



T.C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA*  
SUŞLARININ PLANKTONİK VE BİYOFİLM  
FORMLARINDA, MELATONİNİN ANTİFUNGAL  
DUYARLILIĞA ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ  
ÖZGE KILINÇEL

DÜZCE-2016





T.C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA*  
SUŞLARININ PLANKTONİK VE BİYOFİLM  
FORMLARINDA, MELATONİNİN ANTİFUNGAL  
DUYARLILIĞA ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ  
Dr. ÖZGE KILINÇEL

Prof. Dr. İDRİS ŞAHİN  
TEZ DANIŞMANI

DÜZCE-2016

## ÖNSÖZ

Mesleğine verdiği önem ile çalışma disiplini örnek aldığım, uzmanlık eğitimim ve tezime ilgili her konuda bana destek olan çok değerli hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. İdris ŞAHİN'e; uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, hiçbir zaman sevgisini esirgemeyen değerli hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. C. Elif ÖZTÜRK'e; bilgi ve tecrübelerinden faydalanma şansı bulduğum değerli hocam sayın Prof. Dr. Şükrü ÖKSÜZ'e; her konuda bilgisi ve sevgisiyle her zaman yanımda olan ve tezimin istatistiksel değerlendirmesinde yardımını aldığım hocam sayın Yard. Doç. Dr. Emel ÇALIŞKAN'a;

Asistanlığım süresince uyum içinde çalıştığım sevgili arkadaşım Dr. Nida AKAR başta olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma; laboratuvar ortamında birlikte anlayış ve huzur içinde çalıştığımız tüm biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma;

Hayatımın her aşamasında maddi, manevi destek ve sevgileriyle her zaman yanımda olan; bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan annem Şerife KUŞCU, babam Mustafa KUŞCU ve ablam Bilge VAREL'e;

Kendisini tanıdığım günden beri hayatımın her aşamasında ilgi ve özveriyle desteğini hep hissettiğim, yaşamı birlikte paylaşarak öğrendiğim, sevgi, sabır ve anlayışını benden eksik etmeyen sevgili eşim, hayat arkadaşım Mert KILINÇEL'e; varlığıyla bana mutlulukların en güzelini yaşatan canım oğlum Gökalp KILINÇEL'e sonsuz teşekkürler.

09.2016

Dr. Özge Kılınçel

## ÖZET

Son yıllarda, biyofilm varlığında antifungallere dirençli *Candida* türlerinin izolasyonunda belirgin biçimde artış olması, bu enfeksiyonların tedavisi için alternatif ajanların geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir.

Bu çalışmada, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarının planktonik ve biyofilm formlarında, melatoninin antifungal duyarlılığa etkisi araştırıldı. Suşların identifikasyonu germ tüp testi, Mısır unu-tween 80 agarda morfolojik değerlendirme ve otomatize sistem ile yapıldı. Modifiye mikropak yöntemi ile biyofilm formasyonu araştırıldı. Biyofilm oluşumu gözlenen suşlarda antifungal duyarlılığını belirlemek için planktonik formda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK, biyofilm formunda Calgary biyofilm yöntemi ile MBEK değerleri saptandı. Duyarlılık testleri melatonin varlığında tekrarlandı.

Çalışmaya dahil edilen 350 adet suşun % 64,8'i *C. albicans*, % 15,7'si *C. glabrata*, % 8,6'sı *C. tropicalis*, % 5,4'ü *C. parapsilosis*, % 5,5'i diğer türler (*C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*) olarak saptandı. Suşların % 9,7'sinde biyofilm oluşumu gözlendi; tür düzeyinde incelendiğinde *C. albicans*'ta biyofilm oluşumu % 2,6, Non-*albicans Candida* türlerinde ise % 22,7 olarak belirlendi.

Planktonik formda antifungal duyarlılığı araştırılan bütün suşlar, amfoterisin B MİK değeri  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/ml}$  olduğu için duyarlı olarak değerlendirilirken; *C. tropicalis* suşlarından biri flukonazole karşı doza bağımlı duyarlı, bir *C. albicans* suşu da vorikonazole karşı doza bağımlı duyarlı ve kaspofungine dirençli, birer adet *C. tropicalis* ve *C. kefyr* suşu ise kaspofungine karşı dirençli olarak tespit edildi.

Biyofilm formunda antifungal duyarlılığı araştırılan bütün suşlar, amfoterisin B MBEK değeri  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$  olduğu için dirençli olarak

değerlendirilirken; flukonazole suşların üçü doza bağımlı duyarlı (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*), diğerleri dirençli; vorikonazole sadece *C. guilliermondii* duyarlı, diğerleri dirençli; kaspofungine ise tüm suşlar dirençli olarak saptandı.

Antifungallerle melatonin kombine edilerek tekrar edilen antifungal duyarlılık testleri sonucu hem MİK hem de MBEK değerlerinde düşüş gözlemlendi. Ancak planktonik formda dirençli veya doza bağımlı duyarlı olan suşlar duyarlı hale gelirken, biyofilm formunda MBEK değerinde düşüş olsa da suşların direnç profilinde görülen değişiklik planktonik formlara göre daha az saptandı.

Sonuç olarak antifungal ajanlarla kombine edilmesi sonucu MİK ve MBEK değerlerinde görülen düşüş, melatoninin *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde yeni bir alternatif olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antifungal duyarlılık, biyofilm, *Candida*, melatonin.

## ABSTRACT

In recent years, significant increase in the isolation of the antifungal resistant *Candida* species in the presence of biofilm has made it mandatory to develop alternative agent for the treatment of these infections.

In this study the effect of melatonin to antifungal susceptibility in planktonic and biofilm forms of *Candida* strains which isolated from clinical samples that sent to Duzce University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology was investigated. The identification of the strains made with germ tube test, cornmeal-tween 80 agar morphological assessment and automated system. Biofilm formation was investigated with modified microplate method. MIC and MBEC values were detected with broth microdilution method for planktonic form and Calgary biofilm method for biofilm form, respectively to determine antifungal susceptibility of strains which biofilm formation was observed. Susceptibility tests were repeated in the presence of melatonin.

The species distribution of the 350 strains which included in the study 64,8% *C. albicans*, 15,7% *C. glabrata*, 8,6% *C. tropicalis*, 5,4% *C. parapsilosis*, 5,5% other species (*C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*) were determined. Biofilm formation was observed in 9.7% of the strains. Considering the species level biofilm formation reported in *C. albicans* was 2,6% while Non-*albicans Candida* species was 22,7% .

All strains which investigated antifungal susceptibility in planktonic form were susceptible to amphotericin B. One of the *C. tropicalis* strains was susceptible-dose dependent to fluconazole, one *C. albicans* strain was susceptible-dose dependent to voriconazole and resistance to caspofungin, one each *C. tropicalis* and *C. kefyr* strains were resistance to caspofungin.

All strains which investigated antifungal susceptibility in biofilm form were resistance to amphotericin B. Three of the strains (*C. albicans*, *C.*

*parapsilosis*, *C. guilliermondii*) were susceptible to fluconazole while other strains were resistance. Only *C. guilliermondii* was susceptible to voriconazole while others were resistance. All of the strains were resistance to caspofungin.

According to the repeated antifungal susceptibility tests presence of melatonin, both MIC and MBEC values were decreased. In planktonic form, resistance or susceptible-dose dependent strains became susceptible while in biofilm form even if MBEC values were decreased, strains resistance profile was changed less than planktonic form.

Consequently, the result of the combination of melatonin with antifungal agents decline in the value of MIC and MBEC suggests that melatonin is a new alternative in the treatment of *Candida* infections.

**Key Words:** Antifungal susceptibility, biofilm, *Candida*, melatonin.



# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfalar</u>
Önsöz .....	i
Özet.....	ii
İngilizce Özet (Abstract) .....	iv
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini .....	vii
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1. <i>Candida</i> .....	3
2.1.1. Tarihçe.....	3
2.1.2. Sınıflandırma.....	3
2.1.3. Genel özellikler.....	4
2.1.4. Hücre yapısı.....	5
2.1.5. Antijen yapısı.....	7
2.1.6. Boyanma özellikleri.....	7
2.1.7. Üreme özellikleri.....	8
2.1.8. Virulans faktörleri.....	8
2.1.9. Klinik önemi olan <i>Candida</i> türleri.....	15
2.1.10. <i>Candida</i> türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar.....	18
2.1.11. Laboratuvar tanısı.....	22
2.1.12. Antifungal ilaçlar.....	30
2.1.13. <i>Candida</i> türlerinde antifungal duyarlılık testleri.....	41
2.2. Biyofilm.....	43
2.2.1. Tanımı ve tarihçesi.....	43
2.2.2. Yapısı.....	45
2.2.3. Oluşum evreleri.....	46
2.2.4. Biyofilm-mikroorganizma ilişkisi.....	48
2.2.5. Biyofilm-hastalık ilişkisi.....	50
2.2.6. Quorum-sensing (Çoğunluğu algılama).....	51
2.2.7. <i>Candida</i> ve biyofilm.....	52

2.2.8. Biyofilm-antifungal direnç ilişkisi.....	55
2.2.9. Biyofilm varlığında antimikrobiyal duyarlılık testleri....	56
2.3. Melatonin.....	57
2.3.1. Melatonin sentezi ve kontrolü.....	57
2.3.2. Melatonin metabolizması.....	57
2.3.3. Melatoninin etki mekanizması.....	58
2.3.4. Melatoninin antioksidan etkisi.....	59
2.3.5. Melatonin ve immün sistem.....	59
2.3.6. Melatoninin antimikrobik etkisi.....	60
3. Gereç ve Yöntem.....	62
3.1. Suşların Seçimi ve Saklanması.....	62
3.2. İdentifikasyon.....	62
3.2.1. Germ tüp testi.....	62
3.2.2. Mısır unu-tween 80 agarda morfolojik değerlendirme	63
3.2.3. Otomatize sistem ile identifikasyon.....	64
3.3. Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi.....	65
3.3.1. Modifiye mikropalak yöntemi.....	66
3.4. Planktonik Formda Antifungal Duyarlılık Testi.....	67
3.4.1. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi.....	68
3.5. Biyofilm Varlığında Antifungal Duyarlılık Testi.....	71
3.5.1. Calgary biyofilm yöntemi.....	71
3.6. İstatistiksel Değerlendirme.....	74
4. Bulgular.....	75
5. Tartışma.....	92
6. Sonuçlar.....	110
7. Kaynaklar.....	112

## SİMGELER VE KISALTMALAR

BHIA: Brain-Heart İnfüzyon Agar

BHIB: Brain-Heart İnfüzyon Broth

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CBY: Calgary Biyofilm Yöntemi

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik Asit

EPS: Ekstrasellüler Polisakkarit

GMS: Gomori Metenamin Gümüş

KOH: Potasyum Hidroksit

MBEK: Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MMP: Modifiye Mikroplak Yöntemi

MTA: Modifiye Tüp Aderans

NaCl: Sodyum Klorür

OD: Optik Dansite

OD<sub>C</sub>: Cut-off

OFK: Orofarengeal Kandidoz

PAS: Periyodik Asit-Schiff

PBS: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su

PCR: Polymerase Chain Reaction

QS: Quorum Sensing

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

RNA: Ribonükleik Asit

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

Sap: Sekretuar Aspartik Proteinaz

SDA: Sabouraud Dextrose Agar

SDB: Sabouraud Dextroz Broth

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

SSS: Santral sinir sistemi

VVK: Vulvovajinal Kandidoz

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğada geniş bir yayılım gösteren, insan ve hayvanların normal vücut florasında kommensal olarak bulunan *Candida* türleri, insanlarda en sık enfeksiyona sebep olan fungal patojenler olup, son yıllarda tanı ve tedavi yaklaşımlarındaki gelişmelere paralel olarak gittikçe önem kazanmaya başlamışlardır (1). Ayrıca *Candida* türleri doku ve organ transplantasyonu gibi cerrahi girişimlerin sayısındaki artış, uzun süre ve fazla sayıda antibiyotik kullanımı, malign hastalıklar nedeniyle uygulanan immun sistemi baskılayıcı tedaviler, santral venöz kateter uygulaması, total parenteral beslenme gibi kolaylaştırıcı faktörlerin varlığında da önemli bir morbidite ve mortalite sebebi olabilen fırsatçı patojenler haline gelmişlerdir (2).

Son zamanlarda *Candida* enfeksiyonlarının patogenezi açıklamak ve *Candida* türlerine karşı yeni ilaç geliştirmek amacı ile yapılan çalışmalarda, konağa ait savunma sistemlerinin yanı sıra *Candida* türlerine ait virulans faktörlerinin de önemi belirtilmektedir. Yapılan çalışmalarda *Candida* enfeksiyonlarının patogenezi birçok virulans faktörünün birlikte rol oynayabileceği gösterilmiştir (3). Virulans faktörleri arasında; hif oluşumu, fenotipik ve genotipik değişim, dimorfizm, adezinler, bazı hidrolitik enzimler ve biyofilm oluşturabilme özellikleri sayılabilir (4). Özellikle biyofilm varlığında *Candida* türlerinin tedavisi oldukça zorlaşmaktadır. Çünkü biyofilm mikroorganizmaların fiziksel veya kimyasal etkilerle yüzeylerden kopmalarına engel olarak kolonizasyon oluşumuna, konak immun sistemine ve antimikrobik ajanlara karşı direnç geliştirmesine neden olmaktadır.

*Candida*ların ökaryotik hücre yapısında olmaları, bu etkenlerle oluşabilecek enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak ilaç sayısını sınırlandırmıştır. Son yıllarda artan antifungal ilaç seçeneklerinin çoğalmasına rağmen, bu ilaçların sınırlı etki spektrumları ya da ciddi toksik yan etkilerinin olması nedeniyle invaziv fungal enfeksiyonların tedavisi hala zordur ve yüksek mortalite oranları ile birlikte seyretmektedir (5). Ayrıca

biyofilm varlığında iyice zorlaşan *Candida* enfeksiyonunun tedavisi için yeni tedavi arayışları ön plana çıkmaktadır.

Pineal bezin başlıca salgısı olan melatoninin, endokrin ve sirkadiyen ritm üzerine bilinen etkilerinden başka, in vivo ve in vitro antioksidan etkiye ve immunmodulator özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Hatta antioksidanlar içerisinde, melatoninin en güçlü radikal tutucu olduğu öne sürüldüğünden, melatonine olan ilgi giderek artmaktadır (6). Melatoninin tüm bu özelliklerinden dolayı *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde yeni bir strateji olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarının planktonik ve biyofilm formlarında, melatoninin antifungal duyarlılığa etkisinin araştırılması; böylece biyofilm varlığında sorun haline gelen *Candida* enfeksiyonu tedavisi için yeni stratejiler geliştirilebilmesine yardımcı olmaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Candida*

#### 2.1.1. Tarihçe

*Candida* türlerinin keşfi ve isimlendirilme geçmişi antik Yunan'dan modern günümüz araştırmacılarına kadar uzanmaktadır (7). Ağızdaki pamukçuk lezyonları etiyolojik ajanı tanımlanmadan önce M.Ö. dördüncü yüzyıldan beri bilinmektedir ve bu lezyonların akciğerlerde invaziv olarak yerleşebildiğini de Rosen von Rosenstein 1771'de göstermiştir (8). Charles Cagniard-Latour, Friedrich Kützing ve Theodor Schwann 1836 -1838 yılları arasında mayaların yaşayan bir organizma olduğunu ve bunların mantar olarak tanımlanmasını savunmuşlardır (7). Emil Berg ise 1841'de pamukçuğun mantarlara bağlı olarak meydana geldiğini ortaya koymuştur. Robin 1847 yılında mantarı *Oidium albicans*, Zopf ise 1890'da *Monilia albicans* olarak adlandırmıştır. Roth Berkhout 1920'li yılların başında pamukçuk etkeni olan bu mikroorganizmanın bir *Monilia* türü olmadığını bildirerek jenerik ismi olarak *Candida*'yı önermiştir (9).

Antibiyotik kullanımının yaygınlaşması ve immunsupresyon geliştiren durumların çoğalması nedeni ile *Candida* enfeksiyonlarının sıklığının arttığı görülmüş ve konuyla ilgili çalışmalara ağırlık verilmiştir.

#### 2.1.2. Sınıflandırma

Heterojen bir cins olan *Candida* türlerinin tümü, Fungi aleminin *Phylum Ascomycota* içinde *Hemiascomycetes* sınıfında *Saccharomycetales* takımında *Candidaceae* ailesinde sınıflandırılmaktadır (10).

Bu cins yaklaşık 200 türden oluşur. Ancak bu sayı değişkendir. Yeni teknolojik gelişmeler taksonomiye de sürekli etkileyip bilinen türlerin yeniden adlandırılmasına ve yeni türlerin bulunmasına yol açmaktadır (11). Bunların % 65'inden fazlası 37 °C'de üreyememektedir. Bu nedenle *Candida*ların yaklaşık % 20'si insanlarda kommensal olarak bulunup enfeksiyona neden olmaktadır (8). Bu cins içerisinde *C. albicans*, enfeksiyonlarda en sık izole edilen türdür (11). 2003 yılına ait invazif kandidoz verilerine göre en az 16 farklı tür etken patojen olarak bildirilmiştir. Bunlar sırasıyla *C. albicans* (% 62), *C. glabrata* (% 12), *C. tropicalis* (% 7,5), *C. parapsilosis* (% 7,3), *C. krusei* (% 2,7), *C. guilliermondii* (% 0,8), *C. lusitaniae* (% 0,6), *C. kefyr* (% 0,5), *C. rugosa* (% 0,4), *C. famata* (% 0,3), *C. inconspicua* (% 0,3), *C. norvegensis* (% 0,1), *C. lipolytica* (% 0,08), *C. dubliniensis* (% 0,05), *C. zeylanoides* (% 0,03), *C. pelliculosa* (% 0,03) ve *C. ciferri* (% 0,02)'dir (12).

### 2.1.3. Genel özellikler

*Candida* cinsi mayalar tek hücreli, yaklaşık olarak 3-7 x 4-10 µm büyüklüğünde, oval, kitin ve selüloz içeren sert hücre duvarına sahip, tomurcuklanma (blastospor) veya fisyon ile üreyen, klorofilsiz ökaryot mikroorganizmalardır. İnce duvarlı, kapsülsüz, hareketsiz, Gram-pozitif, fakültatif anaerob mayalardır (13,14).

Maya formu dışında, kültür ve dokularda psödohif veya gerçek hif oluşturabilirler. Psödohifler tomurcuklanma sırasında meydana gelen uzantının ana hücreden ayrılmaması sonucu gelişir. Yeni hücre ana hücreye bağlı kalarak uzar ve filamentöz bir yapı oluşturur. *C. glabrata* hariç diğer türlerde, psödohif yapısı görülür. Gerçek hifler ise maya hücresinden veya hifin bir dalından oluşabilir; boğumlanma göstermez, apikal uzantı tarzında, bölmeli ve düzgün kenarlıdır (9,14). Germ tüp (çimlenme borusu), tavşan veya insan serumunda, 35 °C'de, iki - üç saat inkübe edildiğinde maya hücresinden köken alan, ana hücrenin üç - dört katı uzunluğunda ve yarısı kadar genişliğinde olan ve ana hücreyle arasında daralma bölgesi



bulunmayan filamentöz bir uzantıdır. *C. albicans* ve seyrek olarak izole edilen *C. dubliniensis*, *C. norvegensis*, *C. stellatoidea* ve *C. tropicalis*'in bazı kökenleri germ tüp ve gerçek hif oluşturma özelliğine de sahiptir (9,15,16).

Klamidospor kalın duvarlı, yuvarlak şekilli, içeriğinde yoğun protoplazma ve besin maddesi bulunan, hif içindeki hücrelerin büyümesiyle oluşan bir yapıdır (17). *C. albicans* ve *C. dubliniensis*, mısır unu-tween 80 (corn meal) agarda 26 °C'de 24-48 saat inkübasyondan sonra klamidospor oluşturmaktadır.

*Candida* türlerinin tümü glikozu fermente ederken; hiçbiri nitratı fermente etmez. Karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon özelliklerinin türlere göre farklılık göstermesi tanısal amaçlı kullanılır (Tablo 1) (11,16).

**Tablo 1.** Sık rastlanan *Candida* türlerinin karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon özellikleri (18).

Türler	ASİMİLASYON												FERMENTASYON						
	G	S	M	L	Gl	Ml	Sl	İ	K	R	T	D	G	M	S	L	Gl	T	Ü
<i>C. albicans</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. kefyr</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>C. lusitanae</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-

D: Dulsitol, G: Glukoz, Gl: Galaktoz, İ: İnositol, K: Ksiloz, L: Laktoz, M: Maltoz, Ml: Melibioz, R: Rafinoz, S: Sukroz, Sl: Sellobioz, T: Trehaloz, Ü: Üreaz.

