

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***CANDIDA* TÜRLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMU VE
ANTİFUNGAL DUYARLILIĞA ETKİSİ**

Hacer ASLAN

**Mikrobiyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2015**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CANDIDA TÜRLERİNDE BİYOFİLM OLUŞUMU VE
ANTİFUNGAL DUYARLILIĞA ETKİSİ**

Hacer ASLAN

Mikrobiyoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Dolunay GÜLMEZ KIVANÇ


ANKARA
2015

ONAY SAYFASI

Anabilim Dalı : Mikrobiyoloji
 Program : Mikrobiyoloji
 Tez Başlığı : Candida Türlerinde Biyofilm Oluşumu ve Antifungal Duyarlılığa Etkisi

Öğrenci Adı-Soyadı : Hacer Aslan
 Savunma Sınavı Tarihi : 25.12.2015

Bu çalışmâ jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Cumbur Özkuyumcu Hacettepe Üniversitesi	
Tez danışmanı:	Doç. Dr. Dolunay Gülmez Kıvanç Hacettepe Üniversitesi	
Üye:	Prof. Dr. Sevtap Arıkan Akdağlı Hacettepe Üniversitesi	
Üye:	Doç. Dr. Zeynep Sarıbaş Hacettepe Üniversitesi	
Üye:	Prof. Dr. Aydın Karaarslan Ankara Üniversitesi	

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


 Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU
 Müdür

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasında her aşamada önemli katkıları olan tez danışmanım Doç. Dr. Dolunay Gülmez Kıvanç' a,

Bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Prof. Dr. Sevtap Arıkan-Akdağlı' ya,

Eğitimim süresince bilgi ve desteğini hiç esirgemeyen Prof. Dr. Cumhur Özkuyumcu' ya,

Destek ve yardımlarından dolayı Serpil Özyaşar ve Dilek Çakmak' a,

Destek ve yardımlarından dolayı Gülşen Hazırolan' a,

Desteğiyle her zaman yanımda olan Burak Canberi' ye,

Bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemeyerek tezin gelişimine katkıda bulunan Volkan Aslan ve Melike Dinççelik Aslan' a,

Eğitimim süresince maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan anneme ve babama teşekkür ederim.

ÖZET

Hacer Aslan, *Candida* Türlerinde Biyofilm Oluşumu ve Antifungal Duyarlılığa Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2015. *Candida* türleri sağlıklı bireylerde mikrobiyota elemanı olabilen ve uygun koşullarda fırsatçı enfeksiyonlara yol açabilen mantarlardır. Biyofilm oluşturma yeteneği, özellikle biyomateryaller ile ilişkili enfeksiyonlarda önemli bir virülans faktörüdür. Biyofilm varlığında antifungal ilaç etkinliğinin bilinmesi, bu enfeksiyonların tedavisinde önemlidir. Bu çalışmada üriner sistem enfeksiyonu etkeni olan *Candida*'larda biyofilm yapabilme yeteneğinin, üriner kateteri olan ve olmayan hastalardan izole edilen suşlarda biyofilm özelliğindeki farkın ve biyofilm varlığında antifungal duyarlılıktaki değişimin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Klinik Patoloji Laboratuvarı Mikoloji Birimi'nde tanımlanan, üriner kateteri olan ve olmayan 25'er hastanın idrar kültürlerinden elde edilen toplam 50 *Candida* izolatu alınmıştır. Biyofilm oluşturma yeteneği Kongo Kırmızısı agar ve mikroplakta XTT indirgenmesi yöntemiyle araştırılmıştır. Flukonazol ve amfoterisin B duyarlılıkları, planktonik hücrelerde Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerilerine uygun olarak referans mikrodilüsyon; biyofilm varlığında ise XTT indirgenmesi yöntemi ile saptanmıştır. Kongo kırmızısı agar yöntemi ile suşların 12'sinde (%24), XTT indirgenmesi yöntemiyle ise tüm suşlarda biyofilm oluşumu gösterilmiştir. Hastada üriner kateter varlığı ile izolatu biyofilm özelliği arasında ilişki gözlenmemiştir. Tüm suşlar planktonik formda flukonazol ve amfoterisin B'ye duyarlı bulunmuştur. Biyofilm varlığında ise tümü flukonazole dirençli hale gelmiştir. Suşların hiç birinde test edilen en yüksek amfoterisin B dilüsyonu olan 8µg/ml ile %100 inhibisyon sağlanamamıştır. Değerlendirme %80 inhibisyona göre yapıldığında 14'ü (%28) direnç sınır değerinin altında kalmıştır.

Anahtar sözcükler: *Candida*, biyofilm, antifungal duyarlılık, üriner enfeksiyon

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: 014 D02 101 008-456).

ABSTRACT

Hacer Aslan, Biofilm Formation in *Candida* Species and Its Effect on Antifungal Susceptibility, Health Sciences Institute, Microbiology Program Master of Science Thesis, Ankara, 2015. *Candida* species are fungi that may be present in microbiota of healthy individuals and cause opportunistic infections under appropriate conditions. Biofilm forming ability is an important virulence factor especially in biomaterial related infections. It is important to know the activity of antifungal agents in presence of biofilms for treatment of these infections. This study aimed to investigate biofilm forming ability, difference in biofilm traits in strains isolated from patients with and without urinary catheters, and change of antifungal susceptibility in presence of biofilms for *Candida* that cause urinary infections. The study included a total of 50 isolates isolated from urine cultures of 25 patients each with and without urinary catheters and, identified in Hacettepe University Hospitals Clinical Pathology Laboratory Mycology Division. Biofilm forming ability was tested by Congo Red agar and microplate XTT reduction methods. Susceptibilities against fluconazole and amphotericin B were determined by Clinical and Laboratory Standards Institute reference microdilution method for planktonic cells and XTT reduction assay for biofilms. Biofilm formation was shown for 12 (24%) isolates by Congo Red Agar method and all isolates by XTT reduction method. No relation between urinary catheter presence in patients and biofilm formation in isolates was detected. All strains were susceptible to fluconazole and amphotericin B in planktonic form. However, all isolates became resistant to fluconazole in presence of biofilm. An inhibition of 100% could not be obtained for any of the isolates with 8 µg/ml amphotericin B, the highest dilution tested. If evaluated according to 80% inhibition, 14 (28%) were below resistance breakpoint of amphotericin B in presence of biofilm.

Key words: *Candida*, biofilm formation, antifungal susceptibility, urinary infection

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Coordination Unit (Project Code: 014 D02 101 008-456).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 <i>Candida</i> Türleri	3
2.1.1 Tarihçe	3
2.1.2 <i>Candida</i> Türlerinin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	4
2.1.3. Virülans Faktörleri	6
2.2. Biyofilmler	11
2.2.1. Tanım	11
2.2.2. Tarihçe	11
2.2.3. Biyofilmlerin Yapısı	13
2.2.4. Biyofilmlerin Oluşumu	15
2.2.5. Fungal Biyofilm Oluşumu	16
2.2.6. Biyofilm Gelişiminin Genetik Kontrolü	20
2.2.7. Biyofilm Enfeksiyonları	21
2.2.8. Biyofilm Varlığını Saptama Yöntemleri	24
2.2.9. <i>Candida</i> Biyofilmleri ve Antifungal Direnç	26
2.2.10. Biyofilm Enfeksiyonlarının Tedavisi ve Önleme Stratejileri	29
2.2.11. Üriner Sistem Enfeksiyonlarında Biyofilmlerin ve Kateterizasyonun Rolü	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34

3.1. Maya suşları	34
3.2. Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi	34
3.2.1. Kongo Kırmızısı Agar ile Biyofilm Oluşumunun Test Edilmesi	34
3.2.2. Mikroplakta XTT İndirgenmesi ile Biyofilm Varlığının Test Edilmesi	36
3.3. Planktonik Hücrelerin Antifungal Duyarlılık Durumlarının Belirlenmesi	40
3.3.1. Test Plaklarının Hazırlanıp Dondurulması	40
3.3.2. Test Edilecek Suşların Hazırlanması	41
3.3.3. Testin Uygulanması ve Değerlendirilmesi	41
3.4. Biyofilm Varlığında Antifungal Duyarlılığın Belirlenmesi	42
3.4.1. Test Edilecek Suşların Hazırlanması	42
3.4.2. Biyofilm İçeren Test Plaklarının Hazırlanması ve Antifungal Duyarlılık Testinin Uygulanması	42
4. BULGULAR	45
4.1. Kongo Kırmızısı Agar ile Biyofilm Oluşumunun Test Edilmesi Deneyi Sonuçları	45
4.2. Mikroplakta XTT İndirgenmesi ile Biyofilm Varlığının Test Edilmesi	45
4.3. Antifungal Duyarlılık Testleri	50
5. TARTIŞMA	59
5.1. Kongo Kırmızısı Agar ile Biyofilm Oluşumunun Test Edilmesi	60
5.2. Mikroplakta XTT İndirgenmesi ile Biyofilm Varlığının Test Edilmesi	62
5.3. Antifungal Duyarlılık Sonuçları	63
5.3.1. Planktonik Hücrelerin Antifungal Duyarlılık Sonuçları	64
5.3.2. Biyofilm Varlığında Antifungal Duyarlılık Sonuçları	65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
7. KAYNAKLAR	69
8. EKLER	
Ek 1. Etik Kurul İzni	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABC	ATP- Binding Casette
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Als	Agglutinin like sequences
CFU	Colony Forming Unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
ECM	Extracellular Matrix
EMB	Eosine Methylene Blue
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
Hwp	Hyphal wall protein
MFS	Major Facilitator Superfamily
mg	Miligram
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ml	Mililitre
mm	Milimolar
MOPS	3-(N-morfolino)propanesülfonik asit
MTL	Mating Like Locus
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür
NaOH	Sodyum hidroksit
Nm	Nanometre
OD	Optik Dansite

PBS	Phosphate Buffered Saline
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-karboksanilit
YPD	Yeast Peptone Dextrose
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
3.1 Kongo kırmızısı agarda 48 saatlik inkübasyon sonrası görünüm	35
3.2 Mikroplakta XTT indirgenmesi ile biyofilm varlığının test edilmesi yönteminde yıkama sonrasında kuyucuklardaki biyofilmin görünüşü	36
3.3 Mikroplakta XTT indirgenmesi ile biyofilm varlığının test edilmesi yönteminde XTT eklenip 2 saat inkübe edilen kuyucukların görünüşü	37
3.4 Biyofilm varlığında antifungal duyarlılığın belirlenmesi için kullanılan XTT ile duyarlılık saptama yönteminde XTT ile inkübasyon sonrasında amfoterisin B ile hazırlanmış mikroplakta suşların görünümü.	43

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
4.1. Kongo kırmızısı agarda üreyen koloni rengine göre suşların biyofilm yapma özelliği	45
4.2. Mikroplakta XTT indirgenmesi yöntemine göre kateter pozitif ve kateter negatif hastalardan elde edilen suşların biyofilm yapma özelliği	46
4.3. Kongo kırmızısı agarda üreyen koloni rengi ve mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi sonuçlarına göre kateter pozitif hastalardan elde edilen suşların biyofilm özelliği	47
4.4. Kongo kırmızısı agarda üreyen koloni rengi ve mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi sonuçlarına göre kateter negatif hastalardan elde edilen suşların biyofilm özelliği	48
4.5. Kongo kırmızısı agarda üreme ve mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi ile elde edilen biyofilm varlığı sonuçlarının karşılaştırılması	49
4.6. <i>Candida</i> türlerinde Kongo kırmızısı agar ve mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi ile saptanan biyofilm sonuçları	50
4.7. Flukonazol için kateter pozitif hastalardan elde edilen suşlarda standart referans test ve biyofilm varlığında yapılan antifungal duyarlılık testi sonucunda elde edilen MİK değerleri	51
4.8. Flukonazol için kateter negatif hastalardan elde edilen suşlarda standart referans test ve biyofilm varlığında yapılan antifungal duyarlılık testi sonucunda elde edilen MİK değerleri	52
4.9. Amfoterisin B için kateter pozitif hastalardan elde edilen suşlarda standart referans test ve biyofilm varlığında yapılan antifungal duyarlılık testi sonucunda elde edilen MİK değerleri	54
4.10. Amfoterisin B için kateter negatif hastalardan elde edilen suşlarda standart referans test ve biyofilm varlığında yapılan antifungal duyarlılık testi sonucunda elde edilen MİK değerleri	55
4.11. Test edilen iki antifungal ilaç için standart antifungal test ve biyofilm varlığında yapılan antifungal duyarlılık testi sonuçları	56

- 4.12. Farklı *Candida* türlerinde flukonazol için standart antifungal test ve biyofilm varlığında yapılan antifungal duyarlılık testi sonuçları 57
- 4.13. Farklı *Candida* türlerinde test edilen amfoterisin B için standart antifungal test ve biyofilm varlığında yapılan antifungal duyarlılık testi sonuçları 58

1. GİRİŞ

Hastane kaynaklı fungal enfeksiyonların büyük bir kısmını *Candida* türleri oluşturmaktadır ve son yıllarda bu oran artış göstermiştir. Geniş spektrumlu antibakteriyel kullanımı, immün sistemi baskılayıcı ilaçlar, diabetes mellitus gibi altta yatan metabolik hastalıklar, kateter ve diğer tıbbi cihazların varlığı gibi altta yatan durumlar kandidemi için risk faktörüdür. *Candida* enfeksiyonlarında biyofilm oluşumu önemli bir virülans faktörüdür. Metabolik hastalıklar ve tıbbi cihazlar biyofilm oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Biyofilm içindeki mikroorganizmaların, hastanın immün sistemine ve kullanılan antimikrobiyal ilaçlara karşı planktonik hücrelerden daha dirençli oldukları ve bunun sonucunda tedavi başarısının düştüğü bilinmektedir. Üriner sistem *Candida* enfeksiyonları, üriner kateter ve nefrostomi gibi invazif tıbbi cihazlarla ilişkili olabilirler (1, 2). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) çocuk yoğun bakım ünitelerindeki nozokomiyal enfeksiyonları inceleyen bir sürveyans çalışmasında, *Candida albicans*'ın üriner sistem enfeksiyonlarındaki oranı üriner kateter varlığında %16,6 iken kateter ile ilişkili olmayan enfeksiyonlarda %6,5 olarak saptanmıştır (3).

Üriner kateterler, yapısal ve yüzeysel koşulları bakımından mikrobiyal biyofilm gelişimine uygun ortam sağlamakta ve uzun süreli kullanımları durumunda pek çok enfeksiyonu beraberinde getirmektedirler (4). Bu enfeksiyonlar iki farklı yoldan gelişebilmektedir (4, 5).

1. Üriner kateterlerin dış yüzeyi, üretradan mesaneye yerleştirilirken üretral ve gastrointestinal kaynaklı endojen patojenler ile kontamine olup bunları mesaneye taşıyabilmektedir.

2. Benzer şekilde, drenaj sisteminin kapalı olmaması veya idrar torbasının kontamine olması ile lümen içi kolonizasyon da mümkün olmaktadır.

Kolonizasyondan kısa bir süre sonra da biyofilm oluşumu meydana gelmekte ve antifungal tedavinin başarısı oldukça düşmektedir.

Kateter ve benzeri biyomateryallere bağlı gelişen biyofilmin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde, öncelikli olarak biyomateryalin çıkarılması önerilse de, hastaların bir kısmında bu mümkün olmamakta veya biyofilmin

uzaklaştırılması sonrasında da tedavi gerekebilmektedir. Bu nedenle, biyofilm varlığında antifungal ilaçların etkinliklerinin iyi bilinmesi tedavi başarısı açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Klinik Patoloji Laboratuvarı Mikoloji Birimi'ne gelen idrar örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin biyofilm oluşturma yeteneklerinin belirlenmesi, üriner kateter varlığında biyofilm özelliğindeki farkın araştırılması ve biyofilm oluşturan suşlarda antifungal ilaçların etkinliklerinin saptanması amacıyla planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Candida* Türleri

2.1.1 Tarihçe

Yaklaşık olarak iki yüze yakın tür içeren *Candida* cinsi içerisinde *Candida famata* ve *Candida inconspicua* gibi son zamanlarda önem kazanan türler de dâhil olmak üzere onun üzerinde türün insan ve hayvanlar için hastalık etkeni olabildikleri bilinmektedir (6).

Candida enfeksiyonlarıyla ilgili bilinen ilk tanımlama, M.Ö. IV. yüzyılda Hipokrat'ın Epidemics kitabında, altta yatan hastalığı olan iki hastada tarif edilen oral kandidiyazistir (pamukçuk) (7). Oral kandidiyazis etkeninin mantar olarak tanımlanması 1842 yılında olmuş ve Gruby mikroorganizmayı *Sporotrichum* olarak sınıflamıştır. Takip eden yüzyıl boyunca mayalar ile ilişkili olan birçok patolojik tablo rapor edilmiştir (7).

Candida enfeksiyonları son yıllarda gittikçe artmakla birlikte geçmişte de bildirilmiştir. *Candida* 1844 yılında Bennett tarafından tüberkülozlu bir hastanın balgam örneğinden, 1849'da Wilkinson tarafından vajinal lezyondan, 1853'de Robin tarafından sistemik bir enfeksiyondan, 1861 yılında Zenker tarafından düşkün bir hastada oral lezyondan hematojen olarak yayıldığı gösterilen bir beyin enfeksiyonundan izole edilmiştir (7). *Candida* türlerinin etken olduğu buna benzer patolojik tablolar yirminci yüzyılın başlarında da bildirilmeye devam etmiştir. 1904 yılında Dubendorfer onikomikozu, 1910'da Rafin sistiti, 1923'te Jacobi dermatiti, aynı tarihte Forbes kronik mukokutanöz kandidiyazisi *Candida* türlerinin etken olabildiği klinik tablolar olarak bildirmişlerdir (7). 1928 yılına gelindiğinde Conner osteomyeliti, 1943'te Joachim ve Polayes endokarditi, Suthin de endokrin sistem ile *Candida* enfeksiyonları arasındaki patolojik ilişkiyi tanımlamıştır (7). 1912 yılında Catellani'nin tanımladığı çay tadıcılarının öksürüğü ("tea tasters' cough") ise *Candida albicans* dışındaki *Candida* türlerinin patolojik süreçte yer alabileceğini öne süren ilk rapor olarak literatürdeki yerini almıştır (7).

Farklı klinik tablolarda gösterilen bu mayaların isimlendirilmesi ise sıkça değişmiştir. *Candida albicans*'a; Robin 1853 yılında *Oidium albicans*,

Quinquad 1868'te *Syringspora robini*, Reess 1875'te *Saccharomyces albicans* adını vermiştir. Zorp tarafından 1890 yılında önerilen *Monila albicans* ismi daha kalıcı olmuşsa da, diğer adlar ile karıştırılma sorunu devam etmiştir (7). 1923'te Berghout bu karışıklığı gidermek için *Candida* cinsini tekrar ele alarak oral kandidiyazis etkenini *Candida albicans* olarak isimlendirmiştir.

1970'li yıllardan sonra bağışıklık baskılayan ilaçların kullanımının artması ve AIDS gibi hastalıkların ortaya çıkması ile beraber mantar hastalıkları daha önemli hale gelmiştir (8).

İnsanlarda enfeksiyona neden olan birçok yeni tür ve insan patojeninin keşfi, fungal taksonominin önemini daha da arttırmıştır (8, 9). Tedavinin uygun şekilde yapılabilmesi, mantarın doğru tanımlanmasını gerektirmektedir (8).

2.1.2 *Candida* Türlerinin Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Candida türleri, Ascomycetes şubesinde *Saccharomyces* ailesi içerisinde yer alırlar (6, 8). Mikroskop altında 5-6 µm büyüklüğünde, oval, tomurcuklanan hücreler olarak görülürler (6, 10).

Candida türleri Gram boyama yöntemiyle gram pozitif boyanırlar. Mikroskop altında gram pozitif bakteriler gibi mor renkli görülmesine rağmen, bakterilerden çok daha büyük oval yapılarıdır.

Sabourad Dextrose Agar (SDA), *Candida* türlerinin üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Koloniler, 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra krem rengi, yumuşak kıvamlı, ekşi kokulu koloniler olarak gözlenirler. Bazı türlerin kendine özgü koloni morfolojisine sahip olması, tür hakkında ön tahmin yapılmasını olanaklı kılmaktadır. 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. *Candida glabrata* düz, yumuşak, parlak koloniler şeklinde ürer. *Candida keyfr* krem renginde yumuşak kıvamlı koloniler oluştururken; *Candida lusitanae* krem rengi, yumuşak koloniler yapmaktadır. *Candida guilliermondii* ise SDA' da düz veya buruşuk beyaz renkli koloniler halinde

üremektedirler. *Candida dubliniensis* kolonileri ise koloni morfolojisine bakılarak *C. albicans* kolonilerinden ayırt edilememektedir (10).

C. albicans ve *C. dubliniensis* yalancı hif ve gerçek hif oluşturabildikleri için dimorfik mantarlar olarak da bilinmektedirler. *C. albicans* ve *C. dubliniensis* insan serumunda 37°C'de üç saate kadar inkübe edildiklerinde germ tüp oluşumu saptanabilmektedir. Germ tüp, gerçek hif gelişiminin ilk aşaması olup ana hücreden boğum yapmadan uzayan tübüler bir yapı şeklinde görülür. Germ tüp yapabilen bir *Candida* suşu 45°C sıcaklıkta üreyebiliyorsa *C. dubliniensis*'ten ayrılarak *C. albicans* olarak tanımlanabilmektedir (10).

