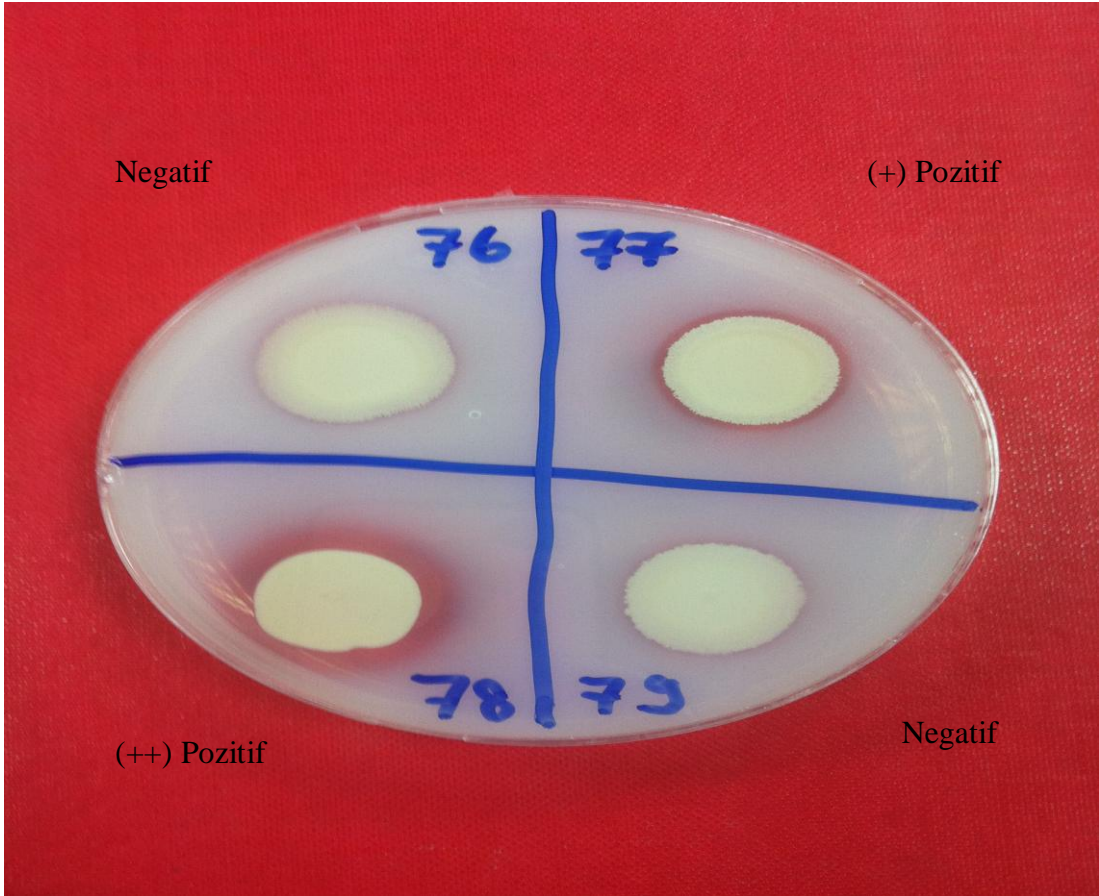
*Candida* suşlarının salgısal asit proteinaz aktivitelerini saptamak için %1'lik sığır serum albumin besiyeri kullanılmıştır. 2 gr dekstroz, 0,1 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,05 gr  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2 gr agar ve 100 ml distile su ile hazırlanan temel besiyeri otoklavda  $110^\circ\text{C}$ 'de 15 dk steril edilip, sitrik asit çözeltisi ile pH 5'e ayarlanıp  $50^\circ\text{C}$ 'lik su banyosuna konulmuştur. 100 ml distile su ve 1 gr sığır serum albuminden oluşan karışım manyetik karıştırıcıda çözüldükten sonra,  $0,2 \mu\text{m}$ 'lik membran filtrelerden geçirilip sterilize edilmiştir. Hazırlanan protein çözeltisi, temel besiyerine % 20 oranında eklenmiş ve 90 mm çaplı petri kaplarına  $10^3$  ar ml dökülmüştür.

$37^\circ\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübasyon sonrası SDA'da üreyen maya kolonilerinden Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD) buyyona pasaj yapıp,  $30^\circ\text{C}$ 'de 4 saat

inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bulanıklık 0,5 McFarland'a ayarlanıp, sığır serum albümin besiyerine kolonilerden bir öze dolusu alınarak direkt damlatılmıştır.

30°C'de 6 gün inkübasyon sonrasında, üreme zonunun çevresinde oluşan, besiyerindeki proteinin parçalandığını gösteren erime zonlarının genişlikleri ölçülmüş, proteolitik aktivitenin düzeyi belirlenmiştir (Şekil 5).

Erime zonu olmayan kökenler asit proteinaz aktivitesi yönünden negatif (-), erime zonu diskin en fazla 1-2 mm açığındaki alana yayılmış olan kökenler zayıf pozitif (+), 3-5 mm açığındaki alana yayılmış olan kökenler ise kuvvetli pozitif (++) olarak değerlendirilmiştir (57, 92).



**Şekil 5.** Asit proteinaz pozitif ve negatif kökenlerin sığır serum albüminli agardaki görüntüsü. (76, 79 nolu suşlar: (-) negatif; 77 nolu suş: (+) pozitif; 78 nolu suş: (++) pozitif)

## **C. ALBİCANS SUŞLARINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAP GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

### **DNA Ekstraksiyonu**

Maya DNA'sını elde etmek için pratik, etkili ve ucuz olan kaynatma yöntemi kullanılmıştır (93).

□ Çalışma öncesinde ilk olarak gliserollü brain heart infüzyon broth'da – 20°C'de saklanan stoklar çözülerek canlandırma pasajı yapılmıştır.

□ Moleküler analizler yapılmadan önce tüm kökenler iki kez SDA plaklarına pasajlanmıştır.

□ SDA plaklarında saf olarak üretilen *C. albicans* kolonilerinden bir öze dolusu alınarak (10-20 mg) 2 cc Sabouraud dekstrozo broth (SDB)'da bir gece 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

□ Bu süspansiyondan steril bir Eppendorf tüpüne 1 cc alınarak 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

□ Üst kısımdaki sıvı dışarıya atıldıktan sonra üzerine 200 µl steril distile su eklenerek 15-20 dakika kaynatılmıştır.

□ Sonrasında 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

□ İçerisinde DNA'nın bulunduğu üst kısımdan 150 µl yeni bir steril Eppendorf tüpüne alınmıştır. Kullanılacağı zamana kadar -20 °C'de saklanmıştır.

### **SAP Genlerinin Saptanması**

Suşlarda, *SAP* genlerinin varlığı PCR ile araştırılmıştır. PCR için kullanılan primerler Tablo 1'de gösterilmiştir. PCR işlemi, termal döngü cihazında (BIO-RAD MyCycler thermal cycler, ABD) kullanılan primerlere uygun reaksiyon koşullarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda *SAP1*, 2, 3, 4, 6, 7 ve 5.8S r DNA için Costa ve arkadaşlarının (94), *SAP5* için Sikora ve arkadaşlarının (95), *SAP8*, 9 ve 10 genleri için ise Schaller ve arkadaşlarının (96) kullandığı primer dizilimleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan *SAP1*, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 primeri Alfagen (ABD), *SAP6* primerleri Heliks (Almanya) firması tarafından sentez edilmiştir. 5.8S r DNA primerleri ise Alfagen (ABD) firması tarafından sentez edilmiştir.

**Tablo 1.** PCR’ da kullanılan özgül primerler (94, 95, 96)

| <b>Primer</b>                    | <b>Dizi (5'-3')</b>  | <b>Ürün (bp)</b> |
|----------------------------------|--|------------------|
| <i>SAP1</i> F<br><i>SAP1</i> R   | TCA ATC AAT TTA CTC TTC CAT TTC TAA CA<br>CCA GTA GCA TTA ACA GGA GTT TAA TGA CA | 161(10)          |
| <i>SAP2</i> F<br><i>SAP2</i> R   | AAC AAC AAC CCA CTA GAC ATC ACC<br>TGA CCA TTA GTA ACT GGG AAT GCT TTA GGA       | 178(10)          |
| <i>SAP3</i> F<br><i>SAP3</i> R   | CCT TCT CTA AAA TTA TGG ATT GGA AC<br>TTG ATT TCA CCT TGG GGA CCA GTA ACA TTT    | 231(10)          |
| <i>SAP4</i> F<br><i>SAP4</i> R   | CAT TCA TTC CTT TAA TAC CGA CTA TC<br>GGT AAC AAA CCC TGT AGA TCT TTT AA         | 156(10)          |
| <i>SAP5</i> F<br><i>SAP5</i> R   | GCT CTT GCT ATT GCT TAA TAA<br>ACC TAA AAT ACC CTT ACG AG                        | 578(11)          |
| <i>SAP6</i> F<br><i>SAP6</i> R   | AAA CCA ACG AAG CTA CCA GAA<br>TAA CTT GAG CCA TGG AGA TTT TC                    | 605(10)          |
| <i>SAP7</i> F<br><i>SAP7</i> R   | GAA ATG CAA AGA GTA TTA GAG TTA TTA C<br>GAA TGA TTT GGT TTA CAT CAT CTT CAA CTG | 866(10)          |
| <i>SAP8</i> F<br><i>SAP8</i> R   | CTG TTA TTG TTG ACA CAG GTT C<br>GTA GAA ATA CTT GAA GAA GTA GTG                 | 903(12)          |
| <i>SAP9</i> F<br><i>SAP9</i> R   | CAC CAT AAG CAA CGT GAC TG<br>GCG AAA GCA ACA ACC CAT AC                         | 898(12)          |
| <i>SAP10</i> F<br><i>SAP10</i> R | ACG TCA GAA GAC TTT TCC ATT G<br>ATA TGG CGA TCC ATG AAC GTG                     | 938(12)          |
| 5.8S rDNA F<br>5.8S rDNA R       | TCC GTA GGT GAA CCT GCG G<br>TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC                          | 534(10)          |



Kullanılan PCR karışımları ve uygun döngü koşulları;

**5.8S r DNA primerleri:**

**PCR karışımı;**

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| 10x PCR buffer           | 5µl    |
| 2.5 mM MgCl              | 3µl    |
| 0.2 mM dNTP              | 1µl    |
| 0.5 u Taq DNA Polimeraz  | 0.5µl  |
| Özgül primer 1 (10 pmol) | 1µl    |
| Özgül primer 2 (10 pmol) | 1µl    |
| Hedef DNA                | 2µl    |
| Nükleaz free distile su  | 11.5µl |

toplamda 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

**5.8S r DNA primerleri:**

**PCR döngü koşulları;**

|   |            |
|---|------------|
| 94 °C' de 3 dakika (ön denatürasyon): 1 döngü |            |
| 94 °C' de 30 saniye (hedef DNA denatürasyonu) | } 30 döngü |
| 56 °C' de 45 saniye (primer bağlanması)       |            |
| 72 °C' de 1 dakika (primer uzaması)           |            |
| 72 °C' de 5 dakika (son uzama): 1 döngü       |            |

**SAP 1-5 geni varlığı araştırılması:**

**PCR karışımı;**

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| 10x PCR buffer           | 5µl    |
| 2.5 mM MgCl              | 3µl    |
| 0.2 mM dNTP              | 1µl    |
| 0.5 u Taq DNA Polimeraz  | 0.5µl  |
| Özgül primer 1 (10 pmol) | 1µl    |
| Özgül primer 2 (10 pmol) | 1µl    |
| Hedef DNA                | 2µl    |
| Nükleaz free distile su  | 11.5µl |

toplamda 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

**PCR döngü koşulları;**

|   |          |
|---|----------|
| 95 °C' de 5 dakika (ön denatürasyon): 1 döngü |          |
| 95 °C' de 30 saniye (hedef DNA denatürasyonu) | }        |
| 58 °C' de 45 saniye (primer bağlanması)       |          |
| 72 °C' de 1 dakika (primer uzaması)           |          |
| 72 °C' de 5 dakika (son uzama): 1 döngü       |          |
|   | 30 döngü |

