



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
CANDIDA İZOLATLARINDA BİYOFİLM OLUŞUMU
VE ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ
BELİRLENMESİ**

SEDA ACAR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
TİBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2018

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
CANDIDA İZOLATLARINDA BİYOFİLM OLUŞUMU
VE ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ
BELİRLENMESİ

Seda ACAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat ARAL

Jüri Üyesi
Doç. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL

KAHRAMANMARAŞ 2018

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Seda ACAR tarafından hazırlanan “Çeşitli klinik örneklerden izole edilen candida izolatlarında biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi “adlı bu tez, jürimiz tarafından 02 / 11 / 2018 tarihinde oy birliği ile Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Murat ARAL (DANIŞMAN)

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KSÜ

Doç.Dr.Kezban Tülay YALÇINKAYA (ÜYE)

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KSÜ

Prof.Dr. Tekin KARSLIGİL (ÜYE)

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, GAÜN

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Mehmet BOŞNAK

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada alıntı yapılan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Seda ACAR



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2017/1-65 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı,5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER

Yüksek Lisans eğitimin ve tez çalışmalarım sürecinde mesleki konularda bilgi birikimi ve tecrübeleriyle yol gösteren, insani yaklaşım ve hoş görüşüyle her konuda desteğini esirgemeyen, bilimselliği ve çalışma disiplini örnek aldığım tez danışmanım saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Murat Aral'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim sürecinde deneyimlerini ve bilgi birikimleri ile her türlü yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım, Sayın Doç. Dr. Kezban Tülay YALÇINKAYA, Dr. Öğr. Üyesi Filiz ORAK, Prof. Dr. Ekrem Kireççi, Doç. Dr. Dolunay Gülmez Kıvanç'a teşekkür ederim.

Tezimin istatistiksel aşamasında yardımda bulunan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Adem DOĞANER'e teşekkür ederim.

Her anımda yanımda olan maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen bugünümü borçlu olduğum aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma süresince bana yardımcı olan ve emeği geçen herkese

Tez çalışmam süresince deneyim ve tecrübeleriyle katkıda bulunan Kahramanmaraş Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında görev yapan tüm çalışanlara teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırma, 2017/1-65 YLS kodlu proje olarak Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.

KASIM-2018

Seda ACAR

ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN CANDİDA İZOLATLARINDA BİYOFİLM OLUŞUMU VE ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEDA ACAR

ÖZET

Candida türleri sağlıklı bireylerde üst solunum yollarında, gastrointestinal sistemde, vajen ve deride normal flora üyeleridir. Sağlıklı kişilerde bulunabilmelerinin yanısıra, bağışıklık sistemi baskılanmış olan bireylerde fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilirler.

Bu çalışmada amacımız Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen klinik örneklerden izole edilen 60 *candida albicans* türünde biyofilm oluşumu tespit etmek ve antifungal duyarlılıklarını belirlemektir.

Biyofilm oluşuma yeteneği Kongo Kırmızısı agar ve mikroplakta XTT indirgenmesi yöntemiyle araştırılmıştır. Kongo kırmızısı agar yönteminde hemde Mikroplakta XTT indirgenmesi yönteminde suşların 29'u (%47,5) pozitif, 32'si (%52,4) negatif olarak tespit edilmiştir. Biyofilm pozitif olan bu suşların 10'u zayıf biyofilm(%34,4), 15'i orta biyofilm(%51,7),4'ü güçlü biyofilm(%13,7) olarak tespit edilmiştir. Suşların amfoterisin B, vorikonazol, flukonazol, kaspofungin, flusitozin duyarlılıkları The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) definitive document E.DEF 7.3.1 Broth dilüsyon metoduna göre araştırılmıştır. Antifungal ilaçların MİK aralıkları vorikonazol için 0,032->4 mg/L,flukonazol için 0,064->64 mg/L,amfoterisin B için 1->4 mg/L aralığında bulunmuştur. Vorikonazol için suşların 53'ü(%88,3)dirençli, amfoterisin B için 56'sı (%93,3) dirençli, flukonazol için 6'sı (%10) dirençli olarak tespit edilmiştir. Kaspofungin için MİK aralığı <0,008->4 mg/L flusitozin için 0.064->64mg/L aralığında elde edilmiştir ancak EUCAST kaspofungin ve flusitozin için tam bir MİK değeri belirtmediğinden dirençli ve duyarlı suş sayısı belirlenememiştir. Sonuç olarak amfoterisin B ve vorikonazole yüksek oranda direnç saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Antifungal ajan, Biyofilm, *Candida*,

Sayfa Adedi:84

Danışman: Prof. Dr. Murat Aral

**DETERMINATION OF BIOFILM FORMATION AND ANTI-FUNGAL
SENSITIVITY IN CANDIDA STRAINS ISOLATED FROM VARIOUS CLINICAL
SAMPLES**

MASTER THESIS

SEDA ACAR

ABSTRACT

Candida species are normal flora members in the upper respiratory and gastrointestinal tract, vagina and skin in healthy individuals. However, they may cause opportunistic infections in immunocompromised individuals. The aim of this study was to determine the biofilm formation and antifungal susceptibility of 60 *Candida albicans* strains isolated from clinical samples in Kahramanmaraş Sütçü İmam University Health Practice and Research Hospital Clinical Microbiology Laboratory. Biofilm formation was investigated using Congo Red agar and XTT reduction method. In both methods, 29 (47.5%) of the strains were positive and 32 (52.4%) were negative. Of the biofilm-positive strains, biofilm production level was weak in 10 strains (34.4%), moderate in 15 strains (51.7%) and strong in 4 strains (13.7%). The susceptibility of strains to amphotericin B, voriconazole, fluconazole, caspofungin and flucytosine were investigated according to the EUCAST Definitive Document 7.3.1 (method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts). MIC ranges of antifungal drugs were 0.032- >4 mg/L for voriconazole, 0.064- >64 mg/L for fluconazole and 1- >4 mg/L for amphotericin B. The number of voriconazole, amphotericin B and fluconazole resistant strains were 53 (88.3%), 56 (93.3%) and 6 (10%), respectively. MIC ranges were <0.008- >4 mg/L for caspofungin and <0.064->64mg/L for flucytosine. Since the EUCAST's threshold values do not include caspofungin and flucytosine, the number of resistant and susceptible strains for these antifungals has not been determined. As a result, high resistance to amphotericin B and voriconazole was detected.

Keywords: Antifungal agents, Biofilm, *Candida*

Page Number: 84

Supervisor: Prof. Dr. Murat Aral

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜRLER.....	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Tarihçe.....	2
2.2. Mantarların Genel Özellikleri.....	2
2.3. Candida Türlerinin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	3
2.4. Candidaların Virülans Faktörleri	5
2.4.1. Hücre yüzeyine yapışma	5
2.4.2. Maya-hif dimorfizm.....	6
2.4.3. Fenotipik değişim	6
2.4.4. Biyofilm Oluşumu	6
2.5. Biyofilmler.....	6
2.5.1. Tanım	6
2.5.2. Tarihçe	7
2.5.3. Biyofilm	8
2.5.4. Biyofilm Oluşumu	9
2.6. Fungal Biyofilm Oluşumu	9
2.7. Biyofilm gelişiminin genetik kontrolü	10
2.8. Biyofilm Enfeksiyonları	11
2.9. Biyofilm Oluşumunu İncelemek İçin Kullanılan Yöntemler	12
2.9.1. Modifiye tüp adherans yöntemi.....	12
2.9.2. Mikroplak yöntemi	12
2.9.3. Kongo kırmızı agar yöntemi	13
2.9.4. XTT redüksiyon yöntemi	13
2.9.5. Diğer yöntemler.....	13
2.10. Candida İmmünolojisi	13

2.11. Mantar Etkenlerinde Tedavi	14
2.11.1. Tedavide kullanılan antifungaller	14
2.12. Mayalar için Antifungal duyarlılık testleri	15
2.13. Candida Türlerinde Antifungal Direnç.....	17
2.13.1. Amfotersin B direnci:	17
2.13.2. Azol grubu direnci	17
2.13.3. Ekinokandinlere direnç	18
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	19
3.1. Maya suşları.....	19
3.1.1. Primer izolasyon	19
3.1.2. İdentifikasyon	20
3.1.2.1. Germ tüp (çimlenme borusu) testi.....	20
3.1.2.2. Kromojenik besiyeri	20
3.1.2.3. Phoenix Mikroorganizma Tanımlama Sistemi	20
3.2. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi.....	21
3.2.1. Kongo kırmızısı agar ile biyofilm oluşumunun test edilmesi	22
3.2.2. Mikroplakta XTT indirgenmesi ile biyofilm varlığının test edilmesi	23
3.3. Mayaların Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	26
3.3.1. Besiyerinin hazırlanması.....	26
3.3.1. Stok solüsyonlarının hazırlanması.....	27
3.3.2. Çalışma solüsyonunun hazırlanması.....	28
3.3.3. Mikrodilüsyon plaklarının hazırlanması	29
3.3.4. Mikrodilüsyon plaklarının saklanması.....	30
3.3.5. Maya inokulumünün hazırlanması	30
3.3.6. Mikrodilüsyon Plaklarının inokülasyonu.....	30
3.3.7. Mikrodilüsyon Plaklarının İnkübasyonu.....	30
3.3.8. Sonuç Okuma	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. Kongo Kırmızısı Agar ile Biyofilm Oluşumunun Test Edilmesi Sonucu.....	32
4.2. Mikroplakta XTT İndirgenmesi Yöntemiyle Biyofilm Varlığının Test Edilmesi Sonucu	33
4.3. Mikroplakta XTT İndirgenmesi ile Kongo Kırmızısı Agar yöntemi Biyofilm Sonucunun Karşılaştırılması.....	33
4.4. Antifungal Duyarlılık Testi Sonuçları.....	34

4.4.1. Amforterisin B ile yapılan çalışma sonucu	34
4.4.2. Flukonazol ile yapılan çalışma sonucu	36
4.4.3. Vorikonazol ile yapılan çalışma sonucu	37
4.4.4. Fulsitozin ile yapılan çalışma sonucu	39
4.4.5. Kaspofungin ile yapılan çalışma sonucu.....	40
4.4.6. İstatistiksel Analiz	42
5.TARTIŞMA	43
5.1. Kongo Kırmızısı Agar ile Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi.....	44
5.2. Mikroplakta XTT İndirgenmesi Yöntemiyle Biyofilm Test Edilmesi.....	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
7. KAYNAKLAR.....	55
8. ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ.....	68
9. TABLOLAR DİZİNİ.....	70
10. EKLER DİZİNİ.....	71
11.EKLER.....	71
12.ÖZGEÇMİŞ	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC	: ATP-Binding Casette
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ALS	: Agglutinin like sequences
AMB	: Amfoterisin B
CFU	: Colony Formit Unit
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CLSM	: Confocal Laser Scanning Microscopy
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
ECM	: Extracellular Matrix
EUCAST	: European Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing
FLU	: Flukonazol
Hwp	: Hyphal wall protein
KSP	: Kaspofungin
MFS	: Majör Facilitator Superfamily
mg	: Miligram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
mm	: Milimolar
MOPS	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazolyum bromür
MTL	: Mating like lokus
MTT	: 3-(4,5 dimetitiazol-2 il) 2,5-difeniltetrazolium bromür
NaOH	: Sodyum Hidroksit
Nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PVC	: Polivinil klorür
rpm	: Rate per minute
SAP	: Secreted Aspartate Proteinases
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
SEM	: Scanning Electron Microscopy
SF	: Serum Fizyolojik
XTT	: 2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5 karboksalinit
YPD	: Yeast Peptone Dextroz
VOR	: Vorikonazol

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Candida türleri insan deri ve mukoza florasında yer alan mikroorganizmalardır. Normal bireylerin %50'sinin ağız ve gastrointestinal sistemlerinde bulunmaktadır. Predispozan faktörlerin varlığında kandidoz olarak tanımlanan yüzeysel veya derin, akut veya kronik infeksiyonlara sebep olurlar.

Candida türleri sistemik mikoz etkenleri arasında önemli ölçüde yer almaktadır. *Candida* türlerinin bazıları insanda infeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. İnsanda hastalık oluşturan türler arasında ilk sırada *C.albicans* yer almaktadır. Diğer önemli türler ise; *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.kefyr*, *C.krusei*, ve *C.glabrata*'dır (1).

Yapılan invaziv girişimler, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, immün süpresif tedaviler, HIV ile infekte popülasyonun artması gibi çeşitli nedenler fungal infeksiyon görülme sıklığını artırmaktadır (2).*Candida* enfeksiyonunda görülen morbidite ve mortalite oranlarının artması, proteaz, esteraz, fosfolipaz, biyofilm gibi virülans faktörlerine karşı araştırmacıların dikkatini çekmeyi başarmıştır (3).

Bu durum *Candida*'ya ait virülans faktörlerinin önemini ortaya koymuş yeni tedavi yöntemleri araştırılmaya başlanmıştır (4).Bu nedenle biyofilm varlığında antifungal ajanların etkilerinin çok iyi bilinmesi tedavinin başarısı açısından oldukça önemlidir.

Yaptığımız çalışmada çeşitli (idrar,kan,trakeal asperat vb) klinik örneklerden izole edilen infeksiyon etkeni olan *Candida* izolatlarında biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılık durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Mantarlar funguslar olarak adlandırılırlar ve mantarları inceleyen bilim dalına ‘mikoloji’adı verilmektedir. Mikoloji Yunanca şapkalı anlamına gelen ‘mykes’ sözcüğünden türemiştir (5).Mantarlar vücudumuzun belirli kısımlarında ortaya çıkan hastalıkların etkenleri ilk çağlarda hekimler tarafından düşünülmüş olmasına karşın bu mikroorganizmalar hakkındaki bilgiler 19.yüzyıldan sonra artmaya başlamıştır (6).

Lagenback 1839’da tifüslü hastanın ağzındaki pamukçuktan alınan kazıntı örneğinde tespit ettiği mantarı tifüs etkeni olarak belirlemiştir. Ancak 1842 yılında Gruby tarafından pamukçuğun asıl nedeninin fungal kökenli olabileceği fikri ortaya sunulmuştur.1853’te Robin bu mikroorganizmayı *Oidium albicans* olarak tanımlamıştır. *Candida albicans* için belirli bir dönem yüzden fazla sinonim ortaya konulmakla beraber, Zopf tarafından 1890’da önerilen *Monilia albicans* ismi kabul edilmiştir. Berkhout 1923 yılında *Monilia* türlerini meyve çürüten, psödohif geliştiren, askospor üretemeyen maya türlerini kapsayan *Candida* cinsini kurmuştur.1954’te Pariste düzenlenen 8.botanik kongresinde Berkhout’un kullandığı *Candida* adı kabul edilerek etken *Candida albicans* olarak belirlenmiştir (7.8.9.10).

Klinik açıdan bakıldığında 1849’da Wilkinson ilk olarak vajina kandidiyazisini tanımlarken, daha sonraları günümüze kadar cilt, cilt altı, sistemik ve merkesi sinir sistemi kandidiyazisleri bildirilmeye başlanılmıştır. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımın yaygınlaştığı 1940’lı yıllarda ise *Candida* enfeksiyonunun artmasına bağlı olarak konuyla ilgili gelişmeler önem kazanmıştır (11,12).

Candida enfeksiyonlarının önlenmesi için 1950’li yıllarda organizasyon gerektiğinin önemi vurgulanmış olmasına rağmen, 1970’li yıllarda ABD ve İngiltere’de ilk komiteler kurulmaya başlanmıştır. Ocak 1970’de CDC (Center for Diseases Control and Prevention) ABD’deki ulusal hastane enfeksiyon verilerini prospektif olarak toplamak ve analiz etmek amacıyla NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance) sistemini kurmuştur (13).

2.2. Mantarların Genel Özellikleri

Mantarlar morfolojik yapılarına göre küf veya maya olmak üzere 2 bölümden oluşurlar. Mayalar tek hücreli, küfler çok hücreli yapıya sahiptirler. Mayalar ve küfler birden fazla nükleusa sahip oldukça farklı çoğalma mekanizmaları vardır. Küfler 2-10 µm çapında. Çok hücreli, kalın, paralel duvarlı tüp benzeri uzantılara sahip hiflerden oluşmaktadır. Hifler

bir araya gelerek miçel adı verilen yapı oluştururlar. Besiyerinde türlerine göre farklı renk ve görünümde yapı oluşturmaktadır (14).

Mayalar ise krem kıvamında, yuvarlak, düzenli sınırları olan koloni yapıları vardır. Kapsüllü mayalar mukoid koloni yapısına sahiptirler. Bazı mayalar germ tüp, klamidospore, artrospore, ve kapsül gibi yapılar oluşturmaktadır. Bu durum identifikasyon açısından oldukça önemlidir. Makroskopik, mikroskopik, biyokimyasal özelliklerine göre tanımlamaları yapılabilmektedir. Mayalar eşeyli olarak üreyip askospore yada basidospore geliştirirken, maya benzeri mantarlar sadece eşeysiz üreme gösterirler (10).

Candida türleri doğada memelilerin sindirim kanalının normal florasında, insan deri ve mukozasında bulunmaktadır. Çeşitli klinik örneklerde kolonizasyon veya enfeksiyon etkeni olarak izole edilebilmektedir. Normal florada bulunan *Candida* türleri immün sistemi çökmüş hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır (15).

Candida'ların 80'den fazla türü bilinmekte olup bunların belli bir kısmı insanlarda patojeniteye neden olurlar. 1960'larda sadece 5 *Candida* türü olduğu düşünülürken son yıllarda en az 17 *Candida* türü insanlarda patojeniteye neden olmaktadır (16).

Bu cins içerisinde en sık karşılaşılan patojen tür *C. albicans*'tir. Diğer sık olarak karşımıza çıkan etkenler (%50-%70) *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. guilliermondii*'dir. Diğer hastalık etkeni olabilen başlıca nadir türler; *C. catenulata*, *C. ciferii*, *C. haemulonii*, *C.intermedia*, *C. kefyr*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. pelliculosa*, *C. pulcherrima*, *C. rugosa*, *C. utilis*, *C.viswanathii* ve *C. zeylanoides*'tir (15).

2.3. *Candida* Türlerinin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Candida türü *Ascomycetes* şubesinin *Saccharomyces* ailesi içinde yer almaktadır(17,18). Mikroskop altında incelendiğinde 5-6 µm boyutunda, oval, tomurcuklanan hücreler şeklinde görülmektedir (19).

Candida türleri gram boyama yöntemiyle boyandığında gram pozitif bakterilerde olduğu gibi mor renkli görünürler fakat bakterilere göre daha büyük yapılardır. *Candida* türlerinin üretiminde çoğunlukla SDA (Sabourad Dextrose Agar) besiyeri kullanılmaktadır. 37⁰C'de 24 saat inkübasyonun ardından koloniler besiyerinde kirli beyaz yada krem rengi tonunda, yumuşak kıvamlı ,ekşi kokulu, koloniler olarak görülmektedir. Bazı türlerin kendine özel morfolojik yapıları vardır. Örneğin, SDA'da *Candida albicans* oval, düzgün kenarlı ve düzgün üst yüzeyli koloniler şeklinde ürerken; *Candida tropicalis* oval, göbekli koloniler

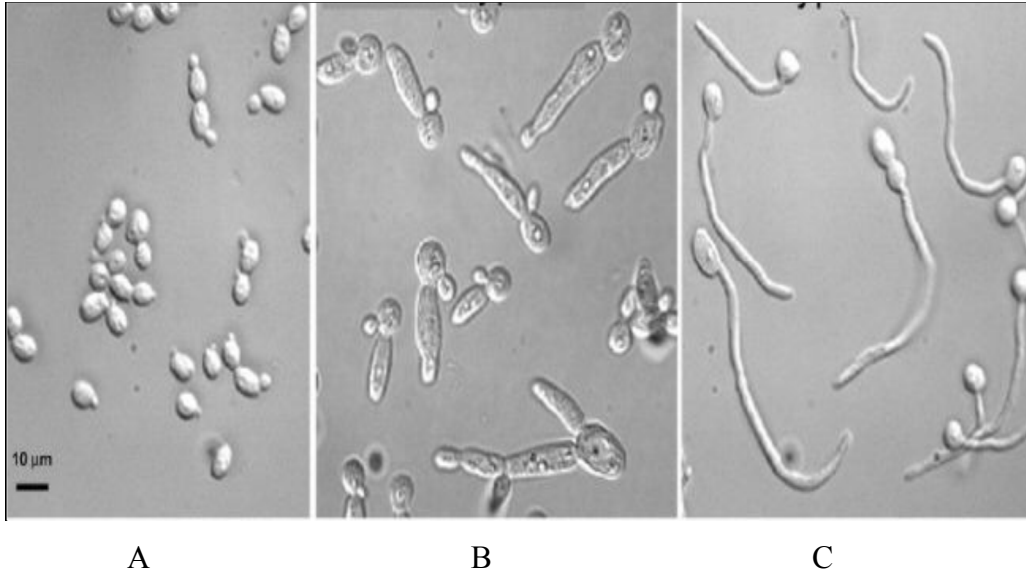
oluşturur. *Candida krusei* kolonileri uç kısımdan uzamış ve eliptik iken, *Candida parapsilosis* dantelimsi koloniler oluşturmaktadır (19).

C.albicans ve *C.dublinensis* yalancı ve gerçek hif oluşturdıkları için dimorfik mantarlar olarak nitelendirilmektedir. *C.albicans* ve *C.dublinensis* serumda 37⁰C’de 4 saatlik inkübasyonun ardından germ tüp oluşturduğu saptanmıştır. Germ tüp, hif gelişiminin ilk başamağı olup ana hücreden boğum yapmadan uzanan tübüler bir yapıdır (19).

Kromojenik besiyerleri, belirli substrattan kromojen faaliyet sonucunda özel bir madde oluşumu ve bunun koloninin renk değişimiyle görünür hale geldiği besiyerleridir. *Candida* türleri kromojen ortamda oluşturdıkları farklı renklerle birbirlerinden ayrılabilir (20).

Candida türlerinin ayırımında asimilasyon testlerini içeren ticari kitlerde kullanılmaktadır. API 20 C (Bio Meriux, Fransa), ID 32 C (Bio Meriux, Fransa) veya otomatize sistem VİTEK maya identifikasyon kartı (Bio Meriux, Fransa), Phoenix maya identifikasyon ID kartı (Becton Dickinson, ABD), bunlar örnek olarak verilebilir. Bu kitlerde, farklı kuyucuklarda meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda dijital kataloglarda sonuçlar değerlendirilip tanımlama yapılmaktadır.

Tür ayırımı, biyokimyasal özellikler veya enzim varlığına dayanan hazır kitler ve manuel bazı testler ile de yapılabilmektedir. Örneğin *Candida krusei* üre içeren besiyerinde 18-48 saatlik inkübasyon ardından besiyerinin rengini sarıdan pembeye dönüştürmektedir (21). *Candida keyfr* laktoz pozitif bir türdür ve Eosin Methylene Blue (EMB) agar besiyerinde metalik röfle oluşturma özelliğine sahiptir (22).



Şekil 2.1. A. Maya hücresi

B. Pseudo hif

C. Gerçek hif (1).

2.4. Candidaların Virülans Faktörleri

Candidaların özellikle *C.albicans*'ın patojenitesinde rol alan virülans faktörleri aşağıda belirtilmektedir(23).

2.4.1. Hücre yüzeyine yapışma

Mayanın konak ile ilişki kurmasının ilk basamağını adhezyon oluşturmaktadır. *C.albicans* adheransı oranı yüksek bir türdür ve yine aynı türler içinde adhezyon yeteneği birbirinde farklı türler saptanmıştır. Maya hücresinin konak hücre yüzeyine tutunmasında konağın immünolojik şartlarının yanı sıra mantarın yüzey özellikleride oldukça önemlidir (23).

A) Hücre Yüzeyinin Hidrofobik Özelliği

Negatif yüke sahip hücre yüzeylerinin birbirini çekme potansiyeli hidrofobik moleküllerin sayesinde mümkündür. Örneğin fenil alenin gibi organik maddelerin adezinlerle beraber hücre yüzeyine tutunmayı desteklediği belirtilmiştir. Aynı zamanda galaktozun aşırı olduğu ortamda üreyenlerin yanı sıra 25⁰C'de üreyen mayalar hidrofobik özelliği oldukça fazladır (23).

B) Yüzey Adezinleri

Konağın endotel hücrelerine yapışmakla görevli olan moleküllerdir (24).

C) 3b reseptörü

Bu molekül konak hücrenin yüzeyinde yer alan arjinin-glisin yapısındaki reseptöre tutunmaktadır (24).

D) Fibronektin reseptörü

C.albicans ve *C.tropicalis* fibronektin reseptörü sayesinde Ekstra Sellüler Matriks (EMP) proteinlerine tutunmaktadır (24).

E) Östrojen reseptörü

Vajen epitelindeki glikojen seviyesinin artmasıyla ve maya hücresindeki östrojen reseptörleri vajinal kolonizasyon oluşumunu kolaylaştırmaktadır (24).