Klinik mikoloji laboratuvarlarında izole edilen mayaların cins ve tür düzeyinde tanımlanabilmesi için spor, gerçek hif ve psödohif gelişimini tetikleyen Mısır Unlu (Corn meal) Tween 80 agar gibi besin içeriği yönünden fakir besiyerleri tercih edilmektedir. Bu besiyerine ekim yapıldıktan sonra oksijen miktarının az, karbondioksit miktarının fazla olması için ekim alanının üzerine lamel kapatılmaktadır. İnkübasyon 25°C'de gerçekleştirilmekte, 24-48 saat sonra gelişen yapılar mikroskop altında türe özgü yapıların belirlenmesi ve ayırım yapılması amaçlanmaktadır (10).

Kromojenik besiyerleri, belli bir substrattan kromojenik faaliyet sonucunda başka bir madde oluşması ve bunun koloninin renk değişimi ile görünür hale getirilmesi prensibine dayanan besiyerleridir. *Candida* türleri birbirlerinden kromojenik agarda oluşturdukları farklı renkteki kolonileri ile de ayrılabilir (10, 11).

Candida türlerinin ayırımında kullanılan bir diğer yöntem de karbon asimilasyon testlerini içeren hazır ticari kitlerdir. Bunlara örnek olarak API 20C (BioMerieux, Fransa), ID32C (BioMerieux, Fransa) veya otomatize sistemlerde kullanılabilen VITEK maya identifikasyon kartı (BioMerieux, Fransa), Phoenix maya ID paneli (Becton-Dickinson, ABD) ve Microscan maya identifikasyon paneli (Siemens, ABD) verilebilir. Bu kitlerde, farklı kuyucuklarda gerçekleştirilen biyokimyasal reaksiyonlar değerlendirilerek basılı veya dijital kataloglarda sonuçlar değerlendirilmekte ve tanımlama yapılmaktadır.

Tür ayırımı, biyokimyasal özellikler ya da enzim varlığı esasına dayanan hazır ticari kitler ve manuel bazı testler ile de desteklenebilmektedir. Örneğin

Candida krusei'nin bazı suşları ve *Candida lipolytica*, üre içeren besiyerinde 18-48 saatlik inkübasyon sonrasında besiyerinin rengini sarıdan pembeye dönüştürmektedir (10, 12). *Candida kefyr* laktoz pozitif bir türdür ve Eosin Methylene Blue (EMB) agarda ürettiğinde yeşil metalik refle yapabilmektedir. Bu özelliği ile diğer türlerden ayrılabilir (10, 13).

2.1.3 Virülans Faktörleri

Candida türleri sağlıklı bireylerin ağız ve gastrointestinal kanalında bulunan normal flora üyesi mikroorganizmalardır (14). İmmün yetmezliği olan konakta yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara neden olan fırsatçı patojenler haline gelmektedirler. Enfeksiyon etkeni olarak ortaya çıkmaları için konak faktörlerinin uygun olması gerekse de, mantarlarda farklı virülans faktörlerinin varlığı gösterilmiştir (6).

Virülans faktörleri mikroorganizmanın konak direnç mekanizmalarına karşı koyarak çoğalabilmesini ve bazı durumlarda konağa hasar verebilmesini sağlarlar. Enfeksiyonun evresine, enfeksiyon bölgesine ve/veya konak yanıtına göre ekspresyonları değişebilir. Mayalarda adezin ve invaziner, enzimler, fenotipik değişim, dimorfizm özelliği ve biyofilm oluşturma yeteneği virülans faktörleri içinde yer almaktadır (6). *C.albicans* suşlarında, non-albicans *Candida* türlerine göre virülans faktörlerinin daha fazla ifade edildiği görülmüştür (6, 15).

Adezinler

C. albicans'ta tanımlanmış adezinler hücre duvarı ile bağlantılıdır. Bunların arasında als ("agglutinin like sequences") proteinleri, Hwp ("hyphal wall protein") hifal hücre duvarı proteinleri, Int 1p yüzey reseptörü, mannoproteinler ve Csh 1p olarak adlandırılan bir yüzey reseptörü sayılabilir (16).

- **Adezin kodlayan ALS gen ailesi**

C. albicans dışındaki *Candida* türlerinde de bulunabilir. On beş yıldan uzun süre önce keşfedilen ALS1'i diğerler aile üyeleri (*ALS2*, *ALS3*, *ALS4*, *ALS5*, *ALS6*, *ALS7* ve *ALS9*) takip etmiştir. Bu gen ailesi içerisinde tanımlanmış sekiz adet gen mevcuttur (17). ALS1'in tanımlanmasından sonra bu ailedeki diğer proteinlerin işlevleri üzerine çalışmalar yapılmıştır (18).

- **Hwp (hyphal wall protein)**

Hifal hücre duvarı proteinleri olarak adlandırılırlar. Hwp1, hifal hücrelerin yüzeyinde bulunur ve hifal yapıların mannoproteinlerinin kodlanmasında rol oynar. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, *HWP1* geni devre dışı bırakılan mantarların fare dokularına bağlanma kapasitesinde azalma gözlenmiştir (16, 19).

- **Int 1p yüzey reseptörü**

C.albicans hücre zarında bulunan, insan kompleman reseptörü 3 ve 4'e benzeyen ve insan fibronektin, laminin ve kollajen gibi hücre dışı matriks elemanlarına bağlanmayı sağlayan bir reseptördür. Bu protein dışardan gelen uyarılara göre morfolojik değişimi uyarmaktadır (16, 19)

- **Mannoproteinler**

Mannoproteinler, insan epitel hücrelerindeki fukozil ve glikozamid molekülleriyle bağlantı kurulmasını sağlayan reseptörlerdir. Bu sayede insan epitel hücrelerine tutunmayı sağlayarak oral ve vajinal kandidiyazise yol açabilirler (16, 19).

- **Csh 1p yüzey reseptörü**

Bu reseptörler, *C.albicans*'ın maya formundaki hücrelerinin fibrinojen, plazminojen ve kininojen gibi serum proteinlerine bağlanmasında rol oynarlar. Maya hücresinde yüzey hidrofobisitesini artırarak konak hücresine bağlanmayı kolaylaştırabilirler (16).

Hidrolitik Enzimler

- **Fosfolipazlar**

Fosfolipazlar, insan hücre membranında bulunan ester bağlarını hidrolize ederek, epitel hücrelerine tutunmada ve invazyonda rol oynamaktadırlar (16). Fosfolipazlar hidrolize ettikleri ester bağlarına göre sınıflandırılmaktadır. *C.albicans*'ın hifal formunun ucunda bulunan ve Tip B olarak sınıflandırılan grup, hem hidrolaz ve hem de lizofosfolipaz - transaçilaz işlevine sahip olduğundan, aynı zamanda fosfolipid oluşumunu da katalize etmektedir. Tip B fosfolipaz, *C.albicans*'ta invazyonda rol oynamaktadır (16).

- **Proteinazlar**

Candida'da SAP ("secreted aspartate proteinases") olarak adlandırılan aspartik proteinazlar ve metalloproteinazlar bulunmaktadır. Proteinaz varlığının virülans ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (20, 21).

Aspartik proteinazlar çoklu SAP gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. *C.albicans*'ta en az on SAP geninin varlığı gösterilmiştir (22). Optimal aktiviteleri asidik pH aralığındadır.

Salgısal asit proteinazlar, proteinlerin tek nitrojen kaynağı olduğu ortamlarda salınırlar (16). Farklı SAP gruplarının özelleşmiş görevleri bulunmaktadır. Mayalarda bulunan SAP1, SAP2 ve SAP3, adezyonun erken aşamasında, invazyonda ve kutanöz enfeksiyonlarda rol alırlar. SAP4, SAP5 ve SAP6 hifal formlar tarafından üretilirler ve invazyonda görevlidirler. SAP8 penetrasyon aşamasında, SAP9 ve SAP10 ise mantar hücresinin duvar bütünlüğünün sağlanmasında ve tomurcukların ana hücreden ayrılmasında işlev görür (16).

- **Hemolitik Faktörler**

Hemolitik kapasite, *Candida* cinsi mantarlar için önemli bir virülans özelliğidir. Mantar hücresinin konaktan demir elde etmesine ve kendi metabolik faaliyetleri için kullanmasına olanak sağlamaktadır (23).

Demir, tüm organizmalar için esansiyel bir elementtir. İnsanlarda hemoglobin gibi bazı proteinlerin yapısında demir bulunmaktadır. *C.albicans* insandaki hemoglobini demir kaynağı olarak kullanabilmektedir. In vivo

ortamda kompleman reseptörleri aracılığıyla eritrositlere bağlanan *C.albicans*'ın, bağlanmayı takiben eritrositlerin lizisini uyararak bir hemoliz faktörü ürettiği bildirilmiştir (24). Bu hemolitik faktörün yüksek ihtimalle fungal hücre yüzeyine bağlı bulunan bir mannoprotein olduğu düşünülmektedir (23).

Dimorfizm

Dimorfizm, mantarın maya ve hif formu arasında geçiş yapabilmesini tanımlamaktadır (25). Çevresel koşulların *C.albicans* morfolojisini belirlediği bilinmektedir. Maya ve gerçek hif enfeksiyon esnasında devamlı olarak gözlenmekte ve patojenitede rol oynamaktadır. Hif formunun invazyon ile, daha küçük olan maya formunun ise yayılım ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Pseudohif ve fenotipik dönüşümün in vivo ortamdaki rolü ise çok net değildir (25).

Fenotipik Değişim (“Phenotypic Switching”)

Fenotipik değişim, bir *Candida* suşunun farklı koloni morfoloju türleri arasında geriye dönüşlü geçiş yapabilme yeteneğidir (6). Ultraviyole ışınlarının varlığı gibi uygunsuz dış ortam koşullarında, mikroorganizmaların kendilerini korumak için koloni yüzeylerinde bulunan antijenlerini modifiye ettikleri ve bu durumun koloni morfolojisini değiştirdiği gösterilmiştir (26). Örneğin, *C.albicans* 3153A suşu ile yapılan çalışmalarda yedi farklı koloni morfolojisi tanımlanmış, bu koloni morfolojilerinin birbirlerine dönüşebildiği gibi, ortam şartları uygun hale geldiğinde en baştaki haline de dönebildiği gözlenmiştir (14, 26). En çok çalışılmış olan fenotipik değişim, beyaz/opak koloni geçişidir. Beyaz ve opak koloniler arasındaki geçişin, Hull ve ark. (27, 28) tarafından tanımlanmış olan MTL (“mating-like”) lokusu tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir. Farklı fenotipler arasında geçiş, in vivo ortamda immün sistemden kaçışa zemin sağlamaktadır (16). Bunun dışında, fenotipik değişimin biyofilm yapımıyla da ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Opak formlarda, α/α homozigot hücreler tarafından α feromonu üretildiği ve bu feromonun beyaz hücrelerde biyofilm üretimini uyardığı bildirilmiştir (16).

Biyofilm Oluşumu

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapıştıktan sonra kendi ürettikleri polisakkarit matriks içine gömülü halde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu yapıdır. Biyofilm oluşturabilen mikroorganizmalar, besin yoksunluğu, uygunsuz pH koşulları, oksijen radikalleri gibi toksik etkiye sahip bileşikler, klor gibi güçlü dezenfektanlar ve antibiyotiklere karşı planktonik (serbest haldeki) hücrelerden daha dirençlidir (29). Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar, vücuda yerleştirilen kalıcı tıbbi araçların (kateter, protez vb) kullanımının artması ve hastalarda daha çok invazif teknik kullanımı nedeniyle artış eğilimi göstermektedir (29).

Quorum Sensing

Yakın zamana kadar, iletişim yeteneğine sadece yüksek yapıli organizmaların sahip olduğu düşünölmekteydi. Basit yapıli canlıların sadece bölünmek ve üremek gibi daha sade yaşam tarzlarına sahip oldukları kanısı hakimdi. Ancak, bakterilerin asosyal ve izole varlıklar olduğu ve değışen ortam şartlarına topluluk olarak uyum sağlayamayacakları düşüncesi günümüzde geçerliliğini yitirmiştir (6, 30, 31). Yeterli sayıda mikroorganizma bir araya geldiklerinde birbirleriyle iletişim kurarak ortama birlikte uyum sağlayabilmektedir. Örneğın gram negatif bir deniz bakterisi olan *Vibrio fischeri*, ortamda az sayıda organizma mevcut olduğunda ışık üretmezken, çoğalarak belli bir nüfus yoğunluğaa ulaştığında tüm hücreler aynı anda ışık üretmeye başlamaktadır. Bu durum, bakteriler arasında haberleşme olduğuna dair ilk kanıtlardan biridir (31). Yeterli sayıdaki mikroorganizma topluluğunun ("quorum") birbiriyle iletişim kurarak ortak hareket etmesi ("quorum sensing") başka mikroorganizmalarda da gösterilmiştir (6, 31). Mikroorganizma yoğunluğuu belirli bir eşik değerin üzerine çıktığında, genlerin ekspresyonu ve hücrelerin aktivitesi değışmektedir (6). Mikroorganizmalar, metabolik aktivitelerini gerçekleştirirken küçük sinyal molekülleri de salgılamaktadırlar. Bu moleküller, yoğunluğun düşük olduğu durumlarda herhangi bir değışikliğe neden olmamakta, yüksek yoğunluklarda ise alarm işlevi görmektedir.

Biyofilm içinde yer alan mikroorganizmaların birbirleriyle sinyaller vasıtasıyla iletişim kurmaları biyofilm yapısı açısından temel bir rol oynamaktadır (32). Yoğunluk uygun olduğunda, yani mikroorganizma sayısı kritik değeri aştığında, yeterli besin sağlayamayacak olan yüzeydeki mikroorganizmaların biyofilmden ayrılması bu sayede olmaktadır (33).

Mantarlarda “quorum sensing” çalışmaları henüz yenidir (34). Farnesol, *Candida* türlerinde, “quorum sensing” çalışmaları sırasında keşfedilen önemli bir sinyal molekülüdür (35, 36). *C. albicans*'ta hücre yoğunluğuna göre hücrelerin maya veya hif formunda olması, farnesol molekülü tarafından belirlenmektedir (36, 37). Farnesolün yüksek konsantrasyonlarında (10-250 µM) hif oluşumu baskılanmaktadır. Farnesol, aynı zamanda mantar hücrelerini hidrojen peroksidin toksik etkisine karşı da korumaktadır (34). Böylelikle mantarın konak savunmasından kaçışına yardım etmektedir.

2.2 Biyofilmler

2.2.1 Tanım

Biyofilm, ekstraselüler matriks (ECM) içinde yüzeye ve birbirlerine tutunan bir mikroorganizma topluluğudur. Biyofilmler canlı dokular, kateterler ve vücuda yerleştirilen diğer tıbbi gereçler, endüstriyel su sistemleri ve doğal akuatik ortamlardaki yüzeyler gibi çok farklı yerlerde oluşabilirler. ECM, biyofilm içindeki mikroorganizmaların kendileri tarafından üretilir. Bu polimerik madde, esas olarak polisakkarit yapıdadır ve biyofilmin bulunduğu yere göre başka bileşenleri de (mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kan bileşenleri vb.) içerebilir. Biyofilm içindeki organizmalar, planktonik karşılıklarından farklı gen ekspresyonu ve fizyolojik-metabolik özellikler gösterirler (38).

2.2.2 Tarihçe

17. yy'da Antonie van Leeuwenhoek'ın mikroskobu keşfi bilim dünyasında pek çok buluşu beraberinde getirmiştir. Leuwenhoek kendi yaptığı

mikroskopta bir biyofilm örneği olan dişeti plaklarında yaptığı incelemelerde bakterileri gruplar halinde gözlemlemiştir (39).

Bu süreler boyunca çeşitli araştırmacılar tarafından biyofilm konusunun aydınlatılması için kıymetli çalışmalar yapılmıştır. Heukelekian ve Heller (40), tutunacak bir yüzeyin olması durumunda mikroorganizmaların serbest durumlarına göre çok daha hızlı bir biçimde çoğaldıklarını gözlemlemiştir. Zobell (41) deniz suyundaki bakterileri inceleyerek, bakterilerin su içindeki cam yüzeylere tutunduklarını ve tutunacak yüzey bulunmayan ortamlara göre buralarda daha hızlı çoğaldıklarını gözlemlemiştir. Biyofilmlerle ilgili detaylı çalışmalar elektron mikroskoplarının kullanıma girmesiyle hız kazanmıştır (38). Elektron mikroskoplarının kullanılmaya başlanmasıyla daha yüksek çözünürlükte ve daha yüksek büyütmeyle incelemeler yapmak olanaklı hale gelmiştir. Jones ve ark. (42) elektron mikroskopları sayesinde, bir atık su tesisindeki filtrelerin yüzeyinde farklı türden mikroorganizmalar bulunduğunu ve çevrelerindeki matriksin polisakkarit yapıda olduğunu göstermişlerdir. Biyofilm yapısının mikroorganizmayı konak savunmasından ve antimikrobialardan koruduğu da ortaya konmuştur (6). Biyofilm mikroorganizmalarının ve planktonik karşılıklarının metabolik aktivitelerini karşılaştıran bir çalışmada şu sonuçlara ulaşılmıştır (43, 44):

- Metabolik olarak aktif bakteri yüzeylere tutunmaya isteklidir ve bu eğilim doğada bulunan sokak suşlarında (“wild type”) daha belirgindir.
- Su içeren bir sistemde biyofilm oluşumu, hücrelerin bölünmesi ve ekzopolisakkarit yapımı için gerekli olan besin miktarı ile sınırlanır.

Besin eksikliği fazla ise, ortamdaki organik maddeler yüzeylere tutunarak lokal biyofilm gelişimine neden olabilir. Ancak, bakteriler genellikle çok fazla besin eksikliği olan ortamlarda yüzeylere tutunamamaktadır.

Aynı yıl Costerton ve ark.(43) mikroorganizmaların yüzeye nasıl tutunduklarını ve bu tutunmanın mikroorganizmaya ne gibi yararlar sağladığını araştırmışlar ve biyofilmleri “mikroorganizmaların canlı ve cansız yüzeye yapışmasını sağlayan polimerik matriks” olarak tanımlamışlardır.

Costerton ve ark.'nın biyofilm konusunda ilk temelleri atması beraberinde 'biyofilmin ne olduğu' konusundaki tanımların da gelişmesine ön ayak olmuştur. Bu konuda araştırmacılar çeşitli tanımlar yapmışlardır.

Zaman içerisinde biyofilm konusunda ortaya çıkan yeni gelişmeler, araştırmacıların daha önceden yaptıkları tanımlamaları geliştirmesine ya da tamamen değiştirmesine yol açmıştır. Elder ve ark.(45), biyofilmleri "ekzopolimer matriks aracılığıyla oluşan yapısal birlik" olarak tanımlamıştır. Carpentier ve Cerf (46) biyofilmler için "gömülü olarak bulunan yüzeye yapışmış, organik polimer matriks" demeyi uygun görmüşlerdir. Biyofilm teorisinin ilk kez ortaya atıldığı zamanlarda biyofilmin ne olduğu, biyofilm oluşturan mikroorganizmanın yapısal olarak hangi durumda olduğu ve bunların organizmaya ne avantajlar sağlayabileceği konuları da anlaşılmaya başlanmıştır. Güçlü elektron mikroskoplarının kullanıma girmesi ile yapılan ayrıntılı incelemeler sayesinde, biyofilmlerin yapısal detayları ve oluşum basamakları daha iyi incelenebilmiş ve biyofilm konusunun daha iyi anlaşılması sağlanmıştır (39).

2.2.3 Biyofilmlerin Yapısı

Biyofilmler, öncelikli olarak, mikrobiyal hücrelerden ve ECM'den oluşmaktadır. ECM, mikrobiyal biyofilmlerin toplam karbon içeriğinin %50 - 90'ını oluşturmaktadır ve temel bileşen polisakkaritlerdir (38). Farklı mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerin farklı kimyasal içerikleri ve yapısal özellikleri olmakla birlikte, bazı temel özelliklerin korunduğu bilinmektedir (38, 47).

Genel olarak biyofilmlerin genel özellikleri şu şekilde sıralanabilir (38):

- Hücreler yüzeye ve birbirlerine kuvvetli bir şekilde tutunmakta ve ekstraselüler matriks (ECM) içinde mikrokoloniler şeklinde bulunmaktadır.
- Hücrelerin oluşturduğu mikrokoloniler arasında besin alımını ve toksik maddelerin uzaklaştırılmasını sağlayan su kanalları bulunur.

Biyofilmi oluşturan mikroorganizmalar yüzeye ve birbirlerine tutunarak mikrokoloni katmanları meydana getirirler. Bu mikrokoloni katmanlarının

arasında besin alınımı ve atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan su kanalları mevcuttur. Mikrokanallar, biyofilmlerin temel ve fonksiyonel birimleridir (44). Moleküler genetik yaklaşımı konfokal lazer tarama mikroskopisi (CLSM) ile birleştiren çalışmalar biyofilm gelişimi ve davranışını daha iyi anlamamızı sağlamıştır (39). CLSM yöntemiyle biyofilm yapısı canlı ve tamamen hidrate iken incelemeler yapmak mümkün olmaktadır. Böylelikle bakteri biyofilmlerindeki mikrokolonilerin kubbe ya da mantar şapkasını anımsatan bir görüntüye sahip olduğu da anlaşılmıştır (48).

Biyofilm oluşumu sırasında, mikroorganizmaların ilk etapta kendilerine özel mikrokoloniler oluşturdukları, takiben mikrokoloniler arasında göçler gerçekleştiği gözlenmiştir. Mikrokolonideki hücreler arasındaki bağlar başlangıçta sıkı iken, zaman içerisinde gevşemekte ve mikrokoloniler arasında göç mümkün olmaktadır (38). Hem bakteri hem mantar biyofilmlerinde ortak olan yapılardan biri de mikrokoloniler arasındaki su kanallarıdır. Besin maddelerinin alınması, biyofilm içinde oksijen, su ve besin deviniminin sağlanması ve atık maddelerin uzaklaştırılması bu kanallar ile mümkün olmaktadır (38).