**SAP 6-10 geni varlığı araştırılması:**

**PCR karışımı;**

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| 10x PCR buffer           | 5µl    |
| 2.5 mM MgCl              | 3µl    |
| 0.2 mM dNTP              | 1µl    |
| 0.5 u Taq DNA Polimeraz  | 0.5µl  |
| Özgül primer 1 (10 pmol) | 1µl    |
| Özgül primer 2 (10 pmol) | 1µl    |
| Hedef DNA                | 2µl    |
| Nükleaz free distile su  | 11.5µl |

toplamda 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

**PCR döngü koşulları;**

|   |          |
|---|----------|
| 95 °C' de 5 dakika (ön denatürasyon): 1 döngü |          |
| 95 °C' de 30 saniye (hedef DNA denatürasyonu) | }        |
| 62 °C' de 45 saniye (primer bağlanması)       |          |
| 72 °C' de 1 dakika (primer uzaması)           |          |
| 72 °C' de 5 dakika (son uzama): 1 döngü       |          |
|   | 30 döngü |

**PCR Ürünlerinin Saptanması**

Agaroz jel, agar konsantrasyonu %1 olacak şekilde 10X TBE tamponu ile hazırlanmıştır ve agaroz içeriğine 2.5 µl etidyum bromür eklenmiştir. 10 µl amplifikasyon ürünü ile 2 µl 6X yükleme tamponu karıştırılıp 10 µl alınarak agaroz jele yüklenmiştir ve elektroforez cihazında (BIO-RAD, ABD) 150 voltta 30 dk. yürütülmüştür. Daha sonra "Gel Logic 2200 Kodak Imaging System" (Kodak, ABD) kullanılarak elde edilen DNA bandları görüntülenmiştir ve amplifiye edilen

DNA'nın moleköl ağırlığı 50bç ve 100bç DNA marker (GeneON-Germany) ile karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve görüntüler kaydedilmiştir.

### **İstatistiksel Analiz**

Verilerin istatistiksel analizi SPSS Version 18.0 kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arası değişkenleri test etme amacıyla *ki-kare* testi kullanılmıştır. İstatistiksel hata payı 0.05 olarak alınmıştır. Yapılan testlerin uyumluluklarını karşılaştırmak için *kappa* analizi kullanılmıştır.

## BULGULAR

Ocak 2012-Ocak 2013 tarihleri arasında Pamukkale Üniversitesi (PAÜ) Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 140 *C. albicans* izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. Aynı hastadan alınan birden fazla örnekte üreyen izolatlar çalışma dışı bırakılmıştır.

### *C. albicans* Suşlarının Dağılımı

Suşların 15 (%10.7)'i poliklinik hastalarına, 125 (%89.3)'i yatan hastalara ait örneklerden izole edilmiştir. Klinik örneklerin 63 (%45)'ü kadın ve 77 (%55)'si erkek hastalara aitti. Kadın ve erkek hastalar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ). Suşların % 55.7'si idrar, %15.7'si balgam, %10'u yara, %8.6'sı kan, %7.9'u trakeal aspirat ve %2.1'i vajinal sürüntü örneklerinden izole edilmiştir. Suşların izole edildikleri örneklere göre dağılımları Tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.** *C. albicans* suşlarının izole edildikleri klinik örneklere göre dağılımı

| Örnek           | Sayı (%)           |
|-----------------|--------------------|
| İdrar           | 78 (55.7)          |
| Balgam          | 22 (15.7)          |
| Yara            | 14 (10)            |
| Kan             | 12 (8.6)           |
| Trakeal aspirat | 11 (7.9)           |
| Vajinal sürüntü | 3 (2.1)            |
| <b>Toplam</b>   | <b>140 (100.0)</b> |

Çalışmaya dahil edilen *C. albicans* suşları en sık Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi'ne (%22.1) ait örneklerden izole edildi. Ayrıca sıklık sırasına göre suşların %10'u Pediatri Bölümü'ne, %9.3'ü Üroloji Servisi'ne, %9.3'ü Nefroloji Servisi'ne, %8.6'sı Göğüs Hastalıkları Servisi'ne, %6.4'ü Pediatri Yoğun Bakım Ünitesi'ne, %5.7'si Kalp Damar Yoğun Bakım Ünitesi'ne, %5.7'si Enfeksiyon Hastalıkları Servisi'ne ve %22.9'u diğer servislere ait klinik örneklerden izole edildi. İzole edilen

suşların servislere göre dağılımındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu suşların izole edildikleri kliniklere göre dağılımları Tablo 3' te gösterilmiştir.

**Tablo 3.** *C. albicans* suşlarının izole edildikleri kliniklere göre dağılımı

| <b>Klinik</b>               | <b>Sayı (%)</b>    |
|-----------------------------|--------------------|
| Anestezi Yoğun Bakım        | 31 (22.1)          |
| Pediyatri                   | 14 (10.0)          |
| Üroloji                     | 13 (9.3)           |
| Nefroloji                   | 13 (9.3)           |
| Göğüs Hastalıkları          | 12 (8.6)           |
| Pediyatri Yoğun Bakım       | 9 (6.4)            |
| Kalp Damar Yoğun Bakım      | 8 (5.7)            |
| Enfeksiyon Hastalıkları     | 8 (5.7)            |
| Beyin Cerrahi               | 4 (2.9)            |
| Çocuk Cerrahi               | 3 (2.1)            |
| Fizik Tedavi Rehabilitasyon | 3 (2.1)            |
| Kardiyoloji                 | 3 (2.1)            |
| Hematoloji                  | 3 (2.1)            |
| Kadın Doğum                 | 2 (1.4)            |
| Plastik Cerrahi             | 2 (1.4)            |
| Nöroloji                    | 2 (1.4)            |
| Onkoloji                    | 2 (1.4)            |
| Yeni Doğan Yoğun Bakım      | 1 (0.7)            |
| Çocuk Acil                  | 1 (0.7)            |
| Ortopedi                    | 1 (0.7)            |
| Organ Nakli                 | 1 (0.7)            |
| Dermatoloji                 | 1 (0.7)            |
| KBB                         | 1 (0.7)            |
| Göğüs Cerrahisi             | 1 (0.7)            |
| Endokrinoloji               | 1 (0.7)            |
| <b>Toplam</b>               | <b>140 (100.0)</b> |

### ***C. albicans* Suşlarının Virülans Faktörleri İle İlgili Bulgular**

#### **Biyofilm Aktivitesi**

Çalışmaya dahil edilen 140 *C. albicans* suşu, Kongo Kırmızılı Beyin Kalp İnfüzyon Agar, Mikroplate ve Modifiye Tüp Aderans yöntemleriyle biyofilm varlığı açısından değerlendirilmiştir. Her üç yöntemde de biyofilm varlığı pozitif olan 49 (%35) suş saptanmıştır.

#### ***Mikroplate Yöntemiyle Biyofilm Aktivitesi Araştırılması***

Çalışmaya dahil edilen suşların biyofilm aktivitelerinin mikroplate yöntemiyle tespitinde incelenen 140 suşun 123 (%87.9)'ünde biyofilm aktivitesi pozitif, 17 (%12.1)'sinde negatif bulunmuştur. Pozitif bulunan 123 suşun 93 (%66.4)'ü (+) pozitif, 17 (%12.1)'si (++) pozitif, 13 (%9.3)'ü (+++) pozitif biyofilm aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Mikroplate yöntemi ile idrar örneklerinin 72 (%92.3)'sinde, balgam örneklerinin 19 (%86.4)'unda, trakeal aspirat örneklerinin 10 (%90.9)'unda, yara örneklerinin 12 (%85.7)'sinde, kan kültürü örneklerinin 9 (%75.0)'unda ve vajinal sürüntü örneklerinin 1 (%33.3)'inde biyofilm pozitifliği saptanmıştır (Tablo 4).

**Tablo 4.** *C. albicans* suşlarında virülans faktörlerinin pozitifliğine göre örneklerin dağılımı

| <b>Örnekler</b>             | <b>İdrar sayı (%)</b> | <b>Balgam sayı (%)</b> | <b>Yara sayı (%)</b> | <b>Kan sayı (%)</b> | <b>Trakeal Aspirat sayı (%)</b> | <b>Vajinal Sürüntü sayı (%)</b> | <b>Toplam sayı (%)</b> |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| <b>Mikroplate</b>           | 72<br>(92.3)          | 19<br>(86.4)           | 12<br>(85.7)         | 9<br>(75.0)         | 10<br>(90.9)                    | 1<br>(33.3)                     | 123<br>(87.9)          |
| <b>Modifiye Tüp Aderans</b> | 53<br>(67.9)          | 15<br>(68.2)           | 6<br>(42.9)          | 6<br>(50.0)         | 8<br>(72.7)                     | 1<br>(33.3)                     | 89<br>(63.6)           |
| <b>KKBKI Agar</b>           | 39<br>(50.0)          | 13<br>(59.1)           | 9<br>(64.3)          | 5<br>(41.7)         | 4<br>(36.4)                     | 2<br>(66.7)                     | 72<br>(51.4)           |
| <b>Asit Proteinaz</b>       | 73<br>(93.6)          | 18<br>(81.8)           | 14<br>(100.0)        | 12<br>(100.0)       | 10<br>(90.9)                    | 3<br>(100.0)                    | 130<br>(92.9)          |
| <b>SAP1</b>                 | 46<br>(59.0)          | 17<br>(77.3)           | 10<br>(71.4)         | 9<br>(75.0)         | 6<br>(54.5)                     | 3<br>(100.0)                    | 91<br>(65.0)           |
| <b>SAP2</b>                 | 62<br>(79.5)          | 20<br>(90.9)           | 13<br>(92.9)         | 10<br>(83.3)        | 8<br>(72.7)                     | 3<br>(100.0)                    | 116<br>(82.9)          |
| <b>SAP3</b>                 | 58<br>(74.4)          | 16<br>(72.7)           | 13<br>(92.9)         | 11<br>(91.7)        | 8<br>(72.7)                     | 3<br>(100.0)                    | 109<br>(77.9)          |
| <b>SAP4</b>                 | 59<br>(75.6)          | 18<br>(81.8)           | 13<br>(92.9)         | 9<br>(75.0)         | 9<br>(81.8)                     | 3<br>(100.0)                    | 111<br>(79.3)          |
| <b>SAP5</b>                 | 12<br>(15.4)          | 2<br>(9.1)             | 2<br>(14.3)          | 3<br>(25.0)         | 0<br>(0.0)                      | 0<br>(0.0)                      | 19<br>(13.6)           |
| <b>SAP6</b>                 | 59<br>(75.6)          | 20<br>(90.9)           | 14<br>(100.0)        | 10<br>(83.3)        | 8<br>(72.7)                     | 3<br>(100.0)                    | 114<br>(81.4)          |
| <b>SAP7</b>                 | 62<br>(79.5)          | 19<br>(86.4)           | 14<br>(100.0)        | 10<br>(83.3)        | 8<br>(72.7)                     | 3<br>(100.0)                    | 116<br>(82.9)          |
| <b>SAP8</b>                 | 29<br>(37.2)          | 7<br>(31.8)            | 9<br>(64.3)          | 6<br>(50.0)         | 3<br>(27.3)                     | 2<br>(66.7)                     | 56<br>(40.0)           |
| <b>SAP9</b>                 | 30<br>(38.5)          | 6<br>(27.3)            | 6<br>(42.9)          | 5<br>(41.7)         | 5<br>(45.5)                     | 2<br>(66.7)                     | 54<br>(38.6)           |
| <b>SAP10</b>                | 34<br>(43.6)          | 4<br>(18.2)            | 4<br>(28.6)          | 4<br>(33.3)         | 3<br>(27.3)                     | 2<br>(66.7)                     | 51<br>(36.4)           |

Mikroplate yöntemiyle biyofilm aktivitesi pozitif bulunan suşlar en fazla idrar örneklerinden (%92.3), en az olarak da vajen örneklerinden (%33,3) izole edilmiş olup, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0.037$ ). Ancak idrar örneklerimiz vajinal sürüntü örneklerimizden sayıca fazla olduğu için bu anlamlılığın sayısal farktan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. *C. albicans* suşlarının, mikroplate yöntemiyle biyofilm aktivitesi sonuçları Tablo 5’te verilmiştir.