#### 2.1.4. Hücre yapısı

Tipik ökaryot hücre yapısına sahip olan *Candida*'lar, sitoplazmalarında nükleolus, nükleer membran ve kromozomları içeren bir nükleus, mitokondri, 80S ribozom, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı gibi organeller, çeşitli maddeleri içeren vezikül ve vakuoller bulundurlar. Bu elemanlar hücrenin

çeşitli metabolik aktivitelerini, enerji üretimini, transport, replikasyon ve hücre yapısını oluşturan maddelerin sentezini gerçekleştirirler (19). Hücre yapısındaki mitokondriler diğer ökaryot hücrelere benzemekle birlikte hücre başına düşen mitokondri miktarı respiratuvar aktiviteye bağlı olarak değişmektedir (8).

Bu yapının önemli bir bileşeni olan çok katlı hücre duvarı, değişen ozmotik basınca karşı hücrenin şeklini korumasını sağlayan konak hücreleriyle ilişkide bulunan dinamik bir yapı olup; hücre kuru ağırlığının % 30'unu oluşturmaktadır. Elektron mikroskopik çalışmalara göre *Candida*'ların hücre duvarı en az 5 katmanlıdır. Bu tabakaların sayısı ve kalınlığı, üreme formuna (maya veya hif), üreme ortamına ve suşa bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (20). *Candida* türlerinin hücre duvarı, karbonhidratlar (% 80-90), proteinler (% 5-15) ve lipidler (% 2-5)' den oluşur. Karbonhidratların % 20-35' ini mannopteinler, % 50-65' ini  $\beta$ -glukan ve % 0,6-10' unu kitin oluşturur. Antijenik özelliğe sahip mannan ve  $\beta$ -glukan serolojik tanıda, mannan ise özellikle *C. albicans* serotiplendirmesinde kullanılır. Kitin, rijid ve çözülmeyen bir yapıya sahip olup hif oluşumunda ve hücre bölünmesinde önemli yapısal destek oluşturur. En dışta konak hücreye adezyonu sağlayan protein tabakası bulunur. Bu tabaka N-asetil glukozaminidaz, asit fosfataz ve enolaz gibi enzimler içerir (15,19,21). Birçok çalışma göstermiştir ki, hücre duvarının tabakalı yapısı, mannopteinlerin hücre duvarı yapısında değişik düzeylerde bulunmasından kaynaklanmaktadır. Diğer bir deyişle, tabakalanma, hücre duvarı bileşenlerinin ( $\beta$ -glukan, kitin ve mannan) her tabakada niteliksel olarak değil, nicelik olarak farklı oranlarda bulunmasından kaynaklanmaktadır (14,22).

Hücre membranı, duvar komponentlerinin sentezini gerçekleştiren kitin sentetaz, hücrenin morfogenezinde ve sinyal iletiminde gerekli olan fosfolipaz C, adenilat siklaz ve proteaz gibi enzimleri yapısında bulundurur. Membranda fosfatidil kolin, fosfatidil etanolamin, fosfatidil serin ve fosfatidil inozitol gibi fosfolipidlerin yanı sıra sterol de bulunur. Membran lipidlerinin % 20'sini

oluşturan sterolün en sık rastlanılan formu ergosterol olup antifungal maddelerin hedeflerinden birini oluşturur (16).

Hücre duvarı ve hücre membranı ile bağlantılı olan hücre iskeletinin yapısında bulunan mikrotübüller, membranın dinamizmini sağlarken, iskeletin diğer bir bileşeni olan aktin sitoplazmik akışkanlıktan, miyozin ise organellerin hareketliliğinden sorumludur (16).

### **2.1.5. Antijen yapısı**

Adsorbe antiserumlarla A (*C. tropicalis*'de de bulunur) ve B olarak iki *C. albicans* serotipi belirlenmiştir. Bu serotipler bağışıklığı sağlam bireylerde yaklaşık olarak eşit dağılım gösterirken; bağışıklığı bozulmuş hastalarda serotip B'nin prevalansı daha yüksektir (11). Ayrıca sekretuar proteazlar, immundominant enolaz ve ısı şok proteinleri gibi farklı antijenler de tanımlanmıştır (23). Diğer önemli antijenik determinantlar ise hücre duvarında bulunan mannan ve  $\beta$ -glukan gibi yüzey polisakkaritleri olmakla birlikte mannan daha spesifiktir.

### **2.1.6. Boyanma özellikleri**

Tüm *Candida* türleri Gram yöntemi ile Gram pozitif boyanırlar. Klinik örneklerin direkt olarak % 10-20'lik potasyum hidroksitle muamele edilmesini takiben hücre duvarındaki kitin ve selüloza nonspesifik olarak bağlanan kalkoflor beyazı kullanıldığında, hücreler ultraviyole ışık altında yeşilden maviye değişen renklere floresans verirler (11).

Histolojik kesitlerde ise Hematoksilen-Eozin ile zayıf boyanırken Periyodik asit-Schiff (PAS), Gomori metenamin gümüş (GMS) ve Gridley gibi mantar boyaları ile iyi boyanırlar (24).

### 2.1.7. Üreme özellikleri

*Candida* türleri oda ısısında (22-26 °C'de) ve 37 °C'de 24-48 saatte, sabouraud dextrose agar (SDA), brain-heart infüzyon agar (BHIA), % 5 koyun kanlı agar, triptik soy agar veya kromojenik agar gibi besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilirler. Kültür için alınan örnekler hem 26 °C'de hem de 37 °C'de ayrı ayrı inkübe edildiğinde 37 °C'de ürememe saprofitliği ortaya koyan bir özelliktir. Patojen *Candida* türlerinin çoğu hem 26 °C hem de 37 °C'de ürerler. Üretildikleri ortamda neme ihtiyaç duyarlar. Üreyebilmeleri için en iyi pH 4,5-5 arasında olmakla birlikte pH 3-7,5 aralığında da üreyebilirler. *Candida* türleri en iyi üremeyi aerobik ortamda göstermekle birlikte, yüksek karbondioksitli ortamda da zayıf olarak üreyebilirler. Türler arası morfolojik farklılıklar ancak, mısır unu-tween 80 agar gibi özel besiyerlerinde saptanabilir. Ayrıca mayaların üreyebilmesi için besiyeri ortamında glukoz, amonyum tuzu, fosfat, biotin ve serbest metallerin bulunması gerekmektedir (16).

Oda ısısında ve SDA besiyerinde 24-48 saatte krem renkli, opak, düzgün yüzeyli veya göbekli, 1-2 mm çapta, tipik maya kokusu olan, S tipi koloniler oluştururlar. *Candida* kolonileri, S formundan R formuna kendiliğinden dönüşebilir. R tipi kolonilerin oluşumu daha çok miçellerin miktarının artması ile ilgilidir. *C. albicans* kanlı agarda kenarlarında yıldızlı uzantıları olan koloniler oluşturur (14,25).

### 2.1.8. Virulans faktörleri

*Candida* türleri arasında virulans özellikleri bakımından belirgin farklılıklar mevcuttur. Diğer yandan yapılan çalışmalarda *C. albicans* kökenleri arasında da konağı hastalandırabilme derecesinde farklılıkların olabileceği yani virulans farklılıklarının varlığı ortaya konmuştur (26). Başlıca virulans faktörleri; germ tüp oluşturması, ekstrasellüler matriks proteinlerine adezyon, "slime" faktörü – biyofilm oluşumu, sideroforları kullanabilme özelliği, proteaz, fosfolipaz, hyaluronidaz, kondroitin fosfataz, kitinaz, esteraz

ve lipaz enzimleri, endotoksin benzeri aktivite, morfolojik dimorfizm, antijenik çeşitlilik, fenotipik değişim ve hücre duvar bileşenleri olarak sayılabilir (11). Bu virulans faktörleri *Candida* enfeksiyonlarının oluşmasında önemlidir. Ancak yapılan çalışmalarda fırsatçı mantar enfeksiyonlarında konağa ait faktörlerin ön plana çıktığı gösterilmiştir (27).

#### 2.1.8.1. Germ tüp

Enfekte dokularda *C. albicans*'ın hem maya hem de hif formu bulunsa da, hif şeklinin aktif semptomlu enfeksiyonlarla ilişkili olduğu, saprofit *C. albicans*'ın maya şeklinde olduğu, çimlenmekte olan miçelli hücrelerin daha virulan oldukları da belirtilmiştir. Germ tüp oluşturan hücrelerin dokuya blastosporlardan 50 kez daha fazla yapışması, plastik yüzeylere yapışmayı sağlayan fibriler yüzey tabakası oluşturmaları patogenez ve virulanstaki rolünü kanıtlayan bulgulardır (26). Bu morfolojik değişim yeteneği *Candida* türlerine avantaj sağlamaktadır. Nötrofillerin *C. albicans* blastosporlarını fagosite etme yeteneği germ tüp ve uzun hiflere göre daha iyidir (27).

#### 2.1.8.2. Adezyon

Önemli virulans faktörlerinden biri insan mukoza epiteline yapışma yeteneğidir. Kolonizasyonun oluşması için mayanın proliferasyonundan önce insan mukoza epiteline tutunması gerekmektedir. *Candida*'ların oral, vajinal ve intestinal epitel hücrelerine, fibronektine, endotele, trombosit fibrin pıhtılarına, akriliğe, lenfosit, endotel ve plastik materyale adezyonu patogenezde önemlidir (25).

Adezyon, hücrelerin yüzey özellikleri ile ilişkilidir ve mukokutanöz kandidozun bu yapışma ile başladığı kabul edilmektedir. Adezyon karmaşık bir işlem olup birden fazla adezinin ve birden fazla bağlanma mekanizmasının etkisi ile gerçekleşir. *Candida*'larda yapışma hücre duvarındaki mannan ve protein bileşenleri vasıtasıyla gerçekleşmektedir (28). Mantarın yapışmasını sağlayan diğer yüzey karbonhidrat yapıları  $\beta$ -glukan ve kitine karşılık; konakta bunların bağlanabileceği fukos, N-asetilglukozamin ve sialik asit gibi bağlayıcı yapılar vardır (27). Bu tabakanın

sentezinin yüksek oranda şeker, özellikle galaktoz içeren besiyeri kullanıldığı zaman, arttığı ve bu besiyerlerinde üreyen *C. albicans* kökenlerinin daha virulan olduğu ve epitel hücrelerine daha iyi bağlandığı saptanmıştır (29). *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* aderans özelliği en fazla olan türlerdir. Bu nedenle kolonizasyon gelişen hastalarda en sık izole edilen tür *C. albicans*'tir (27).

#### 2.1.8.3. Slime faktör ve biyofilm oluşumu

Biyofilm oluşumu pek çok *Candida* türü için güçlü bir virulans faktörüdür. *Candida* türlerinin yabancı cisimlere slime faktörü aracılığı ile tutunması sonucunda hem sürekli bir enfeksiyon odağı gibi rol oynaması hem de vücudun savunma mekanizmalarından ve antifungal tedavinin etkisinden kurtulabilmesi nozokomiyal mantar enfeksiyonları açısından önemli bir durumdur. Yapılan çalışmalarda biyofilm varlığının daha yüksek mortalite hızları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (30,31).

Farklı *Candida* türlerinin, hatta farklı *C. albicans* suşlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri farklıdır. *C. albicans* dışında *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* ve *C. glabrata* suşları da biyofilm oluşturabilmektedir (30). *Candida* biyofilminin saptandığı ve enfeksiyonlara yol açabildiği başlıca yabancı cisimler: Santral venöz kateterler, üriner kateterler, eklem protezleri, arteriyovenöz fistüller, periton diyaliz kateterleri, yapay kalp kapakçıkları, pacemakerlar ve ventriküloperitoneal şantlardır (31).

Ortamdaki artmış glukoz miktarının biyofilm oluşumunu hızlandırdığı görülmüştür. Özellikle intravenöz hiperalbuminasyon uygulanan hastalarda *C. parapsilosis*'in santral venöz katetere kolonize olma kapasitesinin artması ve kateter enfeksiyonlarına yol açması buna örnektir. Hafif akımın olduğu ortamlarda statik ortamlara kıyasla biyofilm oluşumu daha fazladır. Ayrıca, yüzeyin kimyasal yapısı biyofilm oluşum hızını etkilemektedir. Polivinil klorüre kıyasla lateks yüzeylerde daha fazla, poliüretan ve %100 silikon da ise azalmış olarak saptanmıştır (32).

#### 2.1.8.4. Siderofor üretimi

*Candida* türlerinin bir diğer virulans faktörü sideroforları kullanma yeteneğidir. Mantarlar üremeleri için demire ihtiyaç duyarlar. Demir eksikliği durumunda, demir şelatörü olarak bilinen düşük molekül ağırlıklı sideroforları üretirler. Böylece patojen özelliklerini artırmış olurlar (33). Yapılan çalışmalarda *C. albicans*'ın hem hidroksamat hem de fenolat tipi sideroforları ürettiği gösterilmiştir (34).

#### 2.1.8.5. Sekretuar aspartik proteinaz (Sap)

*Candida* türleri dokulara yayılmalarını kolaylaştıran enzimler salgırlar. Bu enzimlerden bir tanesi de proteinazdır. Asit pH'ta (pH: 2,5-4) aktivite gösteren bir enzimdir (29). Bir hücre dışı proteazı olan Sap'ın salgılanmasının on üyeden oluşan SAP adı verilen bir gen ailesi tarafından kontrol edildiği ortaya konmuştur. SAP gen ailesinin *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. dubliniensis* gibi patojen türlerde bulunması, *Saccharomyces cerevisiae* gibi patojen olmayan mayalarda bulunmaması patojenite ile ilgisini göstermektedir (35). Ayrıca hastalık örneklerinden alınan *Candida*'lardaki Sap üretiminin kolonizasyon suşlarına göre anlamlı şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir (36).

Sap enziminin temel işlevlerinden biri, konak proteinlerini parçalayarak nitrojen sağlamaktır. Bu enzimlerin konak hücre yüzey yapılarını ve hücreler arası yapıları parçalayarak mikroorganizmanın adezyon ile invazyonunda ve konak immun sistem hücrelerini parçalayarak konak savunmasından çıkışında rol aldığı bildirilmektedir. Keratin, kollojen, laminin, fibronektin, müsin gibi hücre dışı ve hücre yüzey proteinlerinin; albumin, laktoferrin, laktoperoksidaz,  $\alpha$ -makroglobulin, makrofaj enzimleri gibi konak savunma proteinlerinin ve immunglobulinlerin özellikle Sap 2 enzimi tarafından parçalandığı belirtilmektedir (37).

#### 2.1.8.6. Fosfolipaz

Dokulara yayılmayı kolaylaştıran bir diğer enzim olan fosfolipaz, konak hücre zarındaki fosfolipitleri hidrolize ederek hücreye zarar verir. Birçok canlıda zara bağlı veziküllerde bulunan bir enzimdir ve bu enzimin aktivasyonu ile yıkılan fosfolipitlerden lisofosfolipitler meydana gelir ve bunlar biyolojik membranların bütünlüğünün bozulmasına neden olur (29,38,39).

Fosfolipazlar, hidrolize ettikleri ester bağlarına özgül olarak A, B, C ve D olarak sınıflandırılırlar. Bu dört çeşit fosfolipaz enzimi ile birlikte daha ileri bir basamak olan lizofosfolipidleri de parçalayan lizofosfolipaz enzimi günümüzde farklı oranlarda farklı işlevlerde bulunmak üzere çeşitli hücrelerde bulunmaktadır. *C. albicans*'ın fosfolipaz aktivitesinde en önemli rolü fosfolipaz B'nin oynadığı düşünölmektedir (29,40).

Fosfolipaz aktivitesi en çok *C. albicans*'ta görölmekle birlikte, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* ve *C. krusei* türlerinde de bulunmaktadır (41). Özellikle kandan izole edilen suşların çoğunda fosfolipaz aktivitesi olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (29,40).

#### 2.1.8.7. Esteraz

İlk kez 1978 yılında Rudek, tween 80 opasite testi ile mayaların lipolitik aktivite gösteren esteraz enzimi salgıladığını göstermiştir (42). Ekstrasellöler esterazın fosfolipazdan farkı, sadece karbon kaynağı olarak tween 80 içeren bir ortamda aktive olmasıyla anlaşılmıştır. Ancak, indöklenebilir ekstrasellöler esterazın in vitro şartlarda üreme için mutlak gerekli olmadığı saptanmıştır (43). Stratum korneum tabakasında yüksek oranda bulunan triačilgliserol ve monoačilgliserolün, lipolitik enzimlerin aktivitesi ile parçalanması sonucu *Candida*'ların invazyonu ve kolonizasyonu kolaylaşmaktadır. Esteraz üretimleri incelendiğinde, türler arasında farklar olduğu, bu enzimin aynı zamanda üreme sürecinde de rol aldığı gösterilmiştir (44).



#### 2.1.8.8. Diğer enzimler

*Candida* turlerinde proteinaz, fosfolipaz ve esteraz başta olmak üzere, hyaluronidaz, kondroitin fosfataz, kitinaz, glukoamilaz, lipaz ve çeşitli glukolitik enzimler dokuya invazyonda rol alan önemli virulans faktörleridir (29,45).

#### 2.1.8.9. Toksinler

*C. albicans*'ın maya fazında endotoksin benzeri maddeler ve hemolizin ürettiği gösterilmiştir. Yüksek molekül ağırlıklı toksinler; glikoprotein toksinler ve kandidoksinlerdir. Glikoprotein toksinler, toksik bileşik olarak glikoz, mannoz gibi karbonhidratlar ve protein içeren maddelerdir (29). Yapılan bir çalışmada virulan bir *C. albicans* kökeninden izole edilen kandidoksinin hücre öldürücü ve enfeksiyon arttırıcı etkisinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca kandidoksin üreten bir *C. albicans* kökeninde düşük molekül ağırlıklı toksinler saptanmış bunların da altı çeşidinin olduğu gösterilmiştir (46).

#### 2.1.8.10. Fenotipik değişim

Fenotipik değişim sürecinde maya-hif değişiminden farklı olarak, aynı çevresel şartlar altında aynı popülasyondaki bazı hücreler birbirinden farklı fenotipler sergilerler. *C. albicans* kökenlerinde yüksek sıklıkta ( $10^{-2}$ - $10^{-3}$ ) fenotipik dönüşüm gözlenmektedir. Fenotipik değişikliklerin invazif enfeksiyon yapan kökenlerde, kommensal kökenlere göre daha sık olduğu saptanmıştır ve kökenin invazyon için optimal olan fenotipi seçtiği gözlenmiştir (47).

Bu değişim sonucunda bazı suşlarda beyaz-opak dönüşüm olarak adlandırılan varyant koloni morfolojileri ortaya çıkmaktadır. *C. albicans* WO-1 suşunda gözlenen yuvarlak tomurcuklanan hücrelerden oluşan beyaz kubbeli koloniden, büyük, uzun, asimetrik tomurcuklanan hücrelerden oluşan gri düz koloni haline dönüşüm en tipik örnektir (48). Yine bu değişim sonucunda düzgün yüzeyli (smooth) tipten, tüylü, düzensiz, yıldız, halka, noktalı ve şapka koloni fenotipleri ortaya çıkmaktadır (49). Klinik açıdan ele alındığında ise bu dönüşümün konak fizyolojisindeki değişimlere ve anatomik bölgeye

hızlı adaptasyonu, antifungal ilaçlara duyarlılığı, antijenisiteyi, nötrofil ve oksidanlara duyarlılığı, hayvan deneyleri sonuçlarına göre de virulansı etkileyebileceği düşünülmektedir (50).

#### 2.1.8.11. Hücre duvarı, yüzey değişimi ve hidrofobisite

Mikroorganizmaların ökaryotik hücelere bağlanması hücre-hücre ilişkisine dayanan bir olaydır. Genel olarak mikroorganizmalar da insan ve hayvan hücreleri gibi negatif yüzey potansiyeline sahip olduklarından, yaklaşan iki hücre aynı yüzey potansiyeline sahip olduğu için birbirlerini iterler. Ancak bu itme gücüne karşı spesifik ve nonspesifik olarak gelişen çekici kuvvetler vardır. Bu kuvvetlerden olan ve mikroorganizmaların yüzeyinde bulunan hidrofobik moleküller, nonspesifik olarak negatif yüklü iki yüzeyin itici kuvvetine karşı koyarak mikroorganizmaların mukoza hücrelerine yaklaşmalarını sağlarlar. Bunun sonucunda mikroorganizma yüzeyinde bulunan ligandlar, mukoza hücresi yüzeyinde bulunan reseptörlere irreversibl olarak aynen antijen-antikor ilişkisine benzer şekilde spesifik olarak bağlanırlar (29,40).

Mayanın hücre duvarı ve zarının virulans ile ilgili en önemli işlevi adezyonda oynadığı roldür (29). *C. albicans*'ın yüzeyinde bulunan, epitel ve endotel hücrelerine bağlanmada rol oynayan ligand hücre duvarı moleküllerinden olan mannopteindir (51). Mannoprotein immunomodülatör etkili molekül olup, antijen olarak konağa sunulur. Germ tüp oluşumu döneminde hücre yüzey hidrofobisitesi etkilenir ve *C. albicans*'ın plastik yüzeylere ve epitel hücrelerine bağlanma yeteneği artar (4).