Biyofilm yapısının özelliklerinden biri de üç boyutlu olmasıdır. Biyofilm içinde yer alan her hücre yüzeye farklı uzaklıklarda konumlanmıştır. Bu sebepten dolayı dış ortamdan gelen maddeler de biyofilm içindeki hücrelere farklı düzeylerde nüfuz ederler. Biyofilm yapısı içsel faktörlerin yanında dış faktörlerden de etkilenmektedir. Örneğin, dış mineleri üzerindeki plak oluşumu sırasında biriken albümin, lizozim ve glikoprotein gibi maddeler de biyofilmin yapısına katılmaktadır (44). Üriner kateterlerde meydana gelen biyofilmlerde ise, *Proteus* spp. gibi üreaz aktivitesine sahip bakterilerin bulunması durumunda, artan amonyak seviyeleri idrar pH'sını yükseltmektedir. Alkali ortamda kristalize olarak çöken kalsiyum fosfat ve magnezyum amonyum fosfat mineralleri biyofilm yapısını zamanla sertleştirebilmekte, hatta kateteri tıkayabilmektedir (49).

Yapılan çalışmalar çoğunlukla bakteriyel biyofilmler üzerine odaklanmış ve fungal biyofilmler hakkındaki çalışmalar daha sınırlı kalmıştır. *Candida* biyofilmlerinin genel organizasyonu bakteriyel biyofilmlere benzerlik

göstermektedir. *Candida* biyofilmlerinde de mikroorganizmalar ECM içerisinde, buldukları yüzeye sıkıca tutunmaktadır. Fungal biyofilm yapısında maya hücreleri ve hif yapıları biyofilmin farklı katmanlarını oluşturacak şekilde organize olurlar. Maya formu veya hif oluşturamayan morfolojik mutantlarla biyofilm geliştirildiğinde, maya formlarının yüzeye yakın alt katmanlarda sıkı adezyonu sağlayacak şekilde ince bir tabaka oluşturduğu, hif formlarının ise bu tabakanın üzerinde daha kalın bir katman meydana getirerek yerleşim gösterdiği gözlenmiştir (50).

In vitro *C. albicans* biyofilmlerinin ECM bileşimi karbonhidratlar, protein, heksozamin, fosfor ve üronik asitten oluşmaktadır. Başlıca ekstraselüler karbonhidratlardan biri β -1,3 glukandır (51). Bu bileşenlerin yanı sıra, bakteriyel biyofilmlerde de olduğu gibi, ECM içerisinde ekstraselüler DNA da bulunmaktadır. Ekstraselüler DNA'nın olgun biyofilmlerin yapı ve sağlamlığına katkıda bulunduğu öne sürülmektedir (52).

2.2.4 Biyofilmlerin Oluşumu

Mikrobiyal biyofilmler, günlük hayatımızda yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Sanayi tesislerinde, arıtma borularının üzerinde meydana gelen ve dezenfektanlarla giderilemeyen kontaminasyonlar biyofilmle ilgili fark edilen önemli bir sorun olmuştur. İnsan vücudunda da biyofilm oluşumu görülebilmektedir. Dişlerde ve dişetinde meydana gelen ve ancak sürekli bakım ile sınırlanabilen plaklar günlük hayatta sıkça karşılaşılan problemlerden bir tanesidir. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar da sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Tüm hastane enfeksiyonlarının yarısından fazlası biyofilm temelli olarak ortaya çıkmaktadır (39, 53, 54). Enfeksiyonun ve antimikrobiyal tedavinin seyrini değiştiren bu yapılar morbidite ve mortalitede ciddi artışa sebep olurlar. Biyofilmlerin oluşum basamaklarının iyi bilinmesi, bu yapılarla oluşan enfeksiyon tablolarının tedavisinin başarı şansını gözle görülür olarak arttıracaktır.

Direkt mikroskopik incelemeye ek olarak kullanılan genetik ve moleküler teknikler, biyofilmlerin gelişim sürecini araştırmakta kullanılmaktadır. Biyofilm

ile ilgili yapılan ilk çalışmalar, biyofilmlerin karmaşık bir mikroorganizma topluluğunun oluşumu ile sonuçlanan iyi düzenlenmiş bir gelişim sürecine sahip olduğunu göstermiştir (55). Bakteriyel biyofilmlerin oluşum basamakları şu şekildedir (39, 55):

- 1) Yüzeyde tutunmayı kolaylaştıran hazırlayıcı film tabaka oluşumu (yüzeyin hazırlanması, “surface conditioning”),
- 2) Mikroorganizmaların yüzeye tutunması (adezyon),
- 3) Biyofilmin olgunlaşması,
- 4) Mikroorganizmanın biyofilmden koparak ayrılması.

Biyofilm oluşum süreci genel olarak bu aşamalardan oluşmaktadır. Ancak, mantarların oluşturduğu biyofilmlerde mantara ait farklı morfolojik formların bir arada bulunması nedeniyle süreç daha uzun ve yapı daha karmaşıktır.

2.2.5 Fungal Biyofilm Oluşumu

Hastane kaynaklı fungal enfeksiyonların büyük bir kısmında etken *Candida* türleridir. Özellikle yatan hastalarda kullanılan biyomateryaller ve tıbbi cihazlar sonucunda gelişen biyofilmler, tedavide bazı güçlükler nedeniyle olmaktadır. Yapılan araştırmalar fungal biyofilmlerin, planktonik hücrelere göre antimikrobiyal ilaçlara 1000 kata kadar daha dirençli olabildiklerini göstermiştir (56). İmmün supresyonun mantar enfeksiyonlarıyla yakın ilişkisinin bulunduğu göz önüne alındığında, oluşan bu güçlü direncin daha ağır klinik tablolar ve daha yüksek mortalite oranları anlamına geldiği kolayca anlaşılacaktır.

Hawser ve Douglas'ın (57) kateterden kestikleri küçük diskler üzerinde yaptıkları in vitro biyofilm çalışmaları, fungal biyofilmlerle ilgili önemli bilgiler sağlamıştır. Araştırmacılar bu yöntem ile *C.albicans*'ın lateks, polivinil klorür ve silikon gibi maddeler üzerinde biyofilm oluşturabildiğini ve bu yeteneğinin *albicans* dışı *Candida* türlerinden daha iyi düzeyde olduğunu göstermişlerdir. Ardından Baillie ve Douglas (50) hif formunun biyofilm gelişiminde önemli role sahip olduğunu göstermişlerdir. Yapılan bu çalışmalar, günümüzde yapılan *Candida* biyofilm çalışmalarına zemin hazırlamıştır. *Candida* biyofilmlerinin

gelişim aşamaları da bakteriyel biyofilmlere benzerdir ve şu şekilde basamaklanabilir (39):

- 1) Yüzeyde hazırlayıcı film tabaka oluşumu
- 2) Tutunma (adezyon)
- 3) Hifal oluşum ve olgunlaşma
- 4) Kopma ve ayrılma

Yüzeyde Hazırlayıcı Film Tabaka Oluşumu

Biyofilm gelişiminin ilk basamağını oluşturan hazırlayıcı film tabaka oluşumu aynı zamanda adezyon basamağının da temelidir.

Herhangi bir yüzeyin sıvı ile teması sonrasında film tabaka gelişimi dakikalar içinde başlamaktadır. İnsan vücudu söz konusu olduğunda, biriken maddeler anatomik bölgenin özelliğine göre farklılık göstermektedir (39). Örneğin, diş ve dişeti üzerinde plak oluşumu sırasında albümin, lizozim, glikoprotein gibi maddelerden oluşan bir birikim meydana gelmektedir (39).

Tıbbi cihazların vücuda implantasyonundan sonra ilk olarak vücut içerisindeki tükürük, kan, serum gibi çeşitli sekresyonların taşıdıkları kollajen, fibrinojen ve fibronektin gibi makromoleküller yüzey üzerinde birikmektedir (1, 39). Bu şekilde gereç üzerinde bir hazırlayıcı film oluşmaktadır. Mikroorganizmalar, çıplak gereçlerin yüzeyleri yerine bu tabaka üzerinde tutunmayı tercih etmektedirler.

Tutunma (Adezyon)

Doğal çevrede ve insan vücudunda bulunan yüzeylerde hazırlayıcı film tabaka oluşumunu takiben mikroorganizmaların adezyonu gerçekleşmektedir (39). Durgun sıvılarda mikroorganizmalar partikül gibi davranır ve tabana çökerler (38). Ancak, tutunma yalnızca pasif çökme ile sınırlı değildir ve reseptörlerle kemotaktik hareketleri de içeren sistemli bir olaydır (33, 39, 44). Adezyonun geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz olabileceği bilinmektedir (1, 39). Geri dönüşümlü adezyonda yüzeye zayıf bağlanma gerçekleşirken, geri dönüşümsüz adezyonda güçlü bağlanma görülmekte ve takiben biyofilm oluşumunun sonraki aşamaları meydana gelmektedir (33).

1) Primer Adezyon (Gevşek Adezyon)

Mikroorganizma ve hazırlayıcı film tabaka ile kaplı yüzeyin temasını gerektiren bu aşamada farklı fizikokimyasal değişkenler rol oynamaktadır. Sürüklenerek veya kendi hareketi ile yüzeye 1 nm gibi kritik bir uzaklığa kadar ulaşan mikroorganizma; hidrofobik ve elektrostatik ilişkiler, Van der Waals kuvvetleri, sıcaklık ve benzeri etkilerin sonucunda geri dönüşlü olarak yüzeye tutunur. Hidrofobik etkileşimin etkisinin diğerlerinden fazla olduğu düşünülmektedir (33).

2) Sekonder Adezyon (Sıkı Adezyon)

Bu aşama, yüzeye bağlanan egzopolisakkaritler ve/veya reseptöre özgü ligandlar aracılığıyla gerçekleşir. Mikroorganizma yüzeyin kendisine veya yüzeye tutunmuş diğer mikroorganizmalara tutunabilir. Bu aşamanın sonunda tutunma geri dönüşsüz hale gelmektedir (33).

Candida biyofilmleri için de benzer süreçler söz konusudur. Serbest *Candida*'nın adezyonu yüzey hazırlayıcı film oluşumunun ardından hidrofobik ve elektrostatik etkilerle gerçekleşmekte, sonrasında hücreler arası adezyonu gerçekleştiren özelleşmiş adezinler devreye girmektedir. Bu adezinler, sadece hücreler arası değil, hücre-yüzey tutunmasında da yer almaktadırlar (58, 59). Biyomateryale bağlı gelişen *Candida* biyofilmlerinde en önemli basamağın adezyon olduğu ve bu sürecin biyofilmin iskeletini oluşturduğu göz önünde bulundurulduğunda adezinlerin biyofilmler için önemli proteinler olduğu düşüncesi yanlış olmayacaktır.

Hifal Oluşum ve Olgunlaşma

Hifal Oluşum

Fungal biyofilm gelişiminde dimorfizmin ayrı bir rolü vardır. Maya ve hif formlarının biyofilm içindeki işlevleri farklı görünmektedir. Baillie ve Douglas (50), maya ve küf formunda bulunabilen sokak suşu, hif yapamayan mutant suş ve maya hücresi şeklinde bulunamayan mutant suşun yaptığı biyofilmleri incelemişlerdir. Sokak suşu biyofilminin ince bir maya hücresi tabakası ile yüzeye tutunduğu ve üzerinde kalın bir hif tabakası oluşturduğu görülmüştür. Hif yapamayan mutant ince bir tabaka ile yüzeye tutunabilmiş, biyofilm

kalınlaşmamıştır. Maya hücresi olmayan mutant ise kalın bir tabaka hif içeren biyofilm oluşturmuş ancak bu biyofilm yüzeyden kolayca ayrılmıştır.

Fungal biyofilm gelişimi sırasında filamentasyon ve hifal farklılaşma aşamaları için farklı genler rol almaktadır (58). Hifal oluşumun meydana gelmesiyle ECM içinde maya, yalancı hif ve gerçek hif ağını içeren oldukça karmaşık ve sağlam bir yapı ortaya çıkmaktadır. Mısır koçanını andıran, bakteriyel biyofilmlerde birden fazla türde bakterinin biyofilm yapısına katılmasıyla oluşan ve antimikrobiyal direnci 1000 kata kadar artırabilen bu yapı; *Candida* biyofilmlerinde tek bir türün oluşturduğu biyofilmin yapısıdır (56). Bu heterojenlik, yapıya kazandırdığı sağlamlığın yanında bunun oldukça yoğun bir form olmasını da sağlamaktadır. Heterojenliğin kazandırdığı yoğunluk, hücreler arasında daha fazla iletişim ve işbirliği anlamı taşımaktadır. Diğer bir taraftan biyofilm içindeki sesil mantar hücreleri antifungal tedavide ilk seçenek ilaçlardan olan azollere çok daha az duyarlı hale gelmektedir (56).

Olgunlaşma

C.albicans biyofilm yapısının olgunlaşması 38.–72. saatler arasında gerçekleşmektedir (60). Olgunlaşma ile biyofilmin üç boyutlu yapısı gelişmektedir (56). Bu süreçte biyofilm, blastosporlar ve yoğun psödohif - hif ağından oluşan heterojen bir yapıya sahiptir (60). Mayalar, hiflerin bağlanması için taban katmanını oluşturmaktadırlar (50). Bağlanan mayaların bölünüp çoğalması ve organik - inorganik maddelerin dış ortamlardan ECM yapısına katılması, biyofilm yapısının yoğunluğunun ve yapısal karışıklığın artmasını sağlamaktadır. Biyomateryal ve tıbbi cihaz ile ilişkili biyofilmlerde konak hücrenin salgıladığı enzim ve yapısal proteinler, fibrinojen ve fibronektin gibi maddeler, biyofilm yapısına katılarak yoğunluk artışına neden olmaktadır. Bu olaylar gerçekleşirken, diğer taraftan ECM miktarı da artmaktadır. ECM, konakçının enzimleri ve antifungal ilaçlar gibi dış etkilere karşı mantar hücrelerini koruyan bir kalkan görevi görmektedir. *C.albicans* ve *C.tropicalis* için bu yapı oldukça karmaşıktır. Bu türler için ECM yapısına katılan maddeler protein, heksozamin, fosfor, üronik asit ve karbonhidratlardır. *C. albicans* biyofilmlerinde bu yapıya DNaz da katılmaktadır (61). ECM yapısında bulunan

karbonhidratların bir tanesi beta-1,3-glukandır. Beta-1,3-glukan, hücre duvar yapısında da bulunmakta ve adezyon aşamasında işlev görmektedir (61).

Biyofilmlerin üç boyutlu yapısı incelendiğinde, mikroorganizmaların homojen olarak dağılmadığı ve kanallar ile ayrılmış mikrokoloniler olarak yerleştikleri gözlenmektedir (33, 44). Mikrokanallar biyofilm yapısının içindeki besin ve oksijen devinimini de sağlamaktadır (33, 38).

Kopma ve Ayrılma

Biyofilmin büyüme potansiyeli besin miktarına, besinin iç kısımlara perfüzyonuna ve toksik maddelerin uzaklaştırılabilmesine bağlıdır. Hücre yoğunluğu, ECM yapısı ve ECM içerisindeki maddeler belirli bir seviyeye ulaştığı zaman, biyofilm yapısı da belli bir doygunluğa ulaşmış demektir (33, 38). Biyofilm içindeki hücreler, “quorum sensing” molekülleri sayesinde birbirleri ile iletişim kurmakta ve biyofilimde hücre yoğunluğu arttığında hücrelerin bir kısmı biyofilmden ayrılmaktadır.

Mikroorganizma, biyofilmin içinde hayatına devam etme veya biyofilmden ayrılma kararını vermek için çevredeki diğer mikroorganizmalarla iletişim kurar. Buna “quorum sensing” adı verilmektedir. *C. albicans*'a bağlı enfeksiyon hastalıklarında maya ve filamentöz form arasındaki geçiş önemli virülans faktörüdür. Bu geçiş, hücre yoğunluğundan etkilenmektedir. Durağan fazdaki *C. albicans* kültür süspansiyonlarında, hücre yoğunluğu artışını takiben hifal form baskılanmaktadır (34). Biyofilm içindeki hücre yoğunluğu doyuma ulaştıktan sonra, bazı hücreler yapıyı terk ederek planktonik faza geçmekte ve başka yüzeylerde kolonize olmaktadır. Kopma ve ayrılma basamağı aktif bir süreçtir. Biyofilmi oluşturan mikroorganizmalar belli bir nüfus yoğunluğuna ulaştıklarında morfolojiyi belirleyen genlerin ekspresyon paternleri değişmektedir (34).

2.2.6 Biyofilm Gelişiminin Genetik Kontrolü

Biyofilm gelişiminde mikroorganizmanın adezyonu için bazı genlerin aktive olması gerekmektedir. *Candida* türleri için aglutinin benzeri bir dizi gen (*ALS* genleri) ve hifal duvar proteini olan Hwp1 bu aşamada önemli role

sahiptir. Bu proteinlerin etkileşimi ile meydana gelen hifal uzantılar arasındaki çapraz bağlanma biyofilm yapısının stabilizasyonu açısından önemlidir (62). *ALS* genlerinin biyofilm oluşumunda önemli olduğu gösterilmiştir (17, 59). Adezyonda öncelikli olarak rol alan Als proteini, tip 3'tür (17). Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda Als2'de meydana gelen azalmanın biyofilm kütlelerinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (59).

Bcr ve *Tec* olarak isimlendirilen iki gen ailesindeki genlerin de gen regülasyonunda rol aldığı saptanmıştır. *Tec1* hif gelişimini uyarmakta ve *Bcr1* düzenlemektedir. *Bcr1* ise *als1*, *als3* ve *hwp1*'in kontrol edilmesinde etkindir (58, 62). Fungal biyofilm oluşumunda ikinci aşama hifal gelişimdir. Hif oluşumu biyofilm gelişimi ve yapının sağlamlığı açısından önemli bir faktördür. Yapılan çalışmalar hif gelişimi için *Efg1*'in önemli rolü olduğunu göstermektedir. *Efg1* hifal uzama ve filamentasyon açısından önemli bir gendir (58). Yapılan çalışmalar *SUV3*, *NUP85*, *MDS3*, *KEM1* genlerinin de hifal farklılaşma ve biyofilm gelişiminde rol aldığını göstermektedir (63). Olgunlaşma süreci hücreler arası iletişimin maksimuma ulaştığı basamaktır. Hücreler arasındaki bu iletişim "quorum sensing" molekülleriyle düzenlenmektedir. Farnesol, iletişim için kullanılan önemli bir faktördür ve biyofilm oluşumunda ve hif gelişiminde rol oynamaktadır. Histidin kinaz *Chk1*'in farnesol sinyal mekanizmasının bir parçası olabileceği düşünülmektedir (58). *C.albicans*'ın *Chk1* histidin kinaz defektif suşlarının, ortamda farnesol bulunmamasına rağmen biyofilm oluşturabildikleri gösterilmiştir (64).

2.2.7 Biyofilm Enfeksiyonları

Mikroorganizmalar düşünülenin aksine doğada planktonik hücreler olarak değil, biyofilm oluşturarak yaşamlarını sürdürme eğilimindedirler (53, 65). Varlıklarını sürdürebilmelerinin temelinde de bu stratejileri yer almaktadır. Bunun aksine, mikrobiyoloji çalışmalarının büyük kısmı serbest yaşayan mikroorganizmalarla yapılmıştır.

Biyofilmi oluşturan mikroorganizmalar, biyotik ve abiyotik yüzeylere yerleştikleri zaman kendilerini olumsuz çevre koşullarından ve konak immün sisteminden soyutlayabilmektedir. Bu başarılı kaçış, biyofilm içindeki

hücrelerin reseptörleri, salgıladıkları enzimler ve gen regülasyonları sayesinde gerçekleşmektedir (53). Bu korunaklı yapılar kendi yaşamlarının devamlılığını ve birtakım yapısal düzenlemeleri sağlarken, sahip oldukları patojenik mekanizmalar ile enfeksiyonlara da neden olmaktadır.

Biyofilmlerin genel özellikleri şu şekilde sıralanabilir (53):

1) Biyofilmler çoğunlukla durağan yüzeylerde veya ölü dokuda gelişmekle birlikte, endokarditlerde gözleendiği gibi canlı dokularda da yerleşebilmektedirler.

2) Biyofilmler yavaş gelişirler. Biyofilm enfeksiyonlarında da semptomların ortaya çıkması zaman alabilir.

3) Biyofilm içerisindeki hücreler, antijen salınımına neden olmakla birlikte antikor etkisinden korunurlar. Bu nedenle, konakta biyofilmlere komşu dokularda immün komplekslere bağlı hasara yol açabilirler. Bağışıklık sistemi çok iyi durumda olan konakta bile, biyofilm enfeksiyonu tek başına bağışıklık sistemi ile yok edilememektedir.

4) Antimikrobiyal tedavi biyofilmden yeni ayrılmış planktonik hücreler üzerinde etkili olmasına rağmen, biyofilmi ortadan kaldıramamaktadır. Bu nedenle, tipik bir biyofilm enfeksiyonunda semptomlar antimikrobiyal tedavi sırasında azalmakta/yok olmakta ancak, tedavi kesildiğinde tekrarlamaktadır.