**Tablo 5.** *C. albicans* suşlarında mikroplate yöntemi ile biyofilm aktivitesi sonuçları

| <b>Biyofilm Aktivitesi</b> | <b>Sayı (%)</b>    |
|----------------------------|--------------------|
| (+) pozitif                | 93 (66.4)          |
| (++) pozitif               | 17 (12.1)          |
| (+++)<br>pozitif           | 13 (9.3)           |
| (-) negatif                | 17 (12.1)          |
| <b>Toplam</b>              | <b>140 (100.0)</b> |

#### ***Modifiye Tüp Aderans Yöntemiyle Biyofilm Aktivitesi Araştırılması***

Çalışmaya dahil edilen suşların biyofilm aktivitelerinin modifiye tüp aderans yöntemiyle tespitinde incelenen 140 suşun 89 (%63.6)’ünde biyofilm aktivitesi pozitif, 51 (%36.4)’inde negatif bulunmuştur. Pozitif bulunan 89 suşun 40 (%28.6)’ı (+) pozitif, 31 (%22.1)’i (++) pozitif, 18 (%12.9)’i (+++) pozitif biyofilm aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Modifiye tüp aderans yöntemi ile idrar örneklerinin 53 (%67.9)’ünde, balgam örneklerinin 15 (%68.2)’inde, trakeal aspirat örneklerinin 8 (%72.7)’inde, yara örneklerinin 6 (%42.9)’sında, kan kültürü örneklerinin 6 (%50.0)’sında ve vajinal sürüntü örneklerinin 1 (%33.3)’inde biyofilm pozitifliği saptanmıştır (Tablo 4). Örnekler arasında modifiye tüp aderans yöntemiyle biyofilm aktiviteleri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). *C. albicans* suşlarının, modifiye tüp aderans yöntemiyle biyofilm aktivitesi sonuçları Tablo 6’te verilmiştir.



**Tablo 6.** *C. albicans* suşlarında modifiye tüp aderans yöntemi ile biyofilm aktivitesi sonuçları

| <b>Biyofilm Aktivitesi</b> | <b>Sayı (%)</b>    |
|----------------------------|--------------------|
| (+) pozitif                | 40 (28.6)          |
| (++) pozitif               | 31 (22.1)          |
| (+++) pozitif              | 18 (12.9)          |
| (-) negatif                | 51 (36.4)          |
| <b>Toplam</b>              | <b>140 (100.0)</b> |

***Kongo Kırmızılı Beyin Kalp İnfüzyon (KKBKI) Agar Yöntemiyle Biyofilm Aktivitesi Araştırılması***

Kongo Kırmızılı Beyin Kalp İnfüzyon (KKBKI) Agar yöntemiyle biyofilm aktiviteleri incelenen 140 *C. albicans* suşunun 72 (%51.4)'sinde biyofilm aktivitesi pozitif, 68 (%48.6)'inde negatif bulunmuştur. KKBKI Agar yöntemi ile idrar örneklerinin 39 (%50.0)'unda, balgam örneklerinin 13 (%59.1)'ünde, trakeal aspirat örneklerinin 4 (%36.4)'ünde, yara örneklerinin 9 (%64.3)'ünde, kan kültürü örneklerinin 5 (%41.7)'inde ve vajinal sürüntü örneklerinin 2 (%66.7)'inde biyofilm pozitifliği saptanmıştır (Tablo 4). Örnekler arasında KKBKI yöntemiyle biyofilm aktiviteleri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). *C. albicans* suşlarının, KKBKI Agar yöntemiyle biyofilm aktivitesi sonuçları Tablo 7'da verilmiştir.

**Tablo 7.** *C. albicans* suşlarında Kongo Kırmızılı Beyin Kalp İnfüzyon (KKBKI) Agar yöntemi ile biyofilm aktivitesi sonuçları

| <b>Biyofilm Aktivitesi</b> | <b>Sayı (%)</b>    |
|----------------------------|--------------------|
| Pozitif                    | 72 (51.4)          |
| Negatif                    | 68 (48.6)          |
| <b>Toplam</b>              | <b>140 (100.0)</b> |

Biyofilm varlığını saptama oranı açısından her üç yöntem karşılaştırıldığında en yüksek oran modifiye mikropate yönteminde bulunmuştur, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Her üç yöntemin birbirleriyle

uyumu *kappa* analizi ile değerlendirilmiş ve zayıf da olsa her üç yöntemin birbirleriyle uyumlu oldukları saptanmıştır (*kappa*<20).

#### ***Asit Proteinaz Aktivitesinin Araştırılması***

Asit proteinaz aktivitesi yönünden incelenen 140 *C. albicans* suşun 130 (%92.9)'unda asit proteinaz aktivitesi pozitif, 10 (%7.1)'unda negatif bulunmuştur. Pozitif bulunan 130 suştan 114 (%81.4)'ü (+) pozitif, 16 (%11.4)'sı (++) pozitif asit proteinaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Asit proteinaz aktivitesi, idrar örneklerinin 73 (%93.6)'ünde, balgam örneklerinin 18 (%81.8)'inde, trakeal aspirat örneklerinin 10 (%90.9)'unda, yara örneklerinin 14 (%100.0)'ünde, kan kültürü örneklerinin 12 (%100.0)'sinde ve vajinal sürüntü örneklerinin 3 (%100.0)'ünde pozitif saptanmıştır (Tablo 4). Çalışmamızda, yara, kan kültürü ve vajinal sürüntü örneklerinin tamamında asit proteinaz aktivitesi saptanmıştır. Örnekler arasında asit proteinaz aktiviteleri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Örneklerde biyofilm pozitifliği ile asit proteinaz birlikteliği %90 ve üzerinde saptanmıştır, ancak bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). *C. albicans* suşlarının, asit proteinaz aktivitesi sonuçları Tablo 8'de verilmiştir.

**Tablo 8.** *C. albicans* suşlarının asit proteinaz aktivite sonuçları

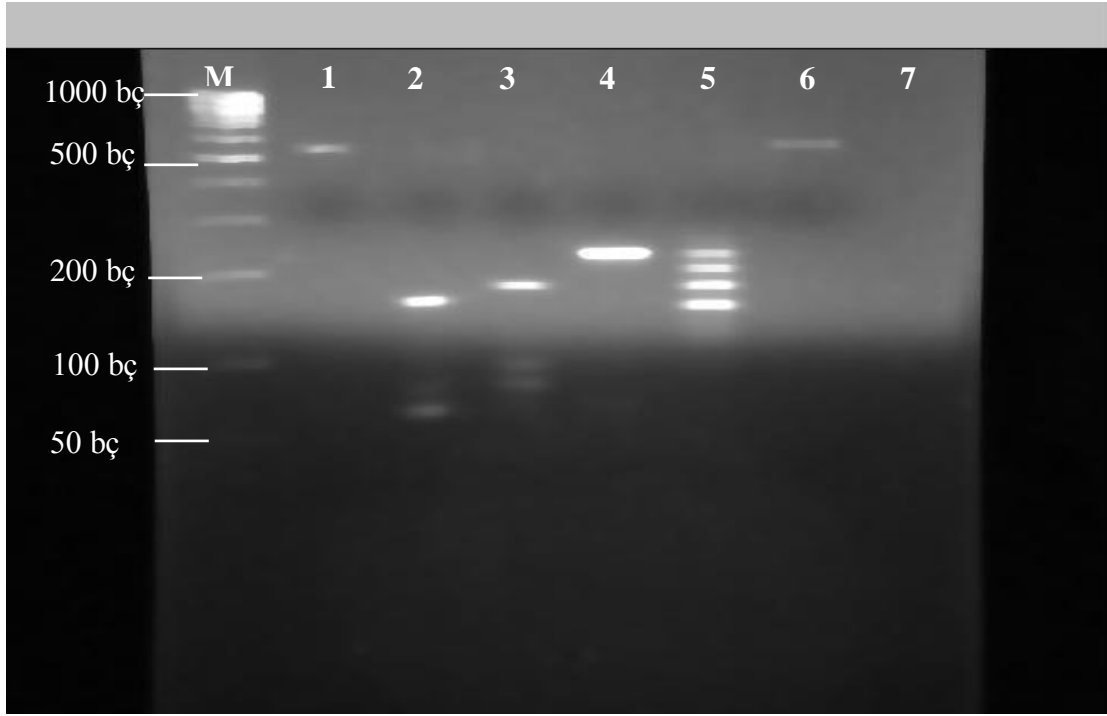
| <b>Asit Proteinaz Aktivitesi</b> | <b>Sayı (%)</b>    |
|----------------------------------|--------------------|
| (+) pozitif                      | 114 (81.4)         |
| (++) pozitif                     | 16 (11.4)          |
| (-) negatif                      | 10 (7.1)           |
| <b>Toplam</b>                    | <b>140 (100.0)</b> |