*C. albicans* suşları yüzey özelliklerine göre iki gruba ayrılırlar: 1. Grup: Besiyerindeki yüksek şeker konsantrasyonuna bağlı olarak mayanın çeşitli hücre ve yüzeylere bağlanmasını ve virulansını artıracak şekilde yüzey kompozisyonunu değiştirebilen suşlardır. Karbonhidratlardan zengin diyetle beslenen kişilerde oral kandidoz gelişmesi bu şekilde açıklanabilir. 2. Grup: Yüzeyini değiştirme özelliğini tamamen kaybetmiş olan suşlardır ve bunlar çok düşük patojenik potansiyele sahiptir (52,53).

### 2.1.9. Klinik önemi olan *Candida* türleri

#### 2.1.9.1. *Candida albicans*

Gastrointestinal sistem, vajina ve ağız boşluğunun normal flora üyesi olan *C. albicans* tüm kandidozlarda klinik örneklerden en sık izole edilen türdür (11). Sahip olduğu hidrolitik enzimleri ve maya-hif dimorfizmi nedeniyle virulansı yüksek bir mikroorganizmadır (54). SDA'da düzgün, krem-beyaz renkli; bazen geniş-pürtüklü, gri renkli koloniler oluşturur. Kanlı agarda yıldız şeklinde çıkıntıları olan koloniler meydana getirir. Serumda 37 °C'de iki-üç saatte ana hücreden orijin alan ve başlangıç noktasında bir boğumlanma veya daralma yapmaksızın birbirine paralel duvarlar tarzında hifal uzantılar gösteren germ tüp oluşumu ve Mısır unu-tween 80 agarda 25 °C'de 72 saatte oluşturduğu blastospor, psödohif ve bazende gerçek hif ve büyük, kalın duvarlı, genellikle bir adet terminal klamidospor yapıları diğer türlerden ayrılmasında kullanılan morfolojik özelliklerindedir (16,24,55).

#### 2.1.9.2. *Candida tropicalis*

*C. tropicalis*, özellikle hematolojik malignitesi olan nötropenik hastalarda kandidemi etkeni olarak izole edilebilen; ayrıca akut, subakut ve kronik enfeksiyonlara yol açabilen bir türdür (56,57). SDA'da krem renginde, yumuşak ve miçelyal koloniler oluşturur. Mısır unu-tween 80 agarda 25 °C ve 72 saatte psödohifler ve bunların etrafında tek tek bazen kümeler halinde blastokonidyumlar ile gözyaşı damlası tarzında bir görüntü oluştururlar (55). Germ tüpe benzeyen ancak ana hücreden çıktığı yerde boğumlanma gösteren ve hifal yapıların duvarlarının birbirine paralellik göstermediği yalancı germ tüp benzeri yapılar gözlenebilir. Klamidospor oluşturmamalarına rağmen bazı türlerin tekrarlayan pasajlarda kaybolan klamidospor benzeri yapılar meydana getirdikleri gözlenmiştir (56,57).

#### 2.1.9.3. *Candida parapsilosis*

Kandidemilerin ve kateter ilişkili enfeksiyonların önemli bir etkeni ve aynı zamanda sağlık personelinin ellerinden en sık izole edilen *Candida*

türüdür (57). Yapılan çeşitli sörveyans çalışmalarında *C. parapsilosis* türünün izolasyon oranlarının son 20 yılda artış gösterdiği saptanmıştır (11,17,21,24). SDA'da krem rengine, yumuşak koloniler oluşturur. Mısır unu-tween 80 agarda 25 °C ve 72 saatte uzun, düzenli olarak dallanan kıvrık psödohifler, bunun etrafında tek tek bazen kümeler yapan blastokonidyumlar ve arada dev hücrelerin bulunması ile karakterizedir (55).

#### 2.1.9.4. *Candida glabrata*

Özellikle nozokomiyal kandidemi ve *Candida* türlerine bağlı gelişen genitoüriner sistem enfeksiyonlarında *C. albicans*'tan sonra en sık saptanan ikinci etkindir. Azol grubu antifungal maddelere karşı kazanılmış ve intrinsek direnci olan. *C. glabrata* türlerinin görölme sıklığı giderek artmaktadır (21,58,59). SDA'da krem rengine, yumuşak kıvamlı, S tipi düzgün koloniler oluşturan; küçük, oval, tek tomurcuklu mayalardır. Mısır unu-tween 80 agarda 25 °C ve 72 saatte, psödohif ve gerçek hif oluşturamamaktadır (12,55,56).

#### 2.1.9.5. *Candida dubliniensis*

İlk kez 1995'te yeni bir tür olarak tanımlanan *C. dubliniensis*, fenotipik açıdan *C. albicans* ile çok benzer yapıda olup sadece moleküler gen analizleriyle kesin ayırım yapılabilir (10). SDA'da hamur kıvamında, krem renkli düzgün yüzeyli koloniler oluşturur. Mısır unu-tween 80 agarda oluşturduğu psödohif, hif ve septalarda kümelene miş blastospor yapıları ile germ tüp oluşturma özellikleri *C. albicans* ile büyük benzerlik taşır. Klamidospor yapıları incelendiğinde *C. albicans*'ın uç kısımda kalın çeperli, tek ya da nadiren çiftler halinde klamidosporlar oluşturduğu; *C. dubliniensis*'in ise ince duvarlı, bol miktarda ikili, üçlü, grup ya da zincir halinde klamidosporlar oluşturduğu gözlenmiştir. Bu türü *C. albicans*'tan ayıran diğer özellikler ise; 45 °C'de üreyememesi, ksiloz ve  $\alpha$ -metil-D-glukozu asimile etmemesidir (55). Oral floranın elemanlarından olan *C. dubliniensis* özellikle AIDS hastalarında oral kandidoz etkeni olarak tespit edilmektedir (10).

#### 2.1.9.6. *Candida krusei*

İmmüsuprese hastalarda önemli bir kandidoz etkeni olan *C. krusei*, SDA'da yassı, kuru, donuk ve krem renginde miçelyal koloniler oluşturur. Mısır unu-tween 80 agarda 25 °C ve 72 saatte psödohif ve üzerinde ağaca benzer dizilimli uzun blastokonidyumlar oluşturur. Bazı kökenleri üreaz pozitif olan bu türün önemli bir özelliği de flukonazole doğal dirençli olmasıdır (11,55).

#### 2.1.9.7. *Candida lusitanae*

*C. lusitanae* ağır fungemi olgularından izole edilebilen bir türdür (60). SDA'da krem renginde, yumuşak, parlak S tipinde koloniler oluşturur. Mısır unu-tween 80 agarda 25 °C ve 72 saatte psödohif, az sayıda, dallanmış ve uzun blastokonidyumlar gözlenir (55). Başta amfoterisin B olmak üzere, birçok antifungale dirençlidir (60).

#### 2.1.9.8. *Candida guilliermondii*

Önceden geçirilmiş kardiyovasküler ve abdominal cerrahi, *C. guilliermondii* kaynaklı kandidemi gelişebilmesi için önemli risk faktörleridir (12). SDA'da beyaz-krem renginde tereyağımsı görünümde koloniler oluşturur. Mısır unu-tween 80 agarda az sayıda kısa ve ince psödohifler ve bunların boğumları üzerinde küçük blastokonidyumların oluşturduğu kümeler bulunur. Gerçek hif oluşturmaz (55). Flukonazole karşı azalmış duyarlılık göstermektedir (62).

#### 2.1.9.9. *Candida kefyr*

Nadiren patojen olan tür, özellikle hematolojik malignitesi olan hastalarda enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (62). SDA'da krem renginde, S tipinde koloniler oluşturur. Mısır unu-tween 80 agarda 25 °C ve 72 saatte psödohif ve tipik görünümü "ırmakta yüzen kütükler" olarak adlandırılan birbirine paralel uzanan blastokonidyumlar meydana getirir (55).

### 2.1.10. *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar

Gastrointestinal sistem, vajina, üretra ve derinin normal flora elemanı olarak bulunan *Candida* cinsi mayalar, mukozal kolonizasyondan, multiorgan tutulumuna kadar geniş bir yelpazede yer alan enfeksiyonlara neden olabilirler.

Kemoterapotik ilaç ve kortikosteroid kullanımı, maligniteler, nötropeniye yol açan durumlar, diyaliz, AIDS, ileri yaşlar ve yenidoğanlar, kötü beslenme alışkanlığı gibi konağın immun sistemini baskılayan faktörlerle birlikte, mevcut kolonizasyon, kateterizasyon gibi girişimsel işlemler, geçirilmiş cerrahi, yanık, hastanede ve yoğun bakım ünitelerinde yatış gibi durumlar *Candida* enfeksiyonlarının oluşmasına zemin hazırlamaktadır (24).

Yüzeyel enfeksiyonlar daha çok toplum kökenli enfeksiyonlar olduğu halde, derin yerleşimli sistemik enfeksiyonlar en sık yoğun bakım ünitelerinde olmakla birlikte hastanede diğer servislerde yatan hastalarda da sık görülmektedir (2).

#### 2.1.10.1 Yüzeyel enfeksiyonlar

a) Deri ve tırnak kandidozu: Klinik prezentasyon intertrigo, diaper döküntüsü, onikomikoz ve paronişi şeklindedir (10,16,21). En sık izole edilen etkenler *C. albicans* ve *C. parapsilosis*' tir (63). Tedavide ilk seçenek ilaçlar topikal azol preparatlarıdır (64,65).

b) Orofarengeal kandidoz (OFK): Diyabet, malignite varlığında, CD4 hücre sayısı <200/μl olan AIDS hastalarında, yenidoğan ve yaşlılarda sağlıklı yetişkinlere oranla daha sık görülmektedir. Ayrıca geniş spektrumlu antibiyotik, steroid ve sitotoksik ilaç kullanımı, radyasyon tedavisi diğer tetikleyici faktörlerdir (63,66). En sık rastlanan etken *C. albicans* olup bunu daha seyrek olarak *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. dubliniensis* izlemektedir (16). Klotrimazol, topikal nistatin veya amfoterisin B süspansiyonları, oral flukonazol, itrakonazol, posakonazol ve vorikonazol, tedavide kullanılan antifungal ilaçlardır (10,16,65).

c) *Candida* özofajiti: İmmun sistemi baskılanmış kişilerde gelişen bir klinik durumdur. Etken türlerin dağılımı OFK'de olduğu gibidir (10,16). Tedavide ilk olarak azol grubu antifungallerin, dirençli vakalarda ise amfoterisin B ve ekinokandin grubu ilaçların sistemik şekilde kullanılması tercih edilir (10,65).

d) Vulvovajinal kandidoz (VVK): Oral kontraseptif, antibiyotik ve kortikosteroid ilaç kullananlarda, gebeler ve diyabetli hastalarda gelişir. Bu klinik durumda en sık etken olarak *C. albicans* izole edilir, bunu *C. glabrata* ve diğer türler izler (16,21). Tedavide öncelikli olarak azol türevleri ve nistatin tercih edilir (10,59,67). Azol türevi antifungallere yanıt vermeyen, VVK'larda flusitozin veya amfoterisin B tedavisi uygulanabilir (59,65,67).

e) Kronik mukokütanöz kandidoz: Konjenital endokrinopatiler veya hücrel immün sistemin bozulması sonucu erken çocukluk yaşlarında ortaya çıkan, orofarenks, cilt ve tırnakların kronik seyirli, tedaviye dirençli, yüzeysel *Candida* enfeksiyonlarıdır (16,66).

#### 2.1.10.2. İnvazif enfeksiyonlar

Sistemik kandidoz en sık uzun süreli kortikosteroid veya başka immunosüpresif ilaç kullanan; lösemi, lenfoma ve aplastik anemi gibi hematolojik hastalıkları olan ve kronik granülomatöz hastalıklı kişilerde görülür (68).

a) Kandidemi: İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının yaklaşık % 50-70'ini oluşturan kandidemiler, klinik olarak enfeksiyon bulgu ve belirtileri gözlenen hastanın en az bir kan kültüründe bir *Candida* türünün izole edilmesi olarak tanımlanır (69,70). Ancak, genel durumu düşkün, üremik veya kortikosteroid tedavisi alan hastalarda klinik belirti ve bulgu olmadan da kandan bir *Candida* türünün izole edilmesi anlamlı kabul edilmelidir (71).

Yoğun bakım ünitesinde uzun süreli yatış, intravenöz veya üriner kateterizasyon, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve bunun sonucu gelişen kandida kolonizasyonunda artış, radyoterapi ve kemoterapiye bağlı

mukozit, özellikle abdominal-üst gastrointestinal sistem cerrahisi, ciddi yanıklar, hemodiyaliz, transplantasyon, nötropeni, diyabet, kanser, AIDS gibi hastalıklara sahip olmak, prematürite ve düşük Apgar skoru invazif kandidozun gelişmesinde rol oynayan risk faktörleridir (10,21,72).

Nozokomiyal kandidemili hastalarda yapılan bir çalışmada en güçlü risk faktörü olarak uygulanan antibiyotik sayısı saptanmıştır. Üçten fazla antibiyotik alanlarda kandidemi riski hiç antibiyotik almayan veya en fazla iki antibiyotik alanlara göre 12,5 kat yüksek bulunmuştur (73).

*C. albicans* kandidemi etyolojisinde en sık izole edilen etkindir. ABD'de *C. glabrata*, Avrupa'da *C. tropicalis* veya *C. parapsilosis* ikinci sıklıkta izole edilen etkenlerdir. *C. tropicalis* kandidemileri daha çok nötropeni ve mukoziti olan, özellikle flukonazol profilaksisi almamış olan hastalarda görülmektedir. *C. glabrata* flukonazolün profilakside kullanıldığı hastalarda ve yaşlılarda artan sıklıkta görülmekte ve bu türe bağlı enfeksiyonlar daha ağır ve ölümcül seyretmektedir. *C. parapsilosis* daha çok deri ve mukozadan kaynaklanan kandidemiye yol açmaktadır. *C. krusei*'ye bağlı kandidemiler daha çok hematolojik malignitesi olanlarda ve/veya kemik iliği ve kan alıcılarında, özellikle flukonazol profilaksisi uygulanan hastalarda görülmektedir (74).

b) Üriner sistem enfeksiyonları: İdrar örneklerinde *Candida* cinsi mayaların izole edilmesi kontaminasyon, kolonizasyon veya enfeksiyon olarak yorumlanabilir. Kontaminasyon ihtimali kadınlarda daha yüksektir ve çoğu zaman örneğin uygun, orta akım idrarı şeklinde alınamamasından kaynaklanır. Uygun şekilde alınacak ikinci bir örneğin değerlendirilmesiyle bu sorun aşılabilir (21,75).

Üriner sistem kateterizasyonu, uzun süre hastanede özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatış, gebelik, kadın cinsiyet, ileri yaş, yenidoğanlar, diyabet, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, immunosupressif tedavi, üriner sistem anomalileri ve obstrüksiyonları *Candida* enfeksiyonu için risk



faktörleridir (16,24,59,76). Üriner sistem kandidozlarında en sık izole edilen tür *C. albicans*'tır ve bunu *C. glabrata* ve *C. tropicalis* takip eder (10,59).

Sistit ve piyelonefrit tedavisinde duyarlı suşlarda oral flukonazol, flukonazol direnci olanlarda ise flusitozin ve amfoterisin B kullanılır. *C. glabrata*, *C. krusei* gibi flukonazol dirençli suşların etken olduğu sistit olgularında amfoterisin B ile mesane irrigasyonu yararlı olabilir (10,65,75,76).

c) *Candida* endokarditi: *Candida* türlerine bağlı kalp tutulumunun çoğu, hematojen yolla protez veya hasar görmüş bir kalp kapağına, miyokarda veya perikardiyal boşluğa etkenin yerleşmesi sonucu ortaya çıkar. Endokardit için risk faktörleri intravenöz ilaç bağımlılığı ve santral venöz kateterizasyondur. Eroin bağımlılarında *C. parapsilosis* en yaygın etkindir (24).

d) Pulmoner kandidoz: *Candida*, solunum sistemini, mukozal membranın kolonizasyonu ve derin dokuların invazyonu yoluyla etkileyebilir. Başlıca immunsuprese hastaları etkiler ve sıklıkla fatal sonuçludur. Pnömoni genellikle hematojen yayılıma sekonder gelişmektedir. *C. albicans* ve *C. parapsilosis* pulmoner kandidozda en sık izole edilen etkenlerdir (77).

e) Santral sinir sistemi (SSS) kandidozu: Mantarların etken olduğu SSS enfeksiyonları ciddi mortalite sebebi olup, *Candida*'lar en sık akut menenjit ve beyin absesi olgularında etken olarak izole edilirler. Özellikle hematolojik malignite, solid organ transplantasyonu, kortikosteroid kullanımı, travma gibi risk faktörlerinin varlığı SSS'e yayılım ya da direkt temas sonrası hastalık tablosunun gelişmesi için kolaylaştırıcı faktörlerdir (78).

f) Oküler kandidoz: Korneanın inflamatuvar tutulumu sonucu gelişen keratitte en sık maya mantarı etkeni *Candida*'lardır. Risk faktörleri korneal travmalar, immunsupresyon, kortikosteroid ve kontakt lens kullanımıdır. Gözün retina, koroid yapı, vitröz ve ön kamara gibi tüm yapılarının etkilendiği endoftalmit, ekzojen ve endojen endoftalmit olarak iki farklı klinik şekilde görülür. Ekzojen endoftalmit travma ya da cerrahi sonrası gelişirken, endojen

endoftalmit daha çok sistemik bir hastalığın göz komplikasyonu olarak örneğin sistemik kandidoza sekonder karşımıza çıkar (79).

g) Kemik ve eklem kandidozu: Osteomyelit; genellikle *Candida*'nın hematojen yayılımı sonucu ortaya çıkabilen klinik bir durum olup özellikle kanser hastaları ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerde daha fazla görülür (16). Vertebral osteomyelit sık görülen bir tablodur, lokal ağrı ve hafif ateş vardır (24).

*Candida* artriti; hematojen yayılım, travma, cerrahi girişim, eklem içi steroid enjeksiyonu ve eroin kullanımının bir komplikasyonu olarak oluşabilir. En sık lösemi hastalarında görülür (25). Genellikle omuz, diz gibi büyük eklemler tutulur (16).

h) *Candida* peritoniti: *Candida* peritoniti kronik periton diyalizi koşullarında ya da gastrointestinal cerrahi sonrası anastomoz sızıntısı veya bağırsak perforasyonunda ortaya çıkar. Bu enfeksiyonlar batında lokalize kalabilir, komşu organları tutabilir veya hematojen yayılabilir (24).

#### **2.1.11. Laboratuvar tanısı**

*Candida* enfeksiyonlarının doğru laboratuvar tanısı için incelenecek örneklerin uygun koşullarda alınması, saklanması ve gönderilmesi öncelikli olarak dikkat edilmesi gereken hususlardır (11,80).

*Candida* enfeksiyonlarının tanısı amacıyla incelenecek örnekler arasında kan, beyin omurilik sıvısı (BOS), idrar, steril vücut boşluklarından alınan sıvı, solunum yolu, doku biyopsisi, ağız ve vajinal sürüntü örnekleri ile, deri, tırnak ve saçtan alınan kazıntı örnekleri sayılabilir (11,80). *Candida*'lar, normal cilt florasında yer aldıkları ve birçok örnekten izole edilebildikleri için tek başına *Candida* izolasyonu, enfeksiyon tanısı koydurmaz. Enfeksiyon kolonizasyon ayrımı için mutlak klinik, histopatolojik ve radyolojik bulgularla birlikte değerlendirilmelidir (81).

#### 2.1.11.1. Direkt mikroskopik inceleme

Mantar enfeksiyonlarının saptanmasında çabuk ve etkili bir yöntemdir ancak cins ve tür düzeyinde kesin tanımlama yapılamaz. Direkt inceleme %10-30'luk potasyum hidroksit (KOH) ile boyasız preparat hazırlanarak veya Gram, metilen mavisi, Wright, Giemza, kalkoflor beyazı, PAS, GMS gibi boyalar kullanılarak hazırlanan preparatlar ile yapılır (82).

KOH dokulardaki proteinli maddeleri sindirirken, mantar hücrelerine zarar vermez. Kalkoflor beyazı ise hücre duvarındaki kitine bağlanarak oluşturduğu parlak yeşil floresans sayesinde KOH ile birlikte kullanıldığında *Candida*'ların saptanmasını kolaylaştırır (11).