5) Planktonik hücreler biyofilmlerden salınmaktadır ve biyofilmden kopma işleminin doğal olarak programlanmış bir olay olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, biyofilmlerden salınan planktonik hücreler, konak savunma mekanizmalarının yeterli olmadığı durumlarda akut enfeksiyon gelişimine neden olabilmektedir.

Doğadaki pek çok mantar türünden 600 kadarı insan patojeni olarak bildirilmiştir (25, 66). Bakteriyel enfeksiyonlar ile kıyaslandığında tanının genellikle gecikmesi, antifungal ilaçların daha pahalı olması ve antifungal tedavinin daha uzun sürmesi fungal enfeksiyonların maliyetini artırmaktadır. Ayrıca tedavi başarısı da daha düşük olmaktadır (1, 2, 67). *Candida*, sık rastlanan fungal patojenler arasındadır ve hayatı tehdit eden sistemik enfeksiyonlara neden olabilmektedir. *Candida* türleri, hastane enfeksiyonu etkenleri arasında ilk sıralarda yerini almaktadır (25, 68-70). *Candida* türleri

hastanede kan akımı enfeksiyonlarında, pnömonilerde ve idrar yolları enfeksiyonlarında sıklıkla izole edilmektedir (69, 71). Bu enfeksiyonlar çoğunlukla kateterler ve benzeri invazif tıbbi gereçlerle ilişkilidir (2, 6, 68, 69, 72). Santral venöz kateterler, *Candida*'ya bağlı kan akımı enfeksiyonlarında en sık görülen risk faktörü olarak bilinmektedir (71). Enfeksiyon, kateter vücuda yerleştirildikten sonra herhangi bir anda gelişebilse de, özellikle uzamış kateterizasyon sonrasında gözlenmektedir. Enfeksiyon, infüzyon sıvısının kendisindeki ya da kateter ucundaki kontaminasyondan kaynaklanabildiği gibi hastanın cilt florası ve hasta bakıcı ve hemşirelerin ellerinden de vücuda girebilmektedir. Bazı durumlarda, özellikle sitotoksik tedavi alan kanserli hastalarda, gastrointestinal sistemde kolonizan olan *Candida* türleri kan yoluyla yayılarak endojen enfeksiyonlara neden olabilmektedir (6, 68, 71).

Fungal biyofilm enfeksiyonlarında, biyofilm içinde tek bir mantar türü olabildiği gibi, bakteriler de birlikte bulunabilmektedir (53, 68, 71, 73). Örneğin, oral mukozada bulunan *Candida* türleri diş protezlerinin akrilik yüzeylerinde biyofilm oluşturabilirler. Bu biyofilmler, fungal hücrelerin yanında streptokoklar başta olmak üzere çeşitli bakteri türlerini de içeren biyofilmlerdir (71, 73). Larengektomili hastalara yerleştirilen silikon vokal protezlerde de *Candida* türlerini barındıran polimikrobiyal biyofilmler görülebilir. Bu durumda protezin kapak mekanizması işlevini yitirmekte ve protez aylar içinde çalışmaz hale gelmektedir (71).

Biyofilm oluşturma yeteneği, enfeksiyon oluşturma yeteneği ile yakından ilişkilidir ve virülansta belirleyici rol oynamaktadır (6, 65). Biyofilmin antifungallere ve konak savunmasına direnç sağlaması patogenezi ve prognozu etkilemektedir. Bu nedenle, in vivo ortamda mikroorganizmaların biyofilm yapma yeteneklerinin araştırılması, biyofilm gelişiminin önlenmesi ve gelişen biyofilmlere ilaç etkisinin saptanması ile ilgili çalışmalar artış göstermiştir (65).

2.2.8 Biyofilm Varlığını Saptama Yöntemleri

Biyofilm varlığı, doğrudan gözlem yoluyla veya dolaylı olarak tutunabilen canlı hücreleri belirleyen yöntemlerle belirlenebilmektedir. Yöntem, araştırılmak istenen özelliğe göre seçilmektedir (68). Direkt inceleme yöntemlerinde, biyofilm yapıları oluştukları yüzey/besiyeri üzerinde göz ile değerlendirilmekte veya çeşitli mikroskopi teknikleriyle incelenmektedir. İndirekt saptama yöntemlerinde ise, biyofilm oluşumu sonrasında planktonik hücreler uzaklaştırılmakta ve takiben biyofilm içindeki hücreler dışarı çıkartılarak kültürde üretilmekte veya metabolik bir substratın kullanım düzeyi ölçülerek canlı hücre varlığı gösterilmektedir (74, 75). Özel bir besiyeri olan Kongo kırmızısı agarda üreyen kolonilerin özelliklerine göre biyofilm yeteneğini belirlemeye çalışan yöntemler de bulunmaktadır (76). Kullanılan yöntemler, biyofilm varlığının yanı sıra yapısının, olgunlaşma aşamasının veya antimikrobilyallere direnç durumunun belirlenmesinde de kullanılabilir. Biyofilm araştırmaları için öncelikle bir yüzey üzerinde biyofilm oluşturulmaktadır. Bunun için kateter gibi tıbbi gereçlerde kullanılan malzemelerden küçük diskler kesilerek veya filtre, cam tüp, plastik tüp, mikroplak vb kullanılarak uygun yüzeylerde biyofilm oluşturulabilmektedir (50, 57, 77). Oluşan biyofilm yapısı, mikroskopi, kuru ağırlık ölçümü, biyofilm boyaları veya canlı hücreler için metabolik substrat olan 2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilit (XTT) gibi maddeler ile araştırılabilmektedir.

Mikroskopi

Uygun yüzey üzerinde hazırlanmış farklı oluşum aşamalarındaki biyofilm, gerektiğinde özel hazırlama işlemleri sonrasında, uygun mikroskop altında incelenebilmektedir. *Candida* biyofilmlerinin ayrıntılı yapısını incelemek için ilk etapta tarayıcı elektron mikroskopları ("scanning electron microscope") kullanılmıştır (57, 68, 71). Bu yöntem yüksek çözünürlükte görüntü sağlayabilmesine karşın, dehidrate örneklerle çalışmayı gerektirmektedir. Bu nedenle biyofilm yapısında deformasyonlar meydana gelebilmektedir. CLSM

ise, canlı ve hidrate örneklerin incelenebilmesi nedeniyle yapıyı inceleyen çalışmalar için belirgin bir avantaj sağlamıştır (68, 71).

CLSM ile, bakteri biyofilmlerinde bulunan mikrokolonilerin kule ya da mantar şapkasını anımsatan görüntüsü incelenebilmiştir (71). Bu mikrokoloniler biyofilm yapısı içindeki besin iletimini sağlayan su kanalları ile ayrılmaktadır (48, 68, 71). Mantar biyofilmleri CLSM tekniği ile incelendiğinde, *C.albicans* ve *C.dublinsiensis* biyofilmlerinin su kanallarıyla çevrili mikrokolonilerden oluşan benzer yapılara sahip olduğu gözlenmiştir (58, 60, 78).

Makroskopik İnceleme

Biyofilm oluşumunun saptanması çalışmalarında Kongo kırmızısı agar yöntemi sıklıkla kullanılan, görsel sonuçlara dayalı bir yöntemdir. İlk olarak Freeman ve ark. tarafından 1989 yılında stafilokoklar üzerinde biyofilm üretiminin araştırılmasında kullanılan bu yöntem, daha sonraları modifiye edilerek fungal biyofilm araştırmalarında da kullanılmaya başlanmıştır (76, 79). Üreyen koloninin rengine göre biyofilmin durumuna karar verilmektedir. Üreyen koloninin siyah ve bordo olarak gözlenmesi bu mikroorganizmanın biyofilm oluşturduğuna, koloni renginin beyaz, pembe ve kırmızı olarak gözlenmesi ise oluşturmadığına işaret etmektedir. Kongo kırmızısı agar yönteminin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, renk değişiminin inkübasyonun son aşamalarında ortaya çıkması nedeniyle, sekonder bir metabolitle ilişkili olabileceği düşünülmüştür (76).

Dolaylı Yöntemler

Biyofilm oluşumu sonrası planktonik hücreler uzaklaştırıldığında farklı yöntemlerle biyofilm varlığı ve miktarı tespit edilebilmektedir. Biyofilm yapısı parçalanarak içindeki canlı mikroorganizmaların çıkarılması ve kültürde üretilmesi mümkündür. Bunun dışında biyofilmin kuru ağırlığının ölçümü, [³H]-lösin kullanımının ölçümü, biyofilmde tutulan bir boyanın (kristal viyole gibi) miktarının spektrofotometrik ölçümü, biyofilm içindeki canlı hücrelerin kullandığı bir substratın azalmasının ölçümü yapılabilmektedir. Sonuncuya

örnek olarak 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromürün (MTT) veya XTT'nin indirgenmesiyle biyofilmdeki canlı hücreleri belirleyen yöntemler verilebilir (74, 77, 80-85).

Sonuçların yorumlanabilmesi için testin standardizasyonu da önem taşımaktadır. XTT tek başına kullanıldığı zaman formazana indirgenmemekte, menadion gibi çözeltilerle kullanılması gerekmektedir. Ayrıca kullanılan menadionun yoğunluğunun da uygun olması gereklidir; 0,2 mM'dan daha yoğun kullanılan menadion, turuncu yerine sarı renk gözlenmesine yol açmaktadır (81).

XTT yöntemiyle antifungal duyarlılık da test edilebilmektedir (74, 77, 81).

2.2.9 *Candida* Biyofilmleri ve Antifungal Direnç

Biyofilm yapısı olumsuz çevre koşulları, konak immün sisteminden kaçış ve antimikrobiyal direnci açısından mikroorganizmaya çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Biyofilm oluşturan hücreler, planktonik hücrelere göre daha inatçı klinik tablolar meydana getirmekte, antimikrobiyal direnç 1000 kata kadar artabilmektedir (6, 56). Yapılan çalışmalar, fungal biyofilmlerin de antifungal ilaçlara daha dirençli olduğunu göstermektedir (60, 65, 82, 86).

Candida biyofilmlerinde antifungal ilaçlara duyarlılığın azaldığı bilinmektedir. *Candida* hücrelerinin biyofilm oluşturan formlarının planktonik hücre formlarına göre amfoterisin B, flukonazol, itrakonazol, nistatin gibi antifungal ilaçlara ve klorheksidin gibi dezenfektanlara daha dirençli oldukları gözlenmiştir (65, 82, 86). *C.albicans* ve *C.parapsilosis* biyofilmlerinin amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol, ravukonazol, nistatin, terbinafin ve klorheksidine dirençli iken, amfoterisin B'nin lipid içeren formülleri ile ekinokandin grubunda yer alan kaspofungin ve mikafungine duyarlı oldukları bildirilmiştir (83). *Candida* biyofilmlerinin antifungallere neden daha dirençli olduğu konusu net olmasa da, bu konu ile ilgili çeşitli hipotezler mevcuttur. Bu olası direnç nedenleri antifungal ilaçların ECM'ye iyi penetre olamaması, biyofilm içindeki hücrelerin yavaş üremesi, inatçı hücrelerin varlığı ve biyofilmi oluşturan hücrelerde yüzeye tutunma sonrası farklı genlerin ön plana çıkması

olarak sıralanabilir (56, 87). Direnç, genellikle bu mekanizmalardan sadece biri ile ortaya çıkmamaktadır ve çoğu durumda mekanizmalar iç içe geçmiştir.

1) ECM'nin, bakteriyel biyofilmler için fiziksel bir bariyer gibi rol oynayarak antibakteriyel penetrasyonunu engellediği ve ilaç direncine neden olduğu bilinmektedir (53, 56). *Candida* biyofilmlerinde de ECM'nin uzaklaştırılması direncin azalmasına neden olmakla birlikte, ECM'nin dirence neden olan tek etken olmadığı gözlenmiştir (56).

2) Biyofilmde gözlenen antifungal direnç ile ilgili öne sürülen bir diğer hipotez ise biyofilm içindeki hücrelerin üreme hızlarının azalmasıdır. Genel olarak, antimikrobiyal ajanların hızlı çoğalan hücrelere daha etkili oldukları ve biyofilm içindeki hücrelerin üreme hızlarının düştüğü bilinmektedir (87). Ancak, Chandra ve ark. (60), biyofilmde gelişen antifungal direncin yalnızca biyofilm içindeki hücrelerin metabolik aktivitesinin azalmasından kaynaklanmadığını, direnç düzeyinin biyofilmin olgunlaşması ile de artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

3) Antifungal tedavi başarısızlığına neden olan ve özellikle kronik enfeksiyonlarda önem kazanan bir diğer mekanizma da inatçı hücrelerdir. İnatçı hücreler, antimikrobiyal varlığında eradike olmayan ve üreme hızlarını yavaşlatarak hayatta kalan hücrelerdir (61, 87). Yapılan çalışmalar inatçı hücrelerin planktonik hücre formlarında gözlenmeyip sadece biyofilm içinde bulunduğunu göstermektedir. İnatçı hücreler fenotipik varyantlar olup mutasyon göstermemektedirler (61). *C. albicans*, *C. krusei* ve *C. parapsilosis* biyofilmlerinde maya hücrelerinin küçük bir kısmının amfoterisin B'ye yüksek düzeyde dirençli olduğu bildirilmiştir (61, 88, 89). Antifungal tedavi sırasında inatçı hücrelerin seçilerek hayatta kalması rekürren enfeksiyonlara neden olabilmektedir (90).

4) Direnç gelişimi için biyofilm yapısının olgunlaşması şart değildir ve tutunma aşamasında bile direnç tetiklenmektedir (89). Yüzeye tutunma, antifungal direnç durumunu etkileyen genlerin ekspresyonunu değiştirmektedir. Bunlar arasında hücre zarındaki sterol çeşidi ve miktarını düzenleyen genler, hücre duvarında ve ECM'de bulunan glukoz miktarını düzenleyen genler ve atım pompası genleri sayılabilir. Biyofilmdeki inatçı

hücrelerde *ERG1*, *ERG25*, *SKN1* ve *KRE1* genlerinin düzenlenmesinde değişiklik gözlenmiş, hücre zarı ve hücre duvarının içeriğinde değişiklikler olabileceği belirtilmiştir (88). Kuhn ve ark. (83), *C.albicans* ve *C.parapsilosis* biyofilmlerinin ekinokandin grubunda yer alan kaspofungin ve mikafungine duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Ekinokandin grubu antifungaller *Candida* hücre duvarında önemli yere sahip olan β -1,3-glukanın sentezini inhibe etmektedir (6, 83). Bu polisakkaridin aynı zamanda biyofilm matriksi içinde de yer aldığı bilinmektedir (61, 83). Yüzeyle temasla aktive olan Mkc1 (“mitogen activated protein kinase”) proteini hif oluşumu ve biyofilmin oluşabilmesi için gerekli görünmektedir. *Mkc1* mutantlarında zayıf bir biyofilm gelişebilse de, biyofilm flukonazole direnç gösterememektedir (58, 91).

Antifungal dirençte atım pompalarının da rolü olabilmektedir. *Candida* türlerinde CDR ve MDR genlerince kodlanan ABC (“ATP-binding cassette”) ve MFS (“Major facilitator superfamily”) taşıyıcılarının antifungal direncinde rol oynadığı bilinmektedir (61). Biyofilm gelişimi sırasında bu genlerin ekspresyonunda artış olmaktadır (61, 68). Mateus ve ark. (92), yaptıkları çalışmalarda *Cdr1* ve *Mdr1* atım pompası genlerindeki mutasyonların biyofilmin flukonazole duyarlılığını arttırdığını belirtmişlerdir. Mukherjee ve ark. (93) ise, bu iki genin erken fazda içindeki hücrelerde planktonik hücrelere göre daha fazla eksprese olduklarını bildirmişlerdir. Bu genlerin birinde ya da ikisinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda biyofilmin antifungal ilaçlara direncinde azalma olmakla birlikte direnç devam etmektedir. Bu durum, biyofilimde gözlenen antifungal direncin birden fazla mekanizmadan kaynaklandığı hipotezi ile uyumludur (61, 68, 92).

Candida biyofilminde görülen direnç mekanizmaları biyofilmin fazına göre değişmektedir. Azol direncinde erken fazda atım pompaları ön planda iken, geç fazda sterol içeriğindeki değişiklikler önem kazanmaktadır. (56, 58, 93). Biyofilmin olgunlaşma sürecinde değişen membran sterol kompozisyonunun amfoterisin B ve azollere olan duyarlılığı etkilediği belirtilmektedir (58, 93).

Biyofilm Varlığında Antifungal Direncin Saptanması

Antimikrobiyal direnç, ilacın mikroorganizmaya etki etmemesi durumudur. Direnç kavramı, farklı durumları tanımlamak için kullanılabilir. Primer direnç, bir mikroorganizmanın ilaç ile hiç karşılaşmamış olsa bile direnç göstermesidir. Sekonder veya kazanılmış direnç, mikroorganizmanın ilaç ile karşılaştıktan sonra antifungale karşı direnç geliştirmesidir. Doğal veya intrinsik dirençte, bir mikroorganizma, belirli bir antifungal ilaç ile daha önce karşılaşmamış olsa da dirençlidir. Örneğin, *C.krusei* flukonazole doğal dirençlidir. Klinik direnç ise, hastanın uygun dozda ilaç tedavisi almasına karşın hastada iyileşme görülmemesidir (94). İmmün yetmezlik, tıbbi cihaz ya da biyomateryal varlığı gibi durumlarda, in vitro olarak etkin olduğu belirlenen antifungalın tedavide yeterli olmaması mantar enfeksiyonlarında sık karşılaşılan bir durumdur.

Mantarlarda antifungal duyarlılık durumunun saptanması için standartların geliştirilmesi dinamik bir süreç olup halen devam etmektedir. Dünyada kabul gören test yöntemleri "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) ve "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) tarafından geliştirilen standart yöntemlerdir ve iki merkez arasında testlerin uyumluluk kazanabilmesi için çalışmalar devam etmektedir. *Candida* türlerinde antifungal MİK değerlerinin belirlenmesi için CLSI M27-A3 veya EUCAST önerilerine uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi kullanılmaktadır (95, 96). Bununla beraber, biyofilm varlığında antifungal MİK değerleri XTT mikropak yöntemiyle belirlenebilmektedir (74).

2.2.10 Biyofilm Enfeksiyonlarının Tedavisi ve Önleme Stratejileri

Standart antimikrobiyal tedavi uygulamaları biyofilm enfeksiyonları için yetersiz kalmaktadır. Planktonik hücrelere etkili olan antimikrobiyal konsantrasyonu 1000 kat artırıldığında bile biyofilm içerisindeki hücrelerin bir kısmı hayatta kalabilmektedir (56). Bu durum, biyofilm enfeksiyonlarında tedavi başarısını azaltmakta, tedavi süresini ve maliyetini artırmakta ve özellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde, tedavi dozunun yükseltilmesi ile toksik etkiler ortaya çıkabilmektedir. Tıbbi cihazlarla ilişkili biyofilm

enfeksiyonlarında ilk tercih biyomateryalin vücuttan uzaklaştırılmasıdır. Biyomateryal vücuttan uzaklaştırılmadığı sürece tedavi genellikle etkisiz kalmaktadır. Tablo bir süreliğine gerilese bile rekürrensler meydana gelmektedir. Biyomateryal uzaklaştırıldıktan sonra iyileşme gözlenebilmekte, duruma göre antifungal tedavi kesilebilmekte veya tedaviye bir süre daha devam edilebilmektedir. Ancak, pratikte biyomateryalin uzaklaştırılması her zaman mümkün olmamaktadır. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar için damar kateterleri ve idrar sondası gibi biyomateryallerin kullanımı çoğunlukla zorunlu olmakta, çıkarılmaları veya değiştirilmeleri hastaların genel durumları itibariyle sıkıntılı olabilmektedir. Bu nedenle biyofilm oluşumunun önlenmesi çalışmaları da büyük önem teşkil etmektedir. Kateter ile ilişkili üriner sistem enfeksiyonlarının patogeneğinde biyomateryalin yapısı ve kolonizasyona duyarlılığı büyük rol oynamaktadır. Biyomateryalde biyofilm oluşumunu engellemek için biyomateryalin yapımında kullanılan malzemelerin yüzey kolonizasyonunu önleyecek şekilde değiştirilmesi umut verici bir çalışma alanıdır (97).

Bu amaçla antibiyotik emdirilmiş, gümüş, heparin veya antiseptik içeren veya hidrofilik kaplaması olan materyaller kullanılabilmektedir. Antibiyotik emdirilmiş üriner kateterler, kateterizasyonun ilk haftasında asemptomatik bakteriüriyi azaltabilmektedir (97, 98). Ancak, mantarlara yönelik çalışma bulunmamaktadır. Benzer şekilde, gümüş alaşımlı kaplamaların da, bir haftadan daha kısa süreli kateterizasyonlarda kolonizasyon ve enfeksiyon insidansını azaltabileceği bildirilmiştir. Daha uzun süreli kateterizasyonlarda etki azalmaktadır (97, 98). Gümüş oksit içeren kateterler artık kullanılmamaktadır (98). Hidrofilik kaplama ve heparin mikroorganizmaların ve diğer organik maddelerin tutunmasını önlemeyi amaçlamakla birlikte etkinliklerinin yetersiz olabileceği bildirilmiştir (97, 99) (100).

Gentin ve triklosan gibi antiseptikleri içeren kateterlerle de bakteri adezyonunun azaldığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (97, 100).

Biyofilmin engellenmesi için fiziksel yöntemler de kullanılabilmektedir. Düşük enerjili yüzeyel ses dalgaları yayan sistemlerin tutunmayı önlediğini

bildiren çalışmalar bulunmaktadır (97). Ancak mekanik yöntemler daha çok oluşan biyofilmlerin yüzeyden uzaklaştırılması için kullanılmaktadır (101).