### ***SAP1-10 Genlerinin Varlığının Araştırılması***

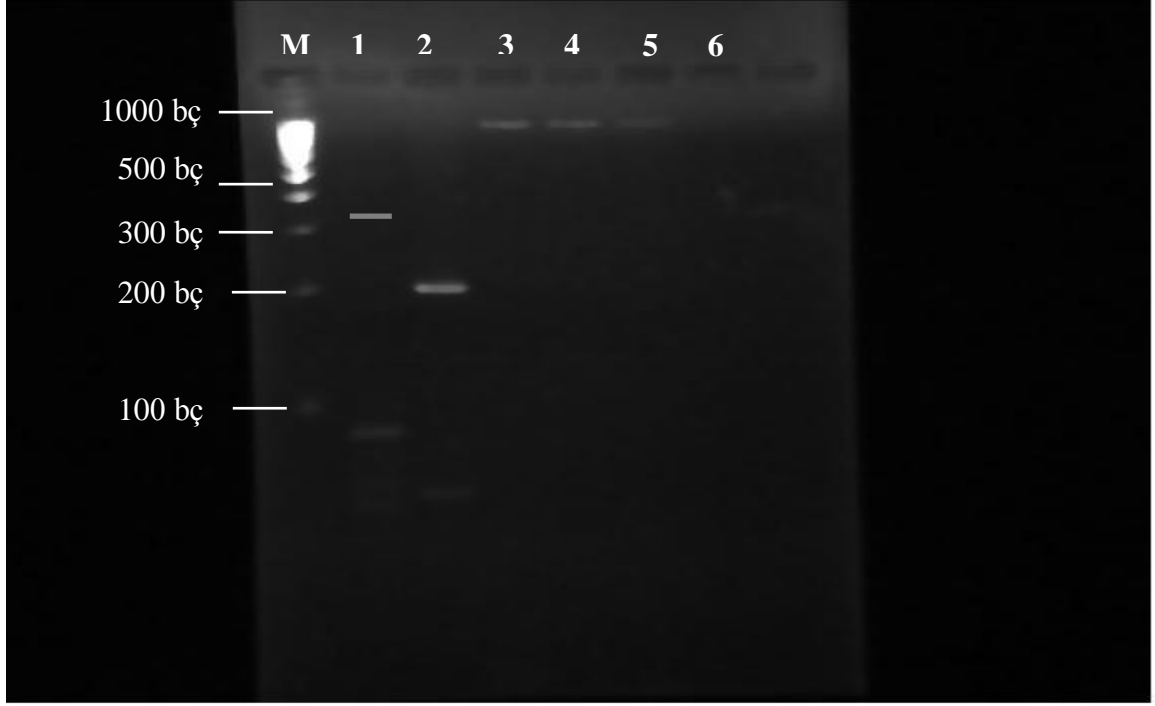
İzole edilen 140 *C. albicans* suşunda genotipik olarak *SAP1-10* genlerinin varlığı PCR yöntemiyle araştırılmıştır. *C. albicans* suşlarının 91 (%65)'inde *SAP1*, 116 (%82.9)'sında *SAP2*, 109 (%77.9)'unda *SAP3*, 111 (%79.3)'inde *SAP4*, 19 (%13.6)'unda *SAP5*, 114 (%81.4)'ünde *SAP6*, 116 (%82.9)'sında *SAP7*, 56 (%40)'sında *SAP8*, 54 (%38.6)'ünde *SAP9* ve 51 (%36.4)'inde *SAP10* gen pozitifliği saptanmıştır. *SAP* genlerinin örneklerle göre varlığına baktığımızda; idrar örneklerinin 46 (%59.0)'sında *SAP1*, 62 (%79.5)'sinde *SAP2*, 58 (%74.4)'inde *SAP3*, 59 (%75.6)'unda *SAP4*, 12 (%15.4)'sinde *SAP5*, 59 (%75.6)'unda *SAP6*, 62 (%79.5)'sinde *SAP7*, 29 (%37.2)'unda *SAP8*, 30 (%38.5)'unda *SAP9* ve 34 (%43.6)'ünde *SAP10* saptanmıştır. Balgam örneklerinin 17 (%77.3)'sinde *SAP1*, 20 (%90.9)'sinde *SAP2*, 16 (%72.7)'sında *SAP3*, 18 (%81.8)'inde *SAP4*, 2 (%9.1)'sinde *SAP5*, 20 (%90.9)'sinde *SAP6*, 19 (%86.4)'unda *SAP7*, 7 (%31.8)'sinde *SAP8*, 6 (%27.3)'sında *SAP9* ve 4 (%18.2)'ünde *SAP10* saptanmıştır. İdrar ve balgam örneklerinde çoğunlukla *SAP1*, *SAP2*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP6* ve *SAP7* birlikteliği saptanmıştır. Trakeal aspirat örneklerinin 6 (%54.5)'sında *SAP1*, 8 (%72.7)'sinde *SAP2*, 8 (%72.7)'inde *SAP3*, 9 (%81.8)'unda *SAP4*, 8 (%72.7)'inde *SAP6*, 8 (%72.7)'inde *SAP7*, 3 (%27.3)'ünde *SAP8*, 5 (%45.5)'inde *SAP9* ve 3 (%27.3)'ünde *SAP10* saptanmıştır. Hiçbir trakeal aspirat örneğinde *SAP5* geni saptanmamıştır. Yara örneklerinin 10 (%71.4)'unda *SAP1*, 13 (%92.9)'sinde *SAP2*, 13 (%92.9)'ünde *SAP3*, 13 (%92.9)'ünde *SAP4*, 2 (%14.3)'sinde *SAP5*, 14 (%100.0)'ünde *SAP6*, 14 (%100.0)'ünde *SAP7*, 9 (%64.3)'unda *SAP8*, 6 (%42.9)'sında *SAP9* ve 4 (%28.6)'ünde *SAP10* saptanmıştır. Tüm yara örneklerinde *SAP6* ve *SAP7* genlerinin varlığı tespit edilmiştir. Kan kültürü örneklerinin 9 (%75.0)'unda *SAP1*, 10 (%83.3)'unda *SAP2*, 11 (%91.7)'inde *SAP3*, 9 (%75.0)'unda *SAP4*, 3 (%25.0)'ünde *SAP5*, 10 (%83.3)'unda *SAP6*, 10 (%83.3)'unda *SAP7*, 6 (%50.0)'sında *SAP8*, 5 (%41.7)'inde *SAP9* ve 4 (%33.3)'ünde *SAP10* saptanmıştır. Kan kültürü örneklerinde çoğunlukla *SAP2*, *SAP3*, *SAP6* ve *SAP7* birlikteliği saptanmıştır. Vajinal sürüntü örneklerinin 3 (%100.0)'ünde *SAP1*, 3 (%100.0)'ünde *SAP2*, 3 (%100.0)'ünde *SAP3*, 3 (%100.0)'ünde *SAP4*, 3 (%100.0)'ünde *SAP6*, 3 (%100.0)'ünde *SAP7*, 2 (%66.7)'sinde *SAP8*, 2 (%66.7)'sinde *SAP9* ve 2 (%66.7)'sinde *SAP10* saptanmıştır (Tablo 4). Vajinal sürüntü örneklerinin hiçbirinde *SAP5* geni saptanmazken, *SAP1*,

*SAP2*, *SAP3*, *SAP4*, *SAP6* ve *SAP7* genleri tüm vajinal sürüntü örneklerinde saptanmıştır. Çalışmamızda *SAP1-10* genlerinin varlığı ile klinik örneklerin dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Tüm *SAP* genlerinin varlığı 4 suşta saptanmıştır. Bunların tamamı idrar örnekleridir. Toplam 10 örnekte hiçbir *SAP* genine rastlanmamıştır. *SAP* geni saptanmayan bu 10 örnekten 7 tanesi idrar, 1 tanesi balgam, 2 tanesi de yara örnekleri idi. Ancak hiçbir *SAP* geni rastlanmayan bu 10 örnekte asit proteinaz ve biyofilm varlığı pozitif bulunmuştur. *SAP5* geni hiçbir trakeal aspirat ve vajinal sürüntü örneğinde saptanmamıştır.

*SAP1-5* genleri pozitif olan suşların PCR jel görüntüleri Şekil 6'da ve *SAP6-10* genleri pozitif olan suşların PCR jel görüntüleri Şekil 7'de gösterilmiştir.



**Şekil 6.** *C. albicans* suşlarında, *SAP 1-5* gen bölgelerine ait PCR jel görüntüleri (M: 50 bç DNA ladder, 1: 5.8S rDNA (534 bç), 2: *SAP 1* geni pozitif suş (161 bç), 3: *SAP 2* geni pozitif suş (178 bç), 4: *SAP 3* geni pozitif suş (231 bç), 5: *SAP 4* geni pozitif suş (156 bç), 6: *SAP 5* geni pozitif suş (578 bç), 7: Negatif kontrol).



**Şekil 7.** *C. albicans* suşlarında, *SAP 6-10* gen bölgelerine ait PCR jel görüntüleri (M: 100 bç DNA ladder, 1: *SAP 6* geni pozitif suş (314 bç), 2: *SAP 7* geni pozitif suş (196 bç), 3: *SAP 8* geni pozitif suş (903 bç), 4: *SAP 9* geni pozitif suş (898 bç), 5: *SAP 10* geni pozitif suş (938 bç), 6: Negatif kontrol).

*SAP* genleri ile asit proteinazın aynı anda varlığı karşılaştırıldığında; asit proteinaz pozitif olan suşlarda, *SAP1*, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 genlerinin varlığı, bu genleri taşımayan asit proteinaz pozitif suşlara göre daha yüksek oranlarda saptanmış olup, bu oranlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 9). *P* değerleri sırasıyla; 0.033, <0.001, 0.001, 0.001, 0.003, <0.001, 0.05, 0.007 ve 0.014 olarak bulunmuştur. *SAP5* geni içinse istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p=0.358$ ).

*SAP* genleri varlığı ile asit proteinaz birlikteliğine bakıldığında, *SAP5* geni pozitif 19 (%100.0) suşun, *SAP9* geni pozitif 54 (%100.0) suşun ve *SAP10* geni pozitif 51 (%100.0) suşun tamamında asit proteinaz aktivitesi varlığı saptanmıştır. Bu da proteinaz aktivitesi ile *SAP* genlerinin korelasyonunu göstermiş olup, virülanstaki rollerini açıklamaktadır (Tablo 9).

**Tablo 9.** *C. albicans* suşlarında biyofilm ve asit proteinaz aktivitesi varlığının *SAP* genlerinin varlığı ile karşılaştırılması

|              | <b>Biyofilm (Mikroplate) Pozitifliği sayı (%)</b> | <b>Asit Proteinaz Pozitifliği sayı (%)</b> |
|--------------|---|--|
| <i>SAP1</i>  | 78<br>(85.7)                                      | 88<br>(96.7)                               |
| <i>SAP2</i>  | 100<br>(86.2)                                     | 114<br>(98.3)                              |
| <i>SAP3</i>  | 94<br>(86.2)                                      | 106<br>(97.2)                              |
| <i>SAP4</i>  | 97<br>(87.4)                                      | 108<br>(97.3)                              |
| <i>SAP5</i>  | 16<br>(84.2)                                      | 19<br>(100.0)                              |
| <i>SAP6</i>  | 99<br>(86.8)                                      | 110<br>(96.5)                              |
| <i>SAP7</i>  | 100<br>(86.2)                                     | 114<br>(98.3)                              |
| <i>SAP8</i>  | 48<br>(85.7)                                      | 55<br>(98.2)                               |
| <i>SAP9</i>  | 42<br>(77.8)                                      | 54<br>(100.0)                              |
| <i>SAP10</i> | 42<br>(82.4)                                      | 51<br>(100.0)                              |

Asit proteinaz enzimi negatif olan 10 suşun 5 tanesi idrar örneklerinden ve diğer 5 tanesi balgam örneklerinden oluşmaktadır. Bu enzimi taşımayan suşlar, *SAP* genleri açısından incelendiğinde 6 tanesinin hiçbir *SAP* geni taşımadığı saptanmıştır.

Örneklerde *SAP* genlerinin varlığı ile biyofilm birlikteliği karşılaştırıldığında (Tablo 10); biyofilm pozitif olan suşlarda *SAP4* geninin varlığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0.019$ ). Diğer *SAP* genleri ile biyofilm birlikteliği arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Biyofilm yöntemlerinden olan mikroplate yöntemiyle pozitif bulunan suşlardaki *SAP9* gen birlikteliği istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır ( $p=0.009$ ).

**Tablo 10.** Her üç yöntem ile biyofilm pozitif bulunan suşlarda, *SAP4* geninin varlığının karşılaştırılması

|             |     | Her Üç Biyofilm Testi Pozitif Olan Suşlar |               | Toplam      |
|-------------|-----|---|---------------|-------------|
|             |     | Pozitif n (%)                             | Negatif n (%) |             |
| <i>SAP4</i> | Var | 44 (39.6)                                 | 67 (60.4)     | 111 (100.0) |
|             | Yok | 5 (17.2)                                  | 24 (82.8)     | 29 (100.0)  |
| Toplam      |     | 49 (35.0)                                 | 91 (65.0)     | 140 (100.0) |

## TARTIŞMA

*Candida* türleri hafif yüzeysel enfeksiyondan ağır sistemik enfeksiyona kadar çeşitli klinik tablolara yol açmaktadırlar. Floralı bölgelerde fizyolojik koşulların değişmesi, hormonal dengenin bozulması, immün sistemi baskılayan ilaçların kullanılması, kanser veya AIDS gibi immün yetmezliğe yol açan hastalıklar *Candida* enfeksiyonlarını kolaylaştırır (26, 27).

*Candida* enfeksiyonlarının patogenezindeki majör virulans faktörleri; konak epitel ve endotel hücrelerine adezyon, germ tüp oluşumu, asit proteinaz ve *SAP* gibi enzimlerin üretimidir. Ayrıca fosfolipaz, toksinler, slime üretimi gibi fenotipik değişimler, hücre duvarı ve yüzey değişimi, hidrofobisite gibi faktörler de virulans ve patogeneizde rol alır (1, 9).

*Candida* türleri normal floranın bir üyesi olarak da bulunabildiklerinden laboratuvarlarda karşılaşılan en büyük sorunlardan birisi klinik örneklerde üretilen *Candida* türlerinin klinik önemi olup olmadığının belirlenip rapor edilip edilmeyeceğine karar verilmesidir. Bu aşamada verilerin doğru yorumlanabilmesi için iyi bir klinik laboratuvar işbirliğine gereksinim vardır (74).