Hazırlanan boyalı preparatlarda tomurcuklanan maya hücreleri, büyüklükleri ve şekilleri, tomurcuğun morfolojisi ve tomurcuk sayısı, psöдохiflerin varlığı, paralel duvarlı ve bölmeli gerçek hiflerin varlığı *Candida*lar için karakteristik özelliklerdir. İnceleme sırasında psödo ve gerçek hif yapılarının görülmesi dokuya invazyonun yani enfeksiyonun göstergesi olabilir (11,82).

#### 2.1.11.2. *Candida* türlerinin identifikasyonu

*Candida* türlerinin tanımlanmasında kullanılan morfolojik ve biyokimyasal özellikleri; kolonilerin primer izolasyon besiyerlerindeki görünümü ve rengi, hücrelerin büyüklüğü ve şekli, hif ve/veya psöдохif oluşumu, germ tüp ve klamidospore oluşturma yeteneği, karbonhidrat ve nitrat asimilasyonu, şeker fermentasyonu gibi özelliklerdir (83).

a) Kültür: Etkenin izolasyonu ve gerektiğinde antifungal duyarlılık testlerinin yapılabilmesine imkan sağlamaktadır. *Candida* türleri genellikle SDA, BHIA, koyun kanlı agar, Mycosel veya Mycobiotic agar gibi rutinde kullanılan mikolojik ve bakteriyolojik besiyerlerinde iyi ürerler. Bununla birlikte kromojenik maddeler içeren besiyerleri de kullanılabilir. Besiyerlerinin içeriğine konulan sikloheksimit gibi antimikotik maddeler kontaminant saprofit mantarların üremesini, kloramfenikol ve gentamisin gibi antimikrobiyal ajanlar

ise bakterilerin üremesini engellemektedirler. Kültür için örnekler primer izolasyon besiyeri olan SDA'ya ekilerek oda ısı ve 37 °C'de inkübe edilirler. Patojen türlerin çoğu bu ısılarda ürerler. 24-48 saatte oluşan *Candida* kolonileri beyazdan krem rengine, mat veya parlak, S tipinden buruşuk yapılı kolonilere kadar değişen renk ve yapıda olabilirler. Sabouraud Dextroz Broth (SDB) besiyerinin yüzeyinde zar oluşturarak üreyebilme özelliği *C. tropicalis* ve *C. krusei*'nin tanımlanmasında yardımcı bir test olarak kabul edilebilir. Kültürde üreyen kolonilerden hazırlanan boyalı preparatlar, hif ve spor varlığı açısından değerlendirilir. Primer besiyerinde üreyen kolonilerden germ tüp testi yaparak *C. albicans* tanımlanabilir. Dissemine invaziv kandidoz veya kandidemiden şüphelenilen hastalardan mutlaka kan kültürü alınmalıdır. Ancak kültür pozitifliği oranları % 23-82 arasında değişebilmektedir. Pozitiflik oranını ve üreme hızını arttırmak için lizis santrifügasyon yöntemleri ve üremenin sürekli izlenilmesini sağlayan otomatize sistemler geliştirilmiştir (82-84).

b) Germ tüp testi: *C. albicans*'ın tanımlanmasında kullanılan en hızlı ve basit testlerden biridir. İnsan serumu, bu test için ideal olup, koyun, fetal sığır serumları, tavşan plazması da kullanılabilir. Testi uygulamak için kültürde üreyen kolonilerden alınan bir miktar maya 0,5 ml serum içine konulup bir tüp içinde karıştırılarak, 35-37 °C'de iki-üç saat inkübe edilirler. Süre sonunda lam-lamel arası hazırlanan preparatın mikroskopik incelemesinde; maya hücrelerinden çıkan paralel uzantılar şeklinde oluşan yapı ve hücreden çıkış noktasında boğumlanma olmaması germ tüp lehine değerlendirilen bulgulardır. *C. albicans*'ın oluşturduğu kısa hiflerin baş tarafının, blastokonidyum ile germ tüpün kesiştiği yerde boğumlanma oluşturmadığı görülür. Bununla birlikte *C. tropicalis*'in de hif çıkıntıları oluşturduğu ancak *C. albicans*'tan farklı olarak blastokonidyumlarının daha büyük olduğu ve blastokonidyum ile hif çıkıntısı bileşkesinde belirgin bir boğumlanma olduğu saptanmıştır. *C. albicans* dışında *C. dubliniensis*, *C. norvegensis* ve *C. stellatoidea*'da da germ tüp oluşturma özelliğine sahiptir (11,86). *C. albicans*'ların yaklaşık olarak % 5'inde germ tüp negatiftir. İnkübasyon süresinin 4 saatten fazla sürmesi yalancı pozitiflik oranını arttırmaktadır.

Bununla birlikte maya inokulumunun yoğun olması ve ortamda bakterilerin bulunması testin yalancı negatif olarak sonuçlanmasına neden olabilir (11).

c) Mısır unu-tween 80 agar: *Candida* türlerinin morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesinde mısır unu-tween 80 agar gibi besin açısından fakir ortam içeren besiyerleri kullanılır. *Candida* türlerinin hif, psöдохif, blastospor ve klamidospore üretme gibi özelliklerinin değerlendirilmesini ve bu yolla da türlerin birbirlerinden ayırt edilebilmesini sağlamaktadır. Bu yöntemde; besiyerinde üreyen koloniden iğne öze ile koloniden bir miktar alınarak mısır unu-tween 80 agar besiyeri üzerine üç paralel çizgi çizilir. Agarın yüzeyine inokulasyon çizgilerini örtecek şekilde steril bir lamel kapatılarak 25 °C'de üç gün süreyle inkübe edilir. Mısır unu-tween 80 agarda gerçek hif ve/veya psöдохif varlığı, blastosporların büyüklüğü, şekil ve dizimleri, klamidospore oluşturabilme özellikleri incelenir. *C. albicans*, mısır unu-tween 80 agarda hiflerin uçlarından tekli, kalın duvarlı, geniş, terminal klamidospore ve psöдохif boyunca dağılan küme yapmış blastokonidyumlar şeklinde görülür. *C. albicans* ile en çok karışan *C. dubliniensis*'te ise klamidospore daha bol, kümeler veya salkımlar şeklindedir (55,86).

d) Üreaz testi: Büyük çoğunluğu üreaz negatif olan *Candida* türlerinin diğer mayalardan ayırımında kullanılır. Bu test mayanın üreaz üretimini saptamaya yönelik bir test olup, üreaz enziminin üreyi parçalaması ve sonucunda oluşan amonyak nedeniyle artan besiyeri pH'ının etkisiyle fenol kırmızısı indikatörünün renginin sarıdan kırmızıya dönüşümü esasına dayanır. *Candida* türleri genel olarak üreaz negatif olmasına rağmen *C. lipolytica* ve *C. krusei*'nin bazı suşları pozitif sonuç verebilir (11,82).

e) Kromojenik agar: *Candida* türlerinin tanısında kullanılan bir diğer besiyeri ise kromojenik agar besiyerleridir. Bu besiyerleri, içeriğindeki kromojenik substratlar sayesinde oluşan farklı renk ve morfolojiler ile hızlı ve basit şekilde tanımlama yapabilmektedirler. Bu besiyerlerinde koloninin tanımlanması, türe özgü ekzoenzim aktivitesi ile besiyeri içeriğinde bulunan kromojenik substratların parçalanması sonucu farklı kromojenik ayrışma ürünlerinin oluşmasına bağlı olarak, farklı morfoloji ve renklerde koloni

oluşumu esasına dayanmaktadır. Özellikle kan kültürlerinde % 3-10 oranında görülen birden fazla maya türünün üremesi durumunda oldukça yararlıdır (11,82).

f) Karbonhidrat asimilasyon testleri: Mayaların oksijen varlığında belirli bir karbonhidratı tek karbon kaynağı olarak kullanabilme özelliklerine dayanarak yapılan bu testler, *Candida*'ların tür düzeyinde tanımlanabilmesini sağlamaktadır. Günümüzde karbonhidrat asimilasyonu ve/veya enzim saptamak amacıyla çeşitli ticari testler bulunmakta olup, bu sistemler belirli bir kimyasal profili saptamak için farklı sustratları içeren kuyucuklardaki kolorimetrik ve florometrik ölçümleri içerirler. Bu testler hızlı veya 24-72 saat içinde sonuç verebilme özelliğine sahiptir (87).

#### 2.1.11.3. Serolojik testler

Serolojik testler ya mantar antijenlerine karşı gelişen antikorları ya da mantar antijenlerinin ve metabolik ürünlerinin varlığını göstermeye yönelik hazırlanan testlerdir. Mantar enfeksiyonlarının tanısı ile birlikte tedaviye yanıtın değerlendirilmesi ve hastalığın takibinde de kullanılabilen serolojik testlerin rutin kullanımı henüz çok yaygınlaşmamıştır. Kandidozun tanısında tek başına kullanılabilecek serolojik bir test bulunmamakla birlikte antijen ve antikorların birlikte araştırıldığı kombine testler daha özgül sonuç vermektedir. Ayrıca özgüllük ve duyarlılığı artırmak adına tek örnek yerine ardışık alınan birden çok örneğin sonuçları birlikte değerlendirilmelidir. Serolojik testlerden elde edilen sonuçlar, hastanın kliniği ve kültür sonuçları ile karşılaştırılmalıdır (82,88).

a) Antijenlerin gösterildiği testler: İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarının tanısında serum veya vücut sıvılarından mantara ait antijenlerin ya da metabolitlerinin aranmasına yönelik testlerdir. Bu testler daha değerli olup, bu amaçla mannan, ısıya duyarlı antijen ve enolaz gibi antijenlerin varlığı araştırılmaktadır (82,88).

Mannan; *Candida* enfeksiyonları sırasında dolaşıma salınan ve yüksek immunojenik özellik gösteren bir antijendir. Bu test yüksek seviyede özgüllük

göstermektedir. Sağlıklı bireylerde antikorlar tarafından hızlı bir şekilde kandan uzaklaştırılması nedeniyle özellikle immunsuprese hastalarda duyarlılığı artırmak amacıyla ardışık alınan serum örneklerinin kullanılması daha uygundur. İnvaziv *Candida* enfeksiyonlarında mannan antijeni ve antikorunun birlikte araştırılması serolojik tanının daha anlamlı olmasını sağlayabilir (82,88).

Enolaz; derin organ invazyonu olan ancak fungemisi olmayan hastalarda değerlidir. Kolonizasyon ve enfeksiyon ayırımında yararlı olabileceği düşünülmektedir (82,88).

D-arabinitol; *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* tarafından serum ve idrarda oluşturulan metabolittir. *C. glabrata* ve *C. krusei*'de bulunmaz. Bu metabolitin saptanabilmesi için ileri tekniklere ihtiyaç duyulması, rutinde kullanımını kısıtlamıştır (82,88).

$\beta$ -(1,3)-D-glukan; *Zygomycetes* dışındaki mantarların polisakkarit yapıdaki hücre duvarı elemanıdır. Erken antifungal tedaviye başlanılmasını sağlaması, invaziv mantar enfeksiyonlarının ekarte edilebilmesi ve antifungal tedaviden test sonuçlarının etkilenmemesi testin avantajlarıdır. Bununla birlikte herhangi bir mantar enfeksiyonuna özgül olmaması,  $\beta$ -D-glukan içeren gazlı bez, selülöz filtreler ve membranlar gibi malzemelerin kullanımı, *Pseudomonas* ve *Streptococcus* gibi bazı bakterilerin enfeksiyonları ile birlikteliği, kolistin, sefepim, amoksisilin-klavunat gibi bazı antibiyotiklerin kullanımı sırasında alınan örneklerde yalancı pozitifliklerin görülebilmesi bu testin dezavantajlarını oluşturur (82,88).

b) Antikorların gösterildiği testler: Bu testler daha çok immun sistemi sağlam hastalarda gelişen kandidozların tanısında daha etkili olup, immunsuprese hastalarda test sonuçları güvenilir değildir. Pozitif antikor varlığının kolonizasyon ve enfeksiyon ayırımını yapamaması, nötralizasyon antikorlarının bulunabilmesi, mannan antikorunun dalak ve karaciğer tarafından hızla kandan uzaklaştırılabilmeleri gibi nedenlerin varlığı bu testlerin kullanımının sınırlandırılmasına neden olmuştur (82,88).

Mannan, kan dolaşımına geçtiğinde güçlü bir anti-mannan antikor yanıtı oluşturur. Bu antikorların kolonizasyon ve enfeksiyon ayırımını yapamaması nedeniyle özellikle immunsuprese hastalardan elde edilen yanlış negatiflik değerleri testin duyarlılığını düşürürken, kolonizasyon nedeniyle de elde edilen yanlış pozitif değerler testin özgüllüğünü düşürmektedir. Özgüllük ve duyarlılığı artırmak için anti-mannan antikorlarının ve mannan antijeninin sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir (82,88).

#### 2.1.11.4. Moleküler yöntemler

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında moleküler yöntemlerin kullanılmasının esas amacı, patojen mikroorganizmaların direkt klinik örneklerden kültürü yapılmadan en kısa sürede doğru olarak saptanması ya da kültürde üretilmiş olan mikroorganizmaların hızlı tanımlanmasıdır. Özellikle *Candida* türlerinin doğru ve hızlı bir şekilde identifikasyonu, etkene yönelik uygun antifungal tedavinin en erken dönemde başlatılmasına imkan sağlamaktadır (89,90).

*Candida*'lar açısından ele alındığında moleküler yöntemler; *Candida*'ların cins ve tür düzeyinde tanımlanması, virulans faktörlerinin saptanması, epidemiyolojik tiplendirme, antifungal direnç genlerinin araştırılması, mutasyon incelemeleri, sınıflandırma ve filogenetik analizlerde kullanılmaktadır (91).

Genotiplendirme, türler arasındaki farklılığın genetik dizilim ve genomik yapı ile gösterilmesidir. Bu amaçla kullanılan çeşitli yöntemler bulunmaktadır ve uygulanacak yöntemin belirlenmesinde; yöntemin kullanım kolaylığı, tekrarlanabilirlik özelliği, ayırım gücü, tiplendirilebilirlik, stabilitesi, ucuzluğu, çalışma süresi ve sonuçların kolaylıkla yorumlanabilmesi gibi konulara dikkat edilmelidir (92,93).

Genotiplendirmede kullanılan yöntemler şunlardır (92,93).

#### I. Prob hibridizasyonuna dayalı yöntemler



II. Genomik Deoksiribonükleik Asit (DNA) kompozisyon farklılığına dayanan yöntemler:

A. Pulsed Field Gel Electrophoresis dayalı genotiplendirme yöntemleri

1. Karyotiplendirme

2. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

B. Single Stand Conformational Polimorphism

C. Heterodubleks Analizi

III. Amplifikasyona dayalı yöntemler:

A. Hedef Amplifikasyonuna Dayalı Yöntemler

1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

a. Klasik PCR

b. Nested PCR

c. Multipleks PCR

d. Reverse Transcription-PCR

e. Random Amplification of Polymorphic DNA

f. Real-time PCR

g. PCR-RFLP

h. PCR- Enzyme Immunoassay

i. PCR-Dizi analizi

j. PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis

k. Repetitive-Sequence-Based PCR

l. Microsatellite PCR

m. Multi-Locus Sequence Typing

n. Amplified Fragment Length Polymorphism

2. Microchip teknolojisi (Microarray analysis)

3. Transcription Mediated Amplification

4. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification

5. Strand Displacement Amplification

6. Self-sustaining Sequence Replication

B. Sinyal Amplifikasyonuna Dayalı Yöntemler

1. Branched DNA

C. Prob Amplifikasyonuna Dayalı Yöntemler

1. Qb replicase

2. Ligase Chain Reaction

### 2.1.12. Antifungal İlaçlar

Mantar hücrelerinin memeli hücreleri gibi ökaryot yapıda olması; protein, DNA veya RNA biyosentezini inhibe eden antifungal ilaçların insanlar için toksik özellikte olması antifungal sağaltım alanındaki gelişmeleri yavaşlatmış olup, hala kısıtlı sayıda antifungal ilaç kullanılmaktadır (94).

İlk kez 1903 yılında bir sporotrikoz vakasında, iodidlerin ve 1939'da dermatofitlere karşı griseofulvinin tedavi maksadıyla kullanılmasından sonra, 1950'li yıllara kadar antifungal tedavide pek fazla gelişme olmamıştır. 1950'de nistatin, 1956'da amfoterisin B, 1964'de flusitozin ve 1960'ların sonlarında da azoller antifungal tedavide kullanılmaya başlanmıştır. 1970'li yılların sonlarında o zamana kadar tedavide kullanılan amfoterisin B ve flusitazine ek olarak intravenöz mikonazol ve oral ketokonazol tedaviye

girmiştir. 1980'lerde triazolollerin kullanılmaya başlaması ile sistemik antifungal seçenekleri artmıştır. Ayrıca, fungal enfeksiyon tedavisinde çeşitli antifungallerin ve immunomodülatör ajanların birlikte kullanımı da gündeme gelmiştir. Tedavi seçeneklerinin bu denli genişlemiş olmasına karşın, antifungal ilaçların yaygın kullanımı ile bir veya birkaç ilaca dirençli fungal patojenler ortaya çıkmıştır (95-98).

Antifungal ilaçlar beş grupta sınıflandırılmaktadır. Bunlardan ilki mantar hücre membranındaki ergosterole etkili ajanlar olup, bu grupta poliyenler, azoller, allilaminler ve morfolinler yer almaktadır. İkinci grup mantar hücre duvarına etki eden ajanlardır; glukan sentez inhibitörleri ve kitin sentez inhibitörleri olarak ayrılır. Diğer üç grup ise nükleik asit inhibitörleri, mitoz inhibitörleri ve protein sentezi inhibitörleridir (Tablo 2) (99).

#### 2.1.12.1. Poliyen grubu antifungaller

Hücre membranındaki ergosterolü hedef alan ajanlardır. Ergosterole bağlanırlar ve bağlanma sonucu oluşan 40-150 µm çapındaki kanallar, membranın geçirgenliğini bozarak hücre içeriğinin dışarı sızmasına ve hücrenin ölümüne sebep olur. Bu ajanların hidrofobik ve hidrofilik kısımları vardır. Amfoterisin B deoksikolat, lipid formulasyonlu amfoterisin B, nistatin, lipozomal nistatin ve pimarisin poliyen grubu antifungalleri oluştururlar (58,100).

Amfoterisin B: Hidrofilik bir polihidroksil zinciri ile lipofilik bir poliyen hidrokarbon zinciri içeren amfoterik bir bileşiktir. 1950'li yılların ikinci yarısında kullanıma giren bu antifungal ilaç, *Streptomyces nodosus*'un bir suşundan elde edilen bir haptendir. Hayatı tehdit eden mantar enfeksiyonlarında ilk tercih edilen ilaçlardır. Suda çözünürlüğü az olduğundan oral ve intramüsküler emilmez. Genellikle kullanılan formu, intravenöz kullanım için uygun olan amfoterisin B deoksikolat formudur. Amfoterisin B, mantar hücre membranındaki ergosterole bağlanır ve osmotik dengeyi bozar. Hücre duvarında porlar oluşturup hücrenin geçirgenliğinin artmasına neden olur. Bunun sonucunda intrasellüler potasyum, magnezyum, şeker ve

metabolitlerinin membrandan sızmasına ve hücre ölümüne neden olur, yani fungisidal etkilidir (100,101). Sistemik ve lokal kandidozda kullanılır. Sistemik kandidoz ile aspergilloz, mukormikoz, kriptokokkoz, koksidomikoz, dissemine histoplazmozda en sık tercih edilen ilaçtır. *C. lusitania* amfoterisin B'ye doğal dirençlidir; ayrıca *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* türlerinde de direnç bildirilmiştir (95). Amfoterisin B direncinin gelişmesinde rol oynayan mekanizmalar arasında, ERG2 ve ERG3 genlerindeki mutasyonlar sonucunda mantar hücre membranında ergosterol yerine poliyenlere afinitesi düşük olan başka sterollerin veya sterol ara bileşiklerinin bulunması veya hücre duvarındaki  $\beta$ -(1,3)-D-glukan kompozisyonundaki değişiklik nedeniyle, poliyenin penetrasyonunun azalması yer alır (102-104). Amfoterisin B, akciğer, dalak, böbrek gibi birçok organ ve dokuya geçebilir fakat BOS'a geçişi zayıftır. Bu sebeple SSS enfeksiyonlarında intratekal kullanılabilir. Amfoterisin B nefrotoksik bir ilaçtır. Bunun yanında ateş, miyalji, hipotansiyon, bronkospazm gibi yan etkiler oluşturabilir. Lipit amfoterisin B bileşiklerinin, konvansiyonel amfoterisin B'ye göre in vivo aktivitesinin daha iyi olduğu bilinmektedir. Bunun nedeni, sadece bu bileşiklerin daha iyi tolere edilmeleri değil, enfeksiyon bölgesine konvansiyonel formülasyona göre daha yüksek düzeylerde ulaşmasıdır. Lipit formülasyonlu amfoterisin B ile tedavi süresi ve dozu artırılabilir (100).