Fibrinojen Bağlayan Proteinler

Bu reseptör *C.albicans*'ın germ tüp şekillerinde oldukça fazladır.Üretral epitel hücrelerine tutunmada görev almaktadır (25).

2.4.2. Maya-hif dimorfizm

C.albicans'ın kökeninde önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Dimorfizm'de bu değişiklikler içinde yer alan oldukça önemli bir virülans faktördür. Maya-germ tüp dönüşümünde rol alır. CO₂, Ph, N-asetil glukoz, aminoasitler bu dönüşümü etkileyen dış faktörlerdir. Hücre içinde oluşan iyon akımları sonucunda hifal uzama meydana gelir. Hif şeklinde dönüşümün ilk aşaması germ tüptür. Hifler dokuya daha fazla yapışma özelliği gösterirler ve fazgosite edilememektedir (26).

2.4.3. Fenotipik değişim

Candida suşu geriye dönüşümlü olarak farklı koloni morfolojisine geçiş yapabilme yeteneğine sahiptir. Yüksek sıcaklık veya Ultraviyole ışınları gibi dış faktörlerin etkisiyle mikroorganizmalar yüzey antijenlerini modifiye edebilir ve koloni morfolojilerini değiştirebilmektedir. *C.albicans* 3153A suşu ile yapılan çalışmalarda birbirine dönüşebilen 7 farklı koloni morfolojisi gösterdiği çalışma sonucunda gözlemlenmiştir (27). Beyaz opak koloni geçişi en çok çalışılan fenotipik değişim çalışmasıdır. Bu koloniler arası geçiş, Hull ve ark(28,29) tarafından tespit edilen MTL (Mating like) lokusu ile kontrol edilmektedir. Opak formlar içinde yer alan α/α homozigot hücreler tarafından α feromonu üretildiği bu ferom sayesinde beyaz hücrelerde biyofilm oluşumu meydana gelmiştir (30).

2.4.4. Biyofilm Oluşumu

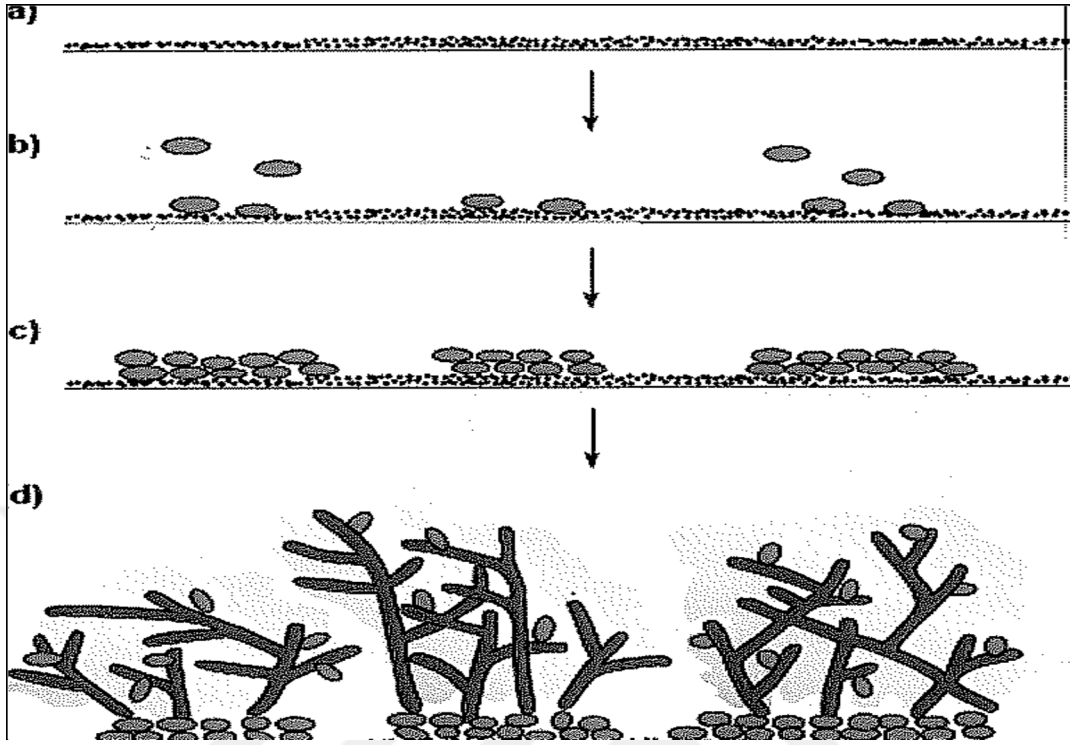
Canlı veya Cansız yüzeye tutunabilen ürettikleri okzopolisakkarit yapıda matriks içinde hareketsiz yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu yapıya biyofilm denir. Biyofilm oluşturabilme yeteneğine sahip mikroorganizmalar uygunsuz çevre koşullarına karşı biyofilm üretemeyenlerden daha çok direnç gösterirler. Biyofilm ile bağlantılı şekilde gelişen enfeksiyonlar vücuda yerleştirilen tıbbi cihazların (protez, katater, rahim içi araç, kalp pili vb) kullanımının artmasıyla giderek artış göstermektedir (31).

2.5. Biyofilmler

2.5.1. Tanım

Ekstraselüler matriks (ECM) içerisinde birbirine bağlı olarak bulunan mikroorganizma topluluğuna biyofilm denir. Canlı doku üzerinde, medikal araç yüzeyinde, endüstriyel su sistemleri gibi farklı ortamlarda meydana gelmektedir. ECM, biyofilm üreten mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır. Polimerik yapıda olan bu maddenin temeli

polisakkarit yapıdan oluşmaktadır ve biyofilmin üretildiği bölgeye göre mineral kristalleri, korozyon partikülleri gibi farklı bileşenleri kapsamaktadır (32).



Şekil 2.2. PVC (Polinivil Klorür) katater yüzeyinde biyofilm oluşum aşamaları (33).

2.5.2. Tarihçe

Biyofilm birçok bilim adamı tarafından çeşitli şekillerde incelenmiştir ve yapılan ilk çalışmalar bakteriler üzerinde olmuştur. İlk olarak 17. yüzyılda Antonie van Leewenhoek'in mikroskobu keşfetmesiyle bilim dünyası aydınlanmaya başlamıştır. Leewenhoek'in kendi icat ettiği mikroskobuyla kendi dişinden aldığı örnekte plaklar içinde yaşayan mikroorganizmalardan bahsetmiştir ve burada bakterilerin büyük çoğunluğunun biyofilm denilen besleyici bir yapı içinde yer aldığını gözlemlemiştir (34).

Günümüze kadar araştırmacılar tarafından biyofilm konusuna ışık tutmak amacıyla çok önemli çalışmalar yapılmaya devam edilmiştir. Heukelekion ve Heller (35) yüzeye tutunabilecek bir ortam olması durumunda mikroorganizmaların daha hızlı çoğaldıklarını gözlemlemiştir. Zobell (36) deniz suyundaki bakterileri inceleyerek su içinde cam yüzeylere bakterilerin tutunup burada hızlı bir şekilde çoğaldıklarını gözlemlemiştir. Biyofilmlerle ilgili detaylı çalışmalar elektron mikroskoplarının kullanıma sunulmasıyla giderek hız kazanmıştır (32).

Jones ve ark (37) elektron mikroskobu sayesinde atık su tesisindeki filtrelerin yüzeyinde farklı mikroorganizmalar bulunduğunu ve etrafındaki matriksin polisakkarit yapıda

olduğunu gözlemlemişlerdir. Costerton ve ark (38) mikroorganizmaların yüzeye nasıl tutunduklarını bunun ne gibi yararlar sağladığını araştırmış ve biyofilmleri “canlı veya cansız yüzeye tutunmaya yardımcı polimerik matriks” olarak tanımlamışlardır. Costerton ve ark’ın biyofilm konusunda yaptıkları bu çalışma “biyofilm nedir” konusundaki tanımların gelişmesine zemin hazırlamıştır.

Elder ve ark (39) yaptıkları çalışmada biyofilmleri ekzopolimer matriks sayesinde oluşan yapısal bütün olarak nitelendirmişlerdir. Biyofilm teorisinin ilk kez ortaya çıktığı dönemlerde biyofilmin ne ve bunların organizmaya ne gibi faydalar sağladığı zamanla anlaşılmaya başlanmıştır. Elektron mikroskopunun kullanılması itibariyle yapılan detaylı incelemelerde biyofilm yapısal kısmı, oluşum aşamaları, biyofilm konusu çok daha iyi anlaşılmuştur (34).

2.5.3. Biyofilm

Biyofilm, Mikrobiyal hücrelerden ve ECM’den meydana gelmiştir. ECM, mikrobiyal biyofilmlerin karbon içeriğinin %50-90’ını kapsamaktadır (40). Biyofilm üreten mikroorganizmalar yüzeye ve birbirlerine yapışarak mikrokoloni denilen yapı oluştururlar. Bu mikrokoloni katmanları içinde besin alınımını sağlayan su kanalları bulunmaktadır. Bu mikrokanallar biyofilmlerin temel birimini oluşturmaktadır (41).

Biyofilm oluşumunun ilk aşamasında mikroorganizmalar kendilerine özgü mikrokoloni oluşturmaktadır. Mikrokoloni içerisindeki hücreler arasında bağlar çok sıkı iken zaman içinde gevşemektedir. Mikrokoloniler içerisindeki su kanalları bakteri ve mantar biyofilmlerinde bulunan ortak bir yapıdır. Biyofilm içerisinde oksijen, su, besin alınımı, atık maddelerin uzaklaştırılması bu kanallar sayesinde mümkündür (32). Biyofilm yapısının özelliklerinden biri 3 boyutlu olmasıdır. Biyofilm içerisinde yer alan hücre yüzeye farklı uzaklıklarda bulunmaktadır. Biyofilm tabakası iç ve dış faktörlerden etkilenmektedir. Örneğin dış minesini üzerine biriken albümin, glikoprotein gibi maddeler biyofilm yapısına katılmaktadır (41). Üriner kataterde oluşan biyofilm yapısında ise *Proteus spp* gibi üreaz aktivitesine sahip bakterilerin bulunması durumunda amonyak seviyesindeki artıştan dolayı idrar Ph’sı yükselmektedir. Kristalize olabilen kalsiyum fosfat ortamın alkali olduğu durumda sertleşmekte ve zamanla katateri tıkamaktadır (42).

Yapılan çalışmalar çoğunlukla bakteriyel biyofilmlerle üzerinde yapılmış ve fungal biyofilm ile ilgili çalışmalar sınırlı olarak bulunmaktadır. *Candida* biyofilmleri bakteriyel biyofilmlerle benzerlik taşımaktadır. *Candida* biyofilminde organizmalar ECM içinde yüzeye

sıkıca yapışabilmektedir. Fungal biyofilm esnasında maya hücreleri ve hif yapıları biyofilmin farklı tabakalarını oluşturacak şekilde görev almaktadır (43).

İn vitro *Candida albicans* biyofilmlerinde Ekstrasellular matriks bileşimi karbonhidrat, protein, heksozamin, ürebik asitten meydana gelmektedir. Başlıca ekstraselüler karbonhidratlardan biri β -1,3 glukandır (44).

2.5.4. Biyofilm Oluşumu

Mikrobiyal biyofilmler günlük hayatımızda yaygın bir şekilde yer almaktadır. Sanayi tesislerinde, arıtma borularının üst kısımlarında oluşan ve dezenfektanlarla giderilemeyen kontaminasyonlar biyofilm kaynaklı nedendir. İnsan vücudunda da biyofilm oluşumu gözlenmektedir. Dış yüzeyinde oluşan plaklar günlük hayatımızı dolduran biyofilm kaynaklı önemli bir problemdir. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar çok sık rastladığımız bir durumdur. Hastane kaynaklı enfeksiyonların yarısından fazlasını biyofilm esaslı olarak meydana gelmektedir (45,46). Antimikrobiyal tedavinin sürecini değiştiren bu durum morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Bu bakımdan biyofilm oluşum aşamalarını iyi bilmek tedavinin başarısı açısından büyük önem taşımaktadır (47).

Bakteriyel kaynaklı biyofilm oluşum aşamaları bu şekildedir (47).

- 1-Tutanmayı sağlayan yüzey film tabakanın oluşması
- 2-Mikroorganizmanın yüzey kısma yapışması
- 3-Biyofilm tabakanın kalınlaşması
- 4-Mikroorganizmanın Biyofilmden koparak düşmesi

Bakteriyel biyofilm oluşum aşamaları yukarıda belirtildiği gibidir. Yalnız fungal kaynaklı biyofilmlerde farklı morfolojik yapıdan kaynaklı olarak süreç biraz daha karmaşık devam etmektedir (47).

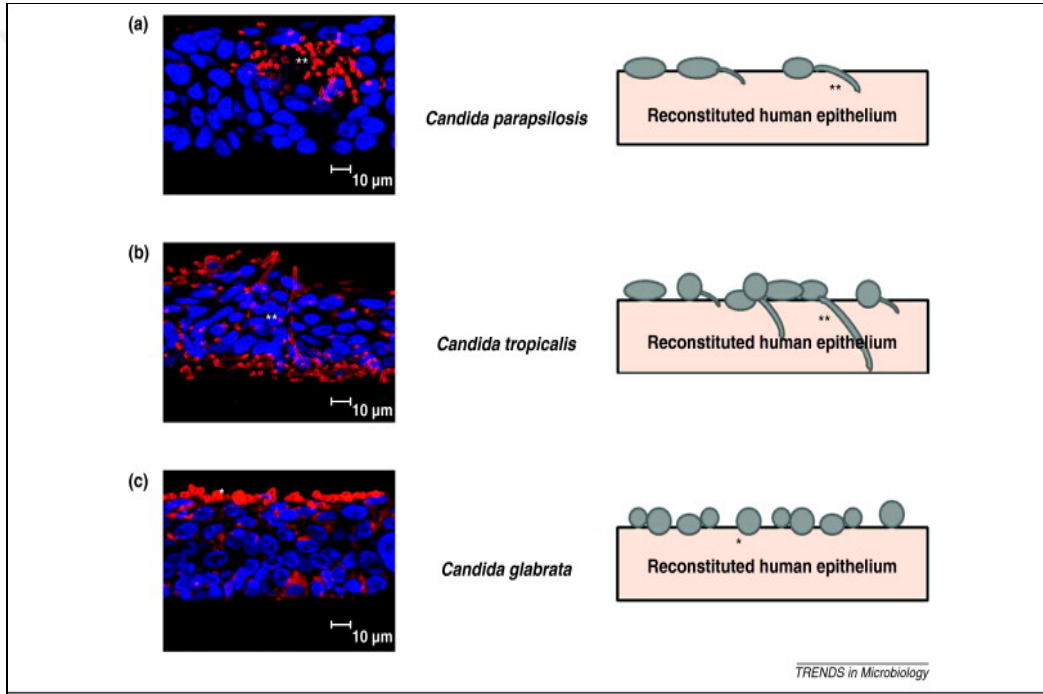
2.6. Fungal Biyofilm Oluşumu

Candida türü mayalar Hastane kaynaklı fungal enfeksiyonların büyük kısmında etken olarak yer almaktadır. Hastanede yatan hastalara takılan biyomateryaller, tıbbi araç ve gereçler nedeniyle oluşan biyofilmler tedavi sırasında önemli problemler oluşturmaktadır. Yapılan araştırmalar fungal kökenli biyofilmlerin sesil hücrelere göre ilaçlara karşı 1000 kat dirençli olduklarını gözlemlemişlerdir (48). Hawser ve Douglas'ın (49) katater üzerinden aldıkları örnekte yaptıkları incelemelerde fungal biyofilmlerle ilgili çok önemli bilgiler ortaya çıkarmışlardır. Bu çalışma sonucu *Candida albicans*'ın lateks veya silikon gibi maddeler

üzerinde biyofilm oluşturabildiğini ve bu özelliği albicans dışı candidalardan daha iyi seviyede olduğunu belirtmişlerdir.

Baillie ve Douglas (43) hif formu biyofilm oluşumunda önemli bir role sahip olduğunu yaptıkları çalışmada göstermişlerdir. Yapılan bu çalışmalar, günümüzde yapılan *Candida* biyofilm çalışmalarına zemin hazırlamıştır. *Candida* biyofilmlerinin gelişim aşamaları bakteriyel biyofilmlere benzemektedir ve aşağıda sırasıyla belirtilmektedir (39).

- 1-Yüzeyde film tabaka meydana getirme
- 2-Tutunma(Adezyon)
- 3-Hifal oluşum ve Olgunlaşma
- 4-Ayrılma



Şekil 2.3. Farklı *Candida* türlerinde konfokal lazer mikroskobu ile biyofilm yapısının görünümü (50).

2.7. Biyofilm gelişiminin genetik kontrolü

Biyofilm oluşumunda mikroorganizmanın adezyonu için bazı genlerin aktif olması gerekir. *Candida*'lar için ALS genleri ve hifal duvar proteini (Hwp 1) çok önemli yere sahiptir. Bu proteinlerin etkileşimi sonucu oluşan hifal uzantılar arasındaki çapraz bağlanma biyofilm yapısının stabilizasyonu bakımından büyük önem taşır (51). ALS genleri biyofilm oluşumunda çok önemlidir (52).Yapılan çalışmalar ALS 2 de meydana gelen azalmanın biyofilm büyümesinde azalmaya neden olduğunu göstermektedir (52). Bcr ve tec olarak

adlandırılan genlerinde gen regülasyonunda rol aldığı belirtilmiştir. Tec 1 hif gelişiminin uyarılmasını sağlamak ve Bcr'i düzenlemektedir. Bcr ise als 1, als 3, hwp 1 'in kontrolünde aktiftir (53).

Fungal biyofilm oluşumunun ikinci aşamasını hifal gelişim oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar hif gelişimi için EFG 1'in önemli olduğunu göstermiştir. EFG 1 hifal uzama ve filamantasyon bakımından çok önemli bir genidir (53). Bununla birlikte olgunlaşma süreci hücreler arası iletişim maksimuma ulaştığı seviyedir. Hücreler arası bu iletişimden "quorum sensing" "molekülleri sorumludur. Farnesol iletişim için kullanılır ve biyofilm oluşum aşamasında önemli bir yere sahiptir. Histidin kinaz Chk 1 'in farnesol sinyal mekanizmasının bir parçası olarak yer almaktadır. *Candida albicans*'ın chk 1 histidin kinaz defektif suşları ortam içinde farnesol olmaması halinde yinede biyofilm oluşturabilmektedir (54).

2.8. Biyofilm Enfeksiyonları

Mikroorganizmalar doğada serbest yaşayan hücreler olarak değil de biyofilm üreterek yaşamlarını devam ettirmektedir (55). Bu durumun tersi olarak mikrobiyolojik çalışmaların çoğunluğu serbest yaşayan mikroorganizmalar aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Biyofilm oluşturma yeteneğindeki mikroorganizmalar yüzeye yapıştıkları zaman olumsuz çevre koşullarına karşı kendilerini korumaktadırlar. Bu durum biyofilm içindeki hücre reseptörleri, enzimler, ve genler tarafından meydana gelmektedir (45). Bu yapılar kendi yaşamlarını devam ettirirken diğer yandan ise sahip oldukları patojenik mekanizmalar aracılığıyla çeşitli enfeksiyonlara sebep olmaktadır.

Biyofilmlerin genel özellikleri aşağıdaki gibidir (45).

1. Biyofilmler canlı yada cansız yüzeylere yerleşebilmektedir.

2. Biyofilmler çok yavaş gelişmektedir.

3. Biyofilm içerisinde yer alan hücreler, antijen salınımına neden olmakla beraber antikor etkisine karşı korunmaktadır. Bu bakımdan immun komplekslere bağlı olarak hasara neden olmaktadır.

4. Antimikrobiyal tedaviler biyofilmi tamamen yok edememektedir.

5. Biyofilmlerden ortaya çıkan planktonik hücreler konak savunma sisteminin yetersiz olduğu durumlarda akut enfeksiyon meydana getirmektedir.

Pek çok mantar türünden yaklaşık 600 civarı insanda patojeniteye neden olmaktadır (56). *Candida* çok sık rastladığımız fungal patojendir ve hayatı tehdit eden enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Hastane enfeksiyonu etkenleri arasında ilk basamakta *Candida* yer

almaktadır (57,58). *Candida* türleri özellikle kan akım enfeksiyonlarında, pnömoni ve idrar yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır (60,61). Bu enfeksiyonların temelinde katater gibi tıbbi araç-gereç kullanımı yatmaktadır (58,60,62). Enfeksiyon katater vücuda yerleştikten sonra oluşabileceği gibi uzamış kateterizasyon sonrasında da oluşabilmektedir.

Fungal biyofilm enfeksiyonlarında biyofilm içinde mantar türü bulabildiği gibi bakteride bulunabilmektedir (45, 57, 60,61). Örneğin oral mukozada yer alan *candida* türleri diş protezlerinin yüzeyinde biyofilm meydana getirmektedir. Bu biyofilmler fungal hücrenin yanı sıra streptokok gibi çeşitli bakteri türlerini içeren biyofilmlerdir (60,62). Biyofilm oluşumunun antifungallere ve konak savunmasına direnç göstermesi patogenezi ve hastalığın seyrini etkilemektedir. Bu bakımdan mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yetenekleri, biyofilm gelişiminin engellenmesi, oluşan biyofilmlere ilaç etkinliğinin araştırılması ile ilgili çalışmalar artış göstermektedir (55).

2.9. Biyofilm Oluşumunu İncelemek İçin Kullanılan Yöntemler

2.9.1. Modifiye tüp adherans yöntemi

Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)'da üreyen maya kolonilerinden belirli miktar alınarak glukoz konsantrasyonu % 8 olacak şekilde hazırlanan Sabouraud buyyondan 10 ml içeren tüplere inokülüm yapılır. Tüpler 35°C de 24-48 saat inkübasyonun ardından tüpler boşaltılır. Distile su ile yıkama yapıldıktan sonra %1 safranin ile boyanır. Tüp duvarındaki renkli yapışkan tabakanın varlığı pozitif olarak kabul edilir (63).

2.9.2. Mikroplak yöntemi

Glukoz konsantrasyonu % 8 olacak şekilde hazırlanmış Sabouraud buyyondan 10 ml içeren tüplere SDA'da üretilen 24-48 saatlik kolonilerden bir öze dolusu inokülüm yapılır. 35⁰C de 24 saat inkübe edilen tüpler 5 saniye vortekslenir ve % 8 glukozlu Sabouraud buyyonla 1/100 oranında sulandırılır. U tabanlı mikroplaklara 200 mikrolitre olacak biçimde her suştan 3 kuyucuğa pipetleme yapılır. Kontrol amacıyla her plaktaki 6 çukura boş besiyeri konulur. 35⁰C 'de 24 saat inkübasyonun ardından fosfat tamponu ile (Ph 7.2) yıkama yapılır. Bu işlemin ardından kuyucuklar metanolla fikse edilir. Bu kuyucuklar %2 kristal viyole ile boyanır, yıkanır ve kurulanır. Mikro ELİSA okuyucuda 492 nm dalga boyunda belirlenir (64).

2.9.3. Kongo kırmızı agar yöntemi

Kongo kırmızılı infüzyon agar litrede 80 gram glukoz ve 0.8 gram Kongo kırmızısı olacak şekilde hazırlanarak otoklavda steril edildikten sonra 9 cm lik petri kabına dökülür. SDA 'da test edilecek *Candida* izolatları bir plakta en az 4 izolat olacak şekilde pasaj yapılarak 35'de 4 saat inkübe edilir. Kongo kırmızısı agarda siyah koloni oluşturan *Candida*'lar biyofilm pozitif pembe koloni oluşturan *Candida*'lar ise biyofilm negatif olarak değerlendirilir (65).

2.9.4. XTT redüksiyon yöntemi

Candida izolatlarının biyolojik materyalleri harici maddelere olan adezyonunu incelemek için kullanılan suda çözünebilen madde olan tetrazolium tuzu (XTT) ilk kez Paull ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir (66). XTT indirgenmesi yöntemi XTT'nin 3-(4,5-dimetil-thiazole-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium bromide yükseltilmesi sırasındaki düzeyinin metabolik göstergesi olarak semi- kantitatif ölçüldüğü yöntemdir (67).

2.9.5. Diğer yöntemler

Biyofilmleri görüntülemek için ayrıca taramalı elektron mikroskobu ile görüntüleme (68), konfokal lazer mikroskobu ile görüntüleme (69), kuru ağırlık ölçümleri (70), FDA (Fluorescein diacetate) görüntüleme (71) gibi yöntemler tek başına ya da kombine şekilde kullanılmaktadır.