Aynalı (1) yaptığı çalışmada, klinik örneklerden izole ederek etken kabul ettikleri 100 *Candida* suşunun 48'inde *C. albicans* suşlarını saptamıştır. Bu suşların klinik örneklere göre dağılımına bakıldığında, en fazla idrar örneklerinden, en az sıklıkta ise vajen, yara ve kateter örneklerinden izole edildiğini bildirmiştir.

Arslan ve ark. (10) 100 *C. albicans* suşu ile yaptıkları çalışmada, suşların klinik örneklere göre dağılımına baktıklarında, en sık idrar ve vajen örneklerinden en az sıklıkta ise kan ve ağızdan alınan örneklerden izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Yıldırım ve ark. (97) 132 *candida* suşuyla yaptıkları çalışmada, 92 suşta *C. albicans* saptamışlardır. Bu çalışmada en sık idrar ve kan kültürlerinden, en az sıklıkta ise vajen, abse ve mayi örneklerinden izole edildiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamıza, 78 (%55.7) idrar, 22 (%15.7) balgam, 14 (%10) yara, 12 (%8.6) kan, 11 (%7.9) trakeal aspirat ve 3 (%2.1) vajinal sürüntü olmak üzere toplam 140 *C. albicans* suşu dahil edilmiştir. Bu suşlar, en sık idrar ve balgam örneklerinden, en az sıklıkta ise vajen örneklerinden izole edilmiştir. Bu da diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur.



Bizim yaptığımız çalışmada ve ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda, *C. albicans* suşları özellikle idrar örneklerinden izole edilmekle beraber birçok farklı klinik örnekten de izole edilebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Önemli nozokomiyal enfeksiyonlar arasında sayılan kateter enfeksiyonları, mikroorganizmaların kateterlere yapışma ve kolonizasyonu sonucu oluşmaktadır. Bu yapışma ve kolonizasyon için slime faktörün gerekli olduğu bildirilmektedir. Kateterlerde ortaya çıkan biyofilmlerde hem mikrobiyal hem de konak faktörleri görev almaktadır. Mikrobiyal faktör olarak slime, konak faktörü olarak ise fibrin ve fibronektin rol oynamaktadır (98).

Yücesoy ve ark. (99) yaptıkları çalışmada, çeşitli candida kökenlerinin biyofilm üretimi toplam 156 *Candida* kökeni içerisinde araştırılmış tüp aderans testi ile izolatların 43'nün (%27,6), mikroplate yöntemiyle ise 26'sının (%16,7) biyofilm ürettiği belirlenmiş ve iki yöntem arasında %65 tutarlılık saptanmıştır. Bu çalışmada candidalar içerisinde antifungal duyarlılık oranlarında önemli bir farklılık gözlenmemesine rağmen, biyofilm üretiminin potansiyel bir virulans faktörü olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Cevahir ve ark. (100) yaptıkları çalışmada, 126 *Candida* suşunda biyofilm üretimini üç farklı yöntem kullanarak araştırmışlardır. Slime faktör yapımı KKBI Agar ile %44,4, Glikozlu Triptik Soy Buyyon ile %39,6 ve Glikozlu Sıvı Sabouraud besiyeri ile %33,3 oranında saptanmıştır. Yöntemler biyofilm üretimi açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı halde en fazla KKBI agar yöntemi ile pozitiflik saptandığı görülmüştür.

Gökçe RG'nin (18) yaptığı çalışmada, modifiye tüp aderans metodu ve modifiye mikroplate metoduyla biyofilm oluşumunu araştırmış, 68 *C. albicans* kökeninin 8 tanesinde (%11,8) biyofilm pozitif olarak tespit edilmiş. Modifiye tüp aderans metoduyla tespit edilen 8 kökenin 6'sı, modifiye mikroplate metoduyla 8 kökenin 5'i kuvvetli pozitif olarak belirlenmiştir.

Yücesoy ve ark. (99) yaptıkları çalışmada, modifiye tüp aderans metoduyla 94 *C. albicans* kökeninin 23 tanesinde (%25), modifiye mikroplate metoduyla yapılan çalışmada ise 11 tanesinde (%12) biyofilm varlığını pozitif olarak tespit edilmiştir.

Yücesoy ve ark. (18), 94 *Candida* kökeni ile yaptıkları başka bir çalışmada her iki yöntemle %91.49 oranında aynı sonuçları elde etmişler, sonuçlarında mikroplate yönteminin daha objektif olması nedeniyle tercih edilebileceğine değinmişlerdir.

Çalışmamızda, KKBI Agar, modifiye tüp aderans ve modifiye mikroplate metoduyla biyofilm varlığı araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen suşların slime aktivitelerinin mikroplate yöntemiyle tespitinde incelenen 140 suşun 123 (%87.9)'ünde biyofilm aktivitesi pozitif, 17 (%12.1)'sinde negatif bulunmuştur. Pozitif bulunan 123 suşun 93 (%66.4)'ünün (+) pozitif, 17 (%12.1)'sinin (++) pozitif, 13 (%9.3)'ünün (+++) pozitif biyofilm aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Çalışmamızdaki suşların biyofilm aktivitelerinin modifiye tüp aderans yöntemiyle tespitinde incelenen 140 suşun 89 (%63.6)'unda biyofilm aktivitesi pozitif, 51 (%36.4)'inde negatif bulunmuştur. Pozitif bulunan 89 suşun 40 (%28.6)'ının (+) pozitif, 31 (%2.1)'inin (++) pozitif, 18 (%12.9)'inin (+++) pozitif biyofilm aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. KKBI Agar yöntemiyle biyofilm aktiviteleri incelenen 140 *C. albicans* suşunun 72 (%51.4)'sinde biyofilm aktivitesi pozitif, 68 (%48.6)'inde negatif bulunmuştur. 140 *C. albicans* suşunun 49 (%35)'unda her üç yöntemle de biyofilm varlığı pozitif olarak saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda biyofilm varlığını saptama oranı, modifiye mikroplate yönteminde diğer iki yönteme göre oldukça yüksek bulunmuştur (%87.9). Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu sonuç Yücesoy ve ark. (18)'nin yaptıkları çalışma ile uyumludur. Sonuç olarak mikroplate yönteminin, yoğun emek ve yüksek maliyetine rağmen daha objektif olması nedeniyle tercih edilebileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda, biyofilm üretimini saptayan 3 yöntem arasındaki uyum *kappa* testi ile karşılaştırılmış olup, 3 test arasında zayıf bir uyum olduğu saptanmıştır ( $kappa<20$ ).

Asit proteinaz ilk olarak 1965 yılında Staib tarafından saptanmış ve üç yıl sonra Remold ve Fasold, enzimi saflaştırarak tiplendirmiştir. Asit proteinaz, patojen *Candida* türleri tarafından salgılanmakta, non-patojen türlerde bulunmamaktadır (34). Patojen *Candida* türlerinin salgıladığı hücre dışı proteinazların doku harabiyetine bağlı olarak mayanın yayılımını desteklediği, mayanın mukozalarda

devamlı olarak kalmasını sağladığı ve mayayı organizmanın savunma sistemine karşı koruduğu belirtilmektedir (101).

Yücesoy ve ark. (102), Sığır Serum Albumin Agar (SSAA) ile yaptıkları çalışmada, oral kandidozlu hastalardan izole edilen 31 *C. albicans* suşunun 3'ünde (%9.7) iki pozitif, 16'sında (%51.6) bir pozitif proteinaz aktivitesi saptamışlardır.

Yapılan diğer çalışmalarda ise; Çerikcioğlu ve Alaçam (57) 75 *C. albicans* suşunun 65'inde (42'si bir pozitif, 23'ü iki pozitif), Erdeniz ve Gürler (103) *C. albicans*'ın etken olduğu vulvovajinal kandidozlu hastalarda izole ettikleri 31 suşun tümünde (7'si bir pozitif, 24'ü iki pozitif) proteinaz aktivitesi bulmuşlardır.

Kantarcioğlu ve Yücel (104) değişik klinik örneklerden izole edilen *Candida* türleri ile yaptıkları çalışmada, 60 *C. albicans* suşunun 57'sinde (%95) proteinaz aktivitesi saptamışlardır. Ener ve ark. (105) ise bu oranı %89.2 olarak bulmuşlardır.

Değişik klinik örnekleri kapsayan diğer *C. albicans* asit proteinaz çalışmalarında; Gülenç ve ark. (106) 113 *C. albicans* suşunun %50.4'ünde, Ergil ve Kuştimur (107) 51 *C. albicans* suşunun %49'unda, Akbaş ve ark. (108) ise 73 *C. albicans* suşunun %73.9'unda asit proteinaz aktivitesi saptamışlardır.

Suudi Arabistan'da yapılan bir çalışmada, vajinit etkeni *Candida* türlerinde asit proteinaz varlığı araştırılmış ve *C. albicans* ve *C. parapsilosis* izolatlarının tümünün (%100), *C. tropicalis* türlerinin %95'nin asit proteinaz ürettiği bildirilmiştir (109).

Yurtdışında yapılan diğer çalışmalarda ise; Röchel ve ark. (110) çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri 103 *C. albicans* suşunun 74'ünde, Chakrabarti ve ark. (111) 227 *C. albicans* suşunun %60'ında proteinaz aktivitesi gözlemlemişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, asit proteinaz aktivitesi yönünden incelenen 140 *C. albicans* suşun 130 (%92.9)'unda asit proteinaz aktivitesi pozitif, 10 (%7.1)'unda negatif bulunmuştur. Pozitif bulunan 130 suştan 114 (%81.4)'ünün (+) pozitif, 16 (%11.4)'sının (++) pozitif asit proteinaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Asit proteinaz aktivitesi negatif olarak saptanan 10 suşun, 5 tanesi idrar ve diğer 5 tanesi balgam örneklerinden izole edilmiştir. Çalışmamızda, yara (%100.0), kan (%100.0) ve vajinal sürüntü örneklerinin (%100.0) tamamında asit proteinaz aktivitesi saptanmıştır. Diğer çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da *C. albicans* suşlarında asit proteinaz varlığı oldukça yüksek saptanmıştır.

Sonuç olarak klinik örneklerden izole edilen *C. albicans* suşlarının çoğunun büyük oranda patojen olduğu gözönünde bulundurulmalıdır.

Salgısal Asit Proteinaz (*SAP*) üretimi ilk kez Staib tarafından 1965 yılında *C. albicans* kökenlerinde saptanmıştır. Kromotografik yöntemlerle saflaştırılan enzim çok sayıda aspartik asit rezidüleri içerdiği için 1993 yılında American Society for Microbiology tarafından Salgısal Aspartik Proteinaz adı ile kabul edilmiştir (52).

*C. albicans* suşlarında 1991 yılından itibaren *SAP* ailesini kodlayan birçok gen tanımlanmıştır (55, 56).

Günümüzde, *C. albicans* türünde 10 farklı *SAP* geni (*SAP1-10*) ve diğer *Candida* türlerinde de homolog genler tanımlanmıştır (53, 58, 59). *C. dubliniensis*'de 7 *SAP* geni tanımlanmış ve bu genlerin *C. albicans*'la yakın gen benzerliği bulunduğu belirlenmiş, *C. dubliniensis*'in sebep olduğu mukozal enfeksiyonlarda *SAP*'ın önemi bildirilmiştir (60).

Salgısal Asit Proteinaz'ın virülans faktör olarak değerlendirildiği çalışmalar genellikle *C. albicans* kökenleri kullanılarak yapılmış ve yapılan çeşitli çalışmalarda proteinaz enzimi üretmeyen kökenlerin üretenlere oranla virülanslarının düşük olduğu, zayıf patojen oldukları ya da patojen olmadıkları gösterilmiştir (64).

Bununla birlikte, yapılan birçok çalışma *C. albicans* kökenlerinin proteinaz aktivitesiyle, deneysel sistemik hayvan enfeksiyonlarında öldürücü etkisi arasındaki bağlantıyı açıklamayı amaçlamıştır. Genetik açıdan akraba olmayan *C. albicans* kökenlerini kullanarak yapılan bir çalışmada, proteolitik olan ve proteolitik olmayan kökenlerin farelerdeki öldürücü etkileri arasındaki fark incelenmiş ve proteolitik olan kökenlerin diğerlerine oranla daha öldürücü olduğu gösterilmiştir (65).