Nistatin: İlk bulunan poliyen grubu antifungal ilaçtır. *Streptomyces noursei*'den elde edilmiştir. Amfoterisin B ile etki mekanizması ve etkilediği organizmalar benzer olan nistatin sistemik toksisitesi nedeniyle sadece topikal olarak kullanılırken yeni geliştirilmiş olan lipozomal formu sistemik yoldan da kullanıma izin vermektedir (19). Başlıca *Candida* cinsi mayaları etkiler. Ağız ve barsak kandidozunun lokal tedavisinde kullanılmaktadır (105).

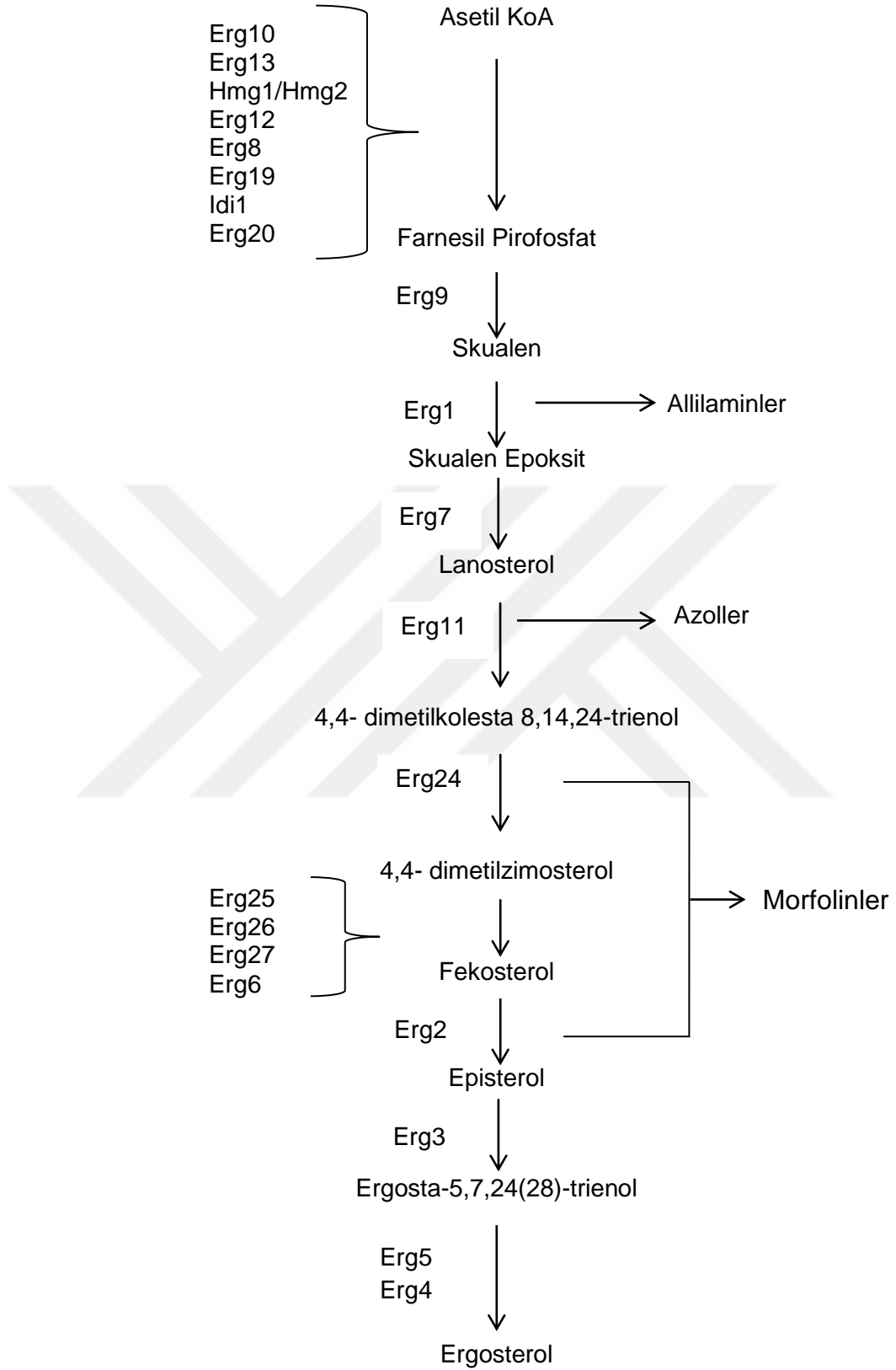
**Tablo 2.** Antifungal ilaçların etki mekanizması ve etki spektrumu.

Antifungal Ajan	Etki Mekanizması	Etki Spektrumu
<b>Polyenler</b>	Ergosterole bağlanma ve membranda por oluşumu	
Amfoterisin B		Sistemik kandidoz, aspergilloz, mukormikoz, kriptokokkoz, koksidiomikoz, dissemine histoplazmoz
Nistatin		Lokal kandidoz
<b>Azoller</b>	C-14 $\alpha$ lanosterol demetilaz inhisyonu	
İmidazoller (ketokonazol, mikonazol, klotrimazol)		Toksisite nedeniyle kullanımı sınırlı. Koksidiomikoz, histoplazmoz, blastomikoz, parakoksidiomikoz
Triazololler Flukonazol İtrakonazol		<i>Candida</i> ve <i>Cryptococcus</i> türleri <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Aspergillus</i> , dermatofitler, <i>Sporothrix schenckii</i>
Vorikonazol Posakonazol		<i>Candida</i> , diğer maya ve küf Mayalar, dimorfik mantarlar
<b>Allilaminler</b>	Skualen epoksidaz inhibisyonu	
Terbinafin Naftifin		<i>Candida</i> Dermatofitler, <i>Candida</i> ve <i>Aspergillus</i> türleri
<b>Morfolinler</b>	Sterol 14 redüktaz ve 7-8 izomeraz inhisyonu	
Amorolfin		Onikomikoz
<b>Glukan Sentez İnhibitörleri</b>	$\beta$ -(1,3)-glukan sentetaz inhibisyonu	
Ekinokandin (kaspofungin, mikafungin, anidulofungin)		İnvaziv kandidoz ve aspergilloz
<b>Kitin Sentez İnhibitörleri</b>	UDP-N asetilglukozamin analoğu	
Nikkomisin Z		koksidiomikoz, histoplazmoz ve blastomikoz
<b>Nükleik Asit İnhibitörleri</b>	Pirimidin metabolizmasını bozar	
Flusitozin		<i>Candida</i> ve <i>Aspergillus</i> türleri <i>Cryptococcus neoformans</i>
<b>Mitoz İnhibitörleri</b>	Mikrotübüler proteinlere bağlanma	
Griseofulvin		Dermatofit
<b>Protein Sentez İnhibitörleri</b>		
Sordarin Azosordarin	Ribozom - elongasyon faktör 2 kompleksine bağlanma	<i>C. albicans</i> , <i>Aspergillus</i> <i>Pneumocystis carinii</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>
İkofungipen	İzolösil-tRNA sentetaz inhibisyonu	Kandidoz

### 2.1.12.2. Azol grubu antifungaller

Azol grubu antifungal ilaçlar hem yüzeysel hem de derin mikozların tedavisinde başarıyla kullanılmakta olan ilaçlardır. Bunlar, fungal plazma membranının önemli bir komponenti olan ergosterol sentezini, C-14 $\alpha$  lanosterol demetilaz enzimini inhibe ederek engellerler (Şekil 1). Klinik kullarımdaki azoller, azol halkasında iki ya da üç nitrojen bulunmasına göre imidazoller ve triazoller olarak sınıflandırılır. İmidazoller; ketakonazol, mikonazol, klotrimazol, ekonazol, sulkonazol, oksikonazol, tiokonazolden oluşur. Triazoller ise birinci ve ikinci kuşak olarak ayrılırlar ve birinci kuşakta; flukonazol, itrakonazol; ikinci kuşakta vorikonazol, posakonazol, ravukonazol bulunur. İmidazol grubu içerisinde sadece ketokonazol sistemik etkili iken, triazol grubundakilerin tümü sistemik etki gösterir. Azol grubu ilaçlar, fungostatik veya fungusidal etki gösterirler (100,106). Triazoller, imidazollerle karşılaştırıldığında; daha yavaş metabolize olurlar, daha az toksiktirler ve endokrin yan etkileri yoktur. *Candida* türlerinde azol direnci mekanizmaları C-14 $\alpha$  lanosterol demetilaz enziminde değişiklik veya sentezinde artış olması, sterol biyosentez yolunun değiştirilmesi ve aktif geri atım pompaları ile ilacın dışarı atılması şeklinde sıralanabilir.

Ketokonazol: 1978'de keşfedilen ajan, oral emilimi normal mide asidifikasyonunda iyi olan geniş spektrumlu bir ilaçtır. Enterohepatik sirkülasyonda metabolize edilir. Proteinlere yüksek oranda bağlandığı için SSS'ne geçişi zayıftır. *Candida*'larda maya şeklinin lökositler tarafından fagositoza daha az elverişli olan psödohif şekline dönüşümünü azaltarak da antifungal etki yapar. Aktif üreme dönemindeki mantarlara etkili olduğundan yeterli süre tedavi yapılmazsa nüks gerçekleşir. *C. tropicalis*'te doğal direnç görülür. Hepatotoksiktir. Ayrıca testesteronu, ACTH uyarımına bağlı kortizol yanıtını ve sentezini baskılayarak impotans, oligospermi, libido azalması, jinekomasti, menstruel düzensizlik gibi endokrin yan etkilere neden olabilmektedir. Daha az toksik ve daha etkili antifungallerin kullanıma girmesiyle günümüzde nadir kullanılan bir antifungaldir (108).



Şekil 1. Mantar hücre membranında ergosterol sentez basamakları ve ergosterol inhibisyonu yapan antifungal ilaçların etki şeması (107).

Flukonazol: 1981 yılında imidazol çekirdeğinin değiştirilmesiyle elde edilen, suda çözünen bir bileşiktir. Oral alımı takiben emilimi çok iyi düzeylerde olur. Oral ve intravenöz formları bulunur. Günlük tek dozla yüksek plazma seviyesine ulaşılır. BOS dahil tüm dokulara iyi dağılan düşük toksisiteli antifungaldir (100). Birçok *Candida* ve *Cryptococcus* türüne etkilidir. Bununla birlikte *C. krusei* flukonazole doğal dirençlidir. *C. glabrata* suşlarının flukonazole duyarlılığı ise önemli ölçüde değişkenlikler gösterir. Bazı *C. tropicalis*, *C. norvegensis*, *C. dubliniensis* ve *C. inconspicua* suşlarına karşı da yüksek flukonazol minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri saptanabilmektedir (109). Yan etkileri bulantı-kusma, eksfoliyatif döküntü, Stevens Johnson Sendromu, AST ve ALT yükselmesi ve hepatit şeklinde sıralanabilir. Uzun süreli tedavilerde karaciğer fonksiyon testleri takibi yapılmalıdır (108).

İtrakonazol: 1986'da keşfedilen ajan, lipofilik triazol grubundan olup kapsül veya solüsyon içinde oral ve intravenöz olarak kullanılır. *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* türleri, dermatofitler, *Sporothrix schenckii* ve endemik dimorfik patojen mantarları içine alan geniş bir antifungal aktiviteye sahiptir (108). Flukonazole karşı dirençli *C. krusei* ve *C. glabrata* kökenlerinin tümüne olmasa da bir kısmına karşı etkinliği vardır (110). Midenin asit ortamında absorpsiyonu artar. Lipofilik olduğundan dolayı pürülan eksudalara ve yağ dokusunda yüksek konsantrasyonlara ulaşırken, BOS'a geçişi zayıftır. İtrakonazole bağlı yan etkiler flukonazolle benzerdir. Yüksek dozlarda hipokalemi, ödem ve hipertansiyon yapabilir. Hepatotoksik etkisi nadirdir (100).

Vorikonazol: Flukonazol çekirdeğinde yapılan değişikliklerin sonucunda daha güçlü, daha geniş spektrumlu oral ve parenteral kullanıma uygun yeni bir ikinci kuşak triazol antifungaldir. Oral ve intravenöz formları mevcuttur. Ayrıca itrakonazol ve flukonazolün aksine emilimi mide içi pH değişikliklerinden etkilenmemektedir. SSS de dahil olmak üzere birçok dokuya dağılım gösterir. Vücuttaki vorikonazolun büyük bir kısmı, karaciğer yoluyla atılır (100,101). Azoller arası çapraz direnç nedeniyle, flukonazole



dirençli *Candida* suşlarının önemli bir kısmı, ketokonazole ve itrakonazole olduğu gibi, vorikonazole de dirençlidir. Vorikonazol, özofageal kandidozun ve nonnötropenik kandideminin tedavisinde endikedir. Bunun yanı sıra, yaygın *Candida* enfeksiyonlarında vorikonazol ile başarılı sonuçlar bildirilmiştir (100,111). Vorikonazol kullanımı sırasında en sık gözlenen yan etkiler geçici görme bozuklukları ve karaciğer enzimlerinde yükselmedir. Deri reaksiyonları, halusinasyonlar veya konfüzyona da neden olabilir. Genelde iyi tolere edilebilen bir ajan olmakla beraber vorikonazol dozunun ayarlanabilmesi için plazma vorikonazol konsantrasyonunun ölçülmesi önerilmektedir (100).

Posakonazol: İkinci kuşak bir triazol olan posakonazol yapısal olarak itrakonazol analogu olup etki spektrumu açısından vorikonazole benzemektedir. Mayalara ve dimorfik mantarlara karşı yüksek etkinliğe sahiptir. Kandidemi tedavisinde sık kullanılmamaktadır. Bu durum yalnızca oral formunun bulunmasından kaynaklanmaktadır. *Aspergillus fumigatus* ve *Aspergillus flavus* küflerine karşı, itrakonazolden 10 kat daha güçlü şekilde etki etmektedir (111,112). Posakonazolün 2006 yılında hematopietik kök hücre transplant alıcılarında gelişebilecek invaziv fungal enfeksiyon profilaksisinde, OFK tedavisinde ve Avrupa'da koksidioidomikozis, miçetoma, kromoblastomikozis, fusarizis ve aspergillozisi içeren dirençli fungal enfeksiyonlarda kullanımı onaylanmıştır (111,113,114).

#### 2.1.12.3. Allilaminler

Ergosterol sentezinde rol alan skualen epoksidazı inhibe ederek etki gösterirler (19). Bu etki sonucunda, ergosterol eksikliğinden ziyade, skualenin yüksek konsantrasyonlarda birikmesine bağlı olarak ortaya çıkan, membran permeabilitesindeki artış sonucunda mantar hücresinin ölümü gerçekleşir. Bu grupta oral ve topikal kullanılan terbinafin ve sadece topikal kullanılan naftifin yer alır (100).

Terbinafin: Yaygın olarak kullanılan, geniş spektrumlu lipofilik bir antifungal ilaçtır. Terbinafin azollerle kombine edildiğinde, azollere azalmış

duyarlılık gösteren bazı *Candida* kökenlerine karşı sinerjistik etki gösterebileceği gözlenmiştir. Terbinafin deri, tırnak ve yağ dokusunda yüksek konsantrasyonlara ulaşır. Son yıllarda elde edilen veriler, flukonazole dirençli *Candida* enfeksiyonlarında, flukonazol-terbinafin kombinasyonuna yanıt alınabileceğini göstermektedir (100,115).

Naftifin: Yüzeysel dermatomikozların tedavisinde kullanılır. Dermatofitik mantarlara karşı geniş spektrumlu fungisidal etkili bir bileşiktir. Ayrıca *Candida* ve *Aspergillus* türlerine de etki etmektedir. Sadece topikal olarak kullanılır (116).

#### 2.1.12.4. Morfolinler

Ergosterol sentezinde rol alan sterol 14 redüktaz ve 7- 8 izomeraz enzimlerini inhibe ederek etki gösterir. Bu grupta bulunan amorolfin özellikle onikomikoz tedavisinde topikal ajan olarak kullanılmaktadır (117).

#### 2.1.12.5. Glukan sentez inhibitörleri

$\beta$ -(1,3)-glukan sentetaz enzimini inhibe ederek, mantar hücre duvarında bulunan glukan sentezini bozarlar. Memeli hücre yapısında  $\beta$ -(1,3)-glukan olmadığından dolayı insan hücrelerine toksik olmayan mantarlar için selektif bir ilaçtır. Akulasinler, ekinokandinler, pnömokandinler ve papulokandinler bu gruba ait ilaçlardır. Farklı ajanlar enzimin farklı bölgelerine bağlanarak etki gösterirler. Güvenilirliği, etkisi ve tolere edilebilir özelliğinden dolayı günümüzde sadece ekinokandinler klinik uygulamalarda kullanılır (24).

Ekinokandin: Yeni üretilen, oldukça selektif, semisentetik siklik heksapeptidlerin yağ asidi derivelerinden oluşan bir antifungaldir. Kaspofungin, mikafungin ve anidulafungini içeren ekinokandinler, kimyasal olarak modifiye edilmiş mantar molekülleridir. Azollere ve amfoterisin B'ye duyarlı *Candida* kökenlerinin yanı sıra, bu ilaçlara dirençli kökenlere de etkili olmaları, klinikte ekinokandin kullanımına ilişkin en önemli avantajlardan birisidir (117). Azollere dirençli olanlar dahil olmak üzere, *Candida* türlerinin

çoğuna fungisidal etki gösterirler. Hücre duvarında glukan içermeyen *Cryptococcus neoformans*'a ve *Zygomycetes*'lere, *Aspergillus* dışında kalan küflere etkileri yoktur. Seçici etki mekanizmaları nedeniyle toksisiteleri ve ilaç etkileşimleri çok azdır. En sık yan etkileri, flebit, transaminaz ve ALP yüksekliği, hemoglobin düşüklüğüdür. Oral biyoyararlanımlarının sınırlı olması nedeniyle sadece intravenöz olarak kullanılırlar. Ekinokandinlerin diğer *Candida* türlerine göre *C. parapsilosis* suşlarına daha az etkin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca *Candida* türleri içerisinde ekinokandinlere en sık direnç gösteren tür *C. glabrata*'dır (105,118).

#### 2.1.12.6. Kitin sentez inhibitörleri

*Streptomyces tendae* tarafından üretilen nükleozit peptid yapısında bir antifungal maddedir. UDP-N-asetilglukozamin analogu olarak kitin sentezini kompetatif inhibe ederek etki gösterir. İn vivo aktif tek bileşik olan Nikkomisin Z'nin, koksidiomikoz, histoplazmoz ve blastomikozda etkin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, flukonazol ve amfoterisin B ile karşılaştırıldığında *Coccidioides spp.*'yi daha iyi öldürdüğü saptanmıştır (119,120). Düşük toksisite göstermesi ve antifungal özgüllüğünün yüksek olması nedeniyle diğer ilaçlarla beraber kombinasyon kullanımı çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır (121).

#### 2.1.12.7. Nükleik asit inhibitörleri

Flusitozin (5-florositozin): Bu ajan antifungal aktivitesini, pirimidin metabolizmasını bozarak, fungal hücrelerdeki DNA, RNA ve protein sentezini engelleyerek gösterir. Flusitozin, sitozin permeaz enzimi sayesinde fungal hücre içerisine girer ve sitoplazmada 5-florourasile çevrilerek etki gösterir. Flusitozinin suda çözünürlüğü iyi olduğundan oral biyoyararlanımı yüksektir. Yüksek dozlarda serum, BOS ve diğer vücut sıvılarına geçebilir (100). Etki spektrumu; *Candida* türleri, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus* türlerini içerir. Yan etkileri doza bağlıdır. Düşük dozlarda; bulantı, kusma, diyare, baş ağrısı, karaciğer enzimlerinde yükselme görülür. Serumdaki konsantrasyonu 100 µg/ml'yi geçtiğinde, belirgin kemik iliği toksisitesi gösterir

(95,96). Flusitozin, primer direnç olasılığı ve sekonder direncin kolayca gelişmesi nedeniyle tedavide tek başına kullanılmaması gereken bir antifungal ilaçtır. Flusitozin, tedavide amfoterisin B veya flukonazol ile kombine edilerek kullanılmaktadır. Direnç gelişimi önemli bir problem olup en önemli nedeni ilacın tek başına kullanımınıdır. Flusitozine iki türlü direnç bilinmektedir. Birincisi, ilacın hücre içine alınmasında görevli olan sitozin permeaz enziminin aktivitesinde azalma; ikinci mekanizma ise flusitozinin 5-florourasile dönüşümünü katalizleyen sitozin deaminaz enziminin aktivitesindeki azalmadır (100).

#### 2.1.12.8. Mitoz inhibitörleri

Griseofulvin: Dermatofit enfeksiyonlarında kullanılan oral bir antifungaldir. Mantar hücrelerinin mikrotübüler proteinlerine bağlanıp mitozu baskılayarak etki gösterir. Fungustatiktir. Lipofiliktir ve dermiste yüksek konsantrasyona erişir. İlacın bulantı, baş ağrısı, diyare, hepatotoksisite, döküntü ve nörolojik belirtiler gibi yan etkileri vardır. İtrakonazol ve terbinafenden sonra tedavide kullanımı azalmıştır (24,100).