2.10. *Candida* İmmünolojisi

Hücre aracılı immünite (T hücreleri) ve spesifik olmayan hücreli immüniteyi (makrofajlar, nötrofiller) mantara karşı savunmayı gerçekleştirmektedir. Mantara karşı oluşan savunmada hücreli savunma mekanizmalarının önemi klinik açıdan invaziv fungal enfeksiyonların büyük kısmının defektif hücreli immüniteli bireylerde ortaya çıktığının görülmesiyle kanıtlanmıştır (72). *Candida* kolonizasyondan, mukuzal invazyon ya da sistemik yayılma geçmesi konak ve mantara ait faktörlerle alakalıdır. Uygulanan antibiyotik tedavi sonrasında normal floranın değişmesi immünyetmezlik ve anatomik bariyerlerin yıkılması enfeksiyona temel hazırlar (73). Mantar hücre duvarı mantarı fiziksel açıdan korur ve onu kompleman aracılı lizis gibi konak savunmalarına karşı direnç göstermesine neden olur. Doğumsal bağışıklık savunma mantar hücre duvarındaki bileşenleri tanımak ve ona uygun yanıt gerçekleştirmek için, B-glukan reseptörü, mannoz reseptörü ve toll-like reseptörü(TLR)

taşıır (73). Nötröfiller, makrofajlar, monositler antifungaller üzerinde önemli hücrelerdir. Nötrofiller ve monositler, sitokinler ve kompleman bileşenlerinin aktivasyonu aracılığıyla enfeksiyonun gerçekleştiği bölgeye toplanırlar (73). Hücresel aracılı immünite esnasında *Candida* antijenleri T hücrelerine sunulur sitokin sentezinin gerçekleşmesi bu hücrelerin proliferasyonu sağlanır ve bu sitokinler fagositlerin kandidasidal fonksiyonlarını artırır (74). Mantarlar bileşenlerini klasik veya alternatif olarak aktive eder ve fungal hücre yüzeyinde C3 birikmesine sebep olur. Kompleman aktivasyon sayesinde infekte dokularda fagositlerin birikmesi kolaylaşır ve antikandidal aktivitelerinde artış meydana gelir (73).

Fungal enfeksiyonlarda antikora bağılı immünitenin rolü tartışmalıdır. Literatür incelendiğinde antikor immünitesinin lehinde veya aleyhinde çok sayıda çalışma mevcuttur. Kandidozlu bireylerde yapılan kontrollere göre *C.albicans*'a karşı oluşan antikorların seviyesi çoğunlukla daha yüksektir (72). Antikorlar maya hücrelerini aglutine ederek enfeksiyonu sınırlandırıp konak savunmasına katkıda bulunurlar. *C.albicans*'a karşı antikorlar güçlü opsoninlerdir. *C.albicans*'a karşı gelişen antikorlar serumda immunosupresif polisakkarit antijenleri bağlayabilir ve böylece fungal ürünlerin nötralizasyonunda rol oynamaktadır (72).

2.11. Mantar Etkenlerinde Tedavi

Candida enfeksiyonlarının tedavisinde amfoterisin B, azol grubu (flukonazol, vorikonazol, ketokonazol), kaspofungin, flusitozin gibi antifungal ajanlar kullanılmaktadır (80). *Candida* enfeksiyonlarında tedavi seyri, hastanın immün durumuna, altta yatan hastalığının var olup olmadığına, çeşitli risk faktörlerine, enfeksiyon etkeni olan *Candida* türüne ve antifungal ilaçlara duyarlılık ya da direnç durumuna bağılı olarak farklılık göstermektedir (81).

2.11.1. Tedavide kullanılan antifungaller

Polyenler: *Streptomyces* cinsi mantarlardan üretilen sekonder metabolitlerden elde edilen antimikotik ilaçlardır. Hücrenin membran mekanizmasını olumsuz yönde etkileyerek membran fonksiyonunu bozmaktadır. Polyenler mantar hücresinin membranında bulunan sterollere yapışmaktadır. Amfoterisin B ve Nistatin bu grubun en önemli antifungal ajanlarıdır. Amfoterisin B *Candida* türleri, *Aspergillus* ve fırsatçı küf mantarlarına etki etmektedir (5).

Azol grubu: Geniş spektrumlu etkiye sahip antimikotik ajanlar olup kısmen Gram pozitif bakteriler üzerine etki etmektedirler. Mantar hücrelerinin oksidaz reaksiyonlarını

bozmaktadırlar. Azoller imidazol ve triazol olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. İmidazoller (ketokonazol, mikonazol) ve triazoller (flukonazol, itrakonazol) dir. Azol grubunda yeni geliştirilen 3 ilaç daha yer almakta olup bunlar; vorikonazol, posakonazol, ravukonazol'dür (5).

Primidinler: En önemli antifungal ajan Flusitozin'dir. Dar spektrumlu etki mekanizmasına sahiptir. *Candida*, *Cryptococcus* ve *Aspergilluslar*'dan kaynaklanan sistemik enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Mantarların nükleik asit sentezleme mekanizması üzerine etki göstermektedir (5).

Benzofuranlar: Bu gruptaki en önemli antimikotik ilaç Griseofulvin'dir. Mantar hücrelerinin mikrotübüler protein kısmına yapışarak mitozu ve kitin sentez reaksiyonunu engellemektedir. Oral yolla alındığında zayıf absorbe olmasına karşın derinin stratum tabakasında yüksek seviyede birikir. Bu sayede mantarın hif oluşturmasını engellemektedir. Dermatafitoz tedavisinde kullanılır (5).

Ekinokandinler: Kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin Ekinokandin grubu içinde yer almaktadır. Mantar hücre duvarının temel bileşeni olan β -(1,3)-D-glukan sentezini inhibe ederek hücre duvarı oluşumunu engellemektedir. *Candida* türlerinin büyük bölümünde fungusidal etkiye sahiptir. Hücre duvarında glukan bulunmayan *Cryptococcus neoformans*'a karşı etkili değildir (82).

2.12. Mayalar için Antifungal duyarlılık testleri

1. Buyyon Makrodilüsyon Yöntemi: Bu yöntemde Ph indikatörlü RPMI 1640 besiyeri kullanılmaktadır. Antifungal ajanlar kendilerine en uygun çözelti içinde eritilip filtreden geçirilerek steril edilmektedir. Bu çalışmada kullanılacak maya çözeltisi serum fizyolojik içinde çözdürülmelidir. Çalışma tüpler kullanılarak çalışılmakta olup son konsantrasyon 0.1 olarak ilaçlardan tüplere eklenir ve üzerine 0.9 ml maya süspansiyonu konur. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 35⁰C'de 46-50 saat inkübasyona bırakılır. Görsel olarak değerlendirilir (5).

2. Buyyon Mikrodilüsyon yöntemi: Makrodilüsyon metoduna benzer olup çok kolay maliyeti uygun 24 saat sonunda sonuç veren bir metottur. Antifungal ajanlar ve kullanılacak maya örneği uygun miktarda sulandırılmaları yapılır. 96 kuyucuklu U tabanlı plaklar kullanılır. Kuyucuklara sırasıyla 100 ml ilaç solüsyonu üzerine 100 ml maya solüsyonu dağıtılır. Plaklar 35⁰C de 24-48 saat inkübasyona bırakılır. Test kuyucukları üreme kontrol

kuyucuğu ile karşılaştırılarak görsel değerlendirme yapılır. Bu duruma göre elde edilen bulanıklık 0-4 e kadar rakamla ifade edilir.

0: Bulanıklık yok

1: Hafif bulanık (Kontrol göre bulanıklık durumu %0-25)

2: Bulanıklıkta belirgin azalma (Kontrol göre bulanıklık durumu % 25-50)

3: Bulanıklıkta hafif azalma (Kontrol göre bulanıklık durumu % 75-100)

4: bulanıklıkta azalma yok (Kontrol göre bulanıklık durumu %100)

Bu kriterlere göre yapılan değerlendirme sonucu MİK değerleri amfoterisin B için bulanıklığın bulunmadığı 0 değeri kabul edilir, Azol grubu için 2 değeri baz alınır(5).

3. Agar dilüsyon metodu: Bu metoda göre göre antifungal ilaç solüsyonları agar besiyeri hazırlanma aşamasında 1/10 oranında eklenir. Üreme kontrolünü yapmak için ilaçsız besiyeri dökülür. Maya solüsyonu benzer yöntemlerde olduğu gibi hazırlandıktan sonra 1-3 µL alınıp besiyerine ekim yapılır. Ekim işlemi bitince besiyeri 30⁰ C’de 24 saat inkübasyona bırakılır. Mik değerleri makroskobik olarak koloni üremesini inhibe eden en düşük ilaç konsantrasyonu olarak değerlendirilir (5).

4. Disk difüzyon yöntemi: Oldukça kolay, maliyeti uygun, hızlı bir yöntemdir. *Candida* ve diğer mantar türlerinin flukonazol ve vorikonazol için direnç belirlemede kullanılır (82).

5. E-test yöntemi: E test striplere emdirilmiş antimikrobiyal ilaçların MİK değerlerinin belirlenebildiği bir yöntemdir. Pahalı bir yöntem olmasına rağmen uygulamanın kolaylığı sebebiyle sık tercih edilen difüzyon prensibine dayalı yöntemdir. Amfoterisin B, Flukonazol, 5-flusitozin, itrakonazol, vorikonazol, kaspofungin gibi ilaçlar emdirilmiş stripler ticari olarak mevcuttur. Standart mikrodilüsyon metodu ile karşılaştırdığında sonuçlar açısından benzerlik bulunmuştur (83,84).

6. Flovritometri yöntemi: DNA’ya bağlanabilen boyalar kullanılarak ölü ve canlı hücreleri birbirinden koparmaya yarayan uygulamadır. Ortama ilave edilen floresan boyalı hücrelerde, ilaca dayalı membran hasarı gerçekleştiği durumda hücre içine girmektedirler. Bu duruma göre antifungal ilacın etkinliği ve mik değerleri tespit edilmektedir (5).

7. Diğer metodlar:

a. Ergosterol biyosentezinin engellenmesini ölçen test, azol grubu için kullanılır ve CLSI ile yüksek oranda uyumludur

b. Hücre içi ATP yoğunluğunun hesaplanmasıyla ilacın etkinliğini belirleyen testlerde kullanılmaktadır (85).

c. Üreme olması ya da olmamasına göre XTT, MTT gibi tetrazolyum bromür, tetrazolyum hidroksit boyalarının kolorimetrik araç olarak renk değiştirmelerine dayanan testlerdir.

2.13. Candida Türlerinde Antifungal Direnç

Son yıllarda yapılan organ nakli, immün sistem hastalıkları, kemoterapi gibi durumlara bağlı olarak fungal infeksiyonların arttığı ve bu duruma bağlı olarak antifungal ilaç kullanımının yaygınlaştığı bildirilmektedir. Tüm bunların ardından antifungal direnç kliniklerde önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (86).

Mantarlardan kaynaklı infeksiyonlar morbidite ve mortalite oranı yüksek hastalıklardır. Buna karşın, antifungal ilaçların profilaktik amaçla kullanılması ile hem albicans dışı *Candida* türlerinin sıklığında artış, özellikle azol grubu antifungallere direnç durumu gelişmiştir (87).

2.13.1. Amfotersin B direnci:

Amfoterisin B ye intrensek direnç, bazı *C.lusitane* suşlarında sekonder direnç ise *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, türlerinde bildirilmiş olmasına rağmen bu durum nadir rastlanılmaktadır. Uzun yıllar intrensek dirençli kabul edilen *C.lusitane* suşlarının pek çoğunun primer Amfoterisin B'ye duyarlı olduğu daha sonra duyarlı durumdan dirençli duruma dönüşmesine neden olan bir mekanizma bulunduğu belirtilmiştir (88).

Amfoterisin B ye direnç hedef membran lipidlerinin plasmalemmadaki ergosterol miktarının düşmesiyle amfoterisin B nin bağlanması azalma sonucu ortaya çıkmaktadır. Mantarlar ergosterol yerine benzer bileşikler oluşturmaktadır (86).

2.13.2. Azol grubu direnci

Azol grubu antifungallerin hedef noktası ERG11 geni tarafından kodlanan 14- α -demetilaz enzimidir (89). Ayrıca azol direnci çeşitli mekanizmalar ile ortaya çıktığı belirtilmiştir.

a. Hücre içinde ilaç birikiminde azalma: Hücre içinde ilaç birikme durumundaki azalma ilacın hücreye alınımında hasar yada ilacın pompa sistemleriyle atılımında artış sonucu ortaya çıkmaktadır (89).

b. Erg11p'nin hücresel içeriğinde artış: ERG 11 geninin fazla ekspresyonuyla bağlantılı olan bu durum 14- α -demetilaz enziminin sentezi aşırı miktarda gerçekleşmektedir.

Bu nedenle ilaç etkin olsa bile ergosterol sentezi devam etmekte ilacın etkinliği kaybolmaktadır (86).

c. Erg11p'nin azollere afinitesinde azalma: Erg11p'nin afinitesini azaltan nokta mutasyonları saptanmış ve *C.albicans* izolatlarında flukonazol direnci ortaya çıktığı bildirilmiştir (86).

d. Ergosterol biyosentezinde değişiklik: Azol grubuna dirençli mayaların sterol yapılarının incelenmesi sonucu, ERG3 ile kodlanan ve ergosterol sentezinde 14- α -demetilazdan daha erken bir basamakta etki gösteren $\Delta^{5,6}$ desaturaz enziminin inaktivasyonu sebebiyle sentez yolunun değiştiği gözlenmiştir. Bu enzimde meydana gelen mutasyonlar membran strolünde değişikliğe neden olmaktadır. Bu durumun sonunda 14- α -metil fekosterol direnci meydana gelmiştir (88).

2.13.3. Ekinokandinlere direnc

Ekinokandinlerin diğer candida türlerine göre *C. parapsilosis* suşlarına daha az etkin olduğu belirlenmiştir. Direnç durumları laboratuvar kökenli mutantlarda incelenmiştir. Glukan sentazın FSK1 tarafından kodlanması sebebiyle *S.cerevisia*, *C.albicans* ve *A.fumigatus* türlerinin genlerinde oluşan bozukluklar ya da mutasyonlar sonucu direnç durumu ortaya çıkmıştır (86).

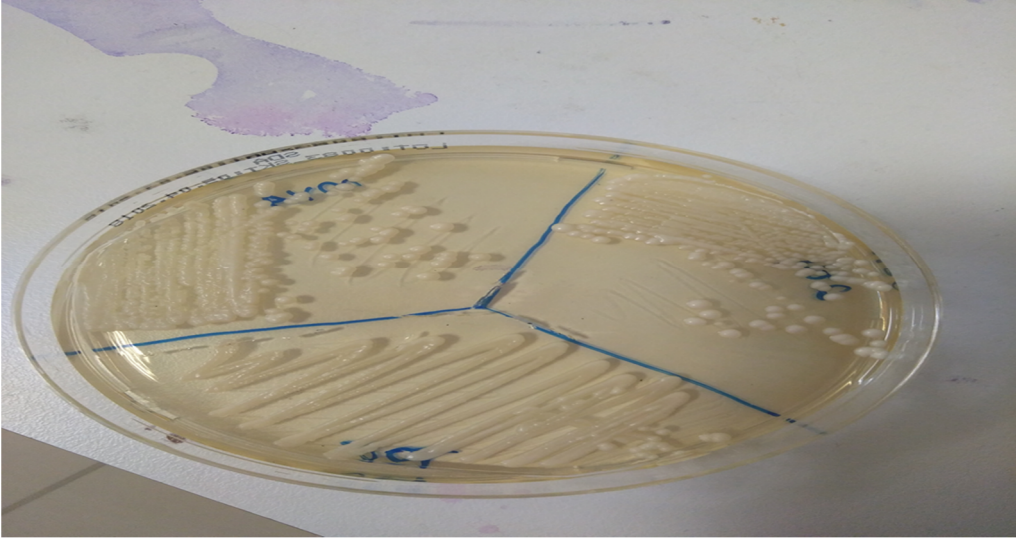
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Maya suşları

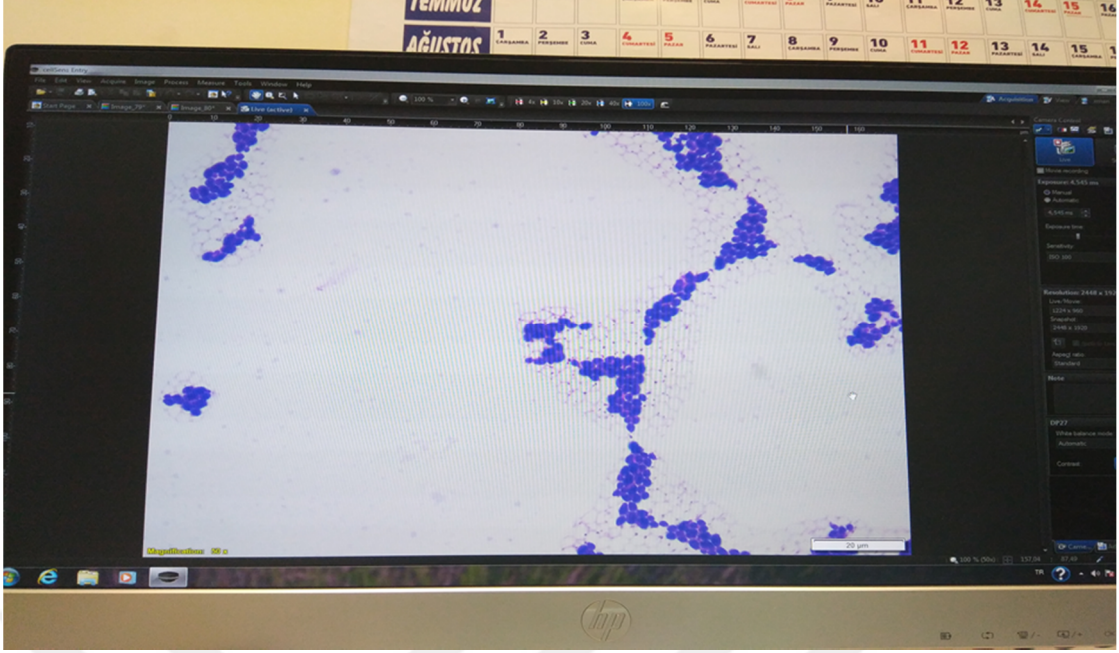
Bu çalışmaya Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen ve çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve tanımlanan 60 adet *Candida albicans* izolatu dahil edilmiştir. Seçilen suşlara ait stok kültürler Sabauraud Dekstroz agarda (SDA) (GBL, Türkiye) 37°C 'de üretilmiştir. Suşların saf olduklarını kesinleştirmek için kültür öncesi tek koloni pasajları yapılmıştır. Üretilen suşların tür tanımlarının doğrulanması için mikroskop altında x40 büyütmede tipik morfolojilerinin gözlemlendiği not edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm *Candida* izolatları saf kültür olarak test edilmiş ve tür tanımlaması doğrulanmıştır.

3.1.1. Primer izolasyon

Klinik örneklerden uygun besiyerlerine ekimler yapıldı. 24-48 saatlik inkübasyonun ardından *Candida* olduğu düşünülen kolonilere Gram boyama yapılarak morfolojik olarak tanımlandı.



Resim 3.1. SDA'da üreyen *C.albicans* suşunun görünümü.



Resim 3.2. *C. albicans* suşunun gram boyama yapıldıktan sonra mikroskobik görünümü.

3.1.2. İdentifikasyon

3.1.2.1. Germ tüp (çimlenme borusu) testi

Çalışmaya alınacak olan maya kolonisinden öze ile bir miktar alınarak 0,5 ml insan serumu içerisinde süspansiyon edildi. 37⁰C’de maksimum 3-4 saat inkübe edildikten sonra süspansiyondan bir damla alınarak lam lamel arası preparat yapılarak mikroskopta incelendi. Maya hücresinden çıkan, maya hücresinin yarısı genişlikte, 3-4 katı uzunlukta olan, başlangıç kısmında boğumlanma bulunmayan ve uzunluğu boyunca belirgin kabarıklık göstermeyen filament şeklindeki uzantılar germ tüp olarak değerlendirildi. Germ tüp oluşturan maya suşları *C. albicans* olarak tanımlandı (75).

3.1.2.2. Kromojenik besiyeri

Kromojenik identifikasyon için kullanılan besiyeri Chromagar *Candida*’dır. Yapılan *Candida* ekimleri 37⁰C’de 48 saatlik inkübasyon ardından kolonilerde renk değişimi gözlemlendi. *C. albicans* yeşil, *C. tropicalis* mavi, *C. glabrata* ve *C. kefyr* pembe-mor olarak görülmüştür.

3.1.2.3. Phoenix Mikroorganizma Tanımlama Sistemi

Kültürden izole edilen *Candida* izolatlarının tanımlanması amacı ile Phoenix (Becton Dickinson, Almanya) tam otomatize maya identifikasyon sistemi kullanıldı. Tek kullanımlık steril eküvyonlu çubukla alınan koloniler Phoenix ID besiyeri (4,5 ml) içinde süspansiyon edildi.

Mayaların identifikasyonunda hazırlanan koloni süspansiyonu 2 McFarland bulanıklığına uygun olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra Phoenix yeast panel ID kısmına dökülüp yerleştirilerek inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.1. Phoenix otomatize maya identifikasyon sisteminde kullanılan biyokimyasal reaktifler.

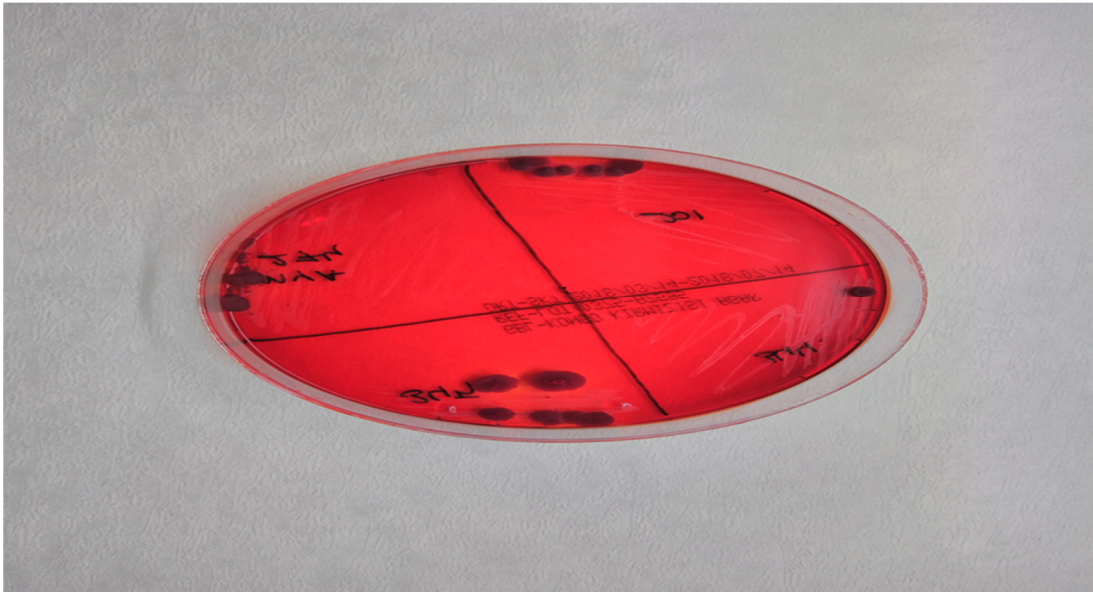
A_Asparagine-7-Amido-4-Methylcoumain	C-Fruktoz
A_Benyl-l_Cysteine7-A-4-M	C-Sükroz
A_Glycine-Arginine-7-A-4-M	D-Fruktoz
A_Glycine-Proli-7-A-4-M	D-Galaktoz
A_Glycine-7-Amido-4-Methylcoumain	D-Dextroz
A_H-B-Alanine-7-Amido-4-Methylcoumain	T-Esculin
A_l-Alanine-7-Amido-4-Methylcoumain	S-Ürea
A_l-Arginine-7-Amido-4-Methylcoumain	l-Alanine-Trifluoromrthylcoumann
A_l-Sitruiline-7-Amido-4-Methylcoumain	S-Glicine-Thiamine-Nsa
A_l-Glutamine-7-Amido-4-Methylcoumain	Flurescent Interference Control Well
A_l-Histidine	N-l-Gamma-Gutamyl-P-Nh
A_l-Proline-7-Amido-4-Methylcoumain	N-1-Proline-P-Nitroanilide-Nh
A_l-Tryptophane-7-A-4-M	P-P-Nitrophenyl-B-D-Glucosine
A_l-H-7-Amido-4-Methylcoumain	P-P-Nitrophenyl-B-A-D-Glucosine
A_l-Valine-7-Amido-4-Methylcoumain	O-Nitrophenyl-B-D-Glucosine
A_l-Lysine-Alanin-7-A-4-M	Maltotrioz
A_l-Lysine-Proline-7-A-4-M	D-Trehaloz
A_Ornithine-7-Amido-4-Methylcoumain	D-Tagatoz
A_Threonine-7-Amido-4-Methylcoumain	C-Mannitol
C- Dekstroz	Polimiksin
D-Glukonik Asit	3-Metil Glutarik Asit

3.2. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi

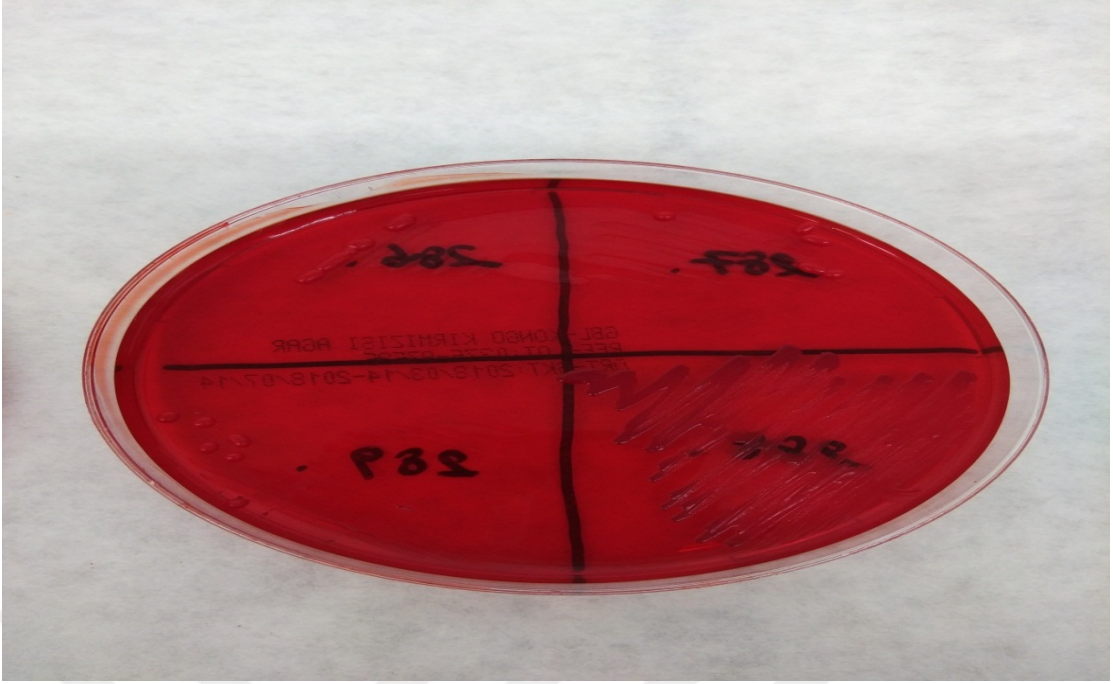
Çalışmaya dahil edilen tüm *Candida* suşlarının biyofilm oluşturma özellikleri iki farklı yöntemle test edilmiştir.