Çeşitli klinik ve deneysel bulgular, proteinaz enziminin *Candida* vajinitinin patogenezinde önemli bir virülans faktörü olduğunu desteklemektedir.

Kılınç ve ark. (69) yaptıkları bir çalışmada, vulvovajinal kandidozlu hastaların tümünde florometrik yöntem ile proteinaz aktivitesi saptamışlardır. Bu çalışmada *SAP2* izoenziminin vajinitlerde önemli rol oynadığı açıkça gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda, tüm trakeal aspirat ve vajinal sürüntü örneklerinde *SAP5* geni haricindeki diğer *SAP* genlerinin varlığı saptanmıştır. Özellikle asit proteinaz aktivitesi, *SAP1* (%100.0), *SAP2* (%100.0), *SAP3* (%100.0), *SAP4* (%100.0), *SAP6* (%100.0) ve *SAP7* (%100.0) genleri, vajinal sürüntü örneklerimizin

tamamında saptanmıştır. Bu sonuçlarımız Kılınç ve ark.'nın çalışmalarıyla uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda *SAP* genleri varlığı ile asit proteinaz birlikteliğine bakıldığında, *SAP5* geni pozitif 19 (%100.0) suşun, *SAP9* geni pozitif 54 (%100.0) suşun ve *SAP10* geni pozitif 51 (%100.0) suşun tamamında asit proteinaz aktivitesi varlığı saptanmıştır. Bu da proteinaz aktivitesi ile *SAP* genlerinin korelasyonunu göstermiş olup, virülanstaki rollerini açıklamaktadır.

Yapılan birçok çalışmada, aktif vajinitli hastalardan izole edilen *C. albicans* kökenlerinin aspartil proteinaz aktivitesi, taşıyıcılardan daha yüksek bulunmuştur (70, 71).

Costa ve ark. (94) yaptıkları çalışmada, flukonazol ve vorikanozole duyarlılıkları bilinen 31 *C. albicans* suşunda *SAP1*'den *SAP7*'ye kadar olan gen varlıkları ile proteinaz aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada özellikle oral kaviteden izole edilen flukonazol ve vorikanozole dirençli veya duyarlı *C. albicans* suşlarında *SAP1*'den *SAP7*'ye kadar olan genlerin varlığı açısından benzer paternler saptamışlardır.

Kalkancı ve ark. (112) kan kültürü ve vajinal sürüntü örneklerinden izole ettikleri toplam 80 *C. albicans* suşunda PCR yöntemiyle yaptıkları çalışmada, *SAP* genlerinin varlığını araştırmışlardır. Kan kültüründen izole ettikleri 40 *C. albicans* suşunda, *SAP1*, *SAP2* ve *SAP3*'ü 13 (%32.5) izolatta, *SAP4*'ü 38 (%95) izolatta, *SAP5*'i 30 (%75) izolatta ve *SAP6*'yü da 23 (%57.5) izolatta saptamışlardır. Vajinal sürüntü kültüründen izole ettikleri 40 *C. albicans* suşunda, *SAP1*, *SAP2* ve *SAP3*'ü 37 (%92.5) izolatta, *SAP4*'ü 3 (%7.5) izolatta, *SAP5*'i 3 (%7.5) izolatta ve *SAP6*'yü da 5 (%12.5) izolatta saptamışlardır. Yapılan bu çalışmada *SAP1*, *SAP2* ve *SAP3* izoenzimlerinin vajinopatik *C. albicans*'larla, *SAP4*, *SAP5* ve *SAP6* izoenzimlerinin ise sistemik enfeksiyonlara neden olan *C. albicans*'larla ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Çalışmamızda, tüm örnekler bazında bakıldığında en az *SAP5* genine rastlanılmış olup, trakeal aspirat ve vajinal sürüntü örneklerimizin hiçbirinde *SAP5* genine saptanmamıştır. Yaptığımız çalışmada vajinal sürüntü örneklerimizin tamamında *SAP1* (%100.0), *SAP2* (%100.0), *SAP3* (%100.0), *SAP4* (%100.0), *SAP6* (%100.0) ve *SAP7* (%100.0) varlığı saptanmıştır. Yine çalışmamızda, kan kültürü

örneklerimizden izole ettiğimiz suşlarda *SAP6* (%83.3) ve *SAP7* (%83.3) genlerinin varlığı yüksek oranda saptanmış olup bu sonuç Kalkancı ve ark.'nın çalışmalarıyla uyumlu bulunmuştur.

Sikora ve ark. (113) total parenteral nutrisyon alan hastalardan izole edilen 13 *C. albicans* suşu ile yaptıkları çalışmada, suşların tamamında *SAP1-3* gen varlığını pozitif olarak saptamışlardır. Ayrıca 11 suшта *SAP4* gen varlığını, 6 suшта *SAP5* gen varlığını ve 11 suшта da *SAP6* gen varlığını pozitif olarak saptamışlardır. Yapılan bu çalışmada *C. albicans* suşlarında *SAP* gen varlığı ile proteolitik aktivitenin düzeyi arasında korelasyon olduğunu ortaya koymuşlardır.

Felk ve ark. (114) yaptıkları çalışmada, *C. albicans*'lardaki *SAP* genlerinin sekans analizinde *SAP1-3* genlerinin %75 oranında, *SAP4-6* genlerinin ise %90 oranında benzerlik gösterdiğini saptamışlardır. Ayrıca bu çalışmada *SAP1-3* enzimlerinin mukozal enfeksiyonlarda, *SAP4-6* enzimlerinin ise sistemik enfeksiyonlarda oldukça önemli bir role sahip olduğunu göstermişlerdir.

Bizim yaptığımız çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 140 *C. albicans* suşundan 81 (%57.8)'inde (özellikle vajinal sürüntü örneklerinde) *SAP1*, *SAP2* ve *SAP3* birlikteliği ve 96 (%68.5) izolatta da (özellikle kan kültürü örneklerinde) *SAP4*, *SAP5* ve *SAP6* birlikteliği saptanmış olup, bu sonuç Felk ve ark.'nın çalışmalarıyla uyumlu bulunmuştur.

Joo ve ark. (115) 35'i kan kültürü ve 28'i diğer örneklerden izole edilen biyofilm varlığı pozitif olan toplam 63 *C. albicans* suşunda, *SAP5* ve *SAP9* genlerinin biyofilm üzerine etkisini araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen *C. albicans* suşlarında *SAP5* ve *SAP9* genlerinin biyofilm üretimini artırdığını ilk kez ortaya koymuşlardır. Ayrıca yine bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilen ve biyofilm üreten *C. albicans* suşlarının; diğer bölgelerden izole edilen *C. albicans* suşlarına göre *SAP9* ekspresyonunun daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda ise biyofilm pozitif olan suşlarda *SAP4* geninin varlığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0.019$ ). Diğer *SAP* genleri ile biyofilm birlikteliği arasındaki ilişki ise istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

Bizim yaptığımız çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 140 *C. albicans* suşunda genotipik olarak *SAP1-10* genlerinin varlığı PCR yöntemiyle

araştırılmıştır. *C. albicans* suşlarının 91 (%65)'inde *SAP1*, 116 (%82.9)'sında *SAP2*, 109 (%77.9)'unda *SAP3*, 111 (%79,3)'inde *SAP4*, 19 (%13.6)'unda *SAP5*, 114 (%81.4)'ünde *SAP6*, 116 (%82.9)'sında *SAP7*, 56 (%40)'sında *SAP8*, 54 (%38.6)'ünde *SAP9* ve 51 (%36.4)'inde *SAP10* gen pozitifliği saptanmıştır. Ayrıca çalışmamızda 4 idrar örneğinde *SAP1-10* genlerinin tamamının birlikte varlığı saptanmıştır. Toplam 10 örnekte hiçbir *SAP* genine rastlanmamıştır. *SAP* geni saptanmayan bu 10 örnekte 7 tanesi idrar, 1 tanesi balgam, 2 tanesi de yara örnekleri idi. *SAP* genlerinin saptanmadığı bu örneklerden izole edilen *C. albicans* suşlarında, biyofilm ve asit proteinaz aktiviteleri pozitif saptanmıştır. *SAP5* geni hiçbir trakea ve vajen örneğinde saptanmamıştır.

Çalışmamızda *SAP1-10* genlerinin varlığı ile klinik örneklerin dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

*SAP* genleri ile biyofilm saptama yöntemleri karşılaştırıldığında her üç biyofilm yöntemi ile slime faktör pozitif bulunan suşlarda, *SAP4* geninin varlığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p: 0.019$ ).

Yaptığımız çalışmada, *SAP* genleri ile asit proteinazın aynı anda varlığı karşılaştırıldığında; asit proteinaz pozitif olan suşlarda, *SAP1*, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 genlerinin varlığı, bu genleri taşımayan asit proteinaz pozitif suşlara göre daha yüksek oranlarda saptanmış olup, bu oranlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *P* değerleri sırasıyla; 0.033, <0.001, 0.001, 0.001, 0.003, <0.001, 0.05, 0.007 ve 0.014 olarak bulunmuştur. *SAP5* geni pozitif olup asit proteinaz aktivitesi olan suşlar, *SAP5* genine sahip olup asit proteinaz aktivitesi olmayan suşlardan daha fazla bulunmuştur. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Bu sonuçlarımız Sikora ve ark. (113) yaptıkları çalışma ile uyumludur. Fenotipik yöntemlerle asit proteinaz varlığını pozitif bulduğumuz *C. albicans* suşlarında yüksek olasılıkla *SAP* genlerinin de pozitif olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak, yapılan çalışmalar çoğunlukla *C. albicans*'a yönelik olmakla birlikte, *C. albicans* dışı *Candida* türlerinin de artışına paralel olarak *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* ve *C. tropicalis* türlerini içeren araştırmalar yapılmış ve patojenik *Candida* türlerinin *SAP* geni taşıdığı ve hücre dışı proteinaz ürettiği belirlenmiştir. *C. kefir*, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *C. guilliermondii* ise nadiren *SAP* enzimi

üretmektedir. *Candida* *SAP* enzimleri ile yapılan geniş kapsamlı genom çalışmalarında bu enzimin *Candida* virülansındaki önemli rolünün detaylı bir şekilde değerlendirilmesine imkan sağlayacağı belirtilmiştir. (58).

Bizim çalışmamızda *Candida* türlerinin virülans faktörlerinden biyofilm ve asit proteinaz oluşumu ile *SAP* genlerinin varlığı araştırılmıştır. *Candida* türlerindeki bu virülans faktörlerinin ve genlerinin belirlenmesinin, *Candida* enfeksiyonlarının patogenezini açıklamada oldukça yararlı olacağı kanısındayız.



## SONUÇLAR

1- Toplam 140 *C. albicans* suşu çalışmaya alındı. Suşların 15 (%10.7)'i poliklinik hastalarına, 125 (%89.3)'i yatan hastalara ait örneklerden izole edildi. Klinik örneklerin 63 (%45)'ü kadın ve 77 (%55)'si erkek hastalara aitti. Suşların %55.7'si idrar, %15.7'si balgam, %10'u yara, %8.6'sı kan, %7.9'u trakeal aspirat ve %2.1'i vajinal sürüntü örneklerinden izole edildi.

2- Çalışmaya dahil edilen *C. albicans* suşları en sık Anestezi Yoğun Bakım Ünitesi'ne (%22.1) ait örneklerden izole edildi. Ayrıca sıklık sırasına göre suşların %10'u Pediatri Bölümü'ne, %9.3'ü Üroloji Servisi'ne, %9.3'ü Nefroloji Servisi'ne, %8.6'sı Göğüs Hastalıkları Servisi'ne, %6.4'ü Pediatri Yoğun Bakım Ünitesi'ne, %5.7'si Kalp Damar Yoğun Bakım Ünitesi'ne, %5.7'si Enfeksiyon Hastalıkları Servisi'ne ve %22.9'u diğer servislere ait klinik örneklerden izole edildi.