#### 2.1.12.9. Protein sentezi inhibitörleri

Sordarin: Protein sentezinde translasyonu inhibe ederek etki gösteren yeni bir sınıf antifungal bileşiklerdir. *Sordaria araneosa* adlı mantarın bir fermentasyon ürünüdür ve bir diterpen glikoziddir (122,123). Sordarinler, ribozom - elongasyon faktör 2 kompleksine yüksek bir afinite ile bağlanıp translokasyonu inhibe ederler. Ribozomun büyük alt ünitesinin çözünür faktörlerle etkileşim gösteren kısmı olan ribozomal sap proteini de bu bağlanmaya dahil olur ki bu proteinde meydana gelen bir mutasyon, sordarinlerde dirence yol açmaktadır. *C. krusei*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata*'ya karşı aktivite göstermezken, *C. albicans*'a karşı yüksek seviyede aktivite gösterirler. Sordarinler, *Aspergillus* türlerine karşı ise minimal in vitro aktivite göstermektedir (124,125).

Azasordarin: Aktivasyon profili daha geniş ve farmakolojik özellikleri daha iyi olan yeni sordarin türevleri geliştirilmesi için yapılan çalışmalar

sonucunda azasordarinler olarak adlandırılan grup ortaya çıkmıştır (126). *C. krusei* hariç flukonazole dirençli suşlar dahil olmak üzere çeşitli *Candida* türlerine karşı aktivite gösterirler (127). Bunun yanı sıra bu bileşikler, *Pneumocystis carinii* ve *Rhizopus arrhizus*'a karşı da potent etkiye sahiptir. *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus* türlerine karşı ise inhibitör aktivitesi yoktur (128).

İkofungipen: Beta aminoasit yapısında olan yeni bir antifungal ilaçtır. İzolösil-tRNA sentetazı kompetitif yolla inhibe ederek protein sentezini önlerler. Hedef bölgesinde, hücre içi inhibitör konsantrasyonu, duyarlı mantar hücresi içinde ilacın aktif birikimi sonucunda ortaya çıkar. İlaç, aminoasit permeazlar tarafından aktif olarak hücre içine alınmaktadır. Hücre içi birikim işlemi mayalara özgül olup, küf mantarlarında yer almaz. Non-*albicans* türler içinde in vivo etkinlik en fazla *C. glabrata* ve *C. krusei*'de saptanmıştır. *Candida* türlerine karşı antifungal etkinliği olan ve azollerle çapraz direnç göstermeyen ikofungipen, kandidoz olgularının oral ve parenteral tedavisinde kullanıma potensiyeline sahip bir ilaçtır (129,130). Yapılan çalışmalarda ilacın beyin ve göz dokularında potent aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (131).

### **2.1.13. *Candida* türlerinde antifungal duyarlılık testleri**

Mantarlar için standart antifungal duyarlılık testleri ile ilgili ilk çalışmalar 1982 yılında Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından başlatılmıştır. İlk olarak CLSI'nin antifungal duyarlılık testleri alt komitesi tarafından, 1997 yılında *Candida* türleri için M27-A rehberi hazırlanmıştır. Daha sonra 2002'de makrodilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemlerini içeren M27-A2 rehberi ve en son olarak 2008'de M27-A3 rehberi yayınlanmıştır (132,133).

Bakterilerin aksine, *Candida* türleri için antifungal duyarlılık testlerinin belirli endikasyonlar varlığında yapılması önerilmektedir. İnvaziv enfeksiyon, steril vücut bölgelerinden *Candida* izolasyonu, direncin görülebildiği ancak

mutlak olmadığı *Candida* türleri, klinik yanıtızsızlık durumu, tedaviye bağlı sekonder direnç gelişimi riski nedeniyle izlem ve epidemiyolojik veri elde etmek amacıyla antifungal duyarlılık testleri yapılabilmektedir (134).

Mayalar için antifungal duyarlılık testleri; dilüsyon temeline dayananlar, difüzyon temeline dayananlar ve diğer yöntemler olarak üçe ayrılır.

#### 2.1.13.1. Dilüsyon temeline dayanan yöntemler

Sıvı makrodilüsyon yöntemi: Mantar izolatlarına karşı tüm antifungal ajanları test etmek için yeterli ve örnek sayısı az olan küçük laboratuvarlar için uygun bir yöntemdir. Bu yöntem yalnızca *Candida* türleri ve *Cryptococcus neoformans* için standardize edilmiştir (135).

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi: Prosedür olarak sıvı makrodilüsyon yöntemine benzer ve test sonuçları arasında uyum vardır. Birçok mikoloji laboratuvarında, kolay uygulanabilir, daha az zaman alıcı ve daha ucuz olması gibi özellikleri nedeni ile makrodilüsyon testine tercih edilmektedir (135).

Kolorimetrik MİK testleri: Mikrodilüsyon yöntemini esas alan, ancak MİK okunması için kolaylık ve daha objektif bir sonuç elde edebilmek amacıyla ortama bir oksidasyon – redüksiyon indikatörü ilave edilen yöntemlerdir (135).

Ticari olarak geliştirilen antifungal duyarlılık sistemleri: Günümüzde antifungal duyarlılık testlerinin hızlı ve güvenilir bir şekilde yapılmasını amaçlayan, kullanıma hazır ticari sistem ve kitler geliştirilmektedir. Bu testler; Vitek Compact System, ATB Fungus ( bioMerieux, Fransa), Candifast (International Microbio/Stago Group, İtalya), Fungitest (Bio-Rad SDP, Fransa) mikrodilüsyon yöntemini esas alan ticari sistemlerdir. M27-A rehberine uygun olarak tasarlanan sistemler arasında kullanılan besiyeri ve denenen antifungal ilaçlar yönünden farklar vardır (135).

Agar dilüsyon yöntemi: Hem mayalar hem de küfler için uygulanabilse de, *C.albicans* suşlarında imidazollere direnci göstermediğinden dolayı, küfler için daha uygun bir yöntem olarak önerilmektedir (135).

#### 2.1.13.2. Difüzyon temeline dayanan yöntemler

Disk difüzyon yöntemi: Kolay, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. *Candida* ve diğer maya cinslerine karşı antifungal duyarlılıklarını belirlemede yararlıdır (132).

Gradyent test yöntemi: Ticari olarak uygulanabilen antifungal duyarlılık testidir. Plastik stripler üzerine çeşitli konsantrasyonlarda emdirilen antifungal ilaçların agarlı besiyerine geçişi ile gerçekleştirilen ve MİK değerini saptayabilen bir difüzyon yöntemidir (135).

#### 2.1.13.3. Diğer yöntemler

Azollere karşı direnci belirlemede kullanılan ergosterol biyosentezinin önlenmesini ölçen test, CLSI ile yüksek uyumludur. Bir diğer yöntem üreme olması ya da olmamasına göre tetrazolyum bromür, tetrazolyum hidroksit boyalarının kolorimetrik ayıraç olarak renk değiştirmesine dayanan testtir (132).

## 2.2. Biyofilm

### 2.2.1. Tanımı ve tarihçesi

Biyofilm ilk olarak 17. yüzyılda Lewenhoek'in dişinden almış olduğu örnekte plaklar içinde yaşayan mikroorganizmalardan bahsetmiştir (136). Daha sonra Zobell ve ark. (136) 1936 yılında deniz suyunda bakteri büyümesini göstermiş, bunun da suyun temas ettiği yüzeyin genişliği ile orantılı olabileceğini düşünmüştür. İlk kez Jones (137) 1969 yılında elektron mikroskobu kullanarak atık su geri dönüşüm ünitelerindeki filtrelerde biyofilm

tabakasını ve tabakanın içindeki hücre topluluklarını göstermiştir. Costerton ve ark. (138) biyofilmi, bakteri tarafından üretilen ve bakterinin canlı ve cansız yüzeylere yapışmasını sağlayan glikokaliks olarak adlandırılan polimerik matriks olarak tanımlamışlardır. Carpentier ve Cerf (139) ise, bakterilerin gömülü olarak bulunduğu ve yüzeye yapışmış olan organik polimer olarak tanımlamıştır. Biyofilmin en güncel tanımı ise mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstraselüler polimerik maddeden oluşmuş matriks şeklindedir (140).

Biyofilm, mikrobiyal hücrelerin dönüşümsüz olarak polisakkarit matriks ve yüzey ile bağlantı kurması ve bu yapıda üreyip gelişmesi sonucu makroskobik olarak opak yapıda, ortalama 100-500 µm yükseklikte koşullara göre değişen en ve boyda, kaygan, pürüzsüz, giderilmesi zor olan bir yapıya sahiptir. Matriks içinde kan pıhtısı, kristaller, toprak, metal korozyon artıkları bulunabilir. Bu nedenle biyofilmin rengi bulunduğu yere göre değişmektedir (140).

Bir yüzeyde koloniler halinde tutunarak yaşayan mikroorganizmaların oluşturdukları her tabaka biyofilm yapısının özelliklerini taşımamaktadır. Gerçek biyofilm yapısında olmayan topluluklar, buldukları yüzeylerde planktonik hücre davranışı sergilemeye devam etmektedirler. Bunlarda biyofilm içerisindeki bakterilerde gösterilen rezistans ve irreversibl yapışma gibi özellikler bulunmamaktadır. Bununla beraber, biyofilm içerisindeki bakterilerin de zamanla matriksten koparak ayrıldıkları, dolaşıma geçtikleri ve planktonik formda olmalarına rağmen, ayrıldıkları topluluğun tüm rezistans karakterlerini taşıdığı gösterilmiştir (141).

Fosil kayıtlarından edinilen bilgiler prokaryotların üç milyar yıldan daha uzun bir süreden beri biyofilmler içerisinde yaşadıklarını ortaya çıkarmıştır (142). Günümüzde derin yeraltı suları ve okyanusların derinlikleri hariç biyofilmin tüm doğal ekosistemde oluşabildiği kabul edilmektedir (143).



Biyofilmler endüstriyel su ve petrol boru sistemlerinde önemli bir sorun olarak bilinirken, artık tıptaki önemi sadece dışteki plaklardan ibaret olmayıp özellikle yabancı cisim enfeksiyonları başta olmak üzere, birçok kronik enfeksiyonda rol oynadığı gösterilmiştir (138). Aderans, antibiyotik direnci ve fagositoza karşı önemli rolünün olduğunun bilinmesi son yıllarda tıbbi önemini arttırırken; mikroorganizmaların birbiriyle konuşarak bir topluluk oluşturmaları ve gen modülasyonu aracılığıyla ortama adapte olmalarında (Quorum sensing-QS) rol oynaması tıbbi önemini daha da artırmıştır (144,145).

### **2.2.2. Yapısı**

Biyofilmler, matriksleri içerisinde yaşamlarını sürdüren hücrelere, esansiyel besinlerin ve oksijenin taşınmasına imkan tanıyan “su kanalları” olan, çok tabakalı heterojen bir yapıya sahiptirler (146). Biyofilm, mikroorganizmanın yüzeyinde düzensiz bir şekilde dağılmış polisakkarit tabiatındaki bir matrikstir. Matriksin yoğunluğu ve genişliği sadece hücresel ve hücresel olmayan yapılar arasında değil aynı zamanda mikroorganizmaların türleri arasında da değişmektedir. Biyofilmin yapısındaki ekstrasellüler polisakkarit (EPS) matriksin yaklaşık %73-98'i sudan oluşmaktadır (141).

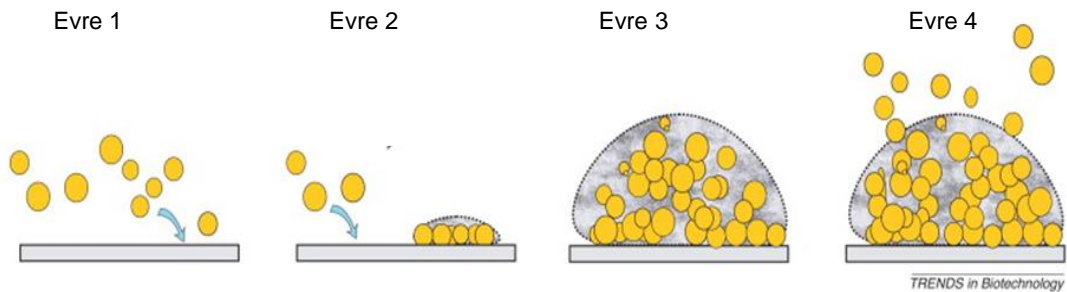
Biyofilm içerisinde yaşayan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkaridler biyofilmin ana ekstrasellüler komponentini oluşturur. Mikrobiyal hücrelerden salgılanan EPS'ler hem fiziksel hem de kimyasal özellikler açısından farklılıklar gösterir (140). EPS'ler jel ya da viskoelastik davranış sergileler ve bu fazlara geçişinde; protein ve  $Ca^{+2}$  iyonları rol oynamaktadır (147). Polisakkaridler uzun, ince moleküler zincirlerdir ve  $0,5-2,0 \times 10^6$  Da'luk bir moleküler yapıya sahiptirler. Biyofilm preparatlarında polisakkaridler bakteriyel hücre yüzeyine tutunmuş olan ince şeritler halinde ve hücrenin etrafında kompleks bir ağ oluşturmuş şekilde izlenir (147-149).

Konakçı ve çevreden kaynaklanan partiküllerin biyofilm mimarisine katıldığı bildirilmiştir. Canlı sistemlerde zaman içerisinde eritrosit ve fibrin katılımı ile besince daha zengin ve daha stabil bir biyofilm oluşumu görülmüştür (138). Biyofilmin gelişmesi, ortam pH'ı, oksijen perfüzyonu, karbon kaynağı, osmolarite, yakın çevredeki besinlerin hücre içine alınıp kullanımı ve atıkların uzaklaştırılması ile yakın ilişkide olup, bunların dışında besin kısıtlanması sonucu sunulan QS moleküllerinin salınımı da biyofilm gelişmesinde oldukça etkilidir (150).

İçerisinde yaşayan organizmaya bağlı olarak biyofilm matrisi farklı özellikler taşıyabilmektedir. Gram negatif bakterilerin nötral veya polianyonik biyofilmler oluşturduğu ve Gram pozitif bakterilerin katyonik matrisler oluşturduğu bilinmektedir (147,151).

### 2.2.3. Oluşum evreleri

Genomik çalışmalar sonunda biyofilm gelişimi ile ilgili birçok gen bulunmuştur. Bu genlerin hücre fizyolojisindeki rolleri araştırıldığında adezyon, QS, hücre duvar yapımı, metabolizma, stres cevabı ve plazmid bağlanmada etkili oldukları görülmüştür. Biyofilm oluşumuna etkili genlerin bir kısmı biyofilm oluşumunu artırırken bir kısmı da azaltmaktadır. Biyofilm oluşturan genetik materyal plazmidler aracılığı ile de kolaylıkla aktarılmaktadır. Biyofilm oluşumu dört evrede gerçekleşmektedir (142,152) (Şekil 2).



Şekil 2. Biyofilm oluşum evreleri (153).

### 2.2.3.1. Tutunma-geri dönüşümlü yapışma

Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir olaydır. Tutunma sonucu biyofilm fenotipinin ortaya çıkmasına neden olan bir dizi genetik işlem başlatılır. Mikroorganizmaların bir yüzeye tutunabilmeleri için, kendilerinin bir yüzey ile ne zaman temas kurduklarını anlamaları ve yapışma şeklinin gerçekleşmesi için öncelikle mikroorganizma ve yüzey arasında yeterli yakınlığın (<1nm) oluşması gerekmektedir. Mikroorganizmalar bu çevresel uyarıları fenotipik değişikliklere çevirebilmek amacıyla, bir verici ve bir alıcıdan oluşan düzenleyici bir sisteme sahiptir. Tutunma işleminden sonra biyofilm oluşturmak yönünde farklılaşma işleminin başlaması, QS sistemi denilen başka bir haberleşme sisteminden gelen yanıtlara bağlıdır. Bu sistem ile mikroorganizmalar çevrelerindeki popülasyonun yoğunluğunu belirlerler. Bir yüzeye tutunan her bir mikroorganizma, ortama mesaj veren bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan mikroorganizmaların sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar intersellüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla iletişim sağlarlar (154).

### 2.2.3.2. Geri dönüşümsüz yapışma

Yapışmanın, mikroorganizma yüzeyindeki piluslar, fimbrialar veya fibriller gibi ligandların; ökaryot hücrelerdeki spesifik ligandlara bağlanması ile oluşan spesifik, geri dönüşümsüz aşamasıdır (155).

### 2.2.3.3. Toplanma-mikrokoloni oluşumu ve olgun biyofilm

Biyofilmin temel birimi olan mikrokoloniler, yüzeye tutunan mikroorganizmaların bölünüp çoğalmasıyla oluşmaktadır. Mikrokolonilerin % 10-25'i hücrelerden, % 75-90'ı ise EPS matriksinden oluşmaktadır. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışmaya devam etmekte ve böylece kolonizasyon sağlanmaktadır (141). Mikrokolonilerin

büyüyüp, kompleks, mantar şeklindeki yapılara dönüşmesiyle olgun biyofilm evresi tamamlanmış olur (154).

#### 2.2.3.4. Hücrelerin biyofilm içinde dağılması, kopma ve ayrılma evresi

Mikroorganizmalar oksijen kullanımı ve antibakteriyel direnç açısından tabakalı bir yerleşim gösterir. Tabakalı yapının altında kalan hücreler diğerlerine nazaran daha stabildir. Biyofilmler, genel olarak mantarimsı görünümde olup tabanında ağırlıklı olarak stasyonel fazdaki bakteriler bulunurken yüzeye doğru bakteri dağılımı seyrelmektedir. Yüzeyde daha çok difüzyona izin veren kanallar, metabolik olarak daha aktif mikroorganizmalar, konak hücre parçaları, fibrin artıkları vb. maddeler bulunmaktadır. Mikroorganizmalar bu yapı içerisinde uygun ortamın gelişmesi halinde özel bir iletişim sistemi ile haberleşerek rahatlıkla stasyonel evreden çıkarak planktonik forma geçebilmekte ve oluşmuş biyofilm içerisinde koparak vücudun başka bölgelerine ulaşabilmektedir. Ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum sürecinin bir parçası olarak tek bir hücrenin veya multipl hücrelerin emboli şeklinde kopması sonucu da gerçekleşebilir (156,157).

#### 2.2.4. Biyofilm-mikroorganizma ilişkisi

Mikroorganizmaların vücudun herhangi bir bölgesinde sabit kalabilmek için bir takım stratejileri vardır. Mikroorganizmalar yüzey proteinleri ile konakçının fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine yapışırlar. Bu adezin ve matriks proteinleri konakçı ile mikroorganizma aderansında anahtar rol oynamaktadır (158).

Aderans sonrası mikroorganizmalar bir yandan belli bir popülasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliğine göre biyofilm yapımına başlarlar. Mikroorganizmalar gerek in vitro gerekse in vivo ortamlarda biyofilm oluşturarak bir dizi avantaja sahip olurlar (142).

#### 2.2.4.1. Çevresel faktörlere direnç

Biyofilmler mikroorganizmaları nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerden, oksijen radikallerinden, besin yoksunluğundan ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korur. Biyofilmin kan akımı ve tükürüğün yıkama gücü gibi bir takım fiziksel güçlere karşı dayanıklılığı vardır (142).

#### 2.2.4.2. Besinlerin depolanması ve atıkların uzaklaştırılması

Biyofilm içerisindeki mikrokolonileri çevreleyen alanlardan geçen yüksek geçirgenliğe sahip dolaşım sistemine benzeyen su kanalları bulunmaktadır. Bu sistem hem besinlerin biyofilm içerisinde eşit bir şekilde dağıtılması, hem de potansiyel olarak toksik metabolitlerin uzaklaştırılması görevini üstlenir (142).

#### 2.2.4.3. Fagositozdan ve antibiyotiklerden korunma

Mikroorganizmaların kümeler halinde ve EPS matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşir ve hümmoral immun sistem bileşenlerinin mikroorganizmalara ulaşmaları engellenmiş olur. Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan EPS'ler savunmada önemli rol oynayan moleküllerdir. EPS'ler bulunduğu bakteriyi güç alanlarından uzaklaştırarak inflamatuvar hücrelerin fagositozundan korurlar. Biyofilme sahip organizmalar, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoza ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençlidir. Biyofilmin, kronik seyirli enfeksiyonlara bu özelliği kazandıran önemli bir faktör olduğu bilinmektedir (141).