3.2.1. Kongo kırmızısı agar ile biyofilm oluşumunun test edilmesi

Kongo kırmızısı agar daha önceki çalışmalarda önerilen şekilde hazırlanmıştır (76). Bunun için 37 g/L beyin kalp infüzyon buyyonu, 10 g/L agar, 80 g/L glukoz ve distile su homojenize edilmiştir. Kongo kırmızısının sudaki çözeltisi 0,8 g/L olacak şekilde hazırlanmıştır. İki çözelti, otoklavda 1 atm basınç altında 121°C de 15 dakikada ayrı ayrı steril edilmiştir. Her iki karışım otoklavdan çıkarıldıktan sonra sıcaklıkları 55°C'ye düşünceye kadar su banyosunda bekletilmiş ve sonra karıştırılarak 9 cm çapındaki steril petrilere 20 mL/petri olacak şekilde dağıtılmıştır. Petrilereki besiyeri katılaştıktan sonra oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş ve temiz plastik poşetler içinde buzdolabına kaldırılmıştır. Test edilecek *Candida* suşunun SDA'da üretilmiş taze kültüründen bir öze dolusu alınarak Kongo kırmızısı agar yüzeyine ekilmiş ve petrilere 35°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında üreyen maya kolonilerinin renkleri incelenerek, sonuçlar görsel olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeye göre koloniler siyah ve bordo ise mikroorganizma biyofilm pozitif; kırmızı, pembe ve beyaz ise biyofilm negatif olarak kabul edilmiştir. Biyofilm pozitif kabul edilen mayaların koloni rengi siyah ise "güçlü", bordo-siyah ise "orta", bordo ise "zayıf" biyofilm olarak değerlendirilmiştir. Tüm suşlar için 24 saat sonunda ön değerlendirme ve 48 saat sonunda asıl sonuç değerlendirilmesi yapılmıştır.



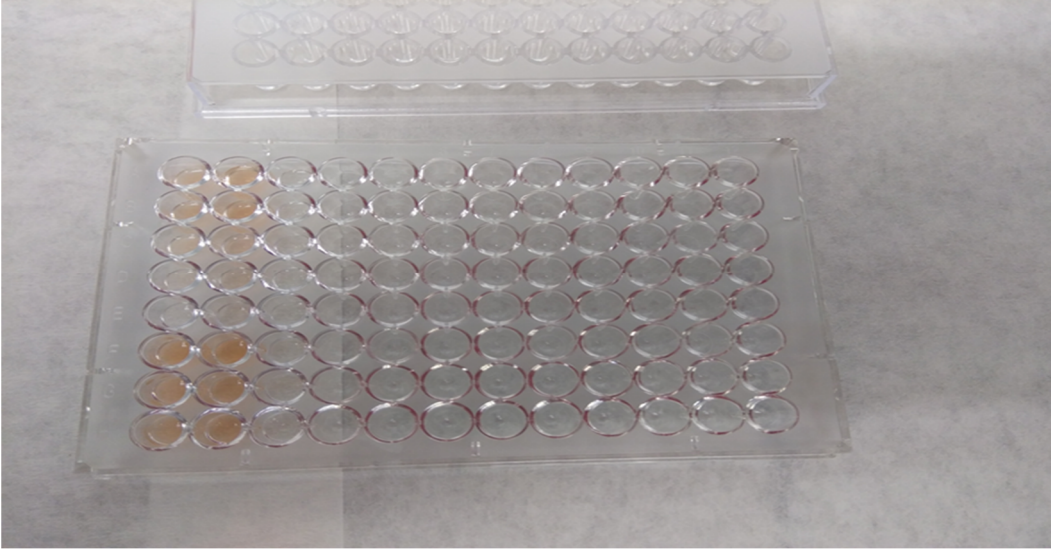
Resim 3.3. Kongo kırmızısı agarda 48 saatlik inkübasyonun ardından görünüm. Suşlar biyofilm pozitif olarak değerlendirilmiştir.



Resim 3.4. Kongo kırmızısı agarda 48 saatlik inkübasyon sonucu koloni görünümü 286, 287, 289 nolu suşlar biyofilm negatif 288 nolu suş biyofilm pozitif.

3.2.2. Mikroplakta XTT indirgenmesi ile biyofilm varlığının test edilmesi

Biyofilm oluşturma özelliği mikroplak yöntemiyle de test edilmiştir. Mikroplakta biyofilm varlığı, Pierce ve ark.'nın (77) daha önce kullandıkları yöntemin modifiye edilmesiyle araştırılmıştır. Bu yöntemde 96 çukurlu mikroplaklar kullanılmıştır. Test edilecek suşlar YPD besiyerinde aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmış, steril RPMI 1640 besiyeri konmuş mikroplak kuyucuklarına eklenmiş ve uygun koşullar altında inkübe edilmiştir. Üreme aşamasının ardından çukurlarda yıkama yapılarak biyofilm oluşturmeyen ve çukur yüzeyine tutunamayan maya hücrelerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işleminin ardından yapılan görsel değerlendirmede, çukurların taban kısmında tabaka oluşumu gözlenmesi biyofilm varlığını, tabaka oluşumu gözlenmemesi biyofilm bulunmadığını işaret etmektedir. Sonuçlar ayrıca hücre canlılığını tayin etmede kullanılan bir kimyasal olan XTT ile spektrofotometrik olarak da değerlendirilmiştir.



Resim 3.5. Mikroplakta XTT indirgenmesi ile biyofilm varlığının test edilmesi yönteminde XTT eklenip 2 saat inkübe edildikten sonra kuyucukların görünüşü

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

1) YPD (“yeast peptone dextrose”) Besiyeri

YPD sıvı besiyeri hazırlamak için 10 g maya özütü, 20 g pepton ve 20 g dektroz bir litre distile suda çözülmüş ve homojenize edilmiştir. Sterilizasyon için çözelti 121°C’de 15 dakika otoklavlanmış, oda sıcaklığına ulaştıktan sonra buzdolabına kaldırılarak $+4\pm 2^{\circ}\text{C}$ ’de saklanmıştır.

2) RPMI 1640 Sıvı Besiyeri

RPMI 1640 sıvı besiyeri hazırlamak için 10,4 g RPMI 1640 ve 69 g 3-(N-morfolino) propan sülfonik asit (MOPS) 900 mL distile su içerisinde homojenize edilmiş ve ardından 1M NaOH (sodyum hidroksit) ile pH 7,0’ye ayarlanmıştır. Son hacim 1 L olacak şekilde distile su eklendikten sonra 0.22 μm por çapı olan filtreden geçirilerek steril edilmiştir. Kullanıma kadar buzdolabında $+4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ’de bekletilmiştir.

3) XTT / Menadion Çözeltisi

a) XTT Çözeltisinin Hazırlanması

XTT çözeltisi, 100 ml PBS (“Phosphate buffered saline”) pH 7,0 içerisinde 50 mg XTT’nin çözülmesiyle hazırlanmıştır. XTT’nin PBS içerisinde tamamen çözüldüğünden emin olduğunda, 0.22 μm por çaplı filtreden geçirilerek sterilite sağlanmıştır. Çözelti 10 ml’lik kısımlara ayrılmış, tüpler ışıktan korunacak şekilde alüminyum folyo ile kaplanarak -70°C ’de saklanmıştır.

b) Menadion Çözeltisinin Hazırlanması

Menadion çözeltisi, 10 ml %100'lük aseton içinde 17,22 mg menadionun çözünmesiyle 10 mM olacak şekilde hazırlanmıştır. Steril ependorflara 10 µl'lik kısımlar halinde dağıtılmış ve -70°C'de saklanmıştır.

c) XTT/ Menadion çözeltisinin hazırlanması

XTT ve menadion çözeltilerinin -70°C'lik derin dondurucudan çıkarılıp oda sıcaklığında erimesinin ardından çalışma çözeltisini elde etmek için 10 ml XTT çözeltisine 1 µl menadion eklenerek karışım hazırlanmıştır.

Test Suşlarının Hazırlanması

Test edilecek suşun SDA'da üretilmiş 24 saatlik taze kültüründen bir öze dolusu 10 ml YPD sıvı besiyerine konmuş ve çalkalayıcıda 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün, içinde üreme olan sıvı besiyeri içindeki maya hücreleri PBS ile üç kez yıkılarak ayrıştırılmıştır. Bunun için besiyeri 3000 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edilmiş, üst kısımdaki sıvı dökülmüştür. Tüpte kalan çökeltiye 5 ml steril PBS eklenerek vortekslenmiş ardından 3000 rpm'de tekrar santrifüjlenmiş ve üsteki sıvı dökülerek bu kez 2 ml steril PBS eklenmiştir. Yeniden vorteksleme ve santrifüj yapılmış ve kalan çökeltiye 37°C sıcaklıkta 1 ml serum fizyolojik (SF) eklenerek karıştırılmıştır. Elde edilen süspansiyondan SF içinde 1×10^6 CFU/ml, spektrofotometrede absorbans 0,09 - 0,13 ve optik dansite (OD) %78 - 80 olacak şekilde süspansiyon hazırlanmıştır. Sonraki işlem 15 dakika içinde gerçekleşmeyecek ise, hazırlanan süspansiyon buzdolabında bekletilmiştir.

Test İçin Mikroplakların Hazırlanması

Mikroplak üzerindeki her kuyucuk bir test için kullanılmıştır. Her suş üçer kez test edilmiştir. Mikroplaklar kontamine edilmeyecek şekilde paketlerinden çıkarıldıktan sonra, test için kullanılacak her kuyucuğa 50 µl RPMI 1640 konulmuş ve pozitif kontrol suşu da dâhil olmak üzere suş süspansiyonlarından 50'şer µl eklenmiştir. Negatif kontrol kuyucuklarına ise sadece 50 µl RPMI 1640 konulmuştur. Hazırlanan test plakları kapakları kapatılıp parafilmle sarıldıktan sonra 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından, çok kanallı pipet kullanılarak 200 µL steril PBS ile üç kez yıkama yapılmıştır. Plaklar kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek tüm PBS'nin akıtılması sağlanmıştır. Bu aşamada kuyucuklardaki biyofilm çıplak göz ile veya "inverted" mikroskopla görülebilir hale gelmektedir. Mikroplaktaki fazla sıvı atıldıktan sonra her kuyucuğa 100µl XTT/ menadion solüsyonu eklenmiştir. Plaklar alüminyum folyo ile sarılarak 2 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Her kuyucuktan 80 µl alınarak temiz düz tabanlı mikroplağa aktarılmıştır. Plaklar 492 nm dalgaboyunda ölçüm yapan spektrofotometrede okutularak absorbans ölçülmüş ve

optik dansite (OD) belirlenmiştir. Kalite kontrol için her çalışmada biyofilm yapan standart suş olan *C.albicans* MYA 274 kullanılmıştır.

Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Sonuçların değerlendirilmesinde Christensen ve arkadaşlarının (78) çalışması temel alınmıştır. Bunun için her kuyucuktan elde edilen OD değerinden negatif kontrol kuyucuğunun OD değeri çıkarılarak test değeri hesaplanmıştır. Her suş için üç test değerinin ortalaması sonuç değeri olarak alınmıştır. Sonuç değeri, negatif kontrol kuyucuklarından elde edilen sınır değer ile karşılaştırılmıştır. Sınır değer, negatif kontrol kuyucuklarının OD değerlerinin ortalamasına üç standart sapma eklenerek hesaplanmıştır.

Suşa ait sonuç değeri < sınır değer ise suş negatif,

Sınır değer < suşa ait sonuç değeri < 2 x sınır değer ise suş zayıf pozitif,

2 x sınır değer < suşa ait sonuç değeri < 4 x sınır değer ise suş orta derecede pozitif,

Suşa ait sonuç değeri > 4 x sınır değer ise suş güçlü pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.3. Mayaların Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Bu çalışmaya Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen ve çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve tanımlanan 60 adet candida albicans izolatı dahil edilmiştir. Klinik suşların yanında çalışmaya standart suş olarak *C.albicans* ATCC 90028 kullanılmıştır. Suşların antifungal duyarlılık durumları sıvı mikrodilüsyon yönteminde referans yöntemlerden biri olan The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) definitive document E.DEF 7.3.1 kılavuzu önerilerine göre gerçekleştirilmiştir. Yöntemin uygulanışı aşağıdaki şekilde belirtilmiştir (79).

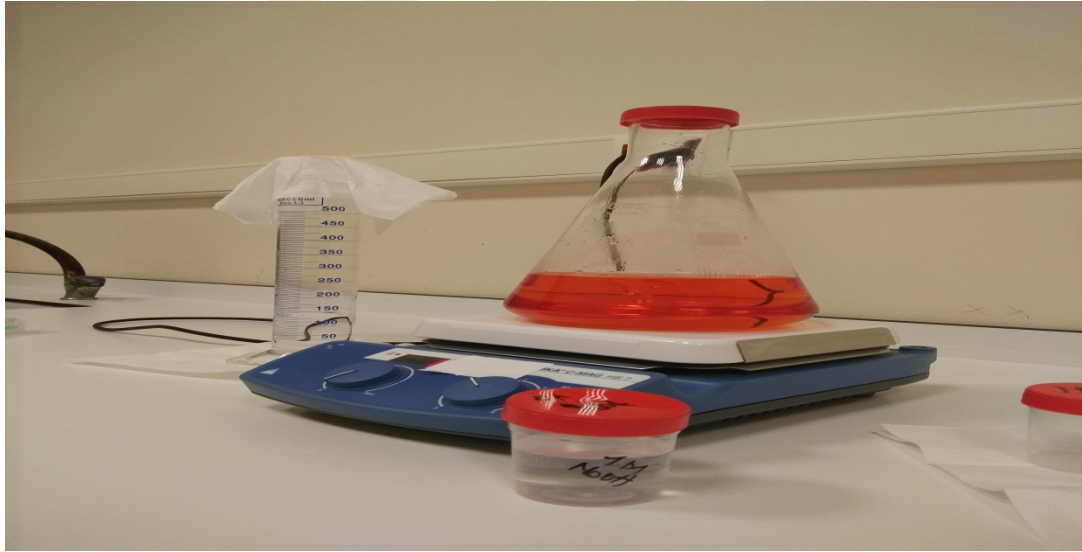
3.3.1. Besiyerinin hazırlanması

Besiyeri olarak glutaminli, bikarbonatsız %2 glikozlu RPMI 1640 kullanılması tavsiye edilmektedir. Besiyerinin hazırlanış stratejisi aşağıdaki gibidir.

Besiyeri hazırlamak için gerekli bileşenler (79).

Component	Double strength concentration
Distilled water	900 mL ^a
RPMI 1640 (Table 1)	20.8 g
MOPS	69.06 g
Glucose	36 g

Belirtilen bileşenler 900 ml distile su içinde çözdürülmüş ve pH 7.0 'a ayarlamak için 1M Sodyum Hidroksit eklenmiştir. Son hacim 1000 ml olacak şekilde distile su ilave edilmiştir. Sterilizasyonu sağlamak amacıyla hazırlanan çözelti 0.22 µm por çaplı filtre kullanılarak süzülmüştür.



Resim 3.6. RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması

3.3.1. Stok solüsyonlarının hazırlanması

Antifungal ilaç çözeltileri, antifungal ilacın tozunun potensi dikkate alınarak hazırlanmıştır. Standart bir çözelti hazırlamak için gereken toz veya seyreltici miktarı aşağıdaki gibi hesaplanabilir:

Antifungal ilaç tartım formülü (79).

$$\text{Weight (g)} = \frac{\text{Volume (L)} \times \text{Concentration (mg/L)}}{\text{Potency (mg/g)}}$$

$$\text{Volume (L)} = \frac{\text{Weight (g)} \times \text{Potency (mg/g)}}{\text{Concentration (mg/L)}}$$

Antifungal tozlar analitik terazi üzerinde tartılmıştır. Antifungal ilaç stok çözelti konsantrasyonu 200 kat yüksek konsantrasyonda hazırlanmıştır. Antifungal ilaçları eritebilmek için gerekli olan solvent miktarları aşağıda belirtilmiştir (79).

Antifungal agent	Solvent	Characteristics	Test range (mg/L)
Amphotericin B	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4
Anidulafungin	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4
Caspofungin	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4
Fluconazole	DMSO/Water ^a	Hydrophobic/hydrophilic	0.125 - 64
Flucytosine	Water	Hydrophilic	0.125 - 64
Isavuconazole	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4
Itraconazole	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4
Micafungin	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4
Posaconazole	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4
Voriconazole	DMSO	Hydrophobic	0.008 - 4

DMSO, dimetil sülfoksit (79).

Stok solüsyonu için sterilizasyon normalde gerekli değildir ama istenirse filtre yardımıyla sterilizasyon yapılabilir. Stok solüsyonu küçük hacimlere bölünerek steril polipropilen yada polietilen tüplerde -70 °C de saklanmıştır.

3.3.2. Çalışma solüsyonunun hazırlanması

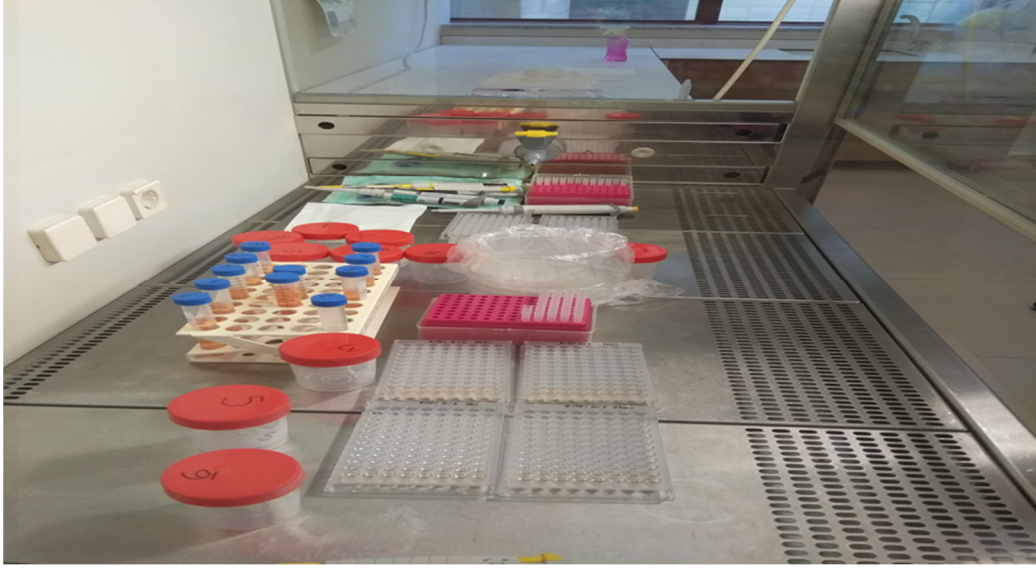
Çalışma solüsyonlarının hazırlanması için gerekli adımlar aşağıda belirtilmiştir:

a. stok tüpleri dondurucudan çıkartılmıştır.

b. Dokuz farklı tüpe her antifungal için ayrı ayrı belirtilen solvent miktarlarından uygun hacimlerde dağıtılmıştır.

c.iki kat güçte hazırlanmış besiyeri olan RPMI % 2 G 'den 9.9 mL alınarak on farklı tüpe dağıtılmıştır.

d.Antifungal ilaçlardan 100 ml alınıp 9.9 mL RPMI konulan tüplerin içine aktarılmıştır. (1:100 dilüsyon)



Resim 3.7. Çalışma solüsyonu hazırlanması.

3.3.3. Mikrodilüsyon plaklarının hazırlanması

Steril plastik, düz tabanlı, tek kullanımlık 96 kuyucuklu 300 μ L kapasiteye sahip plaklar kullanılmıştır. Mikroplağın 1-10 kuyucuklarına 2x final konsantrasyonda hazırladığımız antifungal ilaç içeren besiyerinden 100 μ L dağıtılmıştır. 11.ve 12. kuyucuklara ise sadece RPMI % 2 G içeren besiyerinden dağıtılmıştır.

Tablo 3.2. Antifungal dilüsyon serileri ve final konsantrasyon hazırlanması (79).

Step	Concentration (mg/L)	Source	Volume of antifungal (μ L)	Volume of solvent ^a (μ L)	Intermediate concentration (mg/L)	Concentration (mg/L) after 1:100 dilution with double strength RPMI 2%G ^b
1	12 800 ^c	Stock	200	0	12,800	128
2	12 800	Stock	100	100	6,400	64
3	12 800	Stock	50	150	3,200	32
4	12 800	Stock	50	350	1,600	16
5	1600	Step 4	100	100	800	8
6	1600	Step 4	50	150	400	4
7	1600	Step 4	50	350	200	2
8	200	Step 7	100	100	100	1
9	200	Step 7	50	150	50	0.5
10	200	Step 7	25	175	25	0.25

3.3.4. Mikrodilüsyon plaklarının saklanması

Plaklar alüminyum folyo ile kapatılarak -20°C de 1 ay saklanmıştır. Eğer istenirse -70°C de altı ay kadar saklanabilir.

3.3.5. Maya inokulumünün hazırlanması

Maya inokulumü 18-24 saatlik taze kültürden alınan kolonilerin distile su içinde iyice çözdürülerek elde edilmiş ve son inokulum miktarı 0.5×10^5 ile 2.5×10^5 olacak şekilde ayarlanmış ve inokulum yapılacak plaklara uygun miktarlarda dağıtılmıştır.

3.3.6. Mikrodilüsyon Plaklarının inokülasyonu

Koloni süspansiyonu iyice vortekslelendikten sonra son inokulum miktarı 0.5×10^5 ile 2.5×10^5 olacak şekilde hazırlanan süspansiyondan plağın 11.kuyucuğuda (üreme kontrolü) dahil olmak üzere ekleme yapılmıştır. 12.kuyucuğa ise distile su eklenmiştir (sterilite kontrol amacıyla).

3.3.7. Mikrodilüsyon Plaklarının İnkübasyonu

Alüminyum folyo ile kaplanan mikrodilüsyon plakları 35 ya da 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir.

3.3.8. Sonuç Okuma

Ünkübasyonun ardından plaklar mikrodilüsyon plak okuyucusu cihazında okutulmalıdır. Sonuç okuturken önerilen dalgaboyu 530 nm ancak 450 ve 405 nm dalgaboyunda ölçüm yapan cihazlarda kullanılabilir. Çalışmamızda 450 nm dalga boyunda ölçüm yapan cihaz kullanılmıştır.