Biyofilm oluşumunda önemli rol oynayan sinyal yollarının ve genetik süreçlerinin inhibisyonun da biyomateryaller üzerindeki biyofilm gelişimini engelleyerek etkili olabileceği düşünülmektedir. Adezyon aşamasından sorumlu olan *ALS* genlerinde meydana gelen mutasyonlar biyofilm gelişimini engelleyebilmektedir (59). Ancak bunlar klinik kullanımı olan yöntemler değildir.

Kateteri vücuda yerleştirirken temel antisepsi kurallarına uyulması, el hijyeninin sağlanması, kullanılan eldiven ve tamponların steril olması, kateter giriş yerinin antiseptikle temizlenmesi, kalıcı kateterlerin rutin bakımına dikkat edilmesi gibi korunma önlemleri enfeksiyonu önlemek açısından önem taşımaktadır.

2.2.11 Üriner Sistem Enfeksiyonlarında Biyofilmlerin ve Kateterizasyonun Rolü

Üriner kateterler, hastanelerde ve hastane dışında yaygın olarak kullanılan tıbbi araçlardır. Hastanede kalan hastaların %15 - 25'inde hastanede kaldıkları süre içinde en az bir kez üriner kateter kullanılmaktadır (5).

Üriner sistem enfeksiyonları en sık görülen hastane enfeksiyonlarıdır ve çoğunluğu üriner kateter kullanımına bağlıdır (5, 102, 103). Yedi günden uzun süreli kateterize olan hastaların %25'inde bakteriüri veya kandidüri gelişmektedir (103). Üriner kateterin yerleştirilmesinden en az iki gün sonra (yerleştirme işleminin yapıldığı gün dahil), ya da üriner kateterin çıkartılmasını takiben en fazla iki gün sonra (kateterin çıkartıldığı gün dahil) ortaya çıkan üriner sistem enfeksiyonları "kateter ilişkili üriner sistem enfeksiyonu" olarak tanımlanmaktadır (104).

Üriner kateterler yapısal ve yüzeyel koşulları bakımından biyofilm gelişimine hazır ortamlardır. Kullanım süresi arttıkça mikrobiyal kolonizasyon ve sonrasında enfeksiyon gelişimi riski artmaktadır (4, 6, 103). Üretradan mesaneye yerleştirilen bu kateterler kısa zamanda üretra ve gastrointestinal

kanalda bulunan mikroorganizmalar ile kolonize olmaktadır. Buna ek olarak, kateter mesaneye yerleştirilirken mukoza üzerinde mekanik hasar oluşumu da kolonizasyonu teşvik etmektedir (4, 103).

Üriner kateterizasyon süresi ≤ 30 gün ise kısa süreli, 30 günden fazla ise uzun süreli kateterizasyon olarak tanımlanmaktadır (5, 102). Kapalı üriner kateter sistemlerinde 30. günden sonra tüm hastalarda bakteriüri görülmektedir (5, 103).

Vücuda yerleştirilen yabancı maddelerin, hastalarda enfeksiyonlara yatkınlığa neden oldukları bilinmektedir (4). Yabancı cisim vücuda yerleştirildikten kısa bir süre sonra, yerleştirildiği anatomik bölgeye göre kan, tükürük, idrar, mukus gibi vücut sıvılarıyla karşılaşmaktadır (4). Üriner kanalda da Tamm - Horsfall glikoproteini, çeşitli iyonlar, polisakkaritler ve diğer maddeler dakikalar içinde materyalin üzerinde birikir ve hazırlayıcı filmi oluştururlar (4).

Üriner kateter varlığının üriner *Candida* enfeksiyonu için risk faktörü olduğu bilinmektedir (6). Çocuk yoğun bakım birimlerinde gelişen enfeksiyonları araştıran bir çalışmada, idrar yolu enfeksiyonlarının %21'inde *Candida* türlerinin etken olduğu bildirilmiştir (3). İdrarda *Candida* saptanması kolonizasyon, sistit, kateter enfeksiyonu veya hematojen enfeksiyon şeklinde değerlendirilebilmektedir. Bakteriyel idrar yolu enfeksiyonlarının tanısında idrar kültüründe 10^{4-5} CFU/ml bakteri üremesi anlamlı kabul edilmektedir (105). Fungal enfeksiyonlar için kantitatif idrar kültüründe üreyen koloni sayısı için bu şekilde bir sınır değeri belirlenmemiştir.

Kandidüri için üriner kateter ve diğer üriner işlemler, üriner sistemde tıkanıklık, diabetes mellitus, antibiyotik kullanımı, kadın cinsiyet ve yoğun bakım ünitesine yatış altta yatan risk faktörleri arasında sayılmaktadır (2, 6, 106).

Fungal üriner sistem enfeksiyonlarında *Candida* türlerine gittikçe daha sık rastlanmaktadır (107). Kandidürilerde en sık rastlanan tür *C. albicans* olmasına rağmen, albicans dışı *Candida* türleri de artış göstermektedirler (6) (106, 108). *C. parapsilosis* ise üriner sistem enfeksiyonlarında çok sık izole edilen bir tür değildir (107).

Kandidüri tedavisinde flukonazol kullanımının sonucunda kısa süreli başarı sağlansa da uzun süreli eradikasyon oranlarının tedavi almayan hastalardan farklı olmadığı bildirilmiştir (109). *Candida* biyofilmlerinde antifungal ilaçlara duyarlılığın azaldığı, flukonazol ve amfoterisin B etkinliğinin düşük, amfoterisin B'nin lipid içeren formülleri ile ekinokandinlerin etkinliğinin ise daha iyi olduğu bilinmektedir (83, 110) Her durumda, kateter ve benzeri yabancı cisimlerin uzaklaştırılması tedavi başarısında büyük fark yaratmaktadır (6).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Maya suşları

Bu çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Patoloji Laboratuvarı Mikoloji Laboratuvarı'nda idrar kültürlerinden izole edilen ve tanımlanan *Candida* türleri dahil edilmiştir. Mikoloji laboratuvarı hasta bilgisi kayıtları retrospektif olarak incelenerek üriner kateteri olan ve olmayan hastalardan izole edilmiş 25'er adet olmak üzere toplam 50 suş seçilmiştir. Seçilen suşlara ait stok kültürler Sabouraud dekstroz agarda (SDA) (BBL, Becton Dickinson, ABD) 37°C'de üretilmiştir. Suşların saf kültür olduklarının kesinleştirilmesi için çalışma öncesinde tek koloni pasajları yapılmıştır. Besiyerlerindeki üremenin karışık olmasından şüphelenildiğinde, kromojenik besiyeri (Himedia, Hindistan) kullanılarak üremenin saflığı kontrol edilmiştir. Üretilen suşların tür tanımlamalarının doğrulanması için mısır unlu Tween 80 agara (BBL Becton Dickinson, ABD) ekim yapılarak 25°C'de 24 - 48 saat inkübe edilmiştir ve mikroskop altında x40 büyütmede tipik morfolojinin gözlemlendiği not edilmiştir (10). Çalışmaya alınan tüm izolatlar saf kültür olarak test edilmiş ve tür tanımlaması doğrulanmıştır.

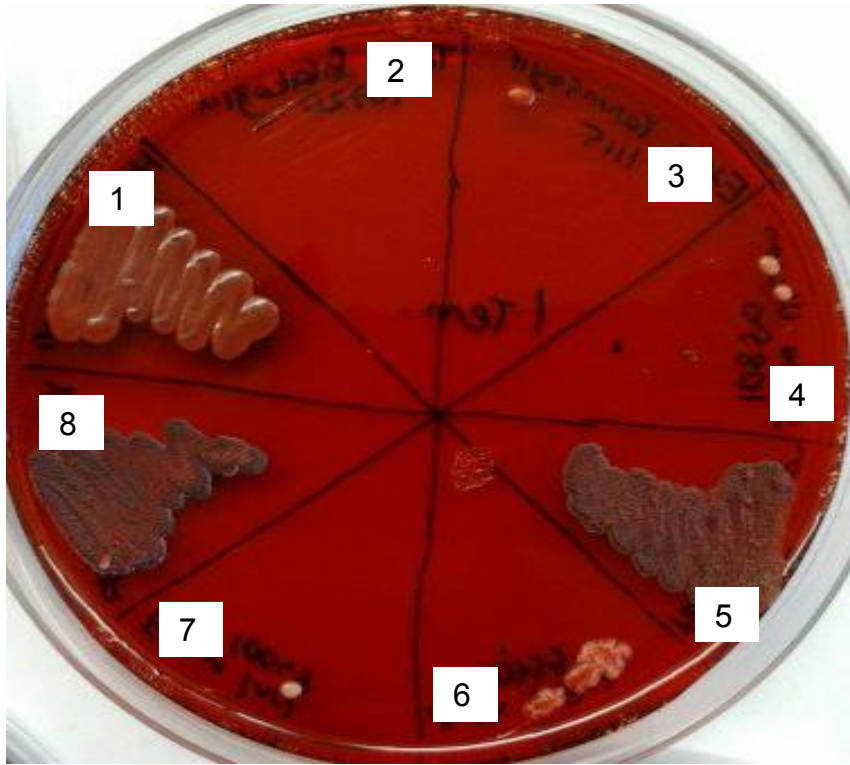
3.2 Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Belirlenmesi

Çalışmaya dâhil edilen tüm suşların biyofilm oluşturma yetenekleri iki farklı yöntem ile test edilmiştir:

3.2.1 Kongo Kırmızısı Agar ile Biyofilm Oluşumunun Test Edilmesi

Kongo kırmızısı agar 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 düşene kadar su banyosunda bekletilmiş ve sonra karıştırılarak 9 cm çapındaki steril petrilere 20 mL/petri olacak şekilde dağıtılmıştır. Petrilere katılaştıktan

sonra oda sıcaklığına gelmesi beklenmiş ve temiz plastik poşetler içinde buzdolabına kaldırılmıştır. Test edilecek *Candida* suşunun SDA'da hazırlanan bir gecelik taze kültüründen bir öze dolusu alınarak Kongo kırmızısı agar yüzeyine ekilmiş ve plaklar 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 kabul edilmiştir. Biyofilm pozitif kabul edilen mayaların koloni rengi siyah ise "güçlü", bordo-siyah ise "orta dereceli", bordo ise "zayıf" biyofilm oluşumu olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1). Tüm suşlar için 24 saat sonunda ön değerlendirme ve 48 saat sonunda asıl sonuç değerlendirilmesi yapılmıştır. Deney üç kez tekrar edilmiş ve elde edilen sonuçların uyumu karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.1. Kongo kırmızısı agarda 48 saatlik inkübasyon sonrası görünüm. 3,4,6 ve 7 numaralı suşlar negatif, 1 numaralı suş zayıf pozitif, 5 ve 8 numaralı suşlar ise güçlü pozitif olarak değerlendirilmiştir. 2 numaralı suşta üreme gözlenmemiştir.

3.2.2 Mikroplakta XTT İndirgenmesi ile Biyofilm Varlığının Test Edilmesi

Biyofilm yapımı mikroplak yöntemiyle de test edilmiştir. Plakta biyofilm varlığı, Pierce ve ark.'nın (74) 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 çukurlarına eklenmiş ve uygun koşullarda inkübe edilmiştir. Üreme aşamasının ardından çukurlarda yıkama yapılarak biyofilm oluşturarak çukur yüzeyine tutunamayan maya hücrelerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işleminin ardından, yapılan görsel değerlendirmede, çukurların taban kısmında tabaka oluşumu gözlenmesi biyofilm varlığına, tabaka oluşumu gözlenmemesi biyofilm yokluğuna işaret etmektedir (Şekil 3.2). Sonuçlar ayrıca hücre canlılığını tayin etmede kullanılan bir kimyasal olan XTT ile spektrofotometrik olarak da değerlendirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.2 Mikroplakta XTT indirgenmesi ile biyofilm varlığının test edilmesi yönteminde yıkama sonrasında kuyucuklardaki biyofilmin görünüşü (A1 ve B1 kuyucukları negatif kontrol).



Şekil 3.3. Mikroplakta XTT indirgenmesi ile biyofilm varlığının test edilmesi yönteminde XTT eklenip 2 saat inkübe edilen kuyucukların görünüşü (A1 ve B1 kuyucukları negatif kontrol)

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

1) YPD (“yeast peptone dextrose”) Besiyeri

YPD sıvı besiyeri 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±2°C’de saklanmıştır.

2) RPMI 1640 Sıvı Besiyeri

RPMI 1640 sıvı besiyeri 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 sterilize edilmiştir. Kullanıma kadar buzdolabında +4±2°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 erimesi beklenmiştir. Çalışma çözeltisini elde etmek için 10 ml XTT çözeltisine 1 µl menadion eklenmiştir.

Yöntemin Uygulanışı

Test Suşlarının Hazırlanması

Test edilecek suşun SDA'da üretilmiş 24 saatlik kültüründen bir koloni 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 yıkanarak ayrılmıştır. Bunun için besiyeri 3000 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edilmiş, üst kısımdaki sıvı dökülmüştür. Tüpte kalan çökeltiye 5 ml steril PBS eklenerek vortekslenmiştir. Sonrasında 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 uer kez test edilmiştir. Mikroplaklar steriliteleeri bozulmayacak 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 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 u 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 solyosunu 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, *C.krusei* ATCC 6258 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019 kullanılmıştır.

Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Sonuçların değerlendirilmesinde Christensen ve ark.'ın (111) alışması temel alınmıştır. Bunun için:

- Her kuyucuktan elde edilen OD değerinden negatif kontrol kuyucuğunun OD değeri çıkarılarak test değeri hesaplanmıştır.
- Her suş için u 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 u 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. Planktonik Hücrelerin Antifungal Duyarlılık Durumlarının Belirlenmesi

Suşların antifungal duyarlılık testleri, mikrodilüsyon testi ile referans yöntemlerden biri olan Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 Kılavuzu önerilerine uygun olarak gerçekleştirilmiştir (95). Bu yöntem, planktonik hücrelerin test edilmesi için standart uygulamaları içermektedir. Elde edilen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri CLSI M27-S4 önerilerine göre değerlendirilmiştir (112). Tüm suşlar için flukonazol ve amfoterisin B MİK değerleri belirlenmiştir.

Yöntem kısaca aşağıdaki şekilde uygulanmıştır:

3.3.1 Test Plaklarının Hazırlanıp Dondurulması

- a. Steril RPMI1640 plaktaki 1-11. kuyucuklara 50 µL, 12. kuyucuğa ise 100 µL olacak şekilde dağıtılmıştır. (Antifungal ilaçların RPMI içinde dilüsyonları 10 adet falkon tüpte hazırlanmıştır.)
- b. 1.tüpe amfoterisin B için 39,5 mL, flukonazol ve mikafungin için 19,5 mL RPMI eklenmiştir. Stok antifungalden 0,5 mL eklenmiştir.
- c. 2. tüpe 5 mL RPMI ve 1.tüpten 5 mL eklenmiştir.
- d. 3. tüpe 15 mL RPMI ve 1 tüpten 5 mL konulmuştur.
- e. 4.tüpe 5 mL RPMI ve 3.tüpten 5 mL ilave edilmiştir.
- f. 5.tüpe 7,5 mL RPMI ve 3.tüpten 2,5 mL konulmuştur.
- g. 6.tüpe 17,5 mL RPMI ve 3.tüpten 2.5 mL eklenmiştir.
- h. 7.tüpe 5 mL RPMI ve 6.tüpten 5 mL konulmuştur.
- i. 8.tüpe 7,5 mL RPMI ve 6.tüpten 2,5 mL ilave edilmiştir.
- j. 9.tüpte 17,5 mL RPMI ve 6.tüpten 2,5 mL konulmuştur.

- k. 10.tüpte 5 mL RPMI ve 9.tüpten 5 mL eklenmiştir.
- l. Hazırlanan antifungal dilüsyonlar, 1-10. kuyucuklara 50'şer μ L dağıtılmıştır.
- m. 11. ve 12. kuyucuğa antifungal eklenmemiştir (sırasıyla, üreme kontrolü ve besiyeri kontrolü).
- n. Plaklar -80°C 'de dondurulmuştur.

3.3.2 Test Edilecek Suşların Hazırlanması

- a. Test edilecek suş SDA'ya ekilerek bir gece inkübe edilmiştir.
- b. Her suş için bir adet 5 mL SF, bir adet 4,9 mL RPMI 1640 ve bir adet 4,75 mL RPMI 1640 içeren tüp hazırlanmıştır.
- c. SF içeren tüpte spektrofotometrede OD %78 - 80 olacak şekilde maya süspansiyonu hazırlanmıştır.
- d. Hazırlanan SF içindeki süspansiyondan 250 μ L alınıp, 4,75 mL RPMI 1640 içeren tüpe konularak 1/20 oranında seyreltilmiştir.
- e. Seyreltilmiş karışımın bulunduğu tüpten 100 μ L alınıp 4,9 ml RPMI 1640 içeren tüpe konularak 1/50 oranında daha seyreltilmiştir.
- f. Son maya süspansiyonu 1/1000 kez seyreltilmiş olup mikroplağa ekim için kullanılmıştır. Beklemesi gereken süspansiyonlar işleme kadar buzdolabına kaldırılmıştır.

3.3.3 Testin Uygulanması ve Değerlendirilmesi

- a. Dondurulmuş test plakları oda sıcaklığına alınıp eritilmiştir.
- b. Plaktaki her sırada ilk 11 kuyucuğa çok kanallı pipet ile 100 μ L maya süspansiyonu eklenmiştir. Her suş için iki sıra kuyucuk kullanılmıştır.
- c. 12. kuyucuğa maya süspansiyonu eklenmemektedir (besiyeri kontrolü).
- d. Kapak kapatılarak 37°C de inkübe edilmiştir.
- e. 24 ve 48. Saatlerde görsel okuma yapılmıştır.
- f. Flukonazol ve mikafungin için üreme kontrol çukuruna göre %50 inhibisyon, amfoterisin B için ise %100 inhibisyon göz önüne alınarak MİK değeri belirlenmiştir.

3.4. Biyofilm Varlığında Antifungal Duyarlılığın Belirlenmesi

Biyofilm varlığında antifungal duyarlılığın belirlenmesi için, Pierce ve ark.'nın (74) daha önce bildirdiği XTT ile duyarlılık saptama yöntemi kullanılmıştır. Her suş için flukonazol ve amfoterisin B etkinliği test edilmiştir. Her test için mikropakta iki sıra kullanılmış ve her suş iki kez test edilmiştir. Kalite kontrol için her çalışmaya *C.albicans* MYA 274, *C.krusei* ATCC 6258 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019 standart suşları eklenmiştir. Yöntem kısaca şu şekildedir:

3.4.1 Test Edilecek Suşların Hazırlanması

Mikropakta XTT indirgenmesi ile biyofilm varlığının test edilmesi bölümünde anlatılan şekilde hazırlanmıştır (Sayfa no: 34).

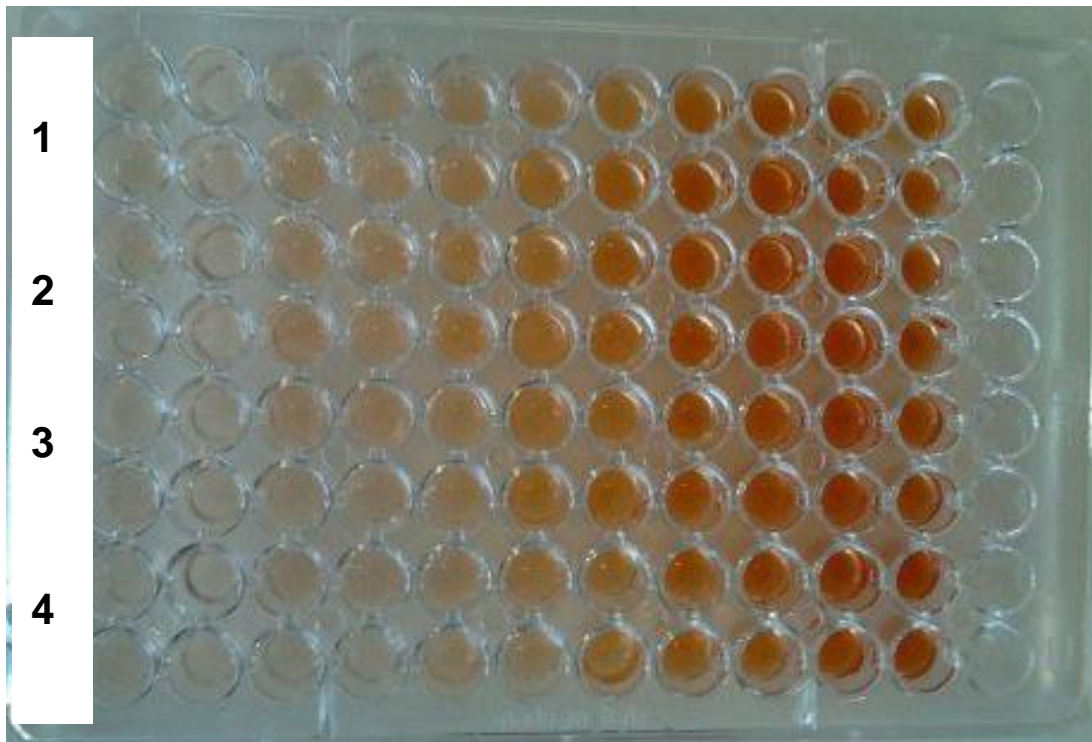
3.4.2 Biyofilm İçeren Test Plaklarının Hazırlanması ve Antifungal Duyarlılık Testinin Uygulanması

Steril mikropaların tüm kuyucuklarına 50 µl RPMI 1640 konmuştur. İlk 11 kuyucuğa test edilecek suşun hazırlanan süspansiyonundan 50'şer µl eklenmiştir. Negatif kontrol kuyucuğu olan 12. kuyucuğa suş eklenmemiştir. Mikropalar kapakları kapatıldıktan sonra parafilmle sarılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilerek biyofilm oluşması sağlanmıştır. İnkübasyon işleminin ardından, çok kanallı pipet kullanılarak 200 µL steril PBS ile üç kez yıkama yapılmış ve planktonik hücreler uzaklaştırılmıştır. Plaklar kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kurutulduktan sonra kuyucuklara farklı konsantrasyonlarda hazırlanan antifungal ilaç çözeltileri dağıtılmıştır. Bu çözeltiler, CLSI M27-A3 kılavuzunda önerildiği gibi planktonik hücrelerin antifungal duyarlılık durumlarının belirlenmesi bölümünde anlatılan şekilde hazırlanmış ve kolonlara dağıtılmıştır (sayfa no: 37). Son iki kuyucuğa antifungal eklenmemiştir (üreme kontrolü ve negatif kontrol). Antifungallerin dağıtılmasının ardından mikropaların kapakları kapatılıp parafilmle sarılmış ve 37°C'de 24 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda, her kuyucuk için 200 µL steril PBS ile üç kez yıkama yapılmıştır. Mikropalar

kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kuyucuklardaki tüm PBS'nin akıtılması sağlanmıştır. Sonrasında kuyucuklara 100µl XTT/menadion çözeltisi eklenmiştir. Mikroplaklar ışık geçirmeyecek şekilde alüminyum folyo ile sarılarak 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında her kuyucuktan 80 µl alınarak temiz düz tabanlı bir mikroplağa aktarılmıştır (Şekil 3.4). Her kuyucuk için 492 nm dalgaboyunda ölçüm yapan spektrofotometrede absorbans ölçülerek OD belirlenmiş, negatif kontrol kuyucuğunun OD değeri çıkarılarak, test değerleri hesaplanmıştır.