3- Çalışmaya dahil edilen 140 *C. albicans* suşu, Kongo Kırmızılı Beyin Kalp İnfüzyon Agar, Mikroplate ve Modifiye Tüp Aderans yöntemleriyle biyofilm varlığı açısından değerlendirildi. Her üç yöntemde de biyofilm varlığı pozitif olan 49 (%35) suş saptandı.

4- Çalışmaya dahil edilen suşların biyofilm aktivitelerinin mikroplate yöntemiyle tespitinde incelenen 140 suşun 123 (%87.9)'ünde biyofilm aktivitesi pozitif, 17 (%12.1)'sinde negatif bulundu. Pozitif bulunan 123 suşun 93 (%66.4)'ü (+) pozitif, 17 (%12.1)'si (++) pozitif, 13 (%9.3)'ü (+++) pozitif biyofilm aktivitesine sahip olduğu görüldü.

5- Çalışmaya dahil edilen suşların biyofilm aktivitelerinin modifiye tüp aderans yöntemiyle tespitinde incelenen 140 suşun 89 (%63.6)'ünde biyofilm aktivitesi pozitif, 51 (%36.4)'inde negatif bulundu. Pozitif bulunan 89 suşun 40 (%28.6)'ı (+) pozitif, 31 (%22.1)'i (++) pozitif, 18 (%12.9)'i (+++) pozitif biyofilm aktivitesine sahip olduğu görüldü.

6- Kongo Kırmızılı Beyin Kalp İnfüzyon (KKBKI) Agar yöntemiyle biyofilm aktiviteleri incelenen 140 *C. albicans* suşunun 72 (%51.4)'sinde biyofilm aktivitesi pozitif, 68 (%48.6)'inde negatif bulundu.

7- Asit proteinaz aktivitesi yönünden incelenen 140 *C. albicans* suşun 130 (%92.9)'unda asit proteinaz aktivitesi pozitif, 10 (%7.1)'unda negatif bulundu.

Pozitif bulunan 130 suştan 114 (%81.4)'ü (+) pozitif, 16 (%11.4)'sı (++) pozitif asit proteinaz aktivitesine sahip olduğu görüldü.

8- İzole edilen 140 *C. albicans* suşunda genotipik olarak *SAP1-10* genlerinin varlığı PCR yöntemiyle araştırıldı. *C. albicans* suşlarının 91 (%65)'inde *SAP1*, 116 (%82.9)'sında *SAP2*, 109 (%77.9)'unda *SAP3*, 111 (%79,3)'inde *SAP4*, 19 (%13.6)'unda *SAP5*, 114 (%81.4)'ünde *SAP6*, 116 (%82.9)'sında *SAP7*, 56 (%40)'sında *SAP8*, 54 (%38.6)'ünde *SAP9* ve 51 (%36.4)'inde *SAP10* gen pozitifliği saptandı.

9- Tüm *SAP* genlerinin varlığı 4 suşta saptandı. Bunların tamamı idrar örnekleri idi.

10- Toplam 10 örnekte hiçbir *SAP* genine rastlanmamıştır. *SAP* geni saptanmayan bu 10 örnekten 7 tanesi idrar, 1 tanesi balgam, 2 tanesi de yara örnekleri idi.

11- Çalışmamızda *SAP1-10* genleri, asit proteinaz, KKBI agar ve modifiye tüp aderans yöntemleri ile klinik örneklerin dağılımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $p>0.05$ ). Ancak modifiye mikropate yöntemiyle klinik örnek dağılımına bakıldığında; en fazla idrar örneklerinde, en az oranda ise vajen örneklerinde biyofilm pozitifliği tespit edildi ve bu oranlar da istatistiksel olarak anlamlı saptandı ( $p=0.037$ ).

12- *SAP* genleri ile biyofilm birlikteliği karşılaştırıldığında her üç biyofilm yöntemi ile pozitif bulunan suşlarda, *SAP4* geninin varlığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0.019$ ).

13- *SAP* genleri ile asit proteinazın aynı anda varlığı karşılaştırıldığında; asit proteinaz pozitif olan suşlarda, *SAP1*, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10 genlerinin varlığı, bu genleri taşımayan asit proteinaz pozitif suşlara göre daha yüksek oranlarda saptandı ve bu oranlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.05$ )

14- Çalışmamızda ayrıca asit proteinaz varlığı ile her üç biyofilm saptama yöntemi karşılaştırıldığında oranlar arasında herhangi bir istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p>0.05$ ).

## KAYNAKLAR

1. Aynalı A. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde izole edilerek tiplendirilen *Candida*'larda virulans faktörlerinin araştırılması ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi (Tıpta Uzmanlık Tezi). Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2010.
2. Yücel A, Kantarcıoğlu S. Hastane kaynaklı mantar infeksiyonlarının epidemiyolojisi. Cerrahpaşa J Med 2001; 32: 259-569.
3. Hazen KC. New and emerging yeast patogen. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 462- 478.
4. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ et al. SENTRY Participant Group: International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. J Clin Microbiol 2001; 39: 3254-3259.
5. İnci R. *Candida* infeksiyonlarının patogeneğinde konağın rolü. *Candida* mikrobiyolojisi ve infeksiyonları simpozyumu (21-22 Haziran 2002, Eskişehir) Kitabı. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti 2002; 71-83.
6. Ener B. *Candida* infeksiyonlarının patogenezi: Etkenin rolü. *Candida* mikrobiyolojisi ve infeksiyonları simpozyumu (21-22 Haziran 2002, Eskişehir) Kitabı. İstanbul: Türk Mikrobiyol Cem 2002; 65-70.
7. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Kandidaların patojenlik belirtgenleri. Cerrahpaşa J Med 2000; 31: 172-186.

8. Birinci A, Çekiç Cihan Ç, Bilgin K, Acuner Ç, Durupınar B. *Candida* türlerinde slime üretiminin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2005; 35: 163- 166.
9. Kuştımur S. *Candida*'da virulans faktörleri. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (4-6 Mayıs 1999, İzmir) Tutanaklarda. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi 1999; 145-50.
10. Arslan U, Fındık D. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virulans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in-vitro araştırılması. İnfek Derg 2003; 17(4): 471-481.
11. Calderone RA. Introduction and historical perspectives. In: Calderone RA, ed. *Candida and Candidiasis*. 1st ed. Washington DC, Am Soc Microbiol Press 2002; 3-13.
12. John E, Edwards JR. *Candida* species. In: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Fifth edition. Pennsylvania, Churchill Livingstone 2000; 2656-2674.
13. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Lippincott Philadelphia New York 1997; 983-1069.
14. Calderone RA. Taxonomy and biology of *Candida*. In: Calderone RA, ed. *Candida and Candidiasis*. 1st ed. Washington DC, Am Soc Microbiol Press 2002; 15-27.
15. Gürbüz M. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* kökenlerinin moleküler analizi (Tıpta Uzmanlık Tezi). Denizli: Pamukkale Üniversitesi; 2008

16. Herrera JR, Elorza MV, Valentin E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. FEMS Yeast Res 2006; 6: 14–29.
17. Yücel A. Medical mycology: Yesterday and Today. Cerrahpasa J Med 1999; 30 (2): 191-198.
18. Gökçe RG. Kandidemi olgularından izole edilen *Candida* türlerinin virülans faktörlerinin araştırılması (Doktora Tezi). İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2006.
19. Ener B. Hastane infeksiyonu etkeni olarak mantarlar. Ed: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi (Cilt 2). İnfeksiyon Hastalıkları, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2002; 1125-1128.
20. Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce F. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. BMC Infec Dis 2006; 6 (21): 1-6.
21. Deborah LRY, Coleman R, Lindsay EN, Stratis I. *Candidemia* at selected Canadian sites: result from the fungal disease registry, 1992-1994. CMAJ 1999; 160(4): 493-499.
22. Stamos JK, Rowley AH. Candidemia in a pediatric population. Clin Infect Dis 1995; 20 : 571-575.
23. Cheng YR, Lin LC, Young TG, Liu CE. Risk factors for candidemia related mortality at a medical center in central Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2006; 39: 155-161.

24. Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ et al. International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J Clin Microbiol 2001; 39(9) : 3254–3259.
25. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Fluit AC, Verhoef J, Sader HS et al. International surveillance of blood stream infections due to *Candida* species in the European SENTRY program: species distribution and antifungal susceptibility including the investigational triazole and echinocandin agents. SENTRY Participant Group (Europe). Diagn. Microbiol Infect Dis 1999; 35(1): 19-25.
26. Erbakan N. Derinin mantar hastalıkları. Ankara, Türkiye Klinikleri Yayınevi 1989; 1-332.
27. Edwards JE. *Candida* Species. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, eds. Principles and Practice of Infectious Disease. Vol 2. New York, Churchill Livingstone 1995; 2289-2306.
28. Trier JS, Bjorkmann DJ. Esophageal, gastric and intestinal candidiasis. Am J Med 1984; 30: 39-43.
29. Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. Antifungal drug susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 1993; 6: 367-381.
30. Bengisun JS, Palabıyıkloğlu İ, Akan H. Hematoloji kliniği kan kùltùr sonuçları. 9. Tùrk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Antalya, Kongre Kitabı 1999; 284.
31. Tekerekođlu MS, Durmaz B, Taştekin N, Otlu B. Otomatize kan kùltùr sistemi ile üç yıllık dönemde alınan sonuçların değerlendirilmesi. 9. Tùrk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Antalya, Kongre Kitabı 1999; 202.

32. Hoşoğlu S. Nozokomiyal hematojen kandidoz. I. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, İzmir, Kongre Kitabı 1999; 157-165.
33. Tümbay E. Kandida türleri. Ustaçalebi Ş, ed. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Öncü basımevi. Güneş Kitabevi 1999; 1081-1085.
34. Kuştimur S. Kandida patogeneğinde rol oynayan faktörler. Mikrobiyol Bult 1994; 28: 175-181.
35. Kirkpatrick CH. Host factors in defence against fungal infections. Am J Med, 1984; 30: 1-12.
36. Öztaş M. *Ptryasis versicolor* ve *Candida* infeksiyonları. 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Ankara, Kongre Kitabı 2001; 85-89.
37. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. *Candida albicans*'ta mannan: çeşitli özellikleri ve önemi. Cerrahpaşa J Med 2004; 35: 42-45.
38. Critchley IA, Kouglass JL. Isolation and partial characterization of an adhesin from *Candida albicans*. J Gen Microbiol 1978; 133: 629-632.
39. Odds FC. Presidential address. *Candida albicans*, the life and times of a pathogenic yeast. J Med Vet Mycol 1994; 32(1): 1-8.
40. Arıkan S. Mantarlarda pleomorfizm. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı; 27-30 Mayıs, 2003; Bodrum, Türkiye. Türk Mikrobiyol Cem Yayını 2003; 46: 77-86.
41. Ghannoum MA, Abu-Elteen KH. Patogenicity determinants of *Candida*. Mycoses 1990; 33: 268-282.

42. Kiraz N. *Candida* türlerinde fenotipik ve genotipik tiplendirme. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, İzmir, Kongre Kitabı 1999; 125-135.
43. Cengiz SA, Us E, Cengiz AT. Slime faktörünün klinikteki yeri ve önemi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2006; 13(3): 193-197.
44. Yandımalamadım S. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen infeksiyon etkeni *Candida* türlerinin virulans faktörlerinin (slime üretimi, hemolitik aktivite, proteinaz, fosfolipaz, esteraz, lipaz enzimleri) araştırılması. Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İstanbul 2004.
45. Özcan SK. Tıbbi gereçlerle ilişkili *Candida* biyofilm ve enfeksiyonları. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007; 27: 589-600.
46. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 167-193.
47. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. J Med Microbiol 2006; 55: 999-1008.
48. Yakupoğulları Y, Aşçı Toraman Z. Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Candida* kökenlerinde slime faktörü üretiminin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34: 178-181.
49. Green CB, Zhao X, Yeater KM, Hoyer LL. Construction and real-time RT-PCR validation of *Candida albicans* PALS GFP reporter strains and their use in flow cytometry analysis of *ALS* gene expression in budding and filamenting cells. Microbiol 2005; 151: 1051-1060.