Amphotericin B

24 saatlik inkübasyonun ardından yapılan okuma sonucuna göre Amphotericin B için ilaçsız kontrol kuyucuguna göre kıyaslandığında üremenin %90 inhibe olduğu kuyucuk MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

Flusitozin ve azol grubu antifungaller

24 saatlik inkübasyonun ardından yapılan okuma sonucuna göre flusitosin (5-flucytosine) ve azol grubu antifungaller için ilaçsız kontrol kuyucuguna göre kıyaslandığında üremenin % 50 azaldığı kuyucuk MİK değeri olarak kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

Bu çalışmaya Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen ve çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve tanımlanan 60 adet *Candida albicans* izolatu ve 1 adet standart suş (*C.albicans* MYA 274) olmak üzere toplam 61 suş çalışmaya dahil edilmiştir.

4.1. Kongo Kırmızısı Agar ile Biyofilm Oluşumunun Test Edilmesi Sonucu

Kongo kırmızısı agar yöntemiyle yapılan çalışma sonucuna göre toplam 61 suşun 32 (%53) si biyofilm negatif olarak değerlendirilirken 29 (%47) suş biyofilm pozitif olarak tespit edilmiştir. Bu test sonucuna göre hastalardan izole edilen suşlardaki biyofilm özelliği Tablo 4.1 'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1. Kongo Kırmızısı Agarda üreyen koloni rengine göre suşların biyofilm yapabilme özelliği

Suş	Renk	Biyofilm Sonucu	Suş	Renk	Biyofilm Sonucu	Suş	Renk	Biyofilm Sonucu
1	BORDO	ZAYIF BİYOFİLM	21	BORDO	ZAYIF BİYOFİLM	41	KIRMIZI	NEGATİF
2	BORDO	ZAYIF BİYOFİLM	22	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM	42	KIRMIZI	NEGATİF
3	BORDO	ZAYIF BİYOFİLM	23	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM	43	KIRMIZI	NEGATİF
4	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM	24	KIRMIZI	NEGATİF	44	KIRMIZI	NEGATİF
5	BORDO	ZAYIF BİYOFİLM	25	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM	45	KIRMIZI	NEGATİF
6	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM	26	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM	46	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM
7	SİYAH	GÜÇLÜ	27	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM	47	KIRMIZI	NEGATİF
8	SİYAH	GÜÇLÜ	28	KIRMIZI	NEGATİF	48	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM
9	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM	29	KIRMIZI	NEGATİF	49	KIRMIZI	NEGATİF
10	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM	30	KIRMIZI	NEGATİF	50	KIRMIZI	NEGATİF
11	BORDO	ZAYIF BİYOFİLM	31	KIRMIZI	NEGATİF	51	KIRMIZI	NEGATİF
12	KIRMIZI	NEGATİF	32	KIRMIZI	NEGATİF	52	KIRMIZI	NEGATİF
13	KIRMIZI	NEGATİF	33	KIRMIZI	NEGATİF	53	KIRMIZI	NEGATİF
14	SİYAH	GÜÇLÜ	34	KIRMIZI	NEGATİF	54	KIRMIZI	NEGATİF
15	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM	35	KIRMIZI	NEGATİF	55	KIRMIZI	NEGATİF
16	BORDO	ZAYIF BİYOFİLM	36	KIRMIZI	NEGATİF	56	KIRMIZI	NEGATİF
17	KIRMIZI	NEGATİF	37	KIRMIZI	NEGATİF	57	KIRMIZI	NEGATİF
18	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM	38	KIRMIZI	NEGATİF	58	BORDO	ZAYIF BİYOFİLM
19	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM	39	KIRMIZI	NEGATİF	59	BORDO-SİYAH	ORTA BİYOFİLM
20	SİYAH	GÜÇLÜ	40	BORDO	ZAYIF BİYOFİLM	60	BORDO	ZAYIF BİYOFİLM
						61	KIRMIZI	NEGATİF

4.2. Mikroplakta XTT İndirgenmesi Yöntemiyle Biyofilm Varlığının Test

Edilmesi Sonucu

Mikroplakta XTT indirgenmesi yöntemiyle yapılan çalışma sonucu 61 suşun 32 (%53) biyofilm negatif olarak bulunurken 29 (%47) suşun biyofilm pozitif olarak tespit edilmiştir. Mikroplakta indirgenme sonucu biyofilm özelliği tablo 4.2’de belirtilmiştir.

Tablo 4.2. Mikroplakta XTT İndirgenmesi Sonucu Biyofilm Özelliğinin Belirlenmesi

Suş	Sonuç	Suş	Sonuç	Suş	Sonuç
1	ZAYIF BİYOFİLM	21	ZAYIF BİYOFİLM	41	NEGATİF
2	ZAYIF BİYOFİLM	22	ORTA BİYOFİLM	42	NEGATİF
3	ZAYIF BİYOFİLM	23	ORTA BİYOFİLM	43	NEGATİF
4	ORTA BİYOFİLM	24	NEGATİF	44	NEGATİF
5	ZAYIF BİYOFİLM	25	ORTA BİYOFİLM	45	NEGATİF
6	ORTA BİYOFİLM	26	ORTA BİYOFİLM	46	ORTA BİYOFİLM
7	GÜÇLÜ BİYOFİLM	27	ORTA BİYOFİLM	47	NEGATİF
8	GÜÇLÜ BİYOFİLM	28	NEGATİF	48	ORTA BİYOFİLM
9	ORTA BİYOFİLM	29	NEGATİF	49	NEGATİF
10	ORTA BİYOFİLM	30	NEGATİF	50	NEGATİF
11	ZAYIF BİYOFİLM	31	NEGATİF	51	NEGATİF
12	NEGATİF	32	NEGATİF	52	NEGATİF
13	NEGATİF	33	NEGATİF	53	NEGATİF
14	GÜÇLÜ BİYOFİLM	34	NEGATİF	54	NEGATİF
15	ORTA BİYOFİLM	35	NEGATİF	55	NEGATİF
16	ZAYIF BİYOFİLM	36	NEGATİF	56	NEGATİF
17	NEGATİF	37	NEGATİF	57	NEGATİF
18	ORTA BİYOFİLM	38	NEGATİF	58	ZAYIF BİYOFİLM
19	ZAYIF BİYOFİLM	39	NEGATİF	59	ORTA BİYOFİLM
20	GÜÇLÜ BİYOFİLM	40	ZAYIF BİYOFİLM	60	ZAYIF BİYOFİLM
				61	NEGATİF

4.3. Mikroplakta XTT İndirgenmesi ile Kongo Kırmızısı Agar yöntemi Biyofilm

Sonucunun Karşılaştırılması

Mikroplakta XTT İndirgenmesi testi ile Kongo kırmızısı agar testi karşılaştırıldığında sonuçlar benzerlik göstermektedir. 61 suşun 32 (%53) si negatif 29 (%47) suş biyofilm pozitif olarak saptanmıştır. Mikroplakta XTT indirgenme deneyi spektrofotometrik değerlendirme yaptığı için tüm türler arasında biyofilm varlığını daha iyi bir şekilde göstermektedir. Elde edilen sonuçlar Kappa Coefficient testi ile değerlendirilmiş biyofilm oluşturma özelliği bakımından iki test arasındaki uyum istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 4.3. Mikroplakta XTT İle Kongo Kırmızısı Yöntemi sonuçlarının karşılaştırması

		Mikroplakta XTT Yöntemi								Total	Kappa Coefficient	p
		Negatif		Zayıf Biyofilm		Orta Biyofilm		Güçlü Biyofilm				
		n	%	N	%	N	%	n	%	n		
Kongo Kırmızısı Agar	Negatif	32	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	32	0,974	p<0,001*
	Zayıf Biyofilm	0	0,0	10	100,0	0	0,0	0	0,0	10		
	Orta Biyofilm	0	0,0	1	6,7	14	93,3	0	0,0	15		
	Güçlü Biyofilm	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	100,0	4		
Total		32		11		14		4		61		

Kappa Coefficient; a: 0,05;* İki test arasındaki uyum istatistiksel olarak anlamlı.

4.4. Antifungal Duyarlılık Testi Sonuçları

4.4.1. Amforterisin B ile yapılan çalışma sonucu

Amforterisin B ile yapılan çalışmaya klinik örneklerden izole edilen 60 adet *C.albicans* izolatu ile yapılmıştır. Çalışma sonucu elde edilen MİK değerleri Tablo 4.4 belirtilmiştir.

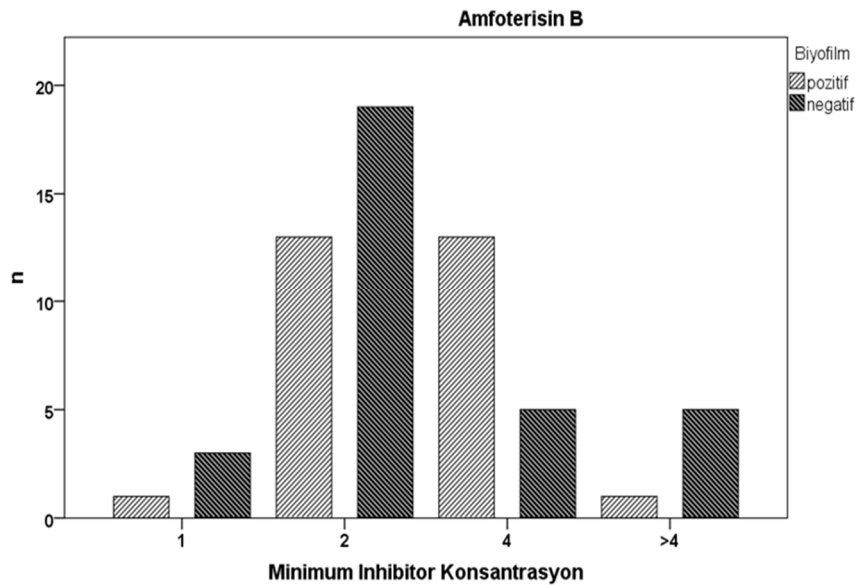
Tablo 4.4. Amfoterisin B ile yapılan çalışma sonucu MİK dağılımları.

Suş No	Tür	Mik değeri	Suş No	Tür	Mik değeri	Suş No	Tür	Mik değeri
1	<i>C.albicans</i>	>4	21	<i>C.albicans</i>	4	41	<i>C.albicans</i>	2
2	<i>C.albicans</i>	4	22	<i>C.albicans</i>	4	42	<i>C.albicans</i>	4
3	<i>C.albicans</i>	4	23	<i>C.albicans</i>	4	43	<i>C.albicans</i>	2
4	<i>C.albicans</i>	2	24	<i>C.albicans</i>	4	44	<i>C.albicans</i>	2
5	<i>C.albicans</i>	4	25	<i>C.albicans</i>	4	45	<i>C.albicans</i>	>4
6	<i>C.albicans</i>	2	26	<i>C.albicans</i>	4	46	<i>C.albicans</i>	2
7	<i>C.albicans</i>	4	27	<i>C.albicans</i>	>4	47	<i>C.albicans</i>	2
8	<i>C.albicans</i>	4	28	<i>C.albicans</i>	2	48	<i>C.albicans</i>	2
9	<i>C.albicans</i>	4	29	<i>C.albicans</i>	>4	49	<i>C.albicans</i>	2
10	<i>C.albicans</i>	4	30	<i>C.albicans</i>	>4	50	<i>C.albicans</i>	2
11	<i>C.albicans</i>	2	31	<i>C.albicans</i>	2	51	<i>C.albicans</i>	2
12	<i>C.albicans</i>	4	32	<i>C.albicans</i>	4	52	<i>C.albicans</i>	4
13	<i>C.albicans</i>	4	33	<i>C.albicans</i>	2	53	<i>C.albicans</i>	2
14	<i>C.albicans</i>	2	34	<i>C.albicans</i>	2	54	<i>C.albicans</i>	2
15	<i>C.albicans</i>	2	35	<i>C.albicans</i>	1	55	<i>C.albicans</i>	2
16	<i>C.albicans</i>	2	36	<i>C.albicans</i>	>4	56	<i>C.albicans</i>	1
17	<i>C.albicans</i>	2	37	<i>C.albicans</i>	2	57	<i>C.albicans</i>	2
18	<i>C.albicans</i>	2	38	<i>C.albicans</i>	2	58	<i>C.albicans</i>	2
19	<i>C.albicans</i>	2	39	<i>C.albicans</i>	2	59	<i>C.albicans</i>	1
20	<i>C.albicans</i>	2	40	<i>C.albicans</i>	2	60	<i>C.albicans</i>	1

*Standart MİK sonuçları üreme yeterli olduğu için 24 saat sonunda okunmuştur.

*EUCAST 9.0 klinik değer tablosuna göre belirtilen MİK değeri Amfoterisin B için $1 \leq$ olduğunda S: duyarlı $1 >$ olduğu durumda R : dirençli olarak değerlendirildiği belirtilmiştir.

Tablo 4.5. Biyofilm pozitif ve biyofilm negatif hastaların MİK değerlerinin karşılaştırılması.



Tablo 4.6 Amfoterisin B

Minimum İnhibitor Konsantrasyon	Biyofilm				Total		P
	Pozitif		negatif				
	n	%	n	%	n	%	
1	1	3,6	3	9,4	4	6,7	0,044*
2	13	46,4	19	59,4	32	53,3	
4	13	46,4	5	15,6	18	30,0	
>4	1	3,6	5	15,6	6	10,0	
Total	28	100,0	32	100,0	60	100,0	

*Chi-square test; Exact test; a: 0,05;

*Konsantrasyon düzeylerinin biyofilm gruplarına göre frekans dağılımındaki farklılıkları istatistiksel olarak anlam

4.4.2. Flukonazol ile yapılan çalışma sonucu

Flukonazol ile yapılan çalışmaya klinik örneklerden izole edilen 60 adet *C. albicans* izolatı dahil edilmiştir. Çalışma sonucu elde edilen MİK değerleri Tablo 4.6 belirtilmiştir

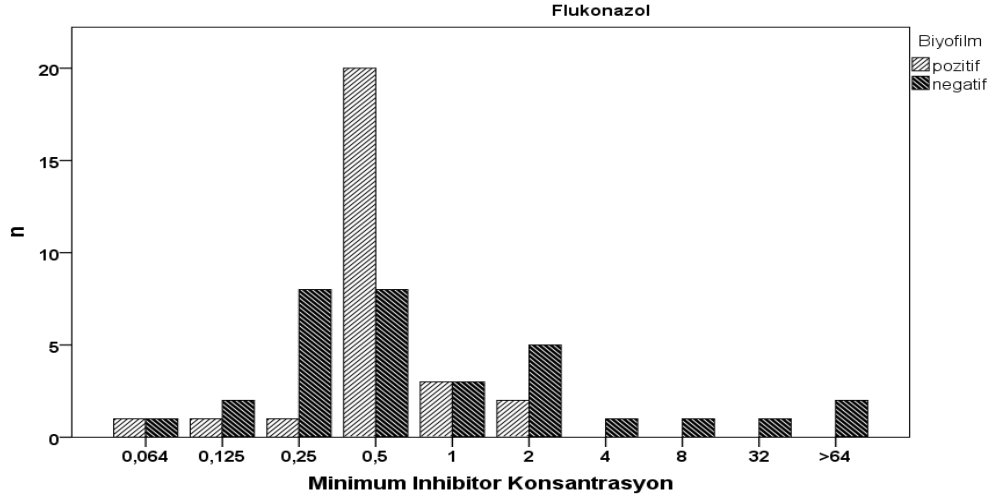
Tablo 4.7. Flukonazol ile yapılan antifungal duyarlılık testi sonucu MİK değerleri

suş	tür	mik	suş	tür	mik	suş	tür	mik
1	<i>C.albicans</i>	2	21	<i>C.albicans</i>	0,5	41	<i>C.albicans</i>	0,5
2	<i>C.albicans</i>	1	22	<i>C.albicans</i>	0,5	42	<i>C.albicans</i>	>64
3	<i>C.albicans</i>	1	23	<i>C.albicans</i>	4	43	<i>C.albicans</i>	0,5
4	<i>C.albicans</i>	0,5	24	<i>C.albicans</i>	0,5	44	<i>C.albicans</i>	0,25
5	<i>C.albicans</i>	0,5	25	<i>C.albicans</i>	0,5	45	<i>C.albicans</i>	2
6	<i>C.albicans</i>	0,5	26	<i>C.albicans</i>	0,5	46	<i>C.albicans</i>	1
7	<i>C.albicans</i>	2	27	<i>C.albicans</i>	2	47	<i>C.albicans</i>	0,5
8	<i>C.albicans</i>	0,5	28	<i>C.albicans</i>	1	48	<i>C.albicans</i>	2
9	<i>C.albicans</i>	0,5	29	<i>C.albicans</i>	0,5	49	<i>C.albicans</i>	16
10	<i>C.albicans</i>	0,5	30	<i>C.albicans</i>	1	50	<i>C.albicans</i>	8
11	<i>C.albicans</i>	0,5	31	<i>C.albicans</i>	32	51	<i>C.albicans</i>	0,125
12	<i>C.albicans</i>	0,5	32	<i>C.albicans</i>	0,25	52	<i>C.albicans</i>	0,25
13	<i>C.albicans</i>	0,5	33	<i>C.albicans</i>	2	53	<i>C.albicans</i>	0,25
14	<i>C.albicans</i>	0,5	34	<i>C.albicans</i>	>64	54	<i>C.albicans</i>	0,5
15	<i>C.albicans</i>	0,5	35	<i>C.albicans</i>	0,25	55	<i>C.albicans</i>	0,5
16	<i>C.albicans</i>	1	36	<i>C.albicans</i>	0,25	56	<i>C.albicans</i>	0,125
17	<i>C.albicans</i>	0,25	37	<i>C.albicans</i>	0,25	57	<i>C.albicans</i>	0,125
18	<i>C.albicans</i>	0,5	38	<i>C.albicans</i>	0,5	58	<i>C.albicans</i>	0,064
19	<i>C.albicans</i>	0,5	39	<i>C.albicans</i>	0,5	59	<i>C.albicans</i>	0,064
20	<i>C.albicans</i>	0,5	40	<i>C.albicans</i>	0,25	60	<i>C.albicans</i>	0,5

*Standart MİK sonuçları üreme yeterli olduğu için 24 saat sonunda okunmuştur

* EUCAST 9.0 klinik değer tablosuna göre belirtilen MİK değeri Flukonazol için $2 \leq$ olduğunda S:duyarlı $4 >$ olduğunda ise R:dirençli olarak belirtilmiştir.

Tablo 4.8. Flukonazol için biyofilm pozitif ve negatif suşların MİK değerlerinin karşılaştırılması



Tablo 4.9. Flukonazol için biyofilm negatif ve pozitif suşların MİK dağılımları

Minimum İnhibitor Konsantrasyon	Biyofilm				Total		P
	Pozitif		negatif				
	N	%	n	%	n	%	
0,064	1	3,6	1	3,1	2	3,3	0,048
0,125	1	3,6	2	6,3	3	5,0	
0,25	1	3,6	8	25,0	9	15,0	
0,5	20	71,4	8	25,0	28	46,7	
1	3	10,7	3	9,4	6	10,0	
2	2	7,1	5	15,6	7	11,7	
4	0	0,0	1	3,1	1	1,7	
8	0	0,0	1	3,1	1	1,7	
>64	0	0,0	2	6,3	2	3,3	
32,00	0	0,0	1	3,1	1	1,7	
Total	28	100,0	32	100,0	60	100,0	

*Chi-square test; Exact test; a:0,05;

*Konsantrasyon düzeylerinin biyofilm gruplarına göre frekans dağılımındaki farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı

4.4.3. Vorikonazol ile yapılan çalışma sonucu

Vorikonazol ile yapılan çalışmaya klinik örneklerden izole edilen 60 *C.albicans* izolatu dahil edilmiştir. Yaptığımız çalışma sonucu elde ettiğimiz veriler Tablo 4.10 'da belirtilmiştir.

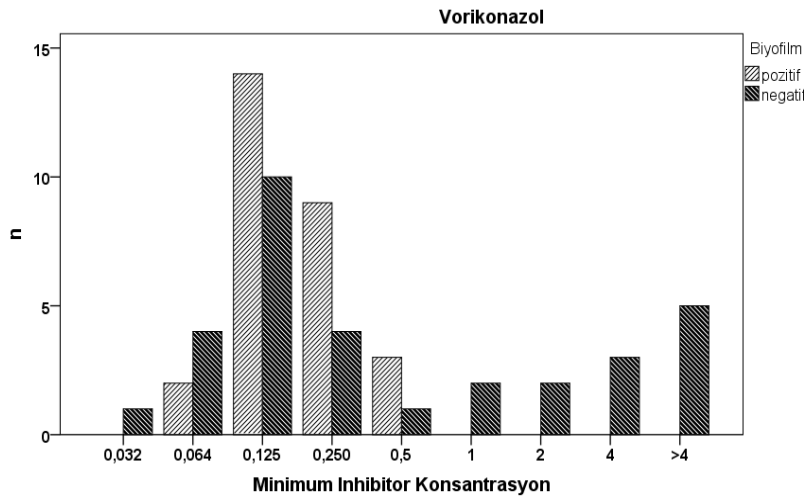
Tablo 4.10. Vorikonazol için antifungal duyarlılık testi sonucu elde edilen MİK değerleri

suş	tür	mik	suş	tür	mik	suş	tür	mik
1	<i>C.albicans</i>	0,5	21	<i>C.albicans</i>	0,25	41	<i>C.albicans</i>	0,125
2	<i>C.albicans</i>	0,25	22	<i>C.albicans</i>	0,125	42	<i>C.albicans</i>	>4
3	<i>C.albicans</i>	0,25	23	<i>C.albicans</i>	4	43	<i>C.albicans</i>	0,25
4	<i>C.albicans</i>	0,25	24	<i>C.albicans</i>	0,125	44	<i>C.albicans</i>	0,125
5	<i>C.albicans</i>	0,125	25	<i>C.albicans</i>	0,125	45	<i>C.albicans</i>	1
6	<i>C.albicans</i>	0,125	26	<i>C.albicans</i>	0,25	46	<i>C.albicans</i>	0,5
7	<i>C.albicans</i>	0,5	27	<i>C.albicans</i>	>4	47	<i>C.albicans</i>	0,125
8	<i>C.albicans</i>	0,25	28	<i>C.albicans</i>	>4	48	<i>C.albicans</i>	2
9	<i>C.albicans</i>	0,125	29	<i>C.albicans</i>	0,125	49	<i>C.albicans</i>	4
10	<i>C.albicans</i>	0,125	30	<i>C.albicans</i>	0,25	50	<i>C.albicans</i>	4
11	<i>C.albicans</i>	0,125	31	<i>C.albicans</i>	>4	51	<i>C.albicans</i>	0,064
12	<i>C.albicans</i>	0,25	32	<i>C.albicans</i>	0,125	52	<i>C.albicans</i>	0,064
13	<i>C.albicans</i>	0,125	33	<i>C.albicans</i>	2	53	<i>C.albicans</i>	0,125
14	<i>C.albicans</i>	0,125	34	<i>C.albicans</i>	>4	54	<i>C.albicans</i>	0,064
15	<i>C.albicans</i>	0,25	35	<i>C.albicans</i>	0,125	55	<i>C.albicans</i>	0,032
16	<i>C.albicans</i>	0,25	36	<i>C.albicans</i>	0,064	56	<i>C.albicans</i>	0,125
17	<i>C.albicans</i>	0,125	37	<i>C.albicans</i>	0,125	57	<i>C.albicans</i>	0,064
18	<i>C.albicans</i>	0,25	38	<i>C.albicans</i>	1	58	<i>C.albicans</i>	0,064
19	<i>C.albicans</i>	0,25	39	<i>C.albicans</i>	0,125	59	<i>C.albicans</i>	0,5
20	<i>C.albicans</i>	0,125	40	<i>C.albicans</i>	0,125	60	<i>C.albicans</i>	0,125

*Standart MİK sonuçları üreme yeterli olduğu için 24 saat sonunda okunmuştur

* EUCAST 9.0 klinik değer tablosuna göre belirtilen MİK değeri Vorikonazol için ≤ 0.064 ise S:duyarlı >0.25 ise R:dirençli olarak kabul edilmektedir.

Tablo 4.11. Vorikonazol için biyofilm pozitif ve negatif suşların MİK dağılımları



Tablo 4.12. Vorikonazol

Minimum İnhibitor Konsantrasyon	Biyofilm				Total		p
	Pozitif		negatif		n	%	
	N	%	n	%			
0,032	0	0,0	1	3,1	1	1,7	0,029*
0,064	2	7,1	4	12,5	6	10,0	
0,125	14	50,0	10	31,3	24	40,0	
0,25	9	32,1	4	12,5	13	21,7	
0,5	3	10,7	1	3,1	4	6,7	
1	0	0,0	2	6,3	2	3,3	
2	0	0,0	2	6,3	2	3,3	
4	0	0,0	3	9,4	3	5,0	
>4	0	0,0	5	15,6	5	8,3	
Total	28	100,0	32	100,0	60	100,0	

*Chi-square test; Exact test ;a: 0,05;

*Konsantrasyon düzeylerinin biyofilm gruplarına göre frekans dağılımındaki farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı

4.4.4. Fulsitozin ile yapılan çalışma sonucu

Fulsitozin(5-FC) ile yapılan çalışmaya klinik örneklerden izole edilen 60 *C.albicans* izolatu dahil edilmiştir. Yaptığımız çalışma sonucu elde ettiğimiz veriler Tablo 4.13’de belirtilmiştir.