Azoller ve ekinokandinler için 11. kuyucuktaki üreme kontrolü kuyucuğuna göre test değerinde %50 azalma gözlenen kuyucuktaki konsantrasyon (MİK-2), MİK değeri olarak belirlenmiştir (Örneğin: kontrol kuyucuğunda OD=1.0 ise OD≤0.5'e karşılık gelen ilk kuyucuktaki antifungal konsantrasyonu MİK değeri olarak alınmıştır).

Amfoterisin B için ise, üreme kontrolüne göre %80 inhibisyon gözlenen kuyucuktaki konsantrasyonlar (MİK-1) MİK değeri olarak not alınmıştır (78).



Şekil 3.4. Biyofilm varlığında antifungal duyarlılığın belirlenmesi için kullanılan XTT ile duyarlılık saptama yönteminde XTT ile inkübasyon sonrasında

amfoterisin B ile hazırlanmış mikroplakta suşların görünümü. (11. kolon
üreme kontrolü,12. kolon negatif kontrol).

4. BULGULAR

4.1 Kongo kırmızısı Agar ile Biyofilm Oluşumunun Test Edilmesi Deneyi Sonuçları

Kongo kırmızısı agar testi sonuçlarına göre 12 suşun biyofilm özelliği gösterdiği, 37 suşun ise biyofilm negatif olduğu saptanmıştır. Bu test sonucuna göre kateter pozitif ve negatif hastalardan izole edilen suşlardaki biyofilm özelliği Tablo 4.1'de özetlenmiştir.

Kateter pozitif ve kateter negatif hastalardan elde edilen suşların her biri için, Kongo kırmızısı agarda üreme sonucunda elde edilen veriler XTT deneyi sonuçları ile birlikte Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.1. Kongo kırmızısı agarda üreyen koloni rengine göre suşların biyofilm yapma özelliği

Biyofilm	Kateter Pozitif Hasta Suşları		Kateter Negatif Hasta Suşları		Toplam	
	n	%	n	%	N	%
Güçlü	0	0	1	4	1	2
Orta	2	8	5	20	7	14
Zayıf	4	16	0	0	4	8
Negatif	19	76	18	72	37	74
Üremedi	0	0	1	4	1	2
Toplam	25	100	25	100	50	100

Sonuçlar ki-kare testi ile analiz edilmiş, Kongo kırmızısı agarda üreme deneyi sonuçlarına göre iki grup arasında biyofilm oluşturma özelliği bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır.

4.2 Mikroplakta XTT İndirgenmesi ile Biyofilm Varlığının Test Edilmesi

Mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi ile tüm suşlarda biyofilm varlığı gösterilmiş ve 46 suşta (% 92) güçlü pozitiflik saptanmıştır. Mikroplakta XTT

indirgenmesi deneyi sonucuna göre kateter pozitif ve negatif hastalardan izole edilen suşlardaki biyofilm özelliği Tablo 4.2'de özetlenmiştir.

Kateter pozitif ve kateter negatif hastalardan elde edilen suşların her biri için mikrolakta XTT indirgenmesi deneyi sonuçları, Kongo kırmızısı agarda üreme sonucunda elde edilen veriler ile birlikte Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te verilmiştir.

Elde edilen sonuçlar ki-kare testi ile değerlendirilmiş, mikrolakta XTT indirgenmesi deneyi sonuçlarına göre biyofilm oluşturma özelliği bakımından iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tablo 4.2. Mikrolakta XTT indirgenmesi yöntemine göre kateter pozitif ve kateter negatif hastalardan elde edilen suşların biyofilm yapma özelliği

Biyofilm	Kateter Pozitif Hasta Suşları		Kateter Negatif Hasta Suşları		Toplam	
	n	%	n	%	N	%
Güçlü	23	92	23	92	46	92
Orta	1	4	2	8	3	6
Zayıf	1	4	0	0	1	2
Toplam	25	100	25	100	50	100

Tablo 4.3. Kongo kırmızısı agarda üreyen koloni rengi ve mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi sonuçlarına göre kateter pozitif hastalardan elde edilen suşların biyofilm özelliği

Suş No.	Tür	Biyofilm Özelliği	
		Kongo kırmızısı agar	XTT indirgenmesi
1	<i>C. albicans</i>	Negatif	Güçlü pozitif
2	<i>C. albicans</i>	Negatif	Güçlü pozitif
3	<i>C. albicans</i>	Negatif	Güçlü pozitif
4	<i>C. albicans</i>	Negatif	Güçlü pozitif
5	<i>C. glabrata</i>	Negatif	Güçlü pozitif
6	<i>C. glabrata</i>	Orta pozitif	Güçlü pozitif
7	<i>C. glabrata</i>	Negatif	Güçlü pozitif
8	<i>C. glabrata</i>	Negatif	Orta pozitif
9	<i>C. glabrata</i>	Zayıf pozitif	Güçlü pozitif
10	<i>C. glabrata</i>	Zayıf pozitif	Güçlü pozitif
11	<i>C. krusei</i>	Negatif	Güçlü pozitif
12	<i>C. parapsilosis</i>	Zayıf pozitif	Zayıf pozitif
13	<i>C. parapsilosis</i>	Orta pozitif	Güçlü pozitif
14	<i>C. parapsilosis</i>	Zayıf pozitif	Güçlü pozitif
15	<i>C. parapsilosis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
16	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
17	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
18	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
19	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
20	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
21	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
22	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
23	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
24	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
25	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif

Tablo 4.4. Kongo kırmızısı agarda üreyen koloni rengi ve mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi sonuçlarına göre kateter negatif hastalardan elde edilen suşların biyofilm özelliği

Suş No.	Tür	Biyofilm Özelliği	
		Kongo kırmızısı agar	XTT indirgenmesi
1	<i>C. albicans</i>	Negatif	Güçlü pozitif
2	<i>C. albicans</i>	Negatif	Güçlü pozitif
3	<i>C. albicans</i>	Negatif	Güçlü pozitif
4	<i>C. albicans</i>	Negatif	Güçlü pozitif
5	<i>C. albicans</i>	Negatif	Güçlü pozitif
6	<i>C. albicans</i>	Negatif	Güçlü pozitif
7	<i>C. glabrata</i>	Negatif	Güçlü pozitif
8	<i>C. keyfr</i>	Orta pozitif	Güçlü pozitif
9	<i>C. keyfr</i>	Negatif	Güçlü pozitif
10	<i>C. krusei</i>	Orta pozitif	Güçlü pozitif
11	<i>C. krusei</i>	Orta pozitif	Güçlü pozitif
12	<i>C. krusei</i>	Güçlü pozitif	Güçlü pozitif
13	<i>C. krusei</i>	Orta pozitif	Güçlü pozitif
14	<i>C. lusitaniae</i>	Negatif	Güçlü pozitif
15	<i>C. parapsilosis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
16	<i>C. parapsilosis</i>	Üremedi	Güçlü pozitif
17	<i>C. parapsilosis</i>	Orta pozitif	Orta pozitif
18	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Orta pozitif
19	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
20	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
21	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
22	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
23	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
24	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif
25	<i>C. tropicalis</i>	Negatif	Güçlü pozitif

Kongo kırmızısı agarda üreme ve mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi sonuçları incelendiğinde, ikinci yöntemin biyofilm yapan suşların belirlenmesinde daha başarılı olduğu saptanmıştır. Kongo kırmızısı agarda üreme testi ile biyofilm saptanamayan 37 suşun (36 biyofilm negatif ve bir üremeyen suş) 36'sında mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi ile güçlü, birinde ise orta derecede biyofilm yapımı gözlenmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Kongo kırmızısı agarda üreme ve mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi ile elde edilen biyofilm varlığı sonuçlarının karşılaştırılması

Kongo kırmızısı agar	XTT deneyi									
	Güçlü		Orta		Zayıf		Negatif		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
Güçlü pozitif	1	2	0	0	0	0	0	0	1	2
Orta pozitif	6	12	1	2	0	0	0	0	7	14
Zayıf pozitif	2	4	1	2	1	2	0	0	4	8
Negatif	36	72	1	2	0	0	0	0	37	74
Üremedi	1	2	0	0	0	0	0	0	1	2
Toplam	46	92	3	6	1	2	0	0	50	100

Farklı *Candida* türlerinde biyofilm saptama deneylerinin sonuçları Tablo 4.6'te özetlenmiştir. Mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi tüm türler için biyofilm varlığını daha iyi gösterebilmiştir.

Tablo 4.6. *Candida* türlerinde Kongo kırmızısı agar ve mikroplakta XTT indirgenmesi deneyi ile saptanan biyofilm sonuçları

	Kongo kırmızısı agar					XTT deneyi		
	Güçlü pozitif	Orta pozitif	Zayıf pozitif	Negatif	Üremedi	Güçlü pozitif	Orta pozitif	Zayıf pozitif
<i>C. albicans</i> (n=10)	0	0	0	10	0	10	0	0
<i>C. tropicalis</i> (n=18)	0	0	0	18	0	18	0	0
<i>C. glabrata</i> (n=7)	0	1	3	3	0	6	1	0
<i>C. parapsilosis</i> (n=7)	0	2	1	3	1	5	1	1
<i>C. krusei</i> (n=5)	1	3	0	1	0	5	0	0
<i>C. keyfr</i> (n=2)	0	1	0	1	0	1	1	0
<i>C. lusitaniae</i> (n=1)	0	0	0	1	0	1	0	0
Toplam (n=50)	1	7	4	37	1	46	3	1

4.3 Antifungal Duyarlılık Testleri

Flukonazol için referans yöntem ile elde edilen standart MİK değerleri ve biyofilm varlığında elde edilen MİK değerleri kateter pozitif hastalardan elde edilen suşlar için Tablo 4.7'de ve kateter negatif hastalardan elde edilenler için Tablo 4.8'de verilmiştir. Tüm suşlarda biyofilm varlığında MİK değerlerinin arttığı ve değerlendirme için önerilen direnç eşik değerini aştığı gözlenmiştir.

Tablo 4.7. Flukonazol için kateter pozitif hastalardan elde edilen suşlarda standart referans test ve biyofilm varlığında yapılan antifungal duyarlılık testi sonucunda elde edilen MİK değerleri

Suş No.	Tür	Standart MİK * (µg/mL)	Biyofilm varlığında MİK-2** (µg/mL)
1	<i>C. albicans</i>	1	>64
2	<i>C. albicans</i>	0,5	>64
3	<i>C. albicans</i>	1	>64
4	<i>C. albicans</i>	0,5	>64
5	<i>C. glabrata</i>	16	64
6	<i>C. glabrata</i>	16	64
7	<i>C. glabrata</i>	8	>64
8	<i>C. glabrata</i>	8	>64
9	<i>C. glabrata</i>	16	>64
10	<i>C. glabrata</i>	16	>64
11	<i>C. krusei</i>	32	>64
12	<i>C. parapsilosis</i>	2	>64
13	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	>64
14	<i>C. parapsilosis</i>	≤0,125	>64
15	<i>C. parapsilosis</i>	2	>64
16	<i>C. tropicalis</i>	0,5	32
17	<i>C. tropicalis</i>	2	>64
18	<i>C. tropicalis</i>	2	>64
19	<i>C. tropicalis</i>	2	>64
20	<i>C. tropicalis</i>	2	>64
21	<i>C. tropicalis</i>	2	>64
22	<i>C. tropicalis</i>	2	>64
23	<i>C. tropicalis</i>	0,25	>64
24	<i>C. tropicalis</i>	1	>64
25	<i>C. tropicalis</i>	0,5	>64

*Standart MİK sonuçları üreme yeterli olduğu için 24 saatte okunmuştur.

**MİK-2: %50 inhibisyon sağlayan minimum antifungal konsantrasyonu

Tablo 4.8. Flukonazol için kateter negatif hastalardan elde edilen suşlarda standart referans test ve biyofilm varlığında yapılan antifungal duyarlılık testi sonucunda elde edilen MİK değerleri

Suş No.	Tür	Standart MİK * (µg/mL)	Biyofilm varlığında MİK-2** (µg/mL)
1	<i>C. albicans</i>	1	>64
2	<i>C. albicans</i>	1	>64
3	<i>C. albicans</i>	0,125	16
4	<i>C. albicans</i>	1	>64
5	<i>C. albicans</i>	0,5	>64
6	<i>C. albicans</i>	1	>64
7	<i>C. glabrata</i>	4	>64
8	<i>C. keyfr</i>	1	>64
9	<i>C. keyfr</i>	1	>64
10	<i>C. krusei</i>	32	>64
11	<i>C. krusei</i>	32	>64
12	<i>C. krusei</i>	32	>64
13	<i>C. krusei</i>	32	>64
14	<i>C. lusitaniae</i>	8	>64
15	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	>64
16	<i>C. parapsilosis</i>	1	>64
17	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	>64
18	<i>C. tropicalis</i>	1	>64
19	<i>C. tropicalis</i>	1	>64
20	<i>C. tropicalis</i>	0,25	>64
21	<i>C. tropicalis</i>	0,5	>64
22	<i>C. tropicalis</i>	0,5	>64
23	<i>C. tropicalis</i>	≤0,125	64
24	<i>C. tropicalis</i>	1	>64
25	<i>C. tropicalis</i>	2	64

*Standart MİK sonuçları üreme yeterli olduğu için 24 saatte okunmuştur.

**MİK-2: %50 inhibisyon sağlayan minimum antifungal konsantrasyonu

Amfoterisin B için referans yöntem ile elde edilen standart MİK değerleri (MİK-0) ve biyofilm varlığında elde edilen MİK-1 değerleri Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da verilmiştir. Biyofilm varlığında tüm suşlarda MİK-0 değeri >8 olarak saptanmıştır. MİK-1 değeri sonucuna göre suşların 14'ü (%28) direnç sınırının altında bulunmuştur.

Tablo 4.9. Amfoterisin B için kateter pozitif hastalardan elde edilen suşlarda standart referans test ve biyofilm varlığında yapılan antifungal duyarlılık testi sonucunda elde edilen MİK değerleri

Suş No.	Tür	Standart MİK * (µg/mL)	Biyofilm varlığında MİK-1** (µg/mL)
1	<i>C. albicans</i>	0,5	1
2	<i>C. albicans</i>	1	1
3	<i>C. albicans</i>	1	2
4	<i>C. albicans</i>	1	4
5	<i>C. glabrata</i>	2	8
6	<i>C. glabrata</i>	1	2
7	<i>C. glabrata</i>	1	>8
8	<i>C. glabrata</i>	2	>8
9	<i>C. glabrata</i>	2	8
10	<i>C. glabrata</i>	1	0,5
11	<i>C. krusei</i>	2	4
12	<i>C. parapsilosis</i>	1	2
13	<i>C. parapsilosis</i>	1	8
14	<i>C. parapsilosis</i>	1	8
15	<i>C. parapsilosis</i>	2	>8
16	<i>C. tropicalis</i>	1	1
17	<i>C. tropicalis</i>	1	>8
18	<i>C. tropicalis</i>	2	4
19	<i>C. tropicalis</i>	2	>8
20	<i>C. tropicalis</i>	2	4
21	<i>C. tropicalis</i>	2	2
22	<i>C. tropicalis</i>	2	4
23	<i>C. tropicalis</i>	1	>8
24	<i>C. tropicalis</i>	2	>8
25	<i>C. tropicalis</i>	0,25	>8

*: Standart MİK sonuçları üreme yeterli olduğu için 24 saatte okunmuştur.

** : Biyofilm varlığında MİK-1 (%80 inhibisyon sağlanan minimum antifungal konsantrasyonu) değerleri verilmiştir. Tüm suşlarda MİK-0 değeri >8 olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.10. Amfoterisin B için kateter negatif hastalardan elde edilen suşlarda standart referans test ve biyofilm varlığında yapılan antifungal duyarlılık testi sonucunda elde edilen MİK değerleri

Suş No.	Tür	Standart MİK * (µg/mL)	Biyofilm varlığında MİK-1** (µg/mL)
1	<i>C. albicans</i>	1	2
2	<i>C. albicans</i>	2	8
3	<i>C. albicans</i>	1	2
4	<i>C. albicans</i>	1	4
5	<i>C. albicans</i>	0,25	8
6	<i>C. albicans</i>	2	>8
7	<i>C. glabrata</i>	1	2
8	<i>C. keyfr</i>	1	8
9	<i>C. keyfr</i>	2	0,25
10	<i>C. krusei</i>	2	8
11	<i>C. krusei</i>	2	4
12	<i>C. krusei</i>	2	4
13	<i>C. krusei</i>	2	>8
14	<i>C. lusitaniae</i>	1	0,5
15	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	>8
16	<i>C. parapsilosis</i>	1	>8
17	<i>C. parapsilosis</i>	1	8
18	<i>C. tropicalis</i>	1	>8
19	<i>C. tropicalis</i>	2	>8
20	<i>C. tropicalis</i>	2	>8
21	<i>C. tropicalis</i>	1	8
22	<i>C. tropicalis</i>	2	>8
23	<i>C. tropicalis</i>	2	>8
24	<i>C. tropicalis</i>	0,25	>8
25	<i>C. tropicalis</i>	1	>8

*: Standart MİK sonuçları üreme yeterli olduğu için 24 saatte okunmuştur.

** : Biyofilm varlığında MİK-1 değerleri (%80 inhibisyon sağlanan minimum antifungal konsantrasyonu) verilmiştir. Tüm suşlarda MİK-0 değeri >8 olarak belirlenmiştir.

Her iki antifungal için biyofilm varlığında MiK_{50} ve MiK_{90} değerlerinin arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.11). Bu durum *Candida* türleri arasında farklılık göstermemiştir (Tablo 4.12 ve Tablo 4.13).