#### 2.2.4.4. Metabolik işbirliği, yeni genetik özelliklerin kazanılması

Mikroorganizmaların ortama adaptasyonundaki beraberlik biyofilm oluşturmada sıklıkla görülmektedir. Mikroorganizmalar biyofilm oluşturdukları gibi ortamdan aldıkları uyarılar (besin, pH, ısı vs.) sonucu hızla planktonik hale de geçebilmektedirler. Bu durum ortama uygun olarak eksprese ettikleri genler aracılığı ile olmaktadır. Tüm mikroorganizmaların çevre faktörlerine

aynı yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri ortak yaşamlarının en önemli göstergesidir. Horizontal gen transferi doğal mikrobiyal toplulukların evrimi ve genetik çeşitliliği için çok önemlidir. Bu durum özellikle çoklu ilaç dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasında önemlidir. Özellikle biyofilm içerisindeki kapalı ortam konjugasyonun kolaylıkla yapılabilmesine imkan sağlamaktadır (159). Çevreden almış olduğu sinyaller sonucunda tehlikede olduğunu algılayan mikroorganizma mevcut genler ile biyofilm oluşturarak kendini koruma altına almaktadır. Karbon katabolitlerinin konakçıda yapışmış mikroorganizmanın gen regülasyonunu indükleyerek biyofilm oluşumunda kritik rol oynaması, mikroorganizmanın konakçıda uygun bir ortam oluşturarak kalabilmesindeki mekanizmalar için biyofilm gerekliliği hipotezini ciddi bir şekilde desteklemektedir (160,161).

### **2.2.5. Biyofilm-hastalık ilişkisi**

Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ile doğal kapak endokarditi, otitis media, kronik bakteriyel prostatit, kistik fibrozis, periodontit gibi doğal seyirli hastalıklar ve bunun dışında, protez kapak, santral venöz katater, üriner kateter, ortopedik protez, kontakt lens ve intrauterin cihazlar gibi yabancı cisim enfeksiyonları arasındaki epidemiyolojik bağ artık kanıtlanmıştır. Bu ilişkide değişik mekanizmaların rol oynadığı bildirilmiştir (141).

#### **2.2.5.1. Hücrelerin ayrılması veya hücre agregatları**

Hücrelerin büyümesi ve aynı zamanda çevreden gelen streslerin artması bazen biyofilm içindeki mikroorganizmayı kopartabilmektedir. Ayrıca biyofilmin düzenleyicisi olarak bilinen açıl homoserin lakton molekülü biyofilmin oluşumunu sağladığı gibi kopmaya neden olarak, dolaşım sisteminde enfeksiyona neden olabilir (162).

#### 2.2.5.2. Endotoksin üretimi

Biyofilm üreten Gram negatif bakteriler endotoksin üretimini artırarak hastada daha fazla immun yanıtı da neden olmaktadır. Oluşan inflamatuvar yanıtın büyüklüğü enfeksiyonun şiddetini de etkilemektedir (163-165).

#### 2.2.5.3. Konağın immun yanıtına direnç

Biyofilm oluşturan mikroorganizmalara karşı makrofaj fagositik aktivitesinin veya yapılan opsonik antikörlerin yetersiz olduğu gösterilmiştir (166-169).

#### 2.2.5.4. Direnç aktarımı

Bir mikroorganizmada bulunan direnç genlerinin, plazmidlerin biyofilmlere konjugasyonu ile türler arasında aktarılabildiği gösterilmiştir (170,171).

### 2.2.6. Quorum-sensing (Çoğunluğu algılama)

Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların bir araya gelerek belirli bir yüzeye tutunarak yapışmaları ve o yüzeydeki diğer türlerle birlikte yaşamaya devam ettikleri, rastgele gerçekleşen bir olay değildir. Bazı mikroorganizmalarda biyofilm oluşumunun, hücreden hücreye iletişim dizgeleri ile kontrol edildiği açıktır. Ökaryot ve prokaryot hücrelerden salınan ve hücreler arası sinyal iletimini sağlayarak, mikroorganizmanın gen ekspresyonunu düzenleyen açıl homoserin lakton gibi moleküllerle, biyofilm yapımının düzenlenebileceği gösterilmiştir. Bu veriler biyofilmin patojenite ve çevreye adaptasyonda önemini artırmıştır. Çoğunluğu algılama, QS olarak adlandırılan bu dizgeler, geniş bir organizma topluluğunda virulans etkenlerinin düzenlenmesinde de yer alırlar (162,172,173).

QS moleküllerini hücreSEL metabolitlerden ayıran temel özellikler; QS molekülünün özel bazı koşullar altında salınması, hücre dışında birikmesi ve özgün reseptörlerce tanınması, molekül miktarı belli bir eşiği aştığında

planlanmış bir yanıtın ortaya çıkması ve bu yanıtın QS molekülünü metabolize ya da detoksifiye etmesi olarak sıralanabilir (174).

QS; mikroorganizmalarda pek çok fizyolojik olayın düzenlenmesinde rol oynar; kümeleşme, hareket, biyofilm oluşturma, antibiyotik sentezi, konjugasyon, virulans gibi. Bu düzenlenme sonucunda bakteri ortamdaki besin maddelerinin daha rasyonel kullanımı, bulunduğu ortama uyum sağlama, çevresel etkenlere karşı korunma, aynı ortamdaki diğer mikroorganizmalarla yarışma veya konağın savunma mekanizması ile mücadele etme, populasyondaki birey sayısını ortamın gereklerine göre kontrol etme gibi fonksiyonları yerine getirme olanağı bulur. Mikroorganizmaların salgıladıkları kimyasal maddeler aracılığı ile genetik mekanizmalar harekete geçer ve yeni davranışlar ortaya çıkar (175). Aynı tür veya farklı türler arasında sinyal molekülleri ile etkileşim olabildiği gibi farklı cinsler arasında da pozitif veya negatif yönde etkileşim olduğu gözlenmiştir (176).

Son yıllarda bakteriler gibi mantarlarda da QS düzenlemelerinin bulunduğu ve biyofilm oluşumu, patogenez gibi mantarların topluluk temelli davranışlarını etkilediği bildirilmektedir. Özellikle *C. albicans*'a ait QS moleküllerinin varlığı gösterilmiştir (177).

### **2.2.7. *Candida* ve biyofilm**

*Candida*larda slime üretimi, aderans ve kolonizasyonda rol oynayan, *Candida*'yı konağın savunma mekanizmalarından koruyan önemli bir patojenite markeri konumundadır (178). *Candida*'ların yapmış olduğu biyofilm, bir yüzeye ağ şeklinde bağlanmış olup iki tabakalı, mayalar, hifler ve psödohiflerden oluşan bir yapıdır. Alttaki tabaka maya hücrelerinden, daha kalın olan üstteki tabaka ise hiflerden meydana gelmiştir. Biyofilm oluşumundaki ilk basamak, maya formunun cisim yüzeyine tutunması ve bunu takip eden 3-7 saat içerisinde germ tüp oluşumunun görülmesidir.



Matür biyofilm maya, hif ve psödohif formlarının hepsini içerir (179). *Candida* türlerinde biyofilm oluşumunu etkileyen bazı faktörler vardır:

#### 2.2.7.1. Yüzey özellikleri

Yüzeyin fizikokimyasal özellikleri *Candida* adezyonunu ve bunu izleyen biyofilm oluşumunu etkileyebilir. Yüzeyin düzensiz oluşu mikroorganizmanın tutunmasını ve kolonizasyonunu artırır. Bunun nedeni ise düzensiz yüzeylerde suyun koparma kuvvetinin oldukça az olması ve bu noktalarda yüzey alanının genişlemesidir. Tutunulan yüzeyin kimyasal özellikleri de tutunma hız ve boyutuna katkı sağlar. Mikroorganizmalar teflon ve bazı plastik gibi hidrofobik nonpolar yüzeylere cam ya da metal gibi hidrofilik yüzeylerden çok daha hızlı tutunabilmektedirler (180).

#### 2.2.7.2. Sıvı ortam içeriği

Sıvı ortamın pH değeri, oksijen ve besin içeriği, iyon gücü, ve ısı yüzey üzerindeki mikrobiyal birleşmede önemli rol oynar (140). Mikroorganizmalar biyofilm oluşturmak için, içinde buldukları ortamın içeriğinden etkilenirler. *Candida* türleri hem aerop hem de anaerop koşullarda biyofilm oluşturabilirler (181).

*Candida*ların dış yüzeyine ve yanak mukozasına yapışması için tükürükte bulunan statherin denen bir protein gerekir. Statherin bloke edildiğinde dışın sert tabakasına tutunma % 93, yanak mukozasına tutunma % 43 azalır. Ortamda galaktoz veya  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  gibi iki değerlikli iyonlar varlığında da biyofilm oluşturmaları artar (68).

Yapılan bir çalışmada 500mM galaktozun 50mM glukozdan daha yüksek derecede biyofilm oluşturduğu; başka bir çalışmada ise glukoz, fruktoz ve laktozun, sükroz ve maltozla karşılaştırıldığında *Candida* biyofilmini artırdığı gösterilmiştir (182,183).

### 2.2.7.3. Sekresyonların etkisi

Bir materyal yüzeyi, içinde organik polimer bulunan sıvı ile temas ettirildiğinde materyal yüzeyi ince bir film halinde kaplanabilir. Bu şekildeki oluşum diğer mikroorganizmaların o yüzeye tutunmasını ve kolonizasyonunu artırmaktadır. Bu nedenle bu yüzeye öncü film tabakası denir. İnsan vücudunda öncü film tabakası oluşumu daha karmaşık olarak gerçekleşmektedir. Kan, gözyaşı, tükürük, idrar ve solunum yolları salgıları konak kaynaklı öncü filmlerin biyomateryallere yapışmasını artırmaktadırlar. Santral venöz kateterlerde, Gram negatif, Gram pozitif bakteriler ve mayaların yapışması ve biyofilm oluşturması, kan ürünleri ve öncü film tabakası varlığında daha hızlı olmaktadır (184).

### 2.2.7.4. Sıvının akım hızı

Katı yüzeyler üzerinde akışkan sıvıların fiziksel özellikleri biyofilm oluşumunda önemli rol oynar. Akan sıvılarda akım hızı, yüzeye en yakın sıvı komşuluğunda en azdır. Bu akım bölgesine hidrodinamik akım bölgesi denir. Bu bölgenin kalınlığı sıvının hızı ile ters orantılıdır. Bu sınır tabakanın dışındaki kısımda yoğun bir türbülans vardır. Dolaşım ve üriner sistem gibi hafif akımın olduğu ortamlarda statik ortamlara kıyasla biyofilm oluşumu daha fazladır (180).

### 2.2.7.5. EPS

EPS, *Candida* adezyonu ve biyofilm oluşumunda kilit rol oynar. Sekrete edilen madde, üç boyutlu, jel benzeri, yüksek ölçüde hidrate, yerel olarak yüklü ve mikroorganizmaların immobilize edildiği bir ortam oluşturur. EPS biyofilme, fagositik hücrelere karşı savunma, biyofilm bütünlüğünü sağlayan yapıyı oluşturma, aktif ilaç difüzyonunu sınırlama ve tüm bunların kombinasyonunu sağlama gibi birçok özel fonksiyon kazandırır. Bakteriyel biyofilm matriksi esas olarak EPS yapıdadır. Benzer şekilde; major karbonhidrat bileşeni türlerimize göre değişiklik göstermekle birlikte, *Candida* biyofilminin yaklaşık % 40'ı karbonhidrattan oluşur (185,186).

#### 2.2.7.6. *Candida* türü

Biyofilm oluşturma yeteneği açısından *Candida* türleri arasında belirgin farklar vardır. Farklı türlerin biyofilm oluşturma düzeyleri, oluşturdukları biyofilmlerin morfolojisi, metabolik aktiviteleri, EPS kompozisyonu ve dolayısıyla antifungal dirençleri birbirlerinden farklı bulunmuştur (30).

#### 2.2.8. Biyofilm-antifungal direnç ilişkisi

Biyofilm içinde bulunan *Candida*'ların antifungal ilaçlara daha dirençli olmasının birçok nedeni vardır. Bunlardan en önemlileri antifungal ilaçların biyofilm matrisine iyi penetre olamaması, biyofilm içindeki hücrelerin daha yavaş üremesi ve hücrelerin yüzeyinde meydana gelen değişikliklerdir (187,188).

EPS, bakteriyel biyofilmlerde fiziksel bir bariyer gibi rol oynayarak antimikrobialerin biyofilme geçişini engeller ve ilaç direncine neden olur. Ancak biyofilm içindeki *Candida*'nın antifungal direncinde EPS'nin rolü net değildir. *C. albicans* biyofilminin sürekli sıvı akışı altında oluşturularak, matris sentezinin stimüle edildiği bir çalışmada artmış amfoterisin B direnci saptanmıştır (186). EPS'nin kaldırıldığı bir başka çalışmada ise, amfoterisin B kullanımı ile biyofilmdeki *Candida* hücrelerinin sağkalımının % 20 oranında azaldığı gösterilmiştir (189).

Biyofilm içindeki *Candida*'ların antifungallere karşı direnç geliştirmesinde MDR1, CDR1 ve CDR2 genleri sorumlu tutulmaktadır (190). Yapılan bir çalışmada MDR ve CDR geni biyofilmde "faz spesifik" olarak saptanmıştır ve azol direncini sadece erken fazda kolaylaştırdığı izlenmiştir (191). Başka bir çalışmada CDR1 ve CDR2 ekspresyonu biyofilm hücrelerinde, serbest hücrelere göre anlamlı ölçüde artarken, EFG11 ve MDR1 gen ekspresyonunda böyle bir fark saptanmamıştır (192).

*Candida* biyofilminde serbest hücrelerden farklı olarak yüksek ölçüde antifungal tolerans gösteren hücreler saptanmıştır. Biyofilm içindeki

*Candida*'ların antifungal ilaçlarla öldürülmeye karşı bifazik patern gösterdiği anlaşılmıştır. Bir kısım subpopülasyon dirençli kalırken, bir kısmı antifungallere duyarlılık göstermiştir (193).

### **2.2.9. Biyofilm varlığında antimikrobiyal duyarlılık testleri**

Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların, antimikrobiyallere planktonik formlarından daha dirençli oldukları bilinmektedir ve planktonik formlara göre saptanan antimikrobiyal duyarlılıkları ile biyofilm enfeksiyonları tedavi edilememektedir. Bu nedenle, biyofilm oluşturan klinik izolatların in vitro duyarlılıklarının saptanması önem arz etmektedir (194,195).

#### **2.2.8.1. Calgary biyofilm yöntemi (CBY)**

Biyofilm varlığında antimikrobiyal duyarlılığı saptamak için kullanılan en popüler yöntemdir. Biyofilmi yok eden minimum konsantrasyon olan minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK)'nu saptamaktadır. Ancak CBY ile biyofilmdeki bakterilerin asıl sayısı tespit edilememektedir (194,196,197).

#### **2.2.8.2. BioTimer yöntemi**

Pantanella ve ark. tarafından 2008 yılında geliştirilen bu yöntem biyofilm içindeki mikroorganizmaların kolaylıkla sayılmasını sağlayan bir başka yöntemdir. Bu yöntemde, mikroorganizmanın metabolizmasına bağlı olarak renk değiştiren fenol kırmızısı indikatör olarak kullanılarak, oluşan renk değişimine bağlı biyofilm tabakada bulunan bakteri sayısı hesaplanmaktadır (194).

## **2.3. Melatonin**

### **2.3.1. Melatonin sentezi ve kontrolü**

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) biyosentezi, kandan beze difüze olan triptofanın, pineal bezde triptofan hidroksilaz enzimi ile hidroksillenmesiyle başlar. Böylece meydana gelen 5-hidroksi triptofan, L-aromatik aminoasit dekarboksilaz enzimi ile karboksil grubunu kaybeder ve neticede serotonin (5-hidroksi triptamin) meydana gelir. Serotonin de, N-asetil transferaz ve hidroksiindol-O-metil transferaz enzimlerinin birbirini takip eden aktiviteleri ile son ürün olan melatonine dönüşür (198).

Melatonin salgısı, canlı türlerine göre farklılık gösteren sirkadiyen bir ritme sahiptir. Bu farklılık, hormonun gece pikinin meydana geldiği saatler ve süreleri ile ilgilidir. Serum melatonin konsantrasyonu, geceleri gündüze göre 3-10 kat daha yüksektir. Melatonin salgısının sirkadiyen ritmi endojen kökenlidir, bu da uyarıların suprakiazmatik çekirdekten çıktığını yansıtır. Melatonin sentezi ve salgılanması karanlıkta uyarılırken, ışık ile baskılanmaktadır (199).

### **2.3.2. Melatonin metabolizması**

Melatonin pineal bezde depolanmadan hızlı bir şekilde komşu kapiller damarlara geçer. Plazmada % 70'i albumine bağlı olarak bulunur. Lipofilik özellikte olmasından dolayı tüm biyolojik doku ve sıvılara dağılımı iyidir. Çoğu karaciğerde olmak üzere böbrekte de metabolize edilir. Melatoninin kandaki yarı ömrü 10-40 dakika civarında olup eksojen melatoninin metabolik yarı ömrü 20-60 dakikadır. Melatoninin % 90'ı karaciğerde hidroksillenir ve kandan tüm vücut sıvılarına dağılır. Başlıca metaboliti 6-sülfatoksimeleatoninindir (200).

### 2.3.3. Melatoninin etki mekanizması

Melatonin lipid çözünürlüğünden dolayı hücre membranından kolaylıkla geçer ve tüm hücre organellerine nüfuz edebilir. Fizyolojik etkilerini hem spesifik reseptörler aracılığı ile hem de reseptörden bağımsız olarak gösterebilir. Beyinde ve suprakiazmatik nükleusta melatonine ait membran reseptörleri belirlenmiştir (198).

Melatonin reseptörleri Mel-1a, Mel-1b ve Mel1c olmak üzere üç tiptir. Mel-1a reseptör aracılığı ile sirkadiyen ve reproduktif etkilerinin gerçekleştiği düşünülür. Mel-1b reseptörü beyin ve retinada eksprese olur ve her iki bölgede de dopaminerjik fonksiyonlarla da ilişkili olduğu düşünülür. Mel-1c geni ise insanda saptanmamıştır. Melatoninin bugüne kadar saptanabilmiş bir antagonisti yoktur (201).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda melatonine ait olduğu gösterilen ya da düşünülen fonksiyonlar şu şekilde sıralanabilir:

Salgılanmasındaki sirküler ritmden dolayı bu pineal hormon suprakiazmatik nükleus üzerine etki ederek 24 saatlik siklusların düzenlenmesinde rol oynar. Melatoninin uyutucu etki ve uzun uçak yolculuklarının yarattığı fizyolojik düzensizliğin tedavisinde kullanılması biyolojik saat olarak da tanımlanan suprakiazmatik nükleusla etkileşiminin bir sonucudur (202).

Potansiyel antikanser bir madde olduğuna inanılmaktadır. Özellikle meme, prostat ve kolorektal kanserler üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur (203,204). Melatonin antioksidan aktivitesi oldukça önemlidir. Melatonin 1-50mg/kg dozda nöroprotektif etki göstermektedir (205). Rejenerasyonu stimule edici, uyku ritmi ve endokrinolojik aktivite düzenleyici, osteoblastik aktiviteyi hızlandırıcı ve immunitiyi güçlendirici etkisi, antiepileptik ve hipotermik etkisi olduğu bildirilmiştir (206-208).

Periferik sinir dejenerasyonunda ve kollajen formasyonunda etkisi olduğuna dair ve nöroprotektif etkisine dair çalışmalar mevcuttur (209,210).

Topikal ya da sistemik kullanılan melatoninin yara iyileşmesine pozitif etkisi olduğu bildirilmiştir (211). Kardiyoprotektif ve analjezik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (212-213).

Pineal bezin yaşlanma ile birlikte fonksiyonlarının azalmasına bağlı olarak melatonin sentezinde de azalma görülmektedir. Farelerde yapılan bir çalışmada, melatonin tedavisinin, farelerin yaşam süresinde % 25'lik bir artışa neden olduğu ve bu farelerin daha genç, sağlıklı ve güçlü göründükleri bildirilmiştir (214).

#### **2.2.4. Melatoninin antioksidan etkisi**

Melatonin yapısında bulunan pirol halkası nedeniyle OH ve O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikallerini yakalamada yüksek bir kapasiteye sahiptir. Toksik hidroksil radikalleri ile reaksiyona girerek, bütün hücre kompartmanlarındaki biyomolekülleri, serbest radikal oluşumuna karşı bölgesel olarak yerinde korur (215). Çok reaktif olan hidroksil radikallerinin yıkıcı etkilerine karşı primer nonenzimatik savunma mekanizmasını oluşturur ve yapılan araştırmalarda organizmayı oksidatif hasara karşı korumada melatonin; mannitol, glutatyon, E vitamini, askorbik asit gibi bilinen diğer antioksidanlardan daha etkili görülmüştür (216). Askorbik asit, E vitamini ve glutatyon gibi antioksidanlardan farklı olarak, melatonin peroksit radikalini yakalayarak, yayılmakta olan lipid peroksidasyonunu sonlandırmaktadır. Melatoninin bu etkilerinin diğer antioksidanlardan daha güçlü olduğu, in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir (217).