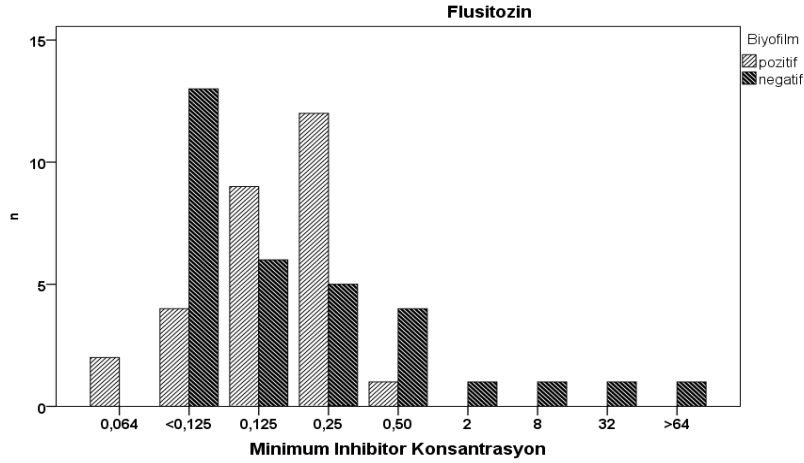
Tablo 4.13. Flusitozin (5-fc) ile yapılan çalışma sonucu MİK Dağılımı

suş	tür	mik	suş	tür	mik	suş	tür	mik
1	<i>C.albicans</i>	0,125	21	<i>C.albicans</i>	0,25	41	<i>C.albicans</i>	0,125
2	<i>C.albicans</i>	0,25	22	<i>C.albicans</i>	0,25	42	<i>C.albicans</i>	0,5
3	<i>C.albicans</i>	0,125	23	<i>C.albicans</i>	<0,125	43	<i>C.albicans</i>	0,125
4	<i>C.albicans</i>	0,125	24	<i>C.albicans</i>	0,25	44	<i>C.albicans</i>	<0,125
5	<i>C.albicans</i>	0,25	25	<i>C.albicans</i>	<0,125	45	<i>C.albicans</i>	<0,125
6	<i>C.albicans</i>	0,125	26	<i>C.albicans</i>	<0,125	46	<i>C.albicans</i>	<0,125
7	<i>C.albicans</i>	0,125	27	<i>C.albicans</i>	0,25	47	<i>C.albicans</i>	<0,125
8	<i>C.albicans</i>	0,25	28	<i>C.albicans</i>	32	48	<i>C.albicans</i>	<0,125
9	<i>C.albicans</i>	0,125	29	<i>C.albicans</i>	<0,125	49	<i>C.albicans</i>	<0,125
10	<i>C.albicans</i>	0,125	30	<i>C.albicans</i>	>64	50	<i>C.albicans</i>	<0,125
11	<i>C.albicans</i>	0,25	31	<i>C.albicans</i>	<0,125	51	<i>C.albicans</i>	0,5
12	<i>C.albicans</i>	0,125	32	<i>C.albicans</i>	<0,125	52	<i>C.albicans</i>	2
13	<i>C.albicans</i>	0,25	33	<i>C.albicans</i>	<0,125	53	<i>C.albicans</i>	0,5
14	<i>C.albicans</i>	0,5	34	<i>C.albicans</i>	0,125	54	<i>C.albicans</i>	0,25
15	<i>C.albicans</i>	0,25	35	<i>C.albicans</i>	<0,125	55	<i>C.albicans</i>	0,25
16	<i>C.albicans</i>	0,25	36	<i>C.albicans</i>	8	56	<i>C.albicans</i>	0,125
17	<i>C.albicans</i>	0,25	37	<i>C.albicans</i>	<0,125	57	<i>C.albicans</i>	0,064
18	<i>C.albicans</i>	0,25	38	<i>C.albicans</i>	<0,125	58	<i>C.albicans</i>	0,064
19	<i>C.albicans</i>	0,125	39	<i>C.albicans</i>	0,25	59	<i>C.albicans</i>	0,5
20	<i>C.albicans</i>	0,25	40	<i>C.albicans</i>	0,125	60	<i>C.albicans</i>	0,125

*Standart MİK sonuçları üreme yeterli olduğu için 24 saat sonunda okunmuştur.

* EUCAST 9.0 klinik değer tablosunda Fulsitozin için kesin MİK aralığı belirtilmemiştir.

Tablo 4.14. Flusitozin için Biyofilm negatif ve pozitif suşların MİK dağılımları



Tablo 4.15. Flusitozin MİK dağılımları

Minimum İnhibitor Konsantrasyon	biyofilm1				Total		P
	Pozitif		negatif		Total		
	n	%	n	%	n	%	
0,064	2	7,1	0	0,0	2	3,3	0,045*
<0,125	4	14,3	13	40,6	17	28,3	
0,25	12	42,9	5	15,6	17	28,3	
0,50	1	3,6	4	12,5	5	8,3	
2	0	0,0	1	3,1	1	1,7	
0,125	9	32,1	6	18,8	15	25,0	
8	0	0,0	1	3,1	1	1,7	
32	0	0,0	1	3,1	1	1,7	
>64	0	0,0	1	3,1	1	1,7	
Total	28	100,0	32	100,0	60	100,0	

*Chi-square test; Exact test ;a :0,05;

*Konsantrasyon düzeylerinin biyofilm gruplarına göre frekans dağılımındaki farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı.

4.4.5. Kaspofungin ile yapılan çalışma sonucu

Kaspofungin ile yapılan çalışmaya klinik örneklerden izole edilen 60 *C.albicans* izolatı dahil edilmiştir. Yaptığımız çalışma sonucu elde ettiğimiz veriler Tablo 4.16'de belirtilmiştir.

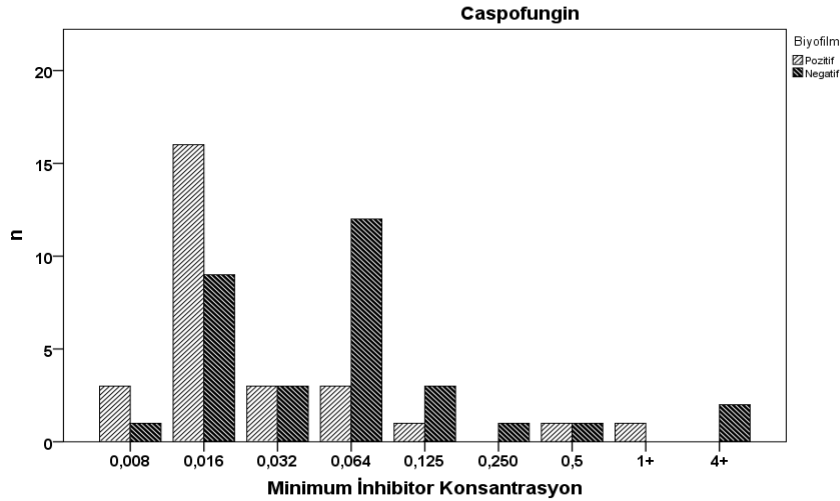
Tablo 4.16. Kaspofungin ile yapılan çalışma sonucu elde edilen MİK değerleri

suş	tür	mik	suş	tür	mik	suş	tür	mik
1	<i>C.albicans</i>	0,032	21	<i>C.albicans</i>	0,016	41	<i>C.albicans</i>	0,064
2	<i>C.albicans</i>	0,064	22	<i>C.albicans</i>	0,032	42	<i>C.albicans</i>	>4
3	<i>C.albicans</i>	0,016	23	<i>C.albicans</i>	0,064	43	<i>C.albicans</i>	0,032
4	<i>C.albicans</i>	0,032	24	<i>C.albicans</i>	0,016	44	<i>C.albicans</i>	0,25
5	<i>C.albicans</i>	0,016	25	<i>C.albicans</i>	<0,008	45	<i>C.albicans</i>	0,064
6	<i>C.albicans</i>	0,016	26	<i>C.albicans</i>	0,016	46	<i>C.albicans</i>	0,064
7	<i>C.albicans</i>	0,016	27	<i>C.albicans</i>	0,125	47	<i>C.albicans</i>	0,016
8	<i>C.albicans</i>	0,008	28	<i>C.albicans</i>	0,064	48	<i>C.albicans</i>	0,064
9	<i>C.albicans</i>	0,008	29	<i>C.albicans</i>	0,064	49	<i>C.albicans</i>	0,5
10	<i>C.albicans</i>	0,016	30	<i>C.albicans</i>	0,064	50	<i>C.albicans</i>	0,125
11	<i>C.albicans</i>	0,032	31	<i>C.albicans</i>	0,125	51	<i>C.albicans</i>	0,016
12	<i>C.albicans</i>	0,008	32	<i>C.albicans</i>	0,032	52	<i>C.albicans</i>	0,064
13	<i>C.albicans</i>	0,016	33	<i>C.albicans</i>	0,064	53	<i>C.albicans</i>	0,064
14	<i>C.albicans</i>	0,016	34	<i>C.albicans</i>	>4	54	<i>C.albicans</i>	0,016
15	<i>C.albicans</i>	0,016	35	<i>C.albicans</i>	0,016	55	<i>C.albicans</i>	0,016
16	<i>C.albicans</i>	0,064	36	<i>C.albicans</i>	0,016	56	<i>C.albicans</i>	0,016
17	<i>C.albicans</i>	0,016	37	<i>C.albicans</i>	0,016	57	<i>C.albicans</i>	0,125
18	<i>C.albicans</i>	0,016	38	<i>C.albicans</i>	0,016	58	<i>C.albicans</i>	0,064
19	<i>C.albicans</i>	0,016	39	<i>C.albicans</i>	<0,008	59	<i>C.albicans</i>	0,064
20	<i>C.albicans</i>	0,016	40	<i>C.albicans</i>	0,016	60	<i>C.albicans</i>	0,5

*Standart MİK sonuçları üreme yeterli olduğu için 24 saat sonunda okunmuştur.

* EUCAST 9.0 klinik değer tablosunda Kaspofungin için kesin MİK aralığı belirtilmemiştir.

Tablo 4.17. Kaspofungin için Biyofilm negatif ve pozitif suşların MİK dağılımları.



Tablo 4.18. Kaspofungin MİK dağılımları

Minimum İnhibitor Konsantrasyon	Biyofilm				Total		p
	Pozitif		Negatif		Total		
	n	%	n	%	n	%	
0,008	3	10,7	1	3,1	4	6,7	0,107
0,016	16	57,1	9	28,1	25	41,7	
0,032	3	10,7	3	9,4	6	10,0	
0,064	3	10,7	12	37,5	15	25,0	
0,125	1	3,6	3	9,4	4	6,7	
0,250	0	0,0	1	3,1	1	1,7	
0,5	1	3,6	1	3,1	2	3,3	
1+	1	3,6	0	0,0	1	1,7	
4+	0	0,0	2	6,3	2	3,3	
Total	28	100,0	32	100,0	60	100,0	

*Chi-square test; Exact test; a:0,05

4.4.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirmesinde kategorik değişkenler arasındaki dağılım ilişkisi ki kare testi ve fisher exact testi ile incelenmiştir. Testler arasındaki uyum Cohen Kappa katsayısı ile incelenmiştir. İstatistik parametreleri oran ve frekanslar ile ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak ifade edilmiştir. Veriler IBM SPSS versiyon 22 programında incelenmiştir.

5.TARTIŞMA

Candida'lar doğada yaygın olarak bulunmakla beraber sağlıklı bireylerin normal vücut floralarında yer almaktadır. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır (90). Son dönemlerde *Candida* türleri kaynaklı enfeksiyonların; invaziv uygulamaların artışı, antibiyotik kullanımı, katater uygulaması, immün sistemi baskılayıcı tedaviler, total parenteral beslenme gibi faktörlere bağlı olarak hızla artmakta morbidite ve mortalite oranlarında artış görülmesine yol açmaktadır (91).

Günümüzde 200 den fazla *Candida* türü bilinmekle beraber en sık izole edilen türler; *C.albicans*,*C.krusei*,*C.parapsilosis*,*C.guilliermondii*,*C.tropicalis*,*C.kyfy*,*C.lusitanie*,*C.dublinensis* ve *C.glabrata* olarak belirtilmiştir (92). *Candida*'ların sebep olduğu yüzeysel veya sistemik hastalıklarda konağın savunma sistemi ve etkene ait virülans faktörleri gibi nedenler oldukça önem katmaktadır. Son dönemlerde yapılan çalışmalar biyofilmlerin hastalık etkeni üzerine dikkat çekilmiş enfeksiyonların %65 'inin biyofilm kaynaklı olduğu tespit edilmiştir (93).

Biyofilm oluşumu ile patojenite arasındaki ilişki 1982 yılında Christensen tarafından *Staphylococcus epidermidis* için tanımlanmış cisimlere tutunabilme kabiliyeti olan türlerin daha virülan oldukları yapılan çalışma sonucu ortaya çıkmıştır(94).Son yıllarda *Candida* enfeksiyonlarındaki artış, protezler, kataterler, kalp kapakçığı, endotrakeal tüpler gibi aletlerin artan sayıda kullanımından kaynaklandığı bildirilmiştir (95). Biyofilm oluşturan bazı *Candida* türlerinin aynı zamanda antifungal ajanlara direnç kazanması önemli problem haline gelmiştir. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavisi biyofilmlerin antimikrobiyal tedaviye azalmış olan duyarlılıklarından dolayı zordur (96). Kazanılmış yada doğal yollarla antifungal ajanlara karşı oluşan direnç durumu söz konusu kullanımından kaynaklı artış olması nedeniyle direnç gelişimi ortaya çıkan azol grubu antifungal ajanlar akla gelmektedir (97).

Yapılan bir çalışma sonucu flukonazol direncinin üç yıl içerisinde %7 'den %12'ye yükseldiği bir diğer çalışmada ise *C.albicans* biyofilmlerinin planktonik hücrelere göre flukonazole 4000 kat daha dirençli olduğu tespit edilmiştir(98). Plastik yüzeylerde üreyen *C.albicans* biyofilminin planktonik hücrelerle kıyaslandığında Amfoterisin B'ye 20-30 kat fazla dirençli olduğu tespit edilmiştir (99). Ayrıca biyofilmler tıbbi aletlerin fonksiyonunu bozmakta ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır (95). Bu nedenle *Candida* cinsi mayaların identifikasyonu, biyofilm oluşturabilme kapasiteleri, antifungal ajanlara karşı duyarlılık ve direnç durumlarının incelenmesi gün geçtikçe önemini vurgulamaktadır.

Bu çalışmada çeşitli, klinik örneklerden izole edilen *C.albicans* izolatında biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılık durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

5.1. Kongo Kırmızısı Agar ile Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

Kongo kırmızı agar yöntemiyle biyofilm saptama ilk kez bakteriyel biyofilmleri belirlemek amacıyla çalışılmış daha sonraları değiştirilerek fungal biyofilm oluşumunu tespit etmek amacıyla kullanılmaya başlanılmıştır (76).

Freeman ve arkadaşları, Bakteriyel biyofilmleri belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda *Staphylococcus* türlerinde çalışmışlardır. Kuagülaz negatif stafilokoklarda Kongo kırmızısı agar yöntemiyle yapılan çalışma sonucunda elde ettikleri verileri Christensen yöntemiyle karşılaştırmış sonuçların birbiriyle uyumlu olduğunu belirtmişlerdir (76).

Kongo kırmızısı agar yöntemi fungal biyofilmleri tespit etmek amacıyla kullanılmıştır. Sexana ve arkadaşları bu yöntemi kullanarak 120 *Candida* suşunda biyofilm oluşumunu araştırmış %38.33 biyofilm pozitifliği rapor etmişlerdir. Biyofilm pozitif olarak belirlenen suşların %27.73’de güçlü pozitiflik, %78.27’de zayıf pozitiflik olduğunu bildirmişlerdir(100).

Yıldırım ve arkadaşları yaptıkları çalışmada albicans ve non-albicans *Candida* suşlarında biyofilm oluşumu, fosfolipaz, esteraz, gibi faktörlerini araştırmış 92 *C.albicans* suşunun 16’sında (%17) ve 40 non-albicans suşunun 13’de (%33) sağlıklı kişilerin ağız florasından izole edilen 27 *C.albicans* suşunun bir tanesinde (%4) ve 12 non- albicans suşunun 6’sında (%50) biyofilm oluşumunu gözlemlediklerini bildirmişlerdir(101).

Birinci ve arkadaşları Kongo kırmızısı agar yöntemiyle yaptıkları çalışmada 77 *C.albicans* suşunun 41’i (%53.2) ve 29 albicans dışı *Candida* suşunun 10’unun (%34.5) biyofilm oluşturabildiklerini gözlemlemişlerdir (3).

Arslan ve arkadaşları, Kongo kırmızılı beyin kalp infüzyon agar yöntemiyle yaptıkları çalışmada 100 adet *C.albicans* suşunun %48’inde biyofilm varlığını rapor etmişlerdir(4).

Cevahir ve arkadaşları yaptıkları çalışma sonucu 126 *Candida* suşunda Kongo kırmızılı beyin kalp infüzyon agar yöntemi, glukozlu triptik soy buyyon, glukozlu sıvı sabouraud besiyeri yöntemleriyle biyofilm varlığını araştırmış Kongo kırmızılı beyin kalp infüzyon agar yöntemiyle (%44,4), glukozlu triptik soy buyyon yöntemiyle (%39,6) , glukozlu sıvı sabouraud besiyeri yöntemiyle (%33,3) biyofilm pozitifliği tespit etmişlerdir. Araştırmacılar yöntemler arasında anlamlı farklılıklar tespit edemedikleri halde uygulaması ve

değerlendirmesi kolay olduğu için Kongo kırmızısı beyin kalp infüzyon agar yönteminin daha iyi olduğunu savunmuşlardır (102).

Hilmioğlu ve arkadaşları *Candida* suşlarında biyofilm oluşumunu araştırmak için 3 farklı yöntem kullanmış olup Kongo kırmızısı agar yöntemiyle çeşitli klinik örneklerden (kan ,vajen, idrar) izole edilen *Candida* izolatlarında her örnek grubu için sırasıyla %52, %60, %51,1 oranlarında biyofilm pozitifliği saptamışlardır. Kongo kırmızısı agar yöntemini kolay uygulanabilir ve ekonomik açıdan uygun olduğu için tavsiye etmişlerdir (65).

Kongo kırmızısı agar yöntemiyle yapılan üriner katateri olan ve olmayan 25'şer hastadan izole edilen 50 *Candida* izolatının dahil edildiği bir çalışmada katater pozitif hastaların 6'sında (%24), katateri olmayan hastaların 7'sinde (%28) biyofilm pozitifliği bulunmuş ayrıca bir suşta (%4) besiyerinde üreme gözlenmemiştir. Üriner katater varlığının bu yöntemle biyofilm pozitifliği için anlamlı bir fark oluşturmadığını rapor etmişlerdir (103).

Zer ve arkadaşları Kongo kırmızılı beyin kalp infüzyon agar yöntemiyle yaptıkları çalışmada YBÜ'den izole edilen 205 izolatın 123'ü (%60) biyofilm pozitif bulmuş, 115 *C.albicans* izolatının 62 (%53,91)' inde 90 non-albicans izolatının 61 (%67,77)' inde biyofilm pozitifliği saptamışlardır (104).

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesinde Kongo kırmızılı beyin kalp infüzyon agar yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada 54 *C.albicans* suşunun 45'i (%88,33), 21 *C.parasilosis* suşunun 16'sı (%76,19), 12 *C.glabrata* suşunun biri (%8,33), 7 *C.tropicalis* suşunun hepsi (%100) biyofilm pozitif olarak tespit edilmiştir (105).

Karaca ve arkadaşları kan ve vajinal sürüntü örneklerinden izole edilen 64 *Candida* suşunun 37'sinde (%57,8) güçlü, 10'unda (%15,6) orta, 9'unda (%14,1) zayıf biyofilm oluşumu tespit etmişlerdir (106).

Kongo kırmızısı agar yöntemiyle yaptığımız çalışmamızda klinik örneklerden izole edilen 60 adet *C.albicans* izolatı ve bir adet standart suş (*C.albicans* MYA 274) dahil olmak üzere 61 adet suştan 29 'u (%47,5) biyofilm pozitif, 32'si (%52,4) biyofilm negatif olarak değerlendirilmiştir. Biyofilm pozitif olarak bulduğumuz 29 suşun 10'u (%34,4) zayıf biyofilm ,15'i(%51,7) orta biyofilm ,4'ü ise (%13,7) güçlü biyofilm olarak tespit edilmiştir.

5.2. Mikroplakta XTT İndirgenmesi Yöntemiyle Biyofilm Test Edilmesi

Biyofilm oluşumunu belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar arasında çok sık kullanılan diğer bir yöntem mikroplakta XTT indirgenmesi yöntemidir. XTT yada MTT gibi tetrazolyum tuzları kullanılarak ökaryotik hücrelerin metabolik aktivitesinin araştırılması

yapılmaktadır (107). Yapılan bu çalışmanın avantajı XTT'nin canlı hücrelerin metabolik aktivitelerini ortaya çıkarabilmesi ve ortamda bulunan planktonik hücreler uzaklaştırıldığında sadece biyofilm tabakası içindeki hücrelerin tespit edilmesini sağlamaktadır (108).

XTT'nin maliyeti yüksek olduğu için yöntemin uygulanabilmesi çok iyi teknik beceri gerekmektedir. Hızlı, tekrarlanabilir, spektrofotometrik değerlendirme yapılabildiğinden dolayı avantajlı bir yöntemdir (107). Biyofilm konusunda yapılan çalışmalarda altın standart yöntem henüz netlik kazanmamıştır ancak XTT indirgenmesi yönteminin altın standart yöntem olarak uygulanabileceğinden bahsedilmektedir (109).

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji mantar kültür koleksiyonu stoklarında bulunan 216 *Candida* türünün dahil edildiği çalışmada biyofilm oluşumu XTT yöntemiyle araştırılmış 216 *Candida* izolatının 128 (%59,3)'ü *C.albicans* olarak tespit edilmiştir. XTT indirgenmesiyle yöntemiyle *C.albicans* izolatlarının 20(%15,6)'sında biyofilm pozitifliği rapor edilmiştir (109).

HIV enfeksiyonu olan hastaların ağız sürüntülerinden izole edilen *Candida* 'larda XTT redüksiyon ve mikropalak yöntemleriyle biyofilm yapabilme yetenekleri araştırılmış, Çalışma sonucunda mikropalak ile tespit edilen biyofilm oranının XTT redüksiyon yöntemiyle belirlenenden daha fazla olduğunu gözlemlemişler. Yinede çalışmada XTT redüksiyon yönteminin mikropalak yöntemine göre daha güvenilir olduğunu belirtmişlerdir (110).

Kandidemili hastalardan izole edilen 126 farklı *Candida* suşunun XTT redüksiyon yöntemiyle biyofilm oluşumu araştırılmış *Candida albicans* suşunda biyofilm oluşumunun daha fazla olduğunu saptanmıştır. Ayrıca biyofilm oluşturan *Candida* izolatının antifungal ajanlara karşı dirençli olduğu vurgulanmıştır (111).

Diş protezi ve diabetes mellitus gibi predispozan faktörlere sahip hastaların ağız sürüntülerinden alınan örneklerden izole edilen 69 *Candida* izolatının biyofilm oluşumu ve zamana bağlı kinetiği değerlendirilmiş XTT indirgenmesi yöntemi ve taramalı elektron mikroskopu ile yapılan değerlendirmede biyofilm oluşumunun en çok *Candida glabrata* izolatında bulunmuştur. Bunu sırası ile *C.tropicalis*, *C.albicans*, *C.krusei* takip etmiştir (112).

Hastane kaynaklı *Candida* enfeksiyon tanısı konulan hastalardan izole edilen *Candida* izolatlarıyla, hasta olmayan bir kontrol grubundan izole edilen *Candida* izolatlarının biyofilm oluşumları iki farklı (%T ve XTT) yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. 294 *Candida* izolatının 80'inde (%27,2) biyofilm oluşumu saptanmış, Biyofilm pozitifliği *Candida albicans*'da (%22,6), albicans dışı *Candida* 'larda (%33,3) olarak saptanmış ve her iki yöntemin sonuçları istatistiksel açıdan uyumlu bulunduğu yapılan çalışma sonucu rapor edilmiştir (113).

Hastane çevresel kültür örnekleri ile yatan hastaların kan ve katater örneklerinden izole edilen 780 *Candida* izolatının biyofilm oluşumları ve metabolik aktiviteleri XTT indirgenmesi yöntemiyle test edilmiştir. Biyofilm oluşumu yönünden çevresel izolatlarla klinik izolatlar arasında istatistiki açıdan anlamlı fark bulunamamıştır. Biyofilm oluşumu en çok *C.tropicalis* izolatında tespit edilmiştir (114).