Tablo 4.11. Test edilen iki antifungal ilaç için standart antifungal test ve biyofilm varlığında yapılan antifungal duyarlılık testi sonuçları

		Standart			Biyofilm varlığında		
		MİK dağılımı ($\mu\text{g/mL}$)	MiK_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	MiK_{90} ($\mu\text{g/mL}$)	MİK dağılımı ($\mu\text{g/mL}$)	MiK_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	MiK_{90} ($\mu\text{g/mL}$)
Flukonazol	Kateter pozitif (n=25)	$\leq 0,125 - 32$	2	16	$32 - >64$	>64	>64
	Kateter negatif (n=25)	$\leq 0,125 - 32$	1	32	$16 - >64$	>64	>64
	Toplam (n=50)	$\leq 0,125 - 32$	1	32	$16 - >64$	>64	>64
Amfoterisin B	Kateter pozitif (n=25)	$0,25 - 2$	1	2	$0,5 - >8$	4	>8
	Kateter negatif (n=25)	$0,25 - 2$	1	2	$0,25 - >8$	8	>8
	Toplam (n=50)	$0,25 - 2$	1	2	$0,25 - >8$	8	>8

Tablo 4.12. Farklı *Candida* türlerinde flukonazol için standart antifungal test ve biyofilm varlığında yapılan antifungal duyarlılık testi sonuçları

Flukonazol	Standart				Biyofilm varlığında			
	Duyarlı suş (n)	MİK dağılımı	MİK ₅ o	MİK ₉ o	Duyarlı suş (n)	MİK dağılımı	MİK ₅ o	MİK ₉ o
<i>C. albicans</i> (n=10)	10	0,125 – 1	1	1	0	16 - >64	>64	>64
<i>C. tropicalis</i> (n=18)	18	≤0,125 – 2	1	2	0	32 - >64	>64	>64
<i>C. glabrata</i> (n=7)	7	4-16	16	16	0	64 - >64	>64	>64
<i>C. parapsilosis</i> (n=7)	7	≤0,125 – 2	0,5	2	0	>64	>64	>64
<i>C. krusei</i> (n=5)	0	32->64	32	>64	0	>64	>64	>64
<i>C. keyfr</i> (n=2)	2	1	-	-	0	>64	>64	>64
<i>C. lusitaniae</i> (n=1)	1	8	-	-	0	>64	8	>64
TOPLAM (n=50)	45	≤0,125 – 32	1	32	0	16 - >64	>64	>64

Tablo 4.13. Farklı *Candida* türlerinde test edilen amfoterisin B için standart antifungal test ve biyofilm varlığında yapılan antifungal duyarlılık testi sonuçları

Amfoterisin B	Standart				Biyofilm varlığında			
	Duyarlı suş (n)	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	Duyarlı suş (n)	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀
<i>C. albicans</i> (n=10)	10	0,25 – 2	1	2	5	1 - >8	4	8
<i>C. tropicalis</i> (n=18)	18	0,25 – 2	2	2	2	1 - >8	>8	>8
<i>C. glabrata</i> (n=7)	7	1-2	2	2	3	0,5 - >8	8	>8
<i>C.parapsilosis</i> (n=7)	7	0,5 – 2	1	2	1	8 - >8	>8	>8
<i>C. krusei</i> (n=5)	5	2	2	2	0	4 - >8	4	8
<i>C. keyfr</i> (n=2)	-	1-2	-	-	-	0,25 – 8	-	-
<i>C. lusitaniae</i> (n=1)	1	1	-	-	1	0,5	-	-
TOPLAM (n=50)	48	0,25 – 2	1	2	12	0,5 - >8	8	>8

5. TARTIŞMA

Candida türleri sağlıklı bireylerde üst solunum yollarında, gastrointestinal sistemde, vajende ve deride normal flora üyeleridir. Sağlıklı kişilerde bulunabilmelerinin yanında, bağışıklık sistemi baskılanmış olan bireylerde fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilirler. Fırsatçı *Candida* enfeksiyonları antibiyotik kullanımı, vücutta nemli bölgelerde aşırı çoğalma ve gebelik gibi durumlarda ortaya çıkabilmektedirler. Bağışıklık sisteminin hastalık veya tedavi nedeniyle baskılandığı durumlarda ağır ve hayatı tehdit eden tablolar gelişmektedir. Konak faktörlerine ek olarak, etken *Candida* türlerinin virülans faktörleri de tedavi başarısını etkilemektedir. Mantarın sahip olduğu çeşitli proteinler ve enzimler, dimorfizm, fenotipik değişim özelliği ve biyofilm oluşturma yeteneği virülans faktörleri içinde yerini almaktadır. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma yeteneği özellikle yabancı cisim varlığında antimikrobiyal tedaviye dirençli kronik enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. *Candida* enfeksiyonları, hastane enfeksiyonları içerisinde önemli bir yere sahiptir (113). Bu enfeksiyonların patogeneğinde önemli rolü olan biyofilm oluşturma yeteneği virülans faktörleri arasında çok çalışılan konulardan biridir.

İdrar yolu enfeksiyonu etkenleri arasında *Candida* türleri önemli yer tutmaktadır. Örneğin yoğun bakım ünitelerinde idrar yolu enfeksiyonlarında *Candida* türleri *E.coli*'nin ardından ikinci sıklıkta olabilmekte ve oran %20'lere ulaşabilmektedir (114). Kandidüri olgularının büyük bir kısmı antibiyotik kullanımı ve kateter varlığı ile ilişkili görülmektedir. Kateter ile ilişkili idrar yolları enfeksiyonları özellikle yoğun bakım ünitelerinde sıklıkla karşılaşılan sorunlardan biridir (114, 115). Kateter vücuda yerleştirildikten kısa bir süre sonra biyofilm oluşumu gözlenmektedir ve bu durum antifungal tedavi için sorun oluşturmaktadır. Antifungal tedavi başarısının artırılması için kateterin vücuttan uzaklaştırılması önerilmektedir (115).

Bu çalışmada üriner kateteri olan ve olmayan hastalarda idrardan izole edilen *Candida* suşlarının biyofilm yapma yetenekleri ve bunun antifungal direncine etkileri incelenmiştir.

5.1 Kongo kırmızısı Agar ile Biyofilm Oluşumunun Test Edilmesi

Kongo kırmızısı agar yöntemi ilk olarak bakteriyel biyofilmleri saptamak amacıyla kullanılmış Freeman (76), daha sonra modifiye edilerek fungal biyofilm çalışmalarında da bu yöntemden yararlanılmıştır.

Bakteriyel biyofilmlerde yapılan çalışmalar daha çok *Staphylococcus* türlerinde yapılmıştır. Freeman ve ark. (76), koagülaz negatif stafilokoklarda biyofilm varlığının araştırılmasında Kongo kırmızısı agar ile elde edilen sonuçların rutinde kullanılan Christensen yöntemi ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Moghadam ve ark. (116) yanık olgularından izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında biyofilm oluşumunu incelemek için Kongo kırmızısı agar ve kristal viyole ile boyama yapılan mikropalak yöntemlerini kullanmışlardır. İki yöntem uyumlu bulunmuş ve metisilin dirençli suşların %97.5'inin, metisilin duyarlı suşların ise %60'ının biyofilm pozitif oldukları belirtilmiştir.

Kongo kırmızısı agar yöntemi, fungal biyofilmlerin araştırılmasında da kullanılmıştır. Saxena ve ark. (117), bu yöntemi kullanarak 120 *Candida* suşunda biyofilm oluşumunu araştırmış, %38,33 biyofilm pozitifliği saptamışlardır. Biyofilm pozitif olarak belirledikleri suşların %21,73'ünde güçlü pozitiflik, %78,27'sinde ise zayıf pozitiflik gözlemişlerdir.

Yıldırım ve ark. (118), albicans ve albicans dışı *Candida* suşlarındaki biyofilm oluşumu, esteraz, fosfolipaz ve hemolitik aktivite gibi virülans faktörlerini araştırmışlardır. Biyofilm varlığı Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon agar yöntemi ile test edilmiştir. Enfeksiyon etkeni olarak hasta bireylerden izole edilen 92 *C.albicans* suşundan 16'sında (%17) ve 40 albicans dışı *Candida* suşunun 13'ünde (%33); sağlıklı bireylerin oral florasından izole edilen 27 *C.albicans* suşunun bir tanesinde (%4) ve 12 albicans dışı *Candida* suşunun altısında (%50) biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Enfeksiyon etkeni olarak hasta bireylerden izole edilen suşlarda biyofilm varlığına daha sık rastlanmışsa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Birinci ve ark. (119), Kongo kırmızısı agarda 48 saatte yaptıkları değerlendirme sonucunda 77 *C.albicans* suşunun 41'inin (%53,2) ve 29

albicans dışı *Candida* suşunun 10'unun (%34,5) biyofilm oluşturduğunu saptamışlardır

Arslan ve ark. (120), 100 adet *C.albicans* suşunun %48'inde Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon agarda biyofilm pozitifliği tespit etmişlerdir

Cevahir ve ark. (79), 126 adet *Candida* suşunda biyofilm oluşumunu Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon agar yönteminin yanında glukozlu triptik soy buyyon ve glukozlu sıvı Sabouraud besiyerinde de araştırmışlardır. Çalışmada biyofilm pozitifliği Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon agar ile %44,4 oranında iken, glukozlu triptik soy buyyon ile %39,6 ve glukozlu sıvı Sabouraud besiyeri ile %33,3 olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulmadıkları halde, uygulama ve değerlendirme kolay olduğu için Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon agar yönteminin biyofilm oluşumunu saptamada diğer iki yöntemden daha uygun olduğunu belirtmişlerdir (79).

Çalışmamıza üriner kateteri olan ve olmayan 25'er hastadan izole edilen 50 *Candida* suşu dahil edilmiştir. Kongo kırmızısı agar yöntemi ile kateter pozitif hasta suşlarından altısı (%24), kateter negatif hasta suşlarından ise yedisi (%28) biyofilm pozitif bulunmuş, suşlardan biri (%4) bu besiyerinde ürememiştir. Üriner kateter varlığının bu yöntemle saptanan biyofilm pozitifliği için anlamlı farka neden olmadığı gözlenmiştir.

Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon agar yöntemiyle çalışan araştırmacılar, bu yöntemin basit, hızlı sonuç veren ve kolay değerlendirilen bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir (79). Ancak, bu yöntemin çalışmamızda da gözlenen bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu dezavantajlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Sonuçların gözle değerlendirilmesi, değerlendiren kişiye göre değişkenlik göstermesine neden olmaktadır. Bunun aşılabilmesi için bir çalışmada birden fazla kişi tarafından değerlendirme yapılıyorsa ortak bir yorum geliştirilmesi uygun olacaktır.
- Değerlendirme için farklı yayınlarda farklı kriterlerden bahsedilmektedir. Örneğin Cevahir ve ark.(79), yalnızca siyah koloni oluşturan suşları biyofilm pozitif olarak değerlendirirken, Birinci ve ark. (119) ile Arslan

ve ark. (120) koyu kırmızı kolonileri biyofilm pozitif olarak almışlardır. Yıldırım ve ark. (118), koyu kırmızı ve pembe kolonileri pozitif ve açık pembe kolonileri negatif olarak yorumlamışlardır. Bunun yanında Birinci ve ark. (119) pembe kolonileri negatif kabul etmişlerdir. Bu nedenle farklı çalışmalara ait sonuçların karşılaştırılmasında zorluklar ortaya çıkmaktadır.

- Suşların üreme hızı türe ve suşa göre değişebilmektedir. Bazı suşların üremesi için 48 saatten uzun süreli inkübasyon gerekmektedir. Bu süre içinde plaktaki besiyerlerinin rengi kırmızıdan siyaha dönüşmekte ve değerlendirilmenin sağlıklı yapılmasına engel oluşturmaktadır.

- Bazı suşlar bu besiyerinde ürememektedir. Bu nedenle değerlendirme yapılamamaktadır. Bizim çalışmamızda da bir suş, bu besiyerinde üreyemediği için değerlendirilmeye alınamamıştır.

Çalışmamızda siyah ve bordo koloniler biyofilm pozitif, kırmızı, pembe ve beyaz koloniler biyofilm negatif olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.1). Yarı kantitatif değerlendirme yapılırken, besiyerinde oluşan koloni rengi siyah ise güçlü, bordo-siyah ise orta, bordo ise zayıf biyofilm olarak sınıflandırılmıştır. Tüm suşlar için 24 saat sonunda ön değerlendirme ve 48 saat sonunda asıl sonuç değerlendirilmesi yapılmıştır. Deney üç kez tekrar edilmiş ve elde edilen tüm sonuçlar birlikte değerlendirilerek testin tekrarlanabilirliği de kontrol edilmiştir. Tekrarlar arasında uyumsuzluk ortaya çıkmamıştır.

5.2 Mikroplakta XTT İndirgenmesi ile Biyofilm Varlığının Test Edilmesi

Biyofilm oluşumunun saptanması çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir diğer yöntem de mikroplakta XTT indirgenmesi ile biyofilm varlığının test edilmesidir. XTT ve MTT gibi tetrazolyum tuzları, ökaryot hücrelerin metabolik aktivitesinin araştırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır (121). Bu yöntemin avantajı, XTT'nin canlı hücrelerin metabolik aktivitesini gösterebilmesi ve ortamdaki planktonik hücreler uzaklaştırıldığında yalnızca biyofilm içindeki canlı hücrelerin tespitine olanak sağlamasıdır (122). Yalnızca canlı hücreler hedef molekülü yıkarak bir substrat açığa çıkarabildiklerinden, bu yöntem biyofilm yapımının ve biyofilm varlığında antifungal ilaç etkisinin

gösterilmesinde kullanılmaktadır. Yöntemin uygulanabilmesi için temel teknik beceriler gerekmede ve XTT maliyeti yüksek olabilmektedir. Ayrıca suş özelliklerine ve inokulum miktarına göre metabolizma hızında farklılık gözlemlendiği bildirilmiştir. Yine de hızlı, basit ve tekrarlanabilir bir yöntem olması nedeniyle avantaj sağlamaktadır (121). Yöntemin başka bir avantajı da değerlendirilmenin spektrofotometrik olarak yapılması sayesinde kişisel yorumlama farklılıklarının ortadan kaldırılmasıdır.

Biyofilm varlığında antifungal duyarlılık durumunun belirlenmesi için XTT yönteminin uygulaması özenli bir çalışma gerektirmektedir. Mikroplakta biyofilm oluşturma aşamasının ve farklı konsantrasyonda antifungal ilaçlarla inkübasyonun ardından yıkama yapılmaktadır. Bu aşamalarda biyofilmin bir kısmı ya da tamamının zarar görmesi hatalı sonuçlara yol açabilmektedir. İyi bir teknik uygulama ile bu sorunların aşılması mümkündür.

Bu çalışmada biyofilm yapımının incelenmesi için iki farklı yöntem uygulanmış ve XTT indirgenmesi yöntemi ile tüm suşlar biyofilm pozitif bulunurken, Kongo kırmızısı agar yöntemi ile 50 suşun yalnızca 12'sinde biyofilm yapımı saptanabilmiştir. Bu nedenle, Kongo kırmızısı agar yönteminin biyofilm varlığının saptanmasında duyarlılığının daha düşük olduğu sonucuna varılmış ve literatürdeki yayınlar incelenirken bu durumun göz önünde tutulması gerektiği düşünülmüştür. Ayrıca, XTT indirgenmesi yöntemi ile tüm suşlarda biyofilm varlığının gösterilmesi, üriner enfeksiyon gelişiminde, patojenin biyofilm yapma yeteneğinin hastada üriner kateter varlığından bağımsız olarak bir avantaj sağladığını düşündürmüştür. Mesane mukozasına tutunma aşamasında biyofilm yapımının avantaj sağladığını bildiren çalışmalar bunu desteklemektedir (123-126). Durumun tam olarak açığa çıkarılabilmesi için daha fazla sayıda suş ile yapılan çalışmaların yanı sıra üriner enfeksiyonların patogenezi araştıran çalışmalara da gerek bulunmaktadır.

5.3 Antifungal Duyarlılık Sonuçları

Çalışmamızda flukonazol, amfoterisin B ve mikafunginin duyarlılıkları hem planktonik hücrelerde hem de biyofilimli hücrelerde belirlenerek bu iki grubun sonuçları birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

5.3.1 Planktonik Hücrelerin Antifungal Duyarlılık Sonuçları

Candida türlerinde antifungallere intrinsik ve kazanılmış direnç gözlenebilmektedir. Ancak direnç oranları çoğu merkez için henüz düşük seyretmektedir. Garnocho – Montero ve ark.(127), 226 *Candida* izolatında Sensititre YeastOne yöntemi ile flukonazol duyarlılığını incelemiştir; 14 *C. glabrata*, 14 *C. krusei* ve iki *C.tropicalis* suşunu flukonazole dirençli bulmuşlardır. *C. krusei*'nin flukonazole doğal dirençli olduğunu belirterek, *C. krusei* dışındaki suşlarda hastanın daha önce flukonazol tedavisi almış olmasının flukonazole dirençli kandidemi gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir.

Özbek ve ark. (128), klinik örneklerden izole edilen toplam 55 adet *Candida* suşunda antifungal duyarlılığın VITEK-2 otomatize sistemi ile araştırdıkları çalışmada, amfoterisin B direnci gözlemediklerini, suşların %1.81'nde ise flukonazol direnci saptadıklarını rapor etmişlerdir.

Erdem ve ark. (129), toplam 114 klinik *Candida* izolatında antifungal duyarlılığı araştırmışlardır. *Candida* türleri, VITEK 2 Compact sistemi ile tanımlanmıştır. Amfoterisin B'ye üç adet *C. glabrata*, bir adet *C. albicans* ve bir adet *C. tropicalis* dirençli iken; flukonazole dört adet *C. glabrata* ve bir adet *C. albicans* doza bağlı duyarlı (MİK 16-32 µg/ml) olarak bildirilmiştir. Flukonazole doğal dirençli olan toplam üç adet *C. krusei* izolatı dışında flukonazole direnç rapor edilmemiştir.

Çalışkan ve ark. (130), kan kültürlerinden izole edilen toplam 58 adet *Candida* suşunu VITEK2 sisteminde tanımlayarak antifungal duyarlılıklarını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda bir *C. guilliermondii* suşu flukonazol ve amfoterisin B'ye dirençli bulunurken, iki *C. albicans* suşu amfoterisin B'ye, bir *C. glabrata* ve bir *C.tropicalis* suşu ise flukonazole orta derece duyarlı bulunmuştur.

Yüksekkaya ve ark. (131), yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların idrar kültüründen izole edilen toplam 56 adet *C.albicans*, *C. glabrata* ve *C.tropicalis* suşlarında antifungal duyarlılığı araştırmışlardır. Suşların hepsi amfoterisin B'ye duyarlı; flukonazole bir (%5.2) *C. glabrata* suşu dirençli, iki

(%10.5) *C. glabrata* ve bir *C.tropicalis* (%6.7) suşu ise doza bağlı duyarlı bulunmuştur.

Çalışmamızdaki tüm suşlar test edilen iki antifungale de duyarlı olarak, *C.glabrata* suşları ise doza bağlı duyarlı olarak belirlenmiştir (Tablo 4.7, Tablo 4.8, Tablo 4.9 ve Tablo 4.10).

Dünyada yapılan antifungal duyarlılık çalışmalarında direnç oranlarının oldukça düşük olduğu gözlenmektedir. Bu durumda *Candida* için türe özgü yeni direnç sınır değerlerinin kullanıma girmesinin de etkisi bulunmaktadır (112). Ülkemizde yapılan çalışmalarda, nadir de olsa antifungal dirence rastlanmıştır. Son yıllarda mantar hastalıklarının sıklığının giderek artması ve antifungal tedavi gereksiniminin yaygınlaşmasının, dirençli mantar suşlarının ortaya çıkmasında ve direnç oranlarının artmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (130, 131). Ayrıca, gerek amfoterisin B, gerekse flukonazol için ülkeler ve hastaneler arasındaki direnç oranlarındaki farkın, antifungal kullanımı ve enfeksiyonların kontrolündeki stratejilerin çeşitliliğinden kaynaklandığını öne sürülmüştür. İncelenen izolat sayılarındaki farklılıklar da bildirilen direnç oranlarını etkilemektedir. Bizim çalışmamızda hastaların antifungal kullanım verileri olmadığından, antifungal duyarlılık ve antifungal tedavi ilişkisi hakkında bir yorum getirilmemiştir.

5.3.2 Biyofilm Varlığında Antifungal Duyarlılık Sonuçları

Biyofilm varlığında MİK, tespiti Pierce' ın (74) geliştirdiği 96 kuyucuklu U tabanlı mikropklarda biyofilm oluşturulması yöntemine uygun olarak çalışılmıştır.

Flukonazol

Ramage ve ark. (122) flukonazolün *C.albicans* biyofilmlerinde etkisinin olmadığını, tüm suşların biyofilm varlığında flukonazole oldukça dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Chandra ve ark. (60), *C.albicans* biyofilmlerindeki flukonazol ve amfoterisin B etkinliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar polimetilakrilat şeritlerdeki XTT indirgenmesini saptayarak, antifungal etkinliği ölçmüşlerdir. *C.albicans* biyofilmlerinin, erken, olgun ve geç fazındaki MİK değerlerini saptayarak bu değerleri birbirleriyle kıyaslamışlardır. Buna göre biyofilmin erken fazı (6- 18 saat) için belirlenen flukonazol etkinliği 1 mg/ml iken, biyofilmin geç fazı (72 saat) için bu değer 128 mg/ml olarak bulunmuştur. Bu sonuç, biyofilmin ilk fazında fungal biyofilmlerdeki kompleks mimariyi oluşturan ve ilaç direncinin asıl etkeni olan maya-pseödohif ve gerçek hif gibi yapılar henüz oluşmadığı için antifungallerin daha etkin oldukları şeklinde yorumlanmıştır. Biyofilmin yapısı olgunlaştıkça (>18 saat) antifungallere direnç artmaktadır. Çalışmamızda yalnızca 24 saatlik biyofilmin direnç üzerine etkisi araştırılmıştır.

Chandra ve ark. (86) dental akrilik yüzeylerde oluşan *Candida* biyofilmlerinde sesil hücrelerde flukonazol için MİK değerini >64 mg/ml olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar hem planktonik hem de biyofilimli hücrelerde her ilaç için MİK-2 değeri üzerinden hesaplamalarını yapmışlardır.

Çalışmamızda da, beklenen şekilde, *Candida* biyofilmlerinde flukonazol etkinliğinin olmadığı gözlenmiş, biyofilm varlığında suşlara ait MİK50 ve MİK90 değerleri >64 µg/ml olarak bulunmuştur. Sadece iki suş için MİK değerleri 64 mg/ml'nin altında olmakla birlikte (bir *C.albicans* ve bir *C.tropicalis* için sırasıyla MİK=16µg/ml ve MİK=32 µg/ml) , tüm suşlar için tespit edilen MİK değerleri direnç sınır değerinden oldukça yüksek bulunmuştur. Flukonazole doğal dirençli olan *C.krusei* suşlarında bile biyofilm varlığında MİK değerlerinde artış saptanmıştır.

Biyofilm hücreleri üzerinde flukonazolün etkisinin olmadığı literatürde bildirilmiştir (58,83(78)). Flukonazol, bizim çalışmamızda kontrol amaçlı olarak dahil edilmiş ve sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur.

Amfoterisin B

Ramage ve ark. (122) amfoterisin B'nin etkinliğinin hem planktonik hem de sesil hücreler için türden türe ya da suştan suşa değişkenlik göstermekle birlikte, planktonik hücrelere etkinliğinin biyofilm içindeki hücrelere göre 1-32 kat daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Planktonik hücrelerden farklı olarak, biyofilimli hücrelerde tam öldürme gözlenmemiş ve etkinliğin karşılaştırılabilmesi için %80 inhibisyon sağlayan amfoterisin B konsantrasyonları belirlenmiştir.