50. Sundstrom P. Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* 2002; 4: 461-469.
51. Staab JF, Bradway SD, Fidel PL, Sundstrom P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* *Hwp1*. *Science* 1999; 283: 1535-1538.
52. Borg M, Röchel R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* spp. during experimental infection of oral mucosa. *Infect Immun* 1988; 56(3): 626-631.
53. Yang YL. Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect* 2003; 36: 223-228.
54. Banerjee A, Ganesan K, Datta A. Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1991; 137(10): 2455-2461.
55. Magee BB, Hube B, Wright RJ, Sullivan PJ, Magee PT. The genes encoding the secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* constitute a family with at least three members. *Infect Immun* 1993; 61(8): 3240-3243.
56. Monod M, Hube B, Hess D, Sanglard D. Differential regulation of *SAP8* and *SAP9*, which encode two new members of the secreted aspartic proteinase family in *Candida albicans*. *Microbiology* 1998; 144: 2731-2737.
57. Çerikçioğlu N, Alaçam R. Detection of secretory acid proteinase enzyme from *Candida* strains on protein supplemented agar media. *Mikrobiol Bult* 1993; 27: 344-351.
58. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trend Microbiology* 2001; 9(12): 591-596.
59. Odds FC. *Candida* species and virulence. *Features* 1994; 60(6): 313-318.

60. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005; 48: 365-367.
61. Fusek M, Smith EA, Monod M, Foundling SI. *Candida parapsilosis* expresses and secretes two aspartic proteinases. *FEBS* 1993; 37(1): 108-112.
62. Skrbec D, Romeo D. Inhibition of *Candida albicans* secreted aspartic protease by a novel series of peptidomimetics, also active on the HIV-1 protease. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 1350-1353.
63. Bernardis FD, Sullivan PA, Cassone A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Medical Mycology* 2001; 39: 303-313.
64. Pichova I, Pavlickova L, Dostal J, Dolejsi E, Hruskova-Heidingsfeldova O, Weber J, et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitaniae* ; Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur. J Biochem* 2001; 268: 2669-2677.
65. Ray TL, Payne CD. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun* 1990; 58: 508-514.
66. Kwon-Chung KJ, Lehman D, Good K, Magee PT. Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1985; 49(3): 571-575.
67. Edison AM, Manning-Zweering M. Comparison of the extracellular proteinase activity produced by a low-virulence mutant of *Candida albicans* and its wild-type parent. *Infect Immun* 1988; 56(5): 1388-1390.
68. Ghannoum M, Elteen KA. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strain of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 1986; 24: 407-413.

69. Kılıç N, Kuştimur S, Arslan S, Aldemir H. Fluorometric determination of acid proteinase activity in vulvovaginal candidosis. *Mycoses* 1996; 39: 347-351.
70. Bernardis FD, Mondello F, Ceddia T, Agatensi L, Cassone A. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *J Infect Dis* 1987; 156(5).
71. Bernardis FD, Morelli L, Ceddia T, Lorenzini R, Cassone A. Experimental pathogenicity and acid proteinase secretion of vaginal isolates of *Candida parapsilosis*. *J Med Vet Mycol* 1990; 28: 125-137.
72. Bernardis F, Mondello F, Millan RS, Ponton J, Cassone A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1999; 37(11): 3481-3486.
73. Hilmioğlu S. *Candida* infeksiyonlarının laboratuvar tanısı: Klasik tanıda izlenecek yol ne olmalı? *Candida* mikrobiyolojisi ve infeksiyonları simpozyumu Eskişehir: Kongre Kitabı 2002; 125-133.
74. Mers WG, Roberts GD. Algorithms for detection and identification of fungi. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington DC: American Society for Microbiology press 2003; 1668-1685.
75. Yıldırım ŞT. Mantar İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanı. Editörler: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi 1999; 1129-1144.
76. Yücel A, Kantarcıoğlu S. Some important changes in taxonomy of *Candida albicans*. *Cerrahpaşa J Med* 2000; 30: 236-246.

77. Willinger B, Hillowoth C, Selitsch B, Manafi M. Performance of *Candida* ID, a new chromogenic medium for presumptive identification of *Candida* species, in comparison to CHROMagar *Candida*. J Clin Microbiol 2001; 39: 3793-3795.
78. Alam FF, Mustafa AS, Khan ZU. Comparative evaluation of (1, 3)- $\beta$ -D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. BMC Infect Dis 2007; 7: 103-111.
79. Çerikçioğlu N. Mantar İnfeksiyonlarında Seroloji ve Deri Testleri. Editörler: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi 1999; 1145-1158.
80. Reiss E, Obayashi T, Orle K, Yoshida M, Zancope-Oliveira RM. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. Med Mycol 2000; 38(1): 147-159.
81. Costa MRE, Lacaz CDS, Kawasaki M, Camargo ZP. Conventional versus molecular diagnostic tests. Med Mycol 2000; 38(1): 139-145.
82. Saraçlı MA. Mikozların Moleküler Tanısı: Neredeyiz? 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Konya: Kongre Kitabı 2005; 33-45.
83. Hughes T, Rogers TR, Haynes K. PCR Diagnostics in medical mycology. In: Bridge PD, Arora DK, Reddy CA, Elander RP, editors. Applications of PCR in mycology. CABI Publishing 1998; 267-287.
84. Kalkancı A. Etken Mantarların Klinik Örnekte Moleküler Yöntemlerle Gösterilmesi ve Tanımlanması. 4. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara: Kongre Kitabı 2006; 132-143.
85. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of *Candidemia*: Comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. J Clin Microbiol 2002; 40: 2483-2489.

86. Arıkan S. Mantar enfeksiyonlarında tanı yöntemleri. Ed: Günalp A, Yılmaz YA, Pınar A. Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvar eğitim kitabı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara 2003; 139-164.
87. Karakoç E. Çeşitli *Candida* türlerinin dört değişik antifungale duyarlılıklarının mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniv. Tıp Fak. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. Erzurum 2007.
88. Branchini ML, Pfaller MA, Chalberg JR, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 1994; 32(2): 452-456.
89. Hilmioğlu S, İlkit M, Çavuşoğlu C, Aydemir Ş, Tümbay E. *Candida* kökenlerinde slaym (slime) üretiminin üç ayrı yöntemle gösterilmesi ve slaym üretiminin kristal viyole reaksiyonu ile ilişkisi. İnfek Derg 1999; 13: 183-6.
90. Freeman DJ, Falkner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative *Staphylococci*. J Clin Pathol 1989; 42: 872-4.
91. Cevahir N, Demir M, Kaleli İ, Gürbüz M, Tikvesli S. Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. J Microbiol Immunol Infect 2008; 41: 513-518.
92. Ray TL, Payne CD. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. Infect Immun 1990; 58: 508-514.
93. Balaban N, Karahan ZC, Mumcuoğlu İ, Çayırılı A, Kuştimur S. *Candida albicans* 25S intron genotipleri ile antifungal duyarlılıkları arasındaki ilişkinin araştırılması. Mikrobiyol Bult 2007; 2: 245-251.
94. Costa CR, Jesumo RSA, Lemos J, Fernandes OFL. Effects of antifungal agents in SAP activity of *Candida albicans* isolates. Mycopathol 2010; 169: 91-98.

95. Sikora M, Dabkowska M, Swoboda-Kopec E, Jarzynka S, Netsvyetayeva I, Jaworska-Zaremba M, et al. Differences in proteolytic activity and gene profiles of fungal strains isolated from the total parenteral nutrition patients. *Folia Microbiol* 2011.
96. Schaller M, Bein M, Korting HC, Baur S, Hamm G, Monod M, et al. The secreted aspartyl proteinases *SAP1* and *SAP2* cause tissue damage in an in vitro model of vaginal *candidiasis* based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun* 2003; 3227-3234.
97. Yıldırım M, Mumcuoğlu İ, Kurşun Ş, Koldaş K, Yetener V, Balaban N. İnfeksiyon etkeni olarak izole edilen *C. albicans* ve *Non-albicans Candida* suşlarındaki bazı virulans faktörlerinin karşılaştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2009; 39(3-4): 62-68.
98. Raad II. The pathogenesis and prevention of central venous catheter-related infections. *Middle East J Anesthesiol* 1994; 12: 381-403.
99. Yücesoy M, Karaman M. *Candida* türlerinin biofilm üretimi ve antifungal duyarlılık paternleri. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Kitabı 2003; 360.
100. Cevahir N, Demir M, Mete E, Kaleli İ. *Candida* suşlarında farklı yöntemlerle slime üretiminin araştırılması. *İnfeks Derg* 2003; 17(1): 67-70.
101. Kuştimur S. Kandidalarda proteinaz aktivitesinin virulans ile ilişkisi. *Gazi Üniv Tıp Fak Derg* 1987; 3: 221-7.
102. Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ N. Sağlıklı bireylerden ve oral kandidiazisli olgulardan izole edilen *Candida albicans* türlerinde proteinaz aktivitesinin incelenmesi. *Mikrobiyol Bult* 2001; 35: 443-50.

103. Erdeniz H, Gürler B. *Candida albicans* suşlarının proteinaz aktivitesi ile vulvovajinal kandidoz arasındaki ilişkinin araştırılması. İnfek Derg 1998; 12: 389-92.
104. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Mycoses 2002; 45: 160-5.
105. Ener B, Eskiürk A, Aydın Ö, Delialioğlu N, Berkıroğlu N, Quint W. Çeşitli *Candida albicans* izolatlarını suş düzeyinde tiplendirmede virulans faktörlerinin rolü. Mikrobiyol Bult 1996; 30: 391-8.
106. Gülenç S, Karadenizli A, Kolaylı F, Bingöl R. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen maya türlerinde slime faktörü ve proteinaz aktivitelerinin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2003; 33: 235-8
107. Ergin M, Kuştimur S. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarında proteinaz aktivitesinin kazein agar yöntemi ile gösterilmesi. Mikrobiyol Bult 1994; 28: 338-44.
108. Akbaş E, Karabıçak N, Güvener E. *Candida* türlerinde salgısal asit proteinaz varlığının araştırılması. KLİMİK Derg 1997; 10: 127-9.
109. Al-Hedaihty SS. Spectrum and proteinase production of yeasts causing vaginitis in Saudi Arabian women. Med Sci Monit 2002; 8: 498-501.
110. Röchel R, Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA, Cole GT. *Candida* acid proteinases. Sabouraudia 1992; 30: 123-32.
111. Chakrabarti A, Nayak N, Talwar P. In vitro proteinase production by *Candida* species. Mycopathol 1991; 114: 163-8.
112. Kalkancı A, Bozdayı G, Biri A, Kuştimur S. Distribution of secreted aspartyl proteinases using a polymerase chain reaction assay with *SAP* spesific primers in *Candida albicans* isolates. Folia Microbiol 2005; 50(5): 409-413.

113. Sikora M, Dabkowska M, Swoboda-Kopec E, Jarzynka S, Netsvyetayeva I, Jaworska-Zaremba M, et al. Differences in proteolytic activity and gene profiles of fungal strains isolated from the total parenteral nutrition patients. *Folia Microbiol* 2011.
114. Felk A, Kretschmar M, Albrecht A, Schaller M, Beinhauer S, Nichterlein T, et al. *Candida albicans* hyphal formation and the expression of the EFG-1- regulated proteinases *SAP4* to *SAP6* are required for the invasion of parenchymal organs. *Infect Immun* 2002; 70: 3689–3700.
115. Joo MY, Shin JH, Jang HC, Song ES, Kee SJ, Shin MG, et al. Expression of *SAP5* and *SAP9* in *Candida albicans* biofilms: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *Medical Mycology* 2013; 51: 892-896.