Albicans dışı *Candida* izolatlarında in-vitro biyofilm aktiviteleri XTT indirgenme yöntemi ve taramalı elektron mikroskopu ile araştırıldığı çalışma sonucunda biyofilm oluşturan tür sıralamasında ilk sırayı *C.tropicalis* ikinci sırada *C.parapsilosis* üçüncü sırada *C.glabrata* şeklinde rapor edilmiştir (68).

Kandidemili hastalardan izole edilen 393 *Candida* izolatıyla yapılan bir çalışmada silikon elastomer yapraklar üzerinde biyofilm oluşumu XTT indirgenmesi ve taramalı elektron mikroskopu ile değerlendirilmiş. *Candida albicans* izolatında biyofilm oluşumu %40,3 albicans dışı *Candida*'ların biyofilm oluşumu %88,7 olarak saptanmıştır. En fazla biyofilm pozitifliği ise *C.tropicalis* izolatında bulunmuştur (115).

Üriner katateri olan ve olmayan 25'şer hastadan izole edilen 50 *Candida* izolatının dahil edildiği çalışmada XTT indirgenmesi yöntemi ve Kongo kırmızısı agar yöntemiyle biyofilm oluşumu araştırılmış ve XTT yöntemiyle tüm suşlar biyofilm pozitif bulunurken, Kongo kırmızısı agar yöntemiyle 50 suşun 12'sinde biyofilm pozitifliği saptanmıştır(103).

Kuhn ve arkadaşları XTT indirgenmesi yöntemi kullanarak biyoprotetik yüzeylerde *C.albicans* ve *C.parapsilosis* biyofilmlerini karşılaştırdıkları çalışma sonunda *C.albicans* biyofilmlerinin daha karmaşık ve niceliksel olarak daha büyük biyofilmler ürettiğini saptamışlardır (70).

Imamura ve arkadaşları yumuşak kontak lensler üzerinde *fusarium* ve *C.albicans* biyofilmlerini araştırmak için XTT indirgenmesi yöntemi kullanmış çalışma sonucunda klinik izolatların tüm lens tipleri üzerinde biyofilm oluşturduğunu tespit etmişlerdir (116).

Mikroplakta XTT indirgemesi yöntemiyle yaptığımız çalışmada 61 (standart suş dahil) *Candida albicans* izolatının 29'u (%47,5) biyofilm pozitif olarak bulunurken 32'si (%52,4) biyofilm negatif olarak elde edilmiştir. Yine bu çalışmada Kongo kırmızısı agar yöntemide kullanılmış olup iki test arasındaki uyum istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.

5.3. Antifungal Duyarlılık Durumlarının Test Edilmesi

Çalışmamıza Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 60 *Candida albicans* suşunun amfoterisin B, Flusitozin, kaspofungin, vorikonazol, flukonazol'e karşı duyarlılıklarını

belirlenmek amacıyla “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) sıvı mikrodilüsyon yöntemi referans alınarak bu antifungallerin MİK değerleri belirlenmiştir.

Mantar enfeksiyonlarının tedavisinde amfoterisin B’ nin 1953 yılında keşfi ile yeni bir döneme girilmiştir. Amfoterisin B klinik alanda kullanılan en toksik mikrobiyal ajan olmasına rağmen standart tedavi özelliğini korumaktadır. Bugün kabul edilen görüş Amfoterisin B direncinin nadir olduğudur. Buna rağmen ülkemizde Amfoterisin B için geniş ölçüde direnç bildirilmiştir. Direnç tespit edilemeyen çalışmalar bulunduğu gibi %57.8’e kadar direnç tespit edilen çalışmalarda mevcuttur (87).

Çalışmamızda amfoterisin B için incelenen 60 *C.albicans* suşu içinde 4 (%6,66) duyarlı, 56(%93,6) dirençli suşa rastlanılmıştır. *C.albicans* için amfoterisin B’nin MİK aralığı 1 mg/L - > 4mg/L değerleri arasında elde edilmiştir.

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılan bir çalışmada 100 *Candida* suşu içerisinde amfoterisin B için dirençli (≥ 2 $\mu\text{g/mL}$) suşa rastalanılmamış. Amfoterisin B’nin MİK aralığı 0.25-1 $\mu\text{g/mL}$ arasında MİK₅₀ ve MİK₉₀ değeri 1 $\mu\text{g/mL}$ olarak rapor edilmiştir (117).

Toka Özer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *Candida* suşunda amfoterisin B’ye karşı hiçbir izolatta direnç gözlenmediği rapor edilmiştir (118).

Atalay ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada idrar örneğinden izole edilen 61 *Candida* spp izolatlarda amfoterin B’ye karşı duyarlılıklarını E test yöntemiyle incelemişlerdir, MİK aralıkları 0.002-0.5 $\mu\text{g/mL}$ arasında tespit edilmiş ve dirençli izolat bulunamamıştır (119).

Manisa Celal Bayar Üniversitesinde yapılan çalışmada idrar örneklerinden izole edilen *Candida* suşlarında amfoterisin B için MİK değerleri *C.albicans* türünde 0,002-0,25 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişmekte olup MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise 0,094-0,19 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Çalışılan tüm *Candida* izolatları amfoterisin B için duyarlı olarak MİK $1 \leq 1$ $\mu\text{g/ml}$ tespit edilmiştir (120).

Çalışkan ve arkadaşlarının vajinal yakınması olan hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada tüm izolatlarda amfoterisin B için MİK değerleri $\leq 1,5$ $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir (121).

Elfeky ve arkadaşlarının vulvovajinite neden olan *Candida*’lar üzerinde yaptıkları çalışmada en etkili antifungal amfoterisin B (%98,4). Amfotersisn B’ye karşı *C.albicans*,*C.glabrata*,*C.krusei*,*C.guillermundii* için dirençli suş gözlenmemiş ve %100 duyarlılık gözlenilmiştir (122).

Mishra ve arkadaşları idrar kültüründen izole edilen 112 *Candida* izolatının 7'sinde (%6,25) amfoterisin B ye direnç tespit etmişlerdir (123).

Zer ve balcı yoğun bakım hastalarından izole ettikleri 205 *Candida* suşunda amfoterisin B 'ye %19,5 oranında direnç gözlemlemişlerdir (124).

Candida suşlarıyla alakalı olarak araştırmacıların dikkatini çeken bir diğer faktör virülan suşların antifungal ajanlara dirençli olup olmadıklarıdır. Jabra ve arkadaşları *Candida* izolatlarında yaptıkları çalışmada biyofilm oluşumu ve amfoterisin B arasında anlamlı ilişki olduğunu tespit etmişlerdir (97).

Amfoterisin B için yaptığımız çalışma yurt içinde veya yurt dışında yapılan çalışmalarla kıyasladığımızda bizim çalışmamızda amfoterisin B için yüksek oranda direnç tespit edilmiştir.

Flukonazol,1981 yılında imidazol çekirdeğinin değiştirilmesiyle meydana gelmiştir (125).

Flukonazol *C.albicans* suşları için düşük minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) düzeyi, yüksek düzeyde idrar konsantrasyonu ve az düzeyde toksik olmasından dolayı özellikle kandidüri tedavisinde önemli bir ilaçtır. Flukonazol tedavisinde en önemli problem *C.albicans* dışındaki türlerde oluşan direnç (*C.krusei* doğal direnç, *C.glabrata* da kazanılmış direnç) tir. *C.tropicalis* gibi diğer türlerde de flukonazole karşı artan MİK düzeyi tespit edilmiştir (126).

Çalışmamızda flukonazol için incelenen 60 *Candida albicans* türünde 54 (%90) duyarlı,6 (%10) dirençli suş tespit edilmiştir. *C.albicans* için flukonazol MİK aralığı 0,064->64 mg/L değerleri arasında bulunmuştur.

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılan çalışmada 100 *Candida* suşunun dahil edildiği çalışmada *Candida* türlerinin 23'ünün (%23) flukonazole duyarlı 37'nin (%37) doza bağlı duyarlı 40'mın dirençli olduğu saptanmıştır. İncelenen 100 *Candida* suşu için MİK₅₀ değeri 4 µg/mL, MİK₉₀ değeri 64 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Çalışmadaki 54 (%100) *C.albicans* izolatının 18'i (%33,3) duyarlı,11 (%20,4) doza bağlı duyarlı ve 25'i (%46,3) dirençli olarak belirlenmiştir (117).

Yashavant ve arkadaşlarının *C.albicans* için yaptıkları duyarlılık çalışmalarında flukonazol için %80'i duyarlı, %10'u doza bağlı duyarlı , %10'u dirençli olarak elde etmişler (127).

Toka Özer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada flukonazol direnci 3 izolatta tespit etmişlerdir. Flukonazol için doza bağlı duyarlı izolatlar 2 *C.glabrata* izolatında bulunmuştur (118).

Singla ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *C.albicans* için flukonazol MİK₅₀ 0,25 µg/mL MİK₉₀ 0,5 µg/mL olarak belirlenmiştir (128).

Gaziantep Üniversitesinde yapılan bir çalışmada 47 (%100) *C.albicans* suşlarının 28'i (%59,6) flukonazole duyarlı, 9'u (%19,1) doza bağlı duyarlı, 10'u (%21,3) dirençli olarak tespit edilmiştir (129).

Kalkancı ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sadece bir *C.glabrata* suşunda flukonazol direnci saptamıştır. 6 *C.albicans* ve 5 *C.glabrata* izolatı doza bağlı duyarlı olarak tespit edilmiştir (130).

Farnari ve arkadaşları yaptıkları çalışmada tüm *Candida albicans* izolatları *C.guilliermondii*, *C.kefyr* flukonazole duyarlı, 3 *C.glabrata* izolatı doza bağlı duyarlı olarak tespit edilmiştir (131).

Conserol ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *C.albicans* için flukonazol MİK₅₀ 0,5 µg/mL MİK₉₀ 0,5 µg/ML olarak belirlenmiştir (132).

Amerikada yapılan çalışmaya göre 393 hastanın 14'ünde flukonazole direnç tespit edilmiştir. 2002 Belçikada yapılan çalışmaya göre 84 vajinal *C.albicans*'ın NCCLS metoduna göre dirençli olduğu rapor edilmiştir (133).

Ying ve arkadaşları *C.albicans* için yaptıkları duyarlılık testlerinde flukonazol için %83 duyarlı , %10 doza bağlı duyarlı , %7 dirençli izolat saptanmıştır (134).

Zer ve balcı yaptıkları çalışmada 205 *Candida* suşunda %27,3 oranında flukonazole direnç saptamışlardır (124).

Flukonazol için yaptığımız çalışma diğer verilerle kıyaslandığında bizim çalışmamızın duyarlılık oranı yüksek bulunmuştur.

Vorikonazol, flukonazolden türetilmiş bir triazoldür. Yapısında oluşan değişiklikten kaynaklı hedef enzim lanosterol demetilazı inhibe edici etkisi artmış ve geniş spektrumlu hale gelmiştir (135). Vorikonazol, flukonazole dirençli *Candida* izolatlarında kullanılabilen antifungal ajandır. Flukonazole dirençli *Candida* izolatlarının büyük kısmı vorikonazolün haricinde ketokonazole direnç geliştirebilmektedir (136).

Çalışmamızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen 60 *Candida albicans* izolatının 7 (%11,6) vorikonazole duyarlı, 53 (%88,3) dirençli olduğu tespit edilmiştir. *Candida albicans* izolatının vorikonazol için bulunan MİK aralığı 0,032->4 mg/L değerleri arasında bulunmuştur.

Gaziantep Üniversitesinde yapılan çalışmada *Candida* türlerinin 38'nin (%66,7) vorikonazole duyarlı, 5'inin (%8,8) doza bağlı duyarlı 14'ününün (%24,6) dirençli olduğu tespit

edilmiştir. İzole edile 47 (%100) *C.albicans* izolatının 29'u (%61,7) vorikonazole duyarlı, 5'i (%10,6) doza bağlı duyarlı, 13'ü (%27,7) dirençli olarak rapor edilmiştir (128).

Elfeky ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *C.albicans* izolatının vorikonazole karşı %89,5 duyarlı,%10 dirençli olarak belirlenmiştir (122).

Ying ve arkadaşları VVC'li hastalardan izole edilen *C.albicans* için yaptıkları çalışmada vorikonazol için %81 duyarlı ,%5 doza bağlı duyarlı,%14 dirençli izolat tespit edilmiştir (134).

Gaziantep Üniversitesinde yapılan bir çalışmada 100 *Candida* suşu vorikonazol için MİK aralığı 0,03-16 µg/mL arasında MİK50 değeri 1 µg/mL, MİK₉₀ değeri 16 µg/mL olarak saptanmıştır. *C.albicans* için 9'u (%16,7) duyarlı, 2'si (%22,2) doza bağlı duyarlı,33'ü (%61,1) dirençli olarak rapor edilmiştir (117).

Alpat ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 50 *Candida* suşu biri hariç diğer hepsi vorikonazole duyarlı bulunmuş bir *C.krusei* suşunun ise flukonazole dirençli olarak belirlemişlerdir (137).

Basma ve arkadaşları 116 *C.albicans* izolatında vorikonazolün MİK aralığını 0,002->32 µg/mL aralığında tespit etmiş ve suşların 9'unda (%7,7) vorikonazole direnç bildirmişlerdir (138).

Johnson ve arkadaşları 1171 *Candida* izolatında vorikonazolün MİK aralığını 0.003-16 µg/mL olarak belirlemiş izolatların 109'unda (%9,3) vorikonazole direnç rapor etmişlerdir (139).

Vorikonazol için yaptığımız çalışma sonucu diğer verilerle kıyaslandığında bizim çalışmamızda vorkonazol direnç oranı yüksek bulunmuştur.

Kaspofunginin en önemli özelliği azol grubu ve amfoterisin B'ye dirençli izolatlara etkili olabilmektedir (135).

Çalışmamızda kaspofungin için incelenen 60 *Candida albicans* izolatı için bulduğumuz MİK aralığı < 0,008- > 4 mg/L olarak belirlenmiştir. EUCAST kesin bir MİK değeri belirtmediğinden duyarlı veya dirençli izolat sayısını belirleyemedik.

Gaziantep Üniversitesinde yapılan çalışmada *Candida* türlerinin 75 inin (%75) kaspofungine duyarlı,12'sinin (%12) orta duyarlı, 13'ünün (%13) dirençli olduğu tespit etmişlerdir (129).

Pfaller ve arkadaşları flukonazole dirençli 351 *Candida* izolatı ile yaptıkları çalışmada, suşların %99'unun kaspofungine duyarlı olduğunu (MİK≤2 µg/mL), 8 izolatın MİK değerinin ≥8 µg/mL olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte, bu 8 suşun laboratuvar kaynaklı glukan sentez mutasyonlu türler olduğu rapor edilmiştir (140).

Toner ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada idrar örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinde kaspofungine karşı %100 duyarlı ve dirençli izolat saptanmamıştır (141).

Başka bir çalışmada *C.albicans* türünde 0,002-0,50 µg/mL arasında bulunan kaspofungin, MİK₅₀ ve MİK₉₀ 0,004-0,25 µg/mL arasında tespit edilmiştir. Albicans dışı *Candidalar*'ın tümünde kaspofungin için MİK Aralığı 0,002-1 µg/mL iken MİK₅₀ ve MİK₉₀ 0,064-0,50 µg/mL olarak belirtilmiştir (120).

Zarei-Mahmoudabadi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada yoğun bakım ünitesinde yatan 120 hastanın idrar kültüründen izole edilen *Candida* izolatlarının kaspofungin MİK aralığı 0,03-4 µg/mL arasında %90 duyarlı %10 dirençli olarak tespit etmişlerdir (142).

Candida türleri genellikle flusitazine duyarlı bulunmaktadır. *Candida albicans* izolatının %25'i flusitazine direnç göstermektedir. *Candida* sistitinin tedavisinde flusitazin kullanılabilir ancak toksik olması sebebiyle sınırlıdır (143).

Çalışmamızda Flusitazin için incelenen *Candida albicans* izolatı için bulunan MİK Aralığı 0.064->64 mg/L arasında bulunmuştur. EUCAST kesin bir MİK aralığı belirtmediğinden dolayı duyarlı ve dirençli izolat sayısını belirleyemedik.

Hun Ding ve arkadaşlarının idrar kültüründen izole edilen *Candida* türlerinin tümü flusitazine duyarlı olarak bulmuşlardır. MİK₅₀ 0,006 µg/mL, MİK₉₀ 0,25 µg/mL olarak saptamışlardır (144).

Toka Özer ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *Candida* türleri için flusitazin MİK Aralığını 0,125-32 µg/mL değerleri arasında tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda bir *C.glabrata* izolatında doza bağlı duyarlı üç farklı *Candida* izolatında; *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei* direnç durumu gözlemlenmiştir (117).

Toner ve arkadaşları retrospektif olarak yaptıkları çalışmalarında idrar kültüründen izole edilen *Candida* türlerinden *C.albicans* suşunda 4, *C.tropicalis* izolatında 2 suşta direnç saptamışlardır (141).

Yashavanath ve arkadaşları *Candida* suşlarında flusitazine %82 duyarlı , *C.tropicalis* izolatlarının ikisi orta duyarlı , birinde direnç saptanmıştır.*C.glabrata* ve *C.krusei*'de birer izolatta direnç saptanmıştır (127).

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesinde yapılan çalışmada 100 *Candida* suşunda flusitazin için dirençli (≥ 32 µg/mL) izolata rastlanılmamış. *Candida* türleri için Flusitazinin MİK aralığı 0,125-2 µg/mL Mİ₅₀ değeri 0,125 µg/mL MİK₉₀ 0,5 µg/mL olarak belirlenmiştir (117).

Son yıllarda mantar hastalıklarında görülen artış ve artışa bağlı olarak antifungal ilaç kullanımının yaygınlaşmasından dolayı dirençli izolatlar ortaya çıkmakta olup bu durum direnç oranının artmasına neden olmuştur (145).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1.Kandidemi ve katatere bağı enfeksiyonlarda yapılan çalışmalarda sıklıkla *Candida* türleri izole edilmektedir. Kateterler, ekstraselüler matriks içinde biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ile kolonize olmakta ve mikroorganizmanın bu biyofilmden ayrılması çoğu kez septisemi ile sonuçlanmaktadır.

2. *Candida* enfeksiyonlarının patogenezinde virülans faktörlerinden biri olan biyofilmin önemi yapılan çalışmalar sonucu ortaya konmuştur.

3.Biyofilm üreten suşlar daha virulan ve antibiyotiklere daha dirençli olduklarından biyofilm oluşumunun tespitinde Kongo kırmızısı agar yöntemi ekonomik açıdan uygun ve rahat uygulanabilen bir yöntemdir. Labartuvarda rutin olarak yapılması ve sonuçların klinisyene bildirilmesi uygun tedavi sağlama açısından faydalı olacaktır.

4. Mikroplakta XTT yöntemi ile biyofilm oluşumunun test edilmesi, iki saatte sonuç verebilmesi, sonuçların objektif olarak değerlendirilebilmesi, yüzeye tutunan biyofilm hücrelerini koparma işlemi gerektirmediğinden biyofilm oluşumunu saptamada kullanılabilen tutarlı yöntemlerden biridir. Ancak maliyet açısından Kongo kırmızısı agar yöntemine göre oldukça pahalıdır.

5. Merkezimizde bu iki yöntem kullanılarak *C.albicans* suşlarında biyofilm oluşumu araştırılmış çalışma sonucunda %47,5 oranında biyofilm pozitifliği saptanmış ve iki yöntem arasındaki uyum istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

6. *Candida* enfeksiyonların da *C.albicans* en sık izole edilen tür olmakla beraber non-albicans türlerde artış gözlenmektedir. Bu artışa paralel olarak yeni antifungaller kullanıma girerek tedavide yaygın olarak kullanılmaya başlanılmıştır. Özellikle triazol grubu antifungallerin çok sık kullanılmasından kaynaklı olarak hem *C.albicans* hemde non – albicans türlerde antifungal ajanlara karşı dirençte artış görülmeye başlanmıştır. Bu türlerin antifungal ilaçlara direncinin yüksek olduğu bu sebeple *Candida* enfeksiyonlarında etkenin tür düzeyinde tanımlanıp antifungal duyarlılıklarının belirlenmesi uygun tedavinin sağlanması ve direnç gelişiminin engellenebilmesi açısından faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

7.Antifungal ilaçların profilakside kullanılması, hastaların uzun süredir yoğun bakımda yatan hasta olmaları ve suşların biyofilm üreten suşlar olmalarından dolayı antifungal direnç oranımız yüksek çıkmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Tümbay E. Kandida Türleri. Ed: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Öncü Basımevi. Güneş Kitabevi, Ankara 1999:1081-1085.
2. Yakupoğulları, Y. Aşçı Toraman Z. Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan Candida kökenlerinde slime faktörü üretiminin araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2004; 34:178-181.
3. Birinci A, Çekiç Cihan Ç, Bilgin K, Acuner Ç, Durupınar B. Candida türlerinde slime üretiminin araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2005;35:163-166.
4. Arslan U, Fındık D. Klinik örneklerden izole edilen Candida albicans türü maya mantarlarında virulans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in-vitro araştırılması. İnfeksiyon Dergisi. 2003;17(4):471-481.
5. Poyraz Ö. Genel ve Özel Tıbbi Mikoloji. No:101, Sivas: Cumhuriyet Üniversitesi Yayınları, 2006: 129-152.
6. Yücel A. Candida' ların dünü: Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. (Editörler). Candida Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu, Tutanaklar. Eskişehir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 2002; 43: 3-28.
7. Kwon Chung KJ, Bennett JE. Medical Mycology. Philadelphia; Lea and Fabinger, 1992; 280-336.
8. Segal E ve Elad D. Candida species and Blastoschizomyces capitatus. Collier L, Balows A, Sus man M. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. v.4 Ajello L, Hay RJ. Medical Mycology. 9th edition. London: 1998:423-460.
9. Unat Ek. Tıbbi Mikoloji. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları 2. Baskı. İstanbul, 1962: 147-162.
10. Bilgehan H. Candida 'ların tarihçesi, ekolojisi ve dağılımı. Ed: Tümbay E. Candida ve enfeksiyonları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No 6. İzmir, Bilgehan Basımevi, 1986:1-8.
11. Koç AN. Tıbbi Bakımdan Önemi Olan Candida Türlerinin Mikolojik Özellikleri. Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y. (Editörler) Candida Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu, Tutanaklar. Eskişehir: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, 2002; 43: 37-45.

12. Edwards JE. *Candida* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone. 2005; p. 2938-58.
13. Back-Sague C, Jarvis WR. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States 1980-1990 and National Nosocomial Infectious Surveillance System. *J Infect Dis* 1993; 167: 1247-51.
14. Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM: Medical mycology, In: "Zinsser Microbiology" ,20thEd, Appleton and Lange; 1992: 1071-1157
15. Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus* ve Tıbbi Önemi Olan Diğer Mantarlar (Çev: Ed. Başustaoğlu A) Klinik Mikrobiyoloji, Atlas Kitabevi, Ankara, 2009: 1762-1765.
16. Yücel A, Kantarcıoğlu AS; *Candida albicans*'ın taksonomisindeki önemli bazı değişiklikler, *Cerrahpaşa J Med* 1999; 30(3): 236-246.
17. Murray, P.R., Rosenthal, K.S and Pfaller, M.A., (2013) *Medical Microbiology* (7th ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders.
18. Asan, A. (2007). Tıpta önemli olan mantarların filogenetik ve sistematığı. *Türk İnfeksiyon Dergisi*, 21, p. 21-31.
19. Larone, D.H., (2011) *Medically important fungi A Guide to Identification*(5th ed.). Washington DC: ASM Press.
20. Odds, F.C., Bernaerts, R. (1994). Chromagar *Candida*, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(8), p. 1923-1929.
21. Roberts, G.D., Horstmeier, C.D., Land, G.A., Foxworth, J.H. (1978). Rapid Urea Broth Test for Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 7(6), p. 584-588.
22. Munson, E.L., Troy, D.R., Weber, J.K., Messer S.A., Pfaller, M.A. (2002). Presumptive identification of *Candida kefyr* on levine formulation of eosin methylene blue agar. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(11), p. 4281-4284.
23. Kustimur S. *Candida* patogeneğinde rol oynayan faktörler. *Mikrobiyoloji Bült.* 1994;28 (2):175–181.

24. Gow NAR. Yeast-hyphal dimorphism. In: Gow NAR, Gadd GM. Editors. *The Growing Fungus*. London: Chapman and Hall; 1995. pp. :403–422.
25. Culter JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 1991; 45: 187–218.
26. Çerikcioglu N, Kotiloglu E, Alaçam R. *Candida* acid proteinase: Its role in virulence. *Türk J. Dermatol.* 1995; 1–2; 50–53.
27. Soll, D.R. (1992). High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(2), p. 183-203.
28. Hull, C.M., Johnson, A.D. (1999). Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science*, 285(5431), p. 1271-5.
29. Miller, M.G., Johnson, A.D. (2002). White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell*, 110(3), p. 293-302.
30. Çerikçiöğlü, N. (2012). Mantarlarda virülans faktörleri. *Ankem Dergisi*, 26, p. 261-269.
31. Uludağ Atun, H., Şener, B. (2008). Biyofilm enfeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39, p. 82-88.
32. Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), p. 881-90.
33. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*, 2003;11,30-36.
34. Percival, S.L., Knottenbelt, D.C. and Cochrane, C.A. (2011) *Introduction to Biofilms, in Biofilms and Veterinary Medicine*, Springer: Verlag Berlin Heidelberg.
35. Heukelekian, H., Heller, A. (1940). Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth. *Journal of Bacteriology*, 40(4), p. 547-58.
36. Zobell, C.E. (1943). The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology*, 46(1), p. 39-56.
37. Jones, H.C., Roth, I.L., Sanders, W.M. 3rd. (1969). Electron microscopic study of a slime layer. *Journal of Bacteriology*, 99(1), p. 316-25.

38. Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), p. 86-95.
39. Elder, M.J., Stapleton, F., Evans, E., Dart, J.K. (1995). Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye (Lond)*, 9 (Pt 1), p. 102-9.
40. Tolker-Nielsen, T., Molin, S. (2000). Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microbial Ecology*, 40(2), p. 75-84.
41. Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review Microbiology*, 49, p. 711-45.
42. Stickler, D.J. (2014). Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. *Journal of Internal Medicine*, 276(2), p. 120-9.
43. Baillie, G.S., Douglas, L.J. (1999). Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 48(7), p. 671-9.
44. Finkel, J.S., Mitchell, A.P. (2011). Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), p. 109-18.
45. Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), p. 1318-22.
46. Donlan, R.M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), p. 1387-92.
47. O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews of Microbiology*, 54, p. 49-79.
48. Tobudic, S., Kratzer, C., Lassnigg, A., Presterl, E. (2012). Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*, 55(3), p. 199-204.
49. Hawser, S.P., Douglas, L.J. (1994). Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infection and Immunity*, 62(3), p. 915-21.
50. Silva S, Negri M, Henriques M, et al. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol*, 2011;19,241-247.
51. Nobile, C.J., Andes, D.R., Nett, J.E., Smith, F.J., Yue, F., Phan, Q.T ve diğ. (2006). Critical role of Bcr1-dependent adhesins in *C. albicans* biofilm formation in vitro and in vivo. *PLoS Pathogens*, 2(7), p. e63.

52. Zhao, X., Oh, S.H., Yeater, K.M., Hoyer, L.L. (2005). Analysis of the *Candida albicans* Als2p and Als4p adhesins suggests the potential for compensatory function within the Als family. *Microbiology*, 151(Pt 5), p. 1619-30.
53. Blankenship, J.R., Mitchell, A.P. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 9(6), p. 588-94.
54. Kruppa, M., Krom, B.P., Chauhan, N., Bambach, A.V., Cihlar, R.L., Calderone, R.A. (2004). The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 3(4), p. 1062-5.
55. Ramage, G., Saville, S.P., Thomas, D.P., Lopez-Ribot, J.L. (2005). *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*, 4(4), p. 633-8.
56. Brown, G.D., Denning, D.W., Levitz, S.M. (2012). Tackling human fungal infections., 336(6082), p. 647.
57. Douglas, L.J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11(1), p. 30.
58. Inweregbu K., Dave, J., Pittard, A. (2005). Nosocomial infections. *Critical Care and Pain*, 5, p. 14-17.
59. Tiraboschi, I.N., Bennett, J.E, Kauffman, C.A., Rex, J.H., Girmenia, C., Sobel, J.D ve diğ. (2000). Deep *Candida* infections in the neutropenic and non-neutropenic host: an ISHAM symposium. *Medical Mycology*, 38(1), p. 199-204.
60. Douglas, L.J. (2002). Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 19(3), p. 139-43.
61. Sellam, A., Al-Niemi, T., McInnerney, K., Brumfield, S., Nantel, A., Suci, P.A. (2009). A *Candida albicans* early stage biofilm detachment event in rich medium. *BMC Microbiology*, 9, p. 25.
62. Jenkinson, H.F., Lala, H.C., Shepherd, M.G. (1990). Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other streptococci with *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 58, p. 1429-1436.
63. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, et al. Genotypic Variation and slime Production among Blood and Catheter Isolates of *Candida parapsilosis*, *J Clin Microbiol*, 1994;32,452-456.

64. Pfaller M, Davenport D, Bale M, et al. Development of the quantitative microtest for slime production by coagulase-negative staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1988;7,30-3.
65. Hilmioğlu S, İlkit M, Çavuşaoğlu C, Aydemir Ş, Tümbay E, Candida izolatlarında slime üretiminin üç ayrı yöntemle gösterilmesi ve slaym üretiminin kristal viyole reaksiyonu ile ilişkisi. *İnfeks Derg*, 1999;13,183-6.
66. Paull KD, Shoemaker RH, Boyd MR, et al. The synthesis of XTT: a new tetrazolium reagent that is bioreducible to a water-soluble formazan. *J Heterocyclic Chem*, 1988;25,911.
67. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, et al. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Met*, 1991;142,257-65.
68. Silva S, Henriques M, Oliveria R, Williams D, Azeredo J. In-vitro Biofilm Activity of Non-Candida albicans Candida Species. *Curr Microbiol*, 2010;61,534-540.
69. Silva WJ, Gonçalves LM, Seneviratne J, et al. Exopolysaccharide Matrix of Developed Candida albicans Biofilms After Exposure to Antifungal Agents. *Braz Dent J*, 2012;23,716-722.
70. Kuhn DM, Chandra J, Mukherje PK, Ghannoum MA, Comparison of Biofilms formed by Candida albicans and Candida parapsilosis on Bioprosthetic Surfaces. *Infect Immun*, 2002;70,878-888.
71. Honraet K, Goetghebeur E, Nelis HJ, Comparison of three assays for the quantification of Candida biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. *J Microbiol Met*, 2005;63,287-295.
72. Casadevall A. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect Immun*. 1995;63(11):4211-4218.
73. Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *Br J Haematol*. 2005;129:569-582.
74. Newman SL, Holly A. Candida albicans is phagocytosed, killed and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *Infect Immun*. 2001;69(11):6813-6822.
75. Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS (eds). The yeasts. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (12th ed.). Missouri, Mosby Elsevier, 2007:696-702.

76. Freeman, D.J., Falkiner, F.R., Keane, C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8), p. 872-4.
77. Pierce, C.G., Uppuluri, P., Tummala, S., Lopez-Ribot, J.L. (2010). A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Journal of Visualized Experiments*, (44).
78. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M ve diğ. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), p. 996-1006.
79. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Arendrup MC, Melatiadis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J, et al. EUCAST definitive document EDEF 7.3.1 January 2017 : method for the determination of the broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeast.
80. Vazquez JA, Sobel JD. Candidiasis. In: Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD (eds). *Clinical Mycology*. New York, Oxford University Press, 2003:143-187.
81. Lewis RE, Fothergill AW. Antifungal Agents. In: *Diagnosis and Treatment of Human Mycoses*. Totowa, New Jersey, Humana Press, 2008:105-133.
82. Metin DY. Ekinokandinler ve yeni azoller. *İnfeksiyon Dergisi*. 2007;21(Ek):185-187.
83. Bourgeois. Antifungal susceptibility of 205 *Candida* spp. isolated primarily during invasive candidiasis and comparison of the Vitek 2 system with the CLSI broth microdilution and E-test methods. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 154-161.
84. Kebudi R, Devecioğlu Ö, Gürler N. Tanımlar ve tanı yöntemleri. *Flora* 2004; 9: 73-105.
85. Çerikçioğlu N. Antifungal duyarlılık testleri. 7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı; 13-15 Nisan, 2006, İstanbul, Türkiye. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No: 54, 2006:93-104.
86. Yücesoy M. Antifungallere direnç. 7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı; 13-15 Nisan, 2006, İstanbul, Türkiye. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No: 54, 2006:113-120.

87. Koç N. Ülkemizde antifungal direnç. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı; 27-30 Mayıs, 2003; Bodrum, Türkiye. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No. 46, 2003:285-300.
88. Yücesoy M. Candida türlerinde antifungal direnç mekanizmaları. 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı; 3-6 Mayıs, 2005; Konya, Türkiye. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No. 49, 2005:46-58.
89. Kalkancı A. Yeni antifungaller ve direnç mekanizmaları. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongre Kitabı; 27-30 Mayıs, 2003; Bodrum, Türkiye. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No. 46, 2003:272-284.
90. Murray P.R, Baron E.J, Pfaller M.A. Editors Manual of Clinical Microbiology 9th ed. Washington DC: Amerikan Society for Microbiology; 2007.
91. Kalkancı A, Yalınay Çırak M, Mansuroglu H Kustimur S. Candida türlerinde slaym faktör belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1999; 29: 183–185.
92. Merz GW, Hay JR. Editors. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Vol. 4. Medical Mycology. New York: Oxford University Pres, Inc. ;2005.
93. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Candida'ların patojenlik belirtgenleri. Cerrahpasa J Med. 2000; 31: 172–186.
94. Gürdoğan K, Dizbay M, Aktas F. Kan kültürlerinden izole edilen koagülaz negatif stafilkoklarda slime üretiminin dört farklı yöntemle araştırılması ve slime yapımı ile antimikrobiyal duyarlılık ilişkisi. Flora 1999; 4 (3): 195–199.
95. Doluca M. Candida biyofilm infeksiyonlarında güncel bilgiler. 34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Girne, 7–11 Kasım 2010, Kongre Kitabı, İstanbul, 2010; 44–46.
96. Ramage G, Bachmann S, Patterson TF, Wickes BL, Lopez-Ribot B. Investigation of multidrug efflux pumps in relation fluconazole resistance in Candida albicans biofilms. J Antimicrob Chemoth 2002;49: 973–980.
97. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. Emerg Infect Dis 2004; 10: 14–19.
98. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. CID 2008; 46 (1): 120–128.

99. Özcan Keçeli S. Tıbbi gereçlerle ilişkili Candida biyofilm ve enfeksiyonları. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2007; 27: 589–600.
100. Saxena, N., Maheshwari, D., Dadhich, D., Singh, S. (2014). Evaluation of Congo Red Agar for detection of biofilm production by various clinical Candida isolates. Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences, 3(59), p. 13234 – 13238.
101. Yıldırım, M., Mumcuoğlu, İ., Kurşun, Ş., Koldaş, K., Yetener, V., Balaban, N. (2009). İnfeksiyon etkeni olarak izole edilen Candida albicans ve non-albicans Candida suşlarındaki bazı virulans faktörlerinin karşılaştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 39(3-4), p. 62-68.
102. Cevahir, N., Demir, M., Mete, E., Kaleli, İ. (2003). Candida suşlarında farklı yöntemlerle slime üretiminin araştırılması. İnfeksiyon Dergisi, 17(1), p. 67-70.
103. Arslan, H. Candida türlerinde Biyofilm oluşumu ve Antifungal Duyarlılığa Etkisi. 2015. T.C Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi; ss.61-63, Ankara.
104. Zer Y. Yogun bakım ünitesindeki hastalardan izole edilen Candida'ların tiplendirilmesi, slime üretimi ve antifungal duyarlılıkları. Uzmanlık tezi. Gaziantep; 2001.
105. Özperçin D, Klinik Örneklerden Soyutlanan Candida Türlerinde Biyofilm Oluşumu ve Bazı Antifungallere Duyarlılıklarının İncelenmesi. 2011, T.C. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi ; ss:69-70, İstanbul.
106. Karaca N, Koç AN, Karagöz S. Kan ve Vajen örneklerinden izole edilen Candida türlerinin slime aktiviteleri. T Mikrobiol Cem Derg 2001; 31:224-6.
107. Kuhn, D.M., Balkis, M., Chandra, J., Mukherjee, P.K., ve Ghannoum, M.A. (2003). Uses and limitations of the XTT assay in studies of Candida growth and metabolism. Journal of Clinical Microbiology, 41(1), p. 506-8.
108. Ramage, G., Vande Walle, K., Wickes, B.L., Lopez-Ribot, J.L. (2001). Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of Candida albicans biofilms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45(9), p. 2475-9.
109. Tüzüner, U. Candida Türlerinde Biyofilm Oluşumunun Modifiye Mikroplak ve XTT Yöntemleri İle Saptanması. 2014. T.C Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi; ss. 25-26. İzmir.

110. Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP, Biofilm –Forming Ability Of *Candida albicans* Is Unlikely to Contribute to High Levels Of Oral Yeast Carriage in Cases of Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Clin Microbiol* ,2003;41,2961-2967.
111. Hasan F, Xess I, Wang X, et al. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Microbes and Infect*, 2009, 11, 753-761.
112. Sanchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, Rivas-Cacares R. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. *Arch Oral Biol*, 2013; 3028, 1-9.
113. Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, et al. Biofilm Production by *Candida* Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia. *J Clin Microbiol* , 2007; 45, 1843-1850.
114. Ferreira AV, Prado CG, Carvalho RR, et al. *Candida albicans* and non – *C. albicans* *Candida* species : comparison of biofilm production and metabolic activity in biofilms, and putative virulence properties of isolates from hospital environments and infections. *Mycopathologia*, 2013; 175, 265-72.
115. Pannonusorn S, Fernandez V, Römling U, Prevalance of biofilms formations in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infections . *Mycoses* , 2013; 56, 264-272.
116. Imamura Y, Chandra J, Mukherje PK et al. *Fusarium* and *Candida albicans* biofilms soft contact lenses model development influence of lens type and susceptibility to lens care solution. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, Jan 2008. p.171-182.
117. Hassan Hassan ,A.B. Yoğun Bakım Hastalarının İdrar Kültüründen İzole Edilen *Candida* Türlerinin Dağılımı ve Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi ,2018. T.C. Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü ,Yüksek Lisans Tezi ; ss 58-65 ,Gaziantep.
118. Toka Özer T, Durmaz S, Yula E. Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from urine culture. *J Infect Chemother*. 2016; 22: 629-632.
119. Atalay M.A, Koç AN, Sav H, Demir G. Yatan hastaların idrar kültürlerinden izole edilen *Candida* türleri ve antifungal duyarlılıkları. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 2013; 70: 185-90.

120. Karakadioğlu P. Kandida türlerine bağlı üriner sistem enfeksiyonlarında risk faktörleri ve antifungal duyarlılık araştırılması. 2013, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 85 sayfa, Doç. (Dr. Çiğdem Banu Çetin).
121. Çalışkan Ş, Ozcan SK, Cınar S, Corakcı A, Çalışkan E. Vajinal Yakınması Olan Kadınların Vajen ve Rahim İçi Araç İpi Örneklerinden İzole Edilen Candida Türlerinin İn Vitro Biyofilm Oluşturma Özellikleri ve Antifungal Direnç ile İlişkisi. Mikrobiyol Bul 2011; 45(4): 697-706.
122. ElFeky DS, Gohar NM, El-Seidi EA, Ezzat MM, AboElew SH. Species identification and antifungal susceptibility pattern of Candida isolates in cases of vulvovajinal candidiasis. Alexandria Journal of Medicine. 2015; 269-277.
123. Mishra M, Agrawal S, Raut S, Kurhade A, Powar R. Profile of yeasts isolated from urinary tracts of catheterized patientp. Journal of clinical and diagnostic research. 2014;8(2):44-46.
124. Zer Y, Balcı İ. Yoğun bakım ünitesindeki hastalardan izole edilen Candida suşlarının identifikasyonu ve antifungal duyarlılıkları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2002;32:230-234.
125. Etienne M, Caron F. Management of fungal urinary tract infection. Presse med. 2007; 36: p.1899-1906.
126. Aktaş F. Kandidüri ve Üriner Sistem Kandidiyazisi. Hastane İnfeksiyonları. İstanbul: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2008; 2: p.191-197.
127. Yashavanth R, Shiju M.P, Bhaskar U.A, Ronald R, Anita K.B. Candiduria: Prevalence and trends in antifungal susceptibility in a tertiary care hospital of Mangalore. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 2013;7(11): 2459-2461.
128. Singla N, Gulati N, Kaistha N, Chander J. Candida Colonization in urine samples of icu patients: Determination of etiology, antifungal susceptibility testing and evaluation of associated risk factorp. Mycopathologia. 2012; 174: 149–155.
129. Hösükoğlu(Çelikkan),G.F.Vajinal Örneklerden İzole Edilen Candidaların Tiplendirilmesi Ve Broth Mikrodilüsyon Yöntemi ile Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi.2017, T.C. Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Yüksek Lisans Tezi ;ss 69-73,Gaziantep.

130. Kalkanci A, Güzel AB, Jabban IIK, Aydin M, Ilkit M & Kuştimur S. Candida vaginitis in non-pregnant patients: A study of antifungal susceptibility testing and virulence factors *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2013; 33: 378–383.
131. Fornaria G, Vicente VA, Gomesa RR, Murob MD, Pinheirob RL, Ferrari C, Herkerta PF, Takimurac M, Carvalhoc NS, Queiroz-Telles F. Susceptibility and molecular characterization of *Candida* species from patients with vulvovaginitis. *Brazilian journal of microbiology* 2016; 47: 373–380.
132. Consolaro¹ MEL, Albertoni¹ TA, Svidzinski¹ AE, Peralta RM & Svidzinski TIE. Vulvovaginal candidiasis is associated with the production of germ tubes by *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2005; 159: 501.
133. Bauters TGM, Dhont MA, Temmerman MI, Nelis HJ. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2002; 187:569–574.
134. Ying C, Zhang H, Tang Z, Chen H, Gao J, Yue C. Antifungal susceptibility and molecular typing of 115 *Candida albicans* isolates obtained from vulvovaginal candidiasis patients in 3 Shanghai maternity hospitals. *Medical Mycology*, 2015,00,1-6.
135. Kebudi R. Yeni antifungaller. *Ankem Dergisi*. 2007;21(Ek 2):210-215.
136. Arıkan S, Rex JH. Antifungal Agents. In: Murray PR, Baron EJ, Landry ML, Jorgensen JH, Pfaller MA (eds). *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed). Washington DC, ASM Press, 2007:1949-1960.
137. Alpat SN, Özgüneş İ, Ertem OT. Kandidürisi Olan Hastalarda Risk Faktörlerinin Değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2011; 45(2): p.318-324.
138. Basma R, Barada G, Ojaimi N, Khalaf RA. Susceptibility of *Candida albicans* to common and novel antifungal drugs, and relationship between the mating type locus and resistance, in Lebanese hospital isolates. *Mycoses*. 2008;52:141-148.
139. Johnson E, Espinel-Ingroff A, Szekely A, Hockey H, Troke P. Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amfotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32:511-514.

140. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Rice C, Tendolkar S, Hollis RJ et al. Caspofungin activity against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida*. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5729-5731.
141. Toner L, Papa N, Aliyu SH, Dev H, Lawrentschuk N, Al-Hayek P. *Candida* growth in urine cultures: A contemporary analysis of species and antifungal susceptibility Profilep. *An International Journal of Medicine* 2016; 109: 325–329.
142. Zarei-Mahmoudabadi A, Matehkolaei A.R, Ghanavati F. The Susceptibility Patterns of *Candida* Species Isolated From Urine Samples to Posaconazole and Caspofungin. *Jundishapur J Microbiol.* 2015; 8(3):24298.
143. Duma RJ, Edwards JE (editörler), *Candida* Urinary Tract Infectionp. *Clinical Infectious Disease*p. 2011;52(6).p.422-466.
144. Hun Ding C, Abdul Wahab A, Muttaqillah N, Tzar M.N. Prevalence of albicans and non-albicans candiduria in a Malaysian medical centre. *J Pak Med Assoc.*2014; 64: 1375-1379.
145. Yüksekaya, Ş., Fındık, D., Arslan, U. (2010). Yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarından idrarlarından izole edilen *Candida* türlerinin moleküler epidemiyolojisi ve antifungal duyarlılıkları, *Tıbbi Mikrobiyoloji*. Selçuk Üniversitesi: Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi.

8. ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 2.1. Maya hücresi	4
Şekil 2.2. PVC (Polinivil Klorür) katater yüzeyinde biyofilm oluşum aşamaları	7
Şekil 2.3. Farklı Candida türlerinde konfokal lazer mikroskobu ile biyofilm yapısının görünümü	10



RESİMLER

	<u>Sayfa No</u>
Resim 3.1. SDA'da üreyen <i>C.albicans</i> suşunun görünümü.	19
Resim 3 .2. <i>C.albicans</i> suşunun gram boyama yapıldıktan sonra mikroskopik görünümü.	20
Resim 3.3. Kongo kırmızısı agarda 48 saatlik inkübasyonun ardından görünüm. Suşlar biyofilm pozitif olarak değerlendirilmiştir.....	22
Resim 3.4. Kongo kırmızısı agarda 48 saatlik inkübasyon sonucu koloni görünümü.286,287,289 nolu suşlar biyofilm negatif 288 nolu suş biyofilm pozitif.	23
Resim 3.5. Mikroplakta XTT indirgenmesi ile biyofilm varlığının test edilmesi yönteminde XTT eklenip 2 saat inkübe edildikten sonra kuyucukların görünüşü.....	24
Resim 3.6. RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması	27
Resim 3.7. Çalışma solüsyonu hazırlanması	29

9. TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 3.1. Phoenix otomatize maya identifikasyon sisteminde kullanılan biyokimyasal reaktifler.....	21
Tablo 3.2. Antifungal dilüsyon serileri ve final konsantrasyon hazırlanması.....	30
Tablo 4.1. Kongo Kırmızısı Agarda üreyen koloni rengine göre suşların biyofilm yapabilme özelliği	32
Tablo 4.2. Mikroplakta XTT İndirgenmesi Sonucu Biyofilm Özelliğinin Belirlenmesi.....	33
Tablo 4.3. Mikroplakta XTT İle Kongo Kırmızısı Yöntemi sonuçlarının karşılaştırması	34
Tablo 4. 4. Amfoterisin B ile yapılan çalışma sonucu MİK dağılımları.....	35
Tablo 4.5. Biyofilm pozitif ve biyofilm negatif hastaların MİK değerlerinin karşılaştırılması.	35
Tablo 4.6. Amfoterisin B	36
Tablo 4.7. Flukonazol ile yapılan antifungal duyarlılık testi sonucu MİK değerleri	36
Tablo 4.8. Flukonazol için biyofilm pozitif ve negatif suşların MİK değerlerinin karşılaştırılması	37
Tablo 4. 9. Flukonazol için biyofilm negatif ve pozitif suşların MİK dağılımları.....	37
Tablo 4.10. Vorikonazol için antifungal duyarlılık testi sonucu elde edilen MİK değerleri ...	38
Tablo 4.11. Vorikonazol için biyofilm pozitif ve negatif suşların MİK dağılımları.....	38
Tablo 4.12. Vorikonazol	39
Tablo 4.13. Flusitozin (5-fc) ile yapılan çalışma sonucu MİK Dağılımı.....	39
Tablo 4.14. Fulsitozin için Biyofilm negatif ve pozitif suşların MİK dağılımları	40
Tablo 4.15. Flusitozin	40
Tablo 4.16. Kaspofungin ile yapılan çalışma sonucu elde edilen MİK değerleri	41
Tablo 4.17. Kaspofungin için Biyofilm negatif ve pozitif suşların MİK dağılımları	41
Tablo 4.18. Kaspofungin.....	42

10. EKLER DİZİNİ

Ek 1. Etik Kurulu Karar Formu



11.EKLER

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	Araştırmanın Başlığı	Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Candida İzolatlarında Biyofilm Oluşumu ve Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi		
	Sorumlu Araştırmacı	Prof.Dr. Murat ARAL		
	Başvuru Tarihi	21.10.2016		
	Protokol No	247		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	-Muayene, tetkik, tahlil ve tedavi işlemleri sırasında elde edilen kan, idrar, doku, radyolojik görüntü veya benzeri materyalle yapılacak araştırmalar			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>
KARAR BİLGİLERİ	Oturum No: 2016/18	Karar No: 01	Tarih: 02.11.2016	
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası; araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel yönden sakınca bulunmadığı toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile KABUL EDİLMİŞTİR.			

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Araştırma ile İlişki		Katılım		İmza
Başkan Prof. Dr. Metin KILINÇ	Tıbbi Biyokimya	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Sefa RESİM Üye	Oroloji	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI
Prof. Dr. Hafize ÖKSÜZ Üye	Anestezi ve Reanimasyon	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. B. Nürten ARKECECI Üye	Fizyoloji	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	KATILMADI
Yrd. Doç. Dr. Adem DOĞANER Üye	Biyostatistik ve Tıbbi Bilşim	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Murat BAYKARA Üye	Radyoloji	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ahmet Burak DOĞAN Üye	Çocuk Cerrahisi	KSÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
ŞERH (VARSA)							

12.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Seda Acar
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 14 /11/1991
Medeni hali : Bekar
Telefon : 05057382932
e-posta : seda.acar.1991@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	KSÜ/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Tıbbi Mikrobiyoloji AD	2018
	KSÜ /Eğitim Fakültesi/Pedagojik Formasyon Eğitimi	2014
Lisans	KİYÜ/Fen Edebiyat Fakültesi/Biyoloji	2013
Lise	İnci Konukoğlu Lisesi	2007

Yabancı Diller

İngilizce

Hobiler

Doğa bilimleri, spor, voleybol ,yüzme,