Chandra ve ark. (60), *C.albicans* biyofilmlerindeki flukonazol ve amfoterisin B etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında, biyofilmin erken fazı (6-18 saat) için amfoterisin B'nin MİK değerini 0.5µg/ml bulurken, bu ilacın biyofilmin geç fazı (72 saat) için MİK değeri 8 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Chandra ve ark. (86) dental akrilik yüzeylerde oluşan *Candida* biyofilmlerinde antifungal direnci araştırdıkları çalışmalarında, sesil hücrelerde amfoterisin B'nin MİK değerini 8µg/ml olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar hesaplamalarını MİK-2 değerini üzerinden yapmışlardır.

Bizim çalışmamızda da amfoterisin B için literatürle benzer sonuçlar elde edilmiştir. Hiçbir suş için %100 inhibisyon gözlenmemiştir (Şekil 3.4). Bununla beraber, %80 inhibisyon sağlayan amfoterisin B konsantrasyonlarına bakıldığında, MİK₅₀ değerini 8 µg/ml, MİK₉₀ değerini ise >8 µg/ml olarak bulunmuştur.

Amfoterisin B'nin lipidli formları biyofilmlere daha etkili olabilmektedir (83). Çalışmamızda lipidli formlar test edilmemiş olmakla birlikte, klasik amfoterin B'nin de biyofilmlere kısmi etkisi gösterilebilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Üriner kateteri olan ve olmayan hastalardan izole edilen *Candida* suşlarında biyofilm oluşturma yeteneği arasında anlamlı fark bulunmamıştır.
2. Kongo kırmızısı agar yöntemi ekonomik açıdan uygun ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir. Ancak, değerlendirme öznel olabilmekte ve biyofilm oluşumunu saptamada yetersiz kalabilmektedir.
3. Mikroplakta XTT indirgenmesi yöntemi uygulama kolaylığı, iki saat gibi kısa bir sürede sonuç vermesi, sonuçların objektif olarak değerlendirilmesi ve tekrarlanabilir olması nedeniyle biyofilm varlığının saptanmasında uygun bir yöntem gibi görünmektedir. Ancak, maliyeti Kongo kırmızısı agar yöntemine göre daha yüksektir.
4. Merkezimizde idrar yolundan izole edilen ve çalışmaya alınan *Candida* suşlarında flukonazol ve amfoterisin B direncine rastlanmamıştır.
5. *Candida* biyofilmleri üzerinde flukonazolün etkili olmadığı gözlenmiştir. Bu durum literatürle uyumludur. *Candida* biyofilmleri ile ilişkili enfeksiyonlarda flukonazol kullanımının uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.
6. Amfoterisin B'nin *Candida* biyofilmleri üzerindeki etkisi suşa göre değişkenlik göstermektedir. Bu bulgular literatürle uyumludur. *Candida* biyofilmleri ile ilişkili enfeksiyonlarda amfoterisin B tedavisi yakın gözlem altında kullanılmalıdır. Çalışmamızda lipidli formların biyofilme etkisi test edilememiş olmakla birlikte, literatürde bu formların daha etkin olabildiği bildirilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Keçeli Özcan, S. (2007). Tıbbi gereçlerle ilişkili *Candida* biyofilm ve enfeksiyonları. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27, p. 589-600.
2. Kojic, E.M., Darouiche, R.O. (2004). *Candida* infections of medical devices. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), p. 255-67.
3. Richards, M.J., Edwards, J.R, Culver D.H, Gaynes, R.P. (1999). Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Pediatrics*, 103(4), p. e39.
4. Tenke, P., Kovacs, B., Jackel, M., Nagy, E. (2006). The role of biofilm infection in urology. *World Journal of Urology*, 24(1), p. 13-20.
5. Warren, J.W. (2001). Catheter-associated urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(4), p. 299-303.
6. Murray, P.R., Rosenthal, K.S and Tenover, M.A., (2013) *Medical Microbiology* (7th ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders.
7. Merz, W.G., Hay, R.J. (2005). *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections Medical Mycology* (10th ed.). London: Hodder Arrol ASM Press.
8. Asan, A. (2007). Tıpta önemli olan mantarların filogenetik ve sistematigi. *Türk İnfeksiyon Dergisi*, 21, p. 21-31.
9. Guarro, J., Gene, J., Stchigel, A.M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(3), p. 454-+.
10. Larone, D.H., (2011) *Medically important fungi A Guide to Identification*(5th ed.). Washington DC: ASM Press.
11. 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.

12. 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.
13. 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.
14. Soll, D.R. (2002). *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica*, 81(2), p. 101-110.
15. Mane, A., Pawale, C., Gaikwad, S., Bembalkar, S., Risbud, A. (2011). Adherence to buccal epithelial cells, enzymatic and hemolytic activities of *Candida* isolates from HIV-infected individuals. *Medical Mycology*, 49(5), p. 548-551.
16. Çerikçioğlu, N. (2012). Mantarlarda virülans faktörleri. *Ankem Dergisi*, 26, p. 261-269.
17. Hoyer, L.L., Green, C.B., Oh S.H, Zhao, X. (2008). Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Medical Mycology*, 46(1), p. 1-15.
18. Hoyer, L.L. (2001). The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*, 9(4), p. 176-80.
19. Khan, M.S.A., Ahmad, I., Aqil, F., Owais, M., Shahid, M., Musarrat, J. (2010). Virulence and pathogenicity of fungal pathogens with special reference to *Candida albicans*. *Combating Fungal Infections*.
20. Aoki, S., Ito-Kuwa, S., Nakamura, Y., Masuhara, T. (1990). Comparative pathogenicity of a wild-type strain and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. *Zentralbl Bakteriologie*, 273(3), p. 332-43.
21. Douglas, L.J. (1988). *Candida* proteinases and candidosis. *Critical Reviews in Biotechnology*, 8(2), p. 121-9.
22. Schaller, M., Borelli, C., Korting, H.C., Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, 48(6), p. 365-77.

23. Rossoni, R.D., Barbosa, J.O., Vilela, S.F., Jorge, A.O., Junqueira, J.C. (2013). Comparison of the hemolytic activity between *C. albicans* and non-albicans *Candida* species. *Brazilian Oral Research*, 27(6), p. 484-9.
24. Moors, M.A., Stull, T.L., Blank, K.J., Buckley, H.R., Mosser, D.M. (1992). A role for complement receptor-like molecules in iron acquisition by *Candida albicans*. *The Journal of Experimental Medicine*, 175(6), p. 1643-51.
25. Mayer, F.L., Wilson, D., Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), p. 119-28.
26. Soll, D.R. (1992). High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(2), p. 183-203.
27. 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.
28. 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.
29. Uludağ Atun, H., Şener, B. (2008). Biyofilm enfeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39, p. 82-88.
30. Swift, S., Throup, J.P., Williams, P., Salmond, G.P., Stewart, G.S. (1996). Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(6), p. 214-9.
31. Fuqua, W.C., Winans, S.C., Greenberg, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), p. 269-75.
32. Spoering, A.L., Gilmore, M.S. (2006). Quorum sensing and DNA release in bacterial biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 9(2), p. 133-7.
33. Dunne, W.M., Jr. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), p. 155-66.

34. Hogan, D.A. (2006). Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell*, 5(4), p. 613-9.
35. Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D., Tasto, J.J., Jahnke, B., Shoemaker, R. ve diğ. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), p. 2982-92.
36. Oh, K.B., Miyazawa, H., Naito, T., Matsuoka, H. (2001). Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), p. 4664-8.
37. Mosel, D.D., Dumitru, R., Hornby, J.M., Atkin, A.L., Nickerson, K.W. (2005). Farnesol concentrations required to block germ tube formation in *Candida albicans* in the presence and absence of serum. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), p. 4938-40.
38. Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), p. 881-90.
39. Percival, S.L., Knottenbelt, D.C. and Cochrane, C.A. (2011) *Introduction to Biofilms*, in *Biofilms and Veterinary Medicine*, Springer: Verlag Berlin Heidelberg
40. Heukelekian, H., Heller, A. (1940). Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth. *Journal of Bacteriology*, 40(4), p. 547-58.
41. Zobell, C.E. (1943). The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology*, 46(1), p. 39-56.
42. 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.
43. Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), p. 86-95.

44. 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.
45. Elder, M.J., Stapleton, F., Evans, E., Dart, J.K. (1995). Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye (Lond)*, 9 (Pt 1), p. 102-9.
46. Carpentier, B., Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), p. 499-511.
47. Tolker-Nielsen, T., Molin, S. (2000). Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microbial Ecology*, 40(2), p. 75-84.
48. Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), p. 167-93.
49. 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.
50. 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.
51. Finkel, J.S., Mitchell, A.P. (2011). Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2), p. 109-18.
52. Martins, M., Uppuluri, P., Thomas, D.P., Cleary, I.A., Henriques, M., Lopez-Ribot, J.L. ve diğ. (2010). Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia*, 169(5), p. 323-31.
53. Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), p. 1318-22.
54. Donlan, R.M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), p. 1387-92.
55. O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews of Microbiology*, 54, p. 49-79.

56. Tobudic, S., Kratzer, C., Lassnigg, A., Presterl, E. (2012). Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*, 55(3), p. 199-204.
57. 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.
58. Blankenship, J.R., Mitchell, A.P. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 9(6), p. 588-94.
59. 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.
60. Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, 183(18), p. 5385-94.
61. Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., Williams, C. (2012). Fungal biofilm resistance. *International Journal of Microbiology*, p. 528521.
62. 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.
63. Richard, M.L., Nobile, C.J., Bruno, V.M., Mitchell, A.P. (2005). *Candida albicans* biofilm-defective mutants. *Eukaryot Cell*, 4(8), p. 1493-502.
64. 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.
65. Ramage, G., Saville, S.P., Thomas, D.P., Lopez-Ribot, J.L. (2005). *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell*, 4(4), p. 633-8.
66. Brown, G.D., Denning, D.W., Levitz, S.M. (2012). Tackling human fungal infections. *Science*, 336(6082), p. 647.

67. Saint, S., Lipsky, B.A., Goold, S.D. (2002). Indwelling urinary catheters: a one-point restraint? *Annals of International Medicine*, 137(2), p. 125-7.
68. Douglas, L.J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11(1), p. 30-6.
69. 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.
70. Inweregbu K., Dave, J., Pittard, A. (2005). Nosocomial infections. *Critical Care and Pain*, 5, p. 14-17.
71. Douglas, L.J. (2002). Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 19(3), p. 139-43.
72. 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.
73. 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.
74. 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).
75. Oliveira, A., Cunha Mde, L. (2010). Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BCM Research Notes*, 3, p. 260.
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. Ramage, G. , Lopez-Ribot, J.L. (2005). Techniques for antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Methods in Molecular Medicine*, 118, p. 71-9.

78. Ramage, G., Vande Walle, K., Wickes, B.L., Lopez-Ribot, J.L. (2001). Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), p. 3234-40.
79. Cevahir, N., Demir, M., Mete, E., Kaleli, İ. (2003). (2003). *Candida* suşlarında farklı yöntemlerle slime üretiminin araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, 17(1), p. 67-70.
80. Hawser, S.P., Baillie, G.S., Douglas, L.J. (1998). Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 47(3), p. 253-6.
81. Tellier, R., Krajden, M., Grigoriev, G.A., Campbell, I. (1992). Innovative endpoint determination system for antifungal susceptibility testing of yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(8), p. 1619-25.
82. Hawser, S.P., Douglas, L.J. (1995). Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(9), p. 2128-31.
83. Kuhn, D.M., George, T., Chandra, J., Mukherjee, P.K., Ghannoum, M.A. (2002). Antifungal susceptibility of *Candida biofilms*: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), p. 1773-80.
84. Peeters, E., Nelis, H.J., Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72(2), p. 157-65.
85. Demirbilek, M., Timurkaynak, F., Can, F., Azap, Ö., Arslan, H. (2007). Hastane kaynaklı *Candida* türlerinde biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılık paternleri. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 41, p. 261-269.
86. Chandra, J., Mukherjee, P.K., Leidich, S.D, Faddoul, F.F., Hoyer, L.L., Douglas, L.J ve diğ. (2001). Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *Journal of Dental Research*, 80(3), p. 903-8.
87. Jabra-Rizk, M.A., Falkler, W.A., Meiller, T.F. (2004). Fungal biofilms and drug resistance. *Emerging Infectious Diseases*, 10(1), p. 14-9.

88. Khot, P.D., Suci, P.A., Miller, R.L., Nelson, R.D., Tyler, B.J. (2006). A small subpopulation of blastospores in *Candida albicans* biofilms exhibit resistance to amphotericin B associated with differential regulation of ergosterol and beta-1,6-glucan pathway genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), p. 3708-16.
89. LaFleur, M.D., Kumamoto, C.A., Lewis, K. (2006). *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(11), p. 3839-46.
90. Lafleur, M.D., Qi, Q., Lewis, K. (2010). Patients with long-term oral carriage harbor high-persister mutants of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), p. 39-44.
91. Kumamoto, C.A. (2005). A contact-activated kinase signals *Candida albicans* invasive growth and biofilm development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(15), p. 5576-81.
92. Mateus, C., Crow, S.A. Jr., Ahearn, D.G. (2004). Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9), p. 3358-66.
93. Mukherjee, P.K., Chandra, J., Kuhn, D.M., Ghannoum, M.A. (2003). Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infection and Immunity*, 71(8), p. 4333-40.
94. Alexander, B.D., Perfect, J.R. (1997). Antifungal resistance trends towards the year 2000. Implications for therapy and new approaches. *Drugs*, 54(5), p. 657-78.
95. CLSI, (2008) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition. CLSI Document M27-A3 (3th ed.). Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
96. Arendrup, M.C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., Hope, W., A. Eucast. (2012). EUCAST technical note on the EUCAST definitive

- document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clinical Microbiology and Infection*, 18(7), p. E246-7.
97. Tenke, P., Koves, B., Nagy, K., Hultgren, S.J., Mendling, W., Wullt, B ve diğ. (2012). Update on biofilm infections in the urinary tract. *World Journal of Urology*, 30(1), p. 51-7.
 98. Lam, T.B., Omar, M.I., Fisher, E., Gillies, K., MacLennan, S. (2014). Types of indwelling urethral catheters for short-term catheterisation in hospitalised adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 9, p. CD004013.
 99. Riedl, C.R., Witkowski, M., Plas, E., Pflueger, H. (2002). Heparin coating reduces encrustation of ureteral stents: a preliminary report. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19(6), p. 507-10.
 100. Lange, D., Elwood, C.N., Choi, K., Hendlin, K., Monga, M., Chew, B.H. (2009). Uropathogen interaction with the surface of urological stents using different surface properties. *Journal of Urology*, 182(3), p. 1194-200.
 101. Meyer, B. (2003). Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int Biodeterioration Biodegradation*, 51, p. 249-153.
 102. Bakır, M. (2002). Üriner kateter infeksiyonlarının önlenmesi ve tedavide temel prensipler. *Yoğun Bakım Dergisi*, 2, p. 106-115.
 103. Maki, D.G., Tambyah, P.A. (2001). Engineering out the risk for infection with urinary catheters. *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), p. 342-7.
 104. CDC. Urinary Tract Infection (Catheter-Associated Urinary Tract Infection [CAUTI] and Non-Catheter-Associated Urinary Tract Infection [UTI]) and Other Urinary System Infection [USI] Events. 2015.
 105. McCarter, Y.S., Burd, E.M., Hall, G.S., Zervos, M. (2009). Cumitech 2C, Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections. ASM Press: Washington, DC.

106. Kauffman, C.A., Vazquez, J.A., Sobel, J.D., ve diğerleri. (2000). Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases*, 30, p. 14-18.
107. Trofa, D., Gacser, A., Nosanchuk, J.D. (2008). *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), p. 606-25.
108. Harris, A.D., Castro, J., Sheppard, D.C., Carmeli, Y., Samore, M.H. (1999). Risk factors for nosocomial candiduria due to *Candida glabrata* and *Candida albicans*. *Clinical Infectious Diseases*, 29(4), p. 926-8.
109. Sobel, J.D., Kauffman, C.A., McKinsey, D., Zervos, M., Vazquez, J.A., Karchmer, A.W. ve diğ. (2000). Candiduria: a randomized, double-blind study of treatment with fluconazole and placebo. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. *Clinical Infectious Diseases*, 30(1), p. 19-24.
110. Uppuluri, P., Dinakaran, H., Thomas, D.P., Chaturvedi, A.K., Lopez-Ribot, J.L. (2009). Characteristics of *Candida albicans* biofilms grown in a synthetic urine medium. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12), p. 4078-83.
111. 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.
112. CLSI, (2012) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth International Supplement. CLSI document M27–S4. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute.
113. Fridkin, S.K., Jarvis, W.R. (1996). Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(4), p. 499-511.
114. Laupland, K.B., Bagshaw, S.M., Gregson, D.B., Kirkpatrick, A.W., Ross, T., Church, D.L. (2005). Intensive care unit-acquired urinary tract infections in a regional critical care system. *Crit Care*, 9(2), p. R60-5.

115. Padawer, D., Pastukh, N., Nitzan, O., Labay, K., Aharon, I., Brodsky, D ve diğ. (2015). Catheter-associated candiduria: Risk factors, medical interventions, and antifungal susceptibility. *American Journal of Infection Control*, 43(7), p. e19-22.
116. Moghadam, S.O., Pourmand, M.R., Aminharati, F. (2014). Biofilm formation and antimicrobial resistance in methicillin – resistant *Stapylococcus aureus* isolated from burn patients, Iran. *The Journal of Infection Developing Countries*, 8(12), p. 1511-1517.
117. Saxena, N., Maheshwari, D., Dadhich, D., Singh, S. (2014). Evalution 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.
118. 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.
119. Birinci, A., Çekiç Cihan, Ç., Bilgin, K., Acuner, Ç., Durupınar, B. (2005). *Candida* türlerinde slime üretiminin araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 35, p. 163-166.
120. Arslan, U., Fındık, D. (2003). Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virülans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in-vitro araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, 17(4), p. 471-481.
121. 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.
122. 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.

123. Lyman, C.A., Navarro, E., Garrett, K.F., Roberts, D.D., Pizzo, P.A., Walsh, T.J. (1999). Adherence of *Candida albicans* to bladder mucosa: development and application of a tissue explant assay. *Mycoses*, 42(4), p. 255-9.
124. Ganguly, S., Mitchell, A.P. (2011). Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, 14(4), p. 380-5.
125. Harriott, M.M., Lilly, E.A., Rodriguez, T.E., Fidel, P.L Jr., Noverr, M.C. (2010). *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology*, 156(Pt 12), p. 3635-44.
126. Dongari-Bagtzoglou, A., Kashleva, H., Dwivedi, P., Diaz, P., Vasilakos, J. (2009). Characterization of mucosal *Candida albicans* biofilms. *PLoS One*, 4(11), p. e7967.
127. Garnacho-Montero, J., Diaz-Martin, A., Garcia-Cabrera, E., Ruiz Perez de Pipaon, M., Hernandez-Caballero, C., Aznar-Martin, J. ve diğ. (2010). Risk factors for fluconazole-resistant candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(8), p. 3149-54.
128. Özbek, E., Tekay, F., Çolak Pirinççioğlu, H. (2012). Yoğun bakım hastalarına ait çeşitli örneklerden izole edilen *Candida* izolatlarında antifungal direnç. *Dicle Tıp Dergisi*, 39(2), p. 207-212.
129. Erdem, F., Tuncer Ertem, G., Oral, B., Karakoç, E., Demiröz, A.P., Tülek, N. (2012). *Candida* türlerine bağlı nozokomiyal enfeksiyonların epidemiyolojik ve mikrobiyolojik açıdan değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 46(4), p. 637-648.
130. Çalışkan, E., Dede, A., Biten Güven, G. (2013). Kan kültürlerinde saptanan *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *Ankem Dergi*, 27(1), p. 25-30.
131. 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.

EKLER

Ek 1. Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 88

24 Ocak 2014

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 22.01.2014 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2014/02
Proje No : GO 14/70 (Değerlendirme Tarihi 22.01.2014)
Karar No : GO 14/70 - 27

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr. Dolunay Gülmez KIVANÇ'ın sorumlu araştırmacı olduğu Hacer ASLAN'ın tezi olan GO 14/70 kayıt numaralı ve "Candida Türlerinde Biyofilm Oluşumu ve Antifungal Duyarlılığa Etikisi" başlıklı proje önerisi araştırmamızın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | | | |
|-----------------------------------|----------|--------------------------------------|-------|
| 1.Prof. Dr. Nurten Akarsu | (Başkan) | 9 Prof. Dr. Melahat Görduysus | (Üye) |
| İZİNLİ | | | |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken | (Üye) | 10. Prof. Dr. Cansın Saçkesen | (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. Yücedim Sara | (Üye) | 11. Prof. Dr. R. Köksal Özgül | (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu | (Üye) | 12. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan | (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer | (Üye) | 13 Doç. Dr. S. Kutay Demirkan | (Üye) |
| İZİNLİ | | | |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay | (Üye) | 14. Prof. Dr Leyla Dinç | (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Songül Vaizoğlu | (Üye) | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl | (Üye) |
| İZİNLİ | | | |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal | (Üye) | 16. Av. Meltem Onurlu | (Üye) |

ASLI GİBİDİR

Bilgisayar İşletmeni
Tülay ATAC
Hacettepe Üniversitesi
Etik Kurullar Sekreteri