#### **2.2.5. Melatonin ve immun sistem**

Enfeksiyonlara karşı melatoninin koruyucu etkisinin mekanizması, serbest radikal süpürücü olması, antioksidan enzim indükleyici etkisi, immun sistem fonksiyonlarındaki pozitif düzenleyici olması, inflamasyonu inhibe

edici rolü ve programlanmış hücre ölümündeki regülatör fonksiyonları ile açıklanabilir (218).

Melatoninin immun sistem hücrelerini melatonin reseptörleri aracılığı ile etkilediği düşünülmektedir. Lökositler ve lenfositler üzerinde saptanan melatonin reseptörleri bunun kanıtı olarak gösterilmektedir. Lenfositler üzerindeki melatonin reseptörleri çoğunlukla CD4+ T lenfositleri, CD8+ T lenfositleri ve B hücrelerinde bulunmuştur. Ayrıca yapılan çalışmalar, melatoninin bu reseptörler aracılığı ile stimüle olmuş lenfositlerin proliferatif yanıtını modüle ettiğini ortaya koymuştur (219).

Melatonin, periferel kandaki mononükleer hücrelerde IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-1 ve IL-12 üretimini stimüle etmektedir (220,221).

Mukozal immunitede etkinlik gösteren IgA ile melatonin ilişkisinin incelendiği bir çalışmada ise idrarda melatonin artışı ile salyada IgA artışı arasında korelasyonun olduğu saptanmıştır (222). Mukozal immun yanıt için özellikle önemli olan IgA seviyesindeki bu artış enfeksiyona bağlı hastalıklardan korunmada önemli bir veridir. Ayrıca farelere melatonin uygulanması sonrası doğal katil hücreler ve monosit sayılarında artış bildirilmiştir (223). Melatoninin immun sistem üzerindeki bir diğer önemli etkisi ise antikora bağlı hücrel sitotoksiteyi artırmasıdır (224).

### **2.2.6. Melatoninin antimikrobik etkisi**

Melatonin, immun sistemi güçlendirici etkisinin yanı sıra antimikrobik özelliğe sahip olması nedeniyle de enfeksiyonlara karşı etkili olmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu antifungal, antibakteriyel ve antitüberküloz etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (225). Antimikrobik etkisini mikroorganizmaların fagositozunu kolaylaştırarak, mikroorganizmaların demir kullanabilme özelliklerini bozarak, özellikle mayalarda hücre membran yapısında bulunan lipit miktarını azaltarak ve biyofilm oluşumunu engelleyerek göstermektedir. (226-229).



Melatoninin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* ve karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* suşları üzerine antimikrobik özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada Gram negatiflere daha etkin olduğu gösterilmiştir (230). Ayrıca çoklu ilaç direncine sahip *Mycobacterium tuberculosis* suşlarına karşı da antitüberküloz etkili olduğu raporlanmıştır (229). Melatoninin bu etkileri genel anlamda in vitro deneylerle araştırılmış olup in vivo çalışmaların sayısı azdır. Ancak yeni doğan sepsislerinde tedavide yararlı olduğunu gösteren in vivo bir çalışma da mevcuttur (231).

Bütün bu özelliklerden dolayı, melatonin, *Candida* enfeksiyonlarında alternatif bir tedavi yöntemi olabilir mi sorusu akla gelmektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamız Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen 2015.04.01.352 protokol numaralı projedir. Etik kurul onayı 2015/149 karar no ile 07.07.2015 tarihinde alındı.

#### 3.1. Suşların Seçimi ve Saklanması

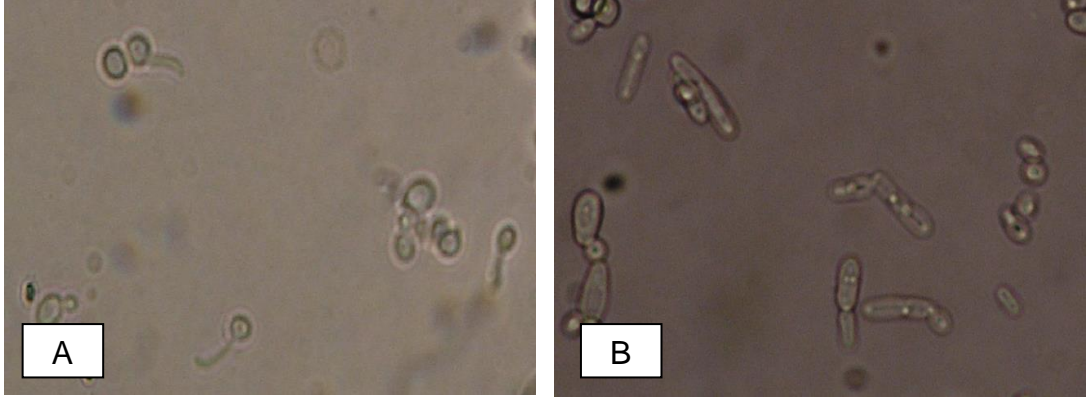
Bu çalışmaya; Eylül 2013 ile Nisan 2016 tarihleri arasında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen toplam 350 adet *Candida* suşu enfeksiyon veya kolonizasyon ayrımı yapılmaksızın dahil edildi.

Tüm suşlar brain-heart infüzyon broth (BHIB) içeren eppendorf tüpü içerisinde çalışma sürecine kadar -20°C'de saklandı. Stoklanan suşlar kullanılacakları zaman, tekrar SDA besiyerine pasajlanarak canlandırıldı. Çalışmada kontrol suşu olarak *C. parapsilosis* ATCC 22019 kullanıldı.

#### 3.2. İdentifikasyon

##### 3.2.1. Germ tüp testi

Test edilecek olan *Candida* suşunun SDA besiyerindeki kolonisinden öze ile bir miktar alınarak 0,5 ml insan serumu içerisinde süspansiyon edildi. 35 °C'de 3 saat inkübasyon sonrasında süspansiyondan bir damla alınarak lam-lamel arasında ışık mikroskopunda 40x objektif ile incelendi. İncelemede ana hücreden orjin alan ve başlangıç noktasında boğumlanma yapmaksızın ve uzunluğu boyunca belirgin kabarık olmayan, filament şeklinde uzantılar gösteren yapılar germ tüpü olarak değerlendirildi ve incelenen suşun *C. albicans* olduğuna karar verildi (Şekil 3) (14).

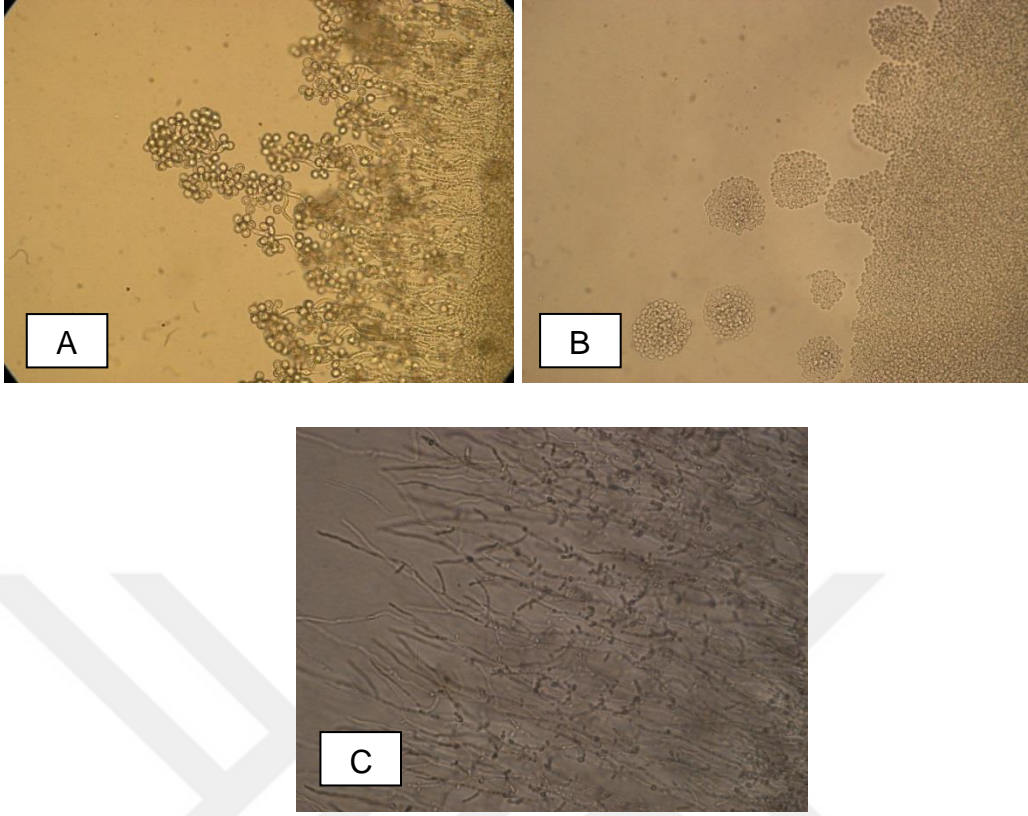


Şekil 3. Germ tüp testi. A) Germ tüp oluşturmuş *C. albicans*. B) Psödohif oluşturmuş Non-*albicans Candida*.

### 3.2.2. Mısır unu-tween 80 agarda morfolojik değerlendirme

Mısır unu-Twen 80 agara Dalmau tekniğine uygun olarak iğne uçlu öze ile saf maya kolonilerinden alınarak besiyerini yırtmadan çizgi şeklinde ince bir ekim yapıldı, ekim çizgisinin üzerine lamel kapatılarak hazırlanan lam kültürü 25 °C'de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ekimler ışık mikroskopunda 10x ve 40x objektif ile incelendi.

Psödohiflerin uçlarında ve yan dallarında görülen büyük, kalın duvarlı, yuvarlak klamidosporeler ile hif birleşim yerlerindeki blastospor kümeleri *C. albicans*; psödohif ve hif boyunca tek tek veya ufak kümeler yapacak şekilde dizilim gösteren blastosporlar *C. tropicalis*; hif ve psödohif yapısı olmadan ucunda tomurcuklanmalar görülen küçük oval blastosporlar *C. glabrata*; dev hif ve gözyaşı damlası şeklinde blastosporlar *C. parapsilosis*; psödohif boyunca ırmakta yüzen kütükler görünümünde uzun blastosporlar *C. kefyr*; az sayıda kısa ve ince psödohifler ve bunların boğumları üzerinde küçük blastokonidyumların oluşturduğu kümeler *C. guilliermondii*; ağaca benzer şekilde dizilmiş uzun blastosporlar ve psödohif *C. krusei*; zayıf, kıvrık, dallanmış psödohif ve uzamış blastosporlar *C. lusitaniae* olarak değerlendirildi (Şekil 4) (55).



Şekil 4. *Candida*'ların mısır unu-twen 80 agardaki morfolojik görüntüleri. A) Klamidospor oluşturmuş *C. albicans*. B) Küçük oval blastospor oluşturmuş *C. glabrata*. C) Psödohif ve blastospor oluşturmuş *C. tropicalis*

### 3.2.3. Otomatize sistem ile identifikasyon

Konvansiyonel yöntemlerle tanımlanamayan veya tanımlanan suşların doğrulanması için Vitek 2 (bioMerieux, France) otomatize sistem kullanıldı. Vitek 2, kolorimetrik reaktif kartların kullanıldığı otomatize identifikasyon sistemidir. Bu amaçla Vitek 2 ID-YST kartları kullanıldı. Vitek 2 ID-YST kartları klinik öneme sahip *Candida* türlerinin büyük bir çoğunluğunu doğru şekilde tanımlayabilmektedir (232).

Süspansiyonun hazırlanması amacıyla, üretici firmanın önerileri doğrultusunda, 24 saatlik taze kültürden steril öze yardımıyla yeterli miktarda şüpheli *Candida* kolonisi alınarak McFarland 2,0 bulanıklığında olacak şekilde 3 ml steril % 0,45'lik sodyum klorür (NaCl) ile 12 x 75 mm'lik temiz

plastik polistiren test tüpleri içerisinde sulandırıldı. *Candida* süspansiyonu içeren test tüpleri özel kasetlere, Vitek 2 ID-YST kartları ise komşu yuvaya yerleştirildi (Şekil 5). Bu kartlara karşılık gelen süspansiyon tüplerinden kartlara yeterli sıvı emilimi olduktan sonra, kart üzerindeki barkotlar okutulurak cihaza yerleştirildi. Yaklaşık 15-18,5 saat içerisinde cihazdan identifikasyon sonuçları alındı.



Şekil 5. Vitek 2 otomatize sisteme ait özel kaset ve ID-YST kartı.

### 3.3. Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi

*Candida* suşlarında biyofilm oluşumu, modifiye mikropalak yöntemi ile araştırıldı (Şekil 6). Standart suş olarak *C. parapsilosis* ATCC 22019 çalışmaya dahil edildi.

### 3.3.1. Modifiye mikropalak yöntemi (MMP)

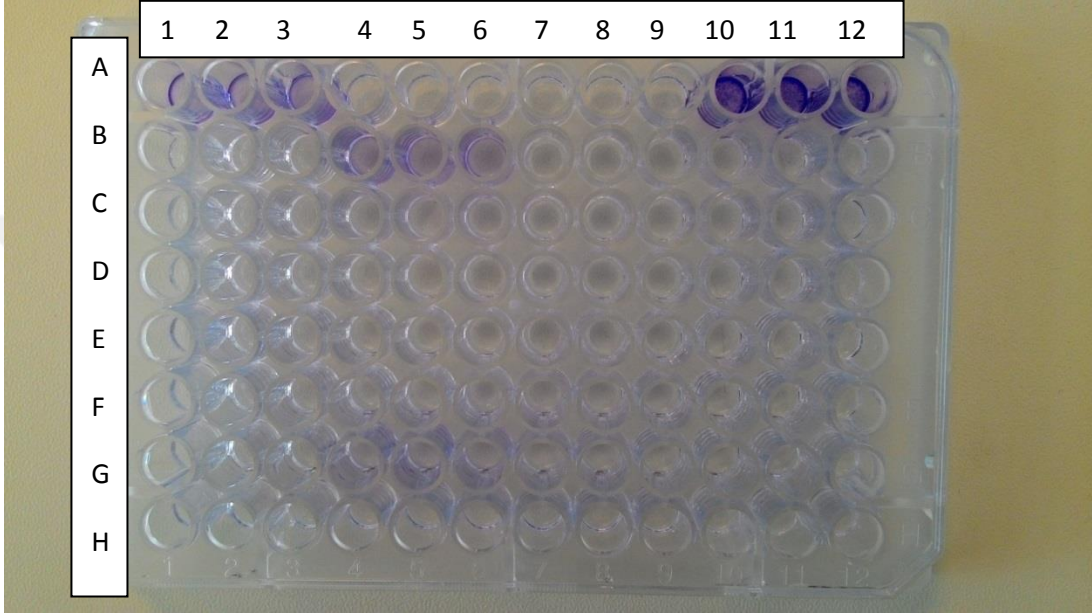
% 8 glukozlu SDB: Bir litre distile suya, ticari olarak toz halinde hazır şekilde temin edilen SDB (SRLChem, India)'dan 30 gr ve son glukoz konsantrasyonu % 8 olacak şekilde glukoz (Merck, Germany) eklenerek hazırlanan besiyerinin pH'sı 5,5-6,0'a ayarlanarak, 121°C'de 15 dakika steril edildi.

Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS): Bir litre distile suya, 8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 1,25 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> eklenerek pH 7,2 olacak şekilde hazırlandı.

% 1'lik kristal viyole: 1 gr kristal viyole (HiMedia, India), 100 ml distile su ile karıştırılarak çözüldü ve karanlık bir ortamda 24 saat dinlenmeye bırakılan boya, iki kez filtre kağıdından süzülerek kullanıma hazır hale getirildi.

Deneyin Yapılışı: SDA'da üretilen 24 saatlik kolonilerden bir öze dolusu alınarak, son glukoz konsantrasyonu % 8 olacak şekilde hazırlanmış SDB'den 10 ml içeren steril cam tüplere inoküle edildi. 35°C'de 24 saat inkübe edilen tüpler 5 saniye vortekslenerek, % 8 glukoz içeren SDB ile 1/100 oranında sulandırıldı. Hazırlanan süspansiyonlardan 200 µl alınarak 96 kuyucuklu U tabanlı mikropalalara, her suş için 3 kuyucuğa eklendi. Her plakta negatif kontrol amacıyla 3 kuyucuğa steril besiyeri, pozitif kontrol amacıyla 3 kuyucuğa da *C. parapsilosis* ATCC 22019 konularak, buharlaşmayı engellemek amacıyla plakların kapakları kapatıldı ve 35°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucukların içeriği otomatik pipetle aspire edilerek dört kez PBS ile yıkandı. Daha sonra kuyucuklar beş dakika metanol (Sigma Aldrich, USA) ile fikse edildi. Metanol aspire edildikten sonra kuyucuklar 200 µl % 1'lik kristal viyole ile boyandı ve onbeş dakika bekletildi. Boya aspire edildi ve plaklar ters çevrilerek kuyucukların kuruması sağlandı. Kuyucukların optik dansiteleri microELİSA otomatik okuyucuda (BioRad, USA) 490 nm dalga boyunda okutuldu. Steril besiyeri içeren üç kuyucuğun optik dansitelerinin ortalaması alınarak bu değere +2

standart sapma eklenerek, sınır değeri (cut-off -  $OD_C$ ) belirlendi. Her köken için çalışılan üç kuyucuğun optik dansitelerinin (OD) ortalaması alındı. Elde edilen cut off değerine göre biyofilm pozitiflikleri yorumlandı. Buna göre  $OD \leq OD_C$ : negatif,  $OD_C < OD \leq 2xOD_C$ : zayıf pozitif (+),  $2xOD_C < OD \leq 4xOD_C$ : orta pozitif (++) ,  $4xOD_C < OD$ : kuvvetli pozitif (+++) olarak değerlendirildi (233).



Şekil 6. MMP yöntemi ile biyofilm oluşumunun gösterilmesi. A1, A2, A3: Pozitif kontrol zayıf pozitif *C. parapsilosis* ATCC 22019. H10, H11, H12: Negatif kontrol steril besiyeri. A10, A11, A12: Kuvvetli pozitif klinik örnekten izole edilen *Candida tropicalis*.

### 3.4. Planktonik Formda Antifungal Duyarlılık Testi

Orta ve kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu saptanmış *Candida* suşlarının planktonik formunda amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve kaspofungin tek başına ve melatonin ile kombinasyonlarının MİK değerleri CLSI M27-A3 kriterlerine uygun olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile araştırıldı (133).

### 3.4.1. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Yöntem CLSI M27-A3 önerileri doğrultusunda hazırlandı ve uygulandı (133).

Antifungal ilaçlar: Antifungal ilaç olarak amfoterisin B (Santa Cruz Biotechnology, USA), flukonazol (Santa Cruz Biotechnology, USA), vorikonazol (Sigma Aldrich, USA) ve kaspofunginin (Sigma Aldrich, USA) saf etken maddeleri kullanıldı.

Diğer kimyasallar: Antifungal ilaçlarla kombine edilerek antifungal etkisine bakılacak olan melatoninin (Santa Cruz Biotechnology, USA) saf etken maddesi ve suda çözünemeyen amfoterisin B. vorikonazol ve melatoninin çözünemesi için dimetil sülfoksit (DMSO) (Loba Chemia, India) kullanıldı.

Besiyeri: Besiyeri olarak L-glutamin içeren Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco, UK) hazır sıvı besiyeri kullanıldı.

Antifungal ilaçların ve melatoninin sulandırımı: İlaç solüsyonlarından, amfoterisin B son konsantrasyonu 16 µg/ml olacak şekilde DMSO içinde çözülerek, flukonazol son konsantrasyonu 128 µg/ml olacak şekilde steril distile su içinde çözülerek, vorikonazol son konsantrasyonu 16 µg/ml olacak şekilde DMSO içinde çözülerek ve kaspofungin son konsantrasyonu 32 µg/ml olacak şekilde steril distile su içinde çözülerek hazırlandı (133). Melatonin ise çözelti içerisindeki son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde DMSO içinde çözülerek hazırlandı (227).

Maya süspansiyonlarının hazırlanması: Test edilecek suşların SDA'da saf kültürleri elde edildikten sonra 24 saatlik kültüründen birkaç koloni alınarak 3 ml steril serum fizyolojik içinde homojen süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyon 15 sn vortekslelendikten sonra bulanıklığı spektrofotometrik olarak 530 nm'de McFarland 0,5 bulanıklığına ayarlandı. Daha sonra bu süspansiyondan 10 µl alınıp 1 ml steril serum fizyolojik içine konularak süspansiyon seyreltildi. Daha sonra bu süspansiyonun tamamı 9 ml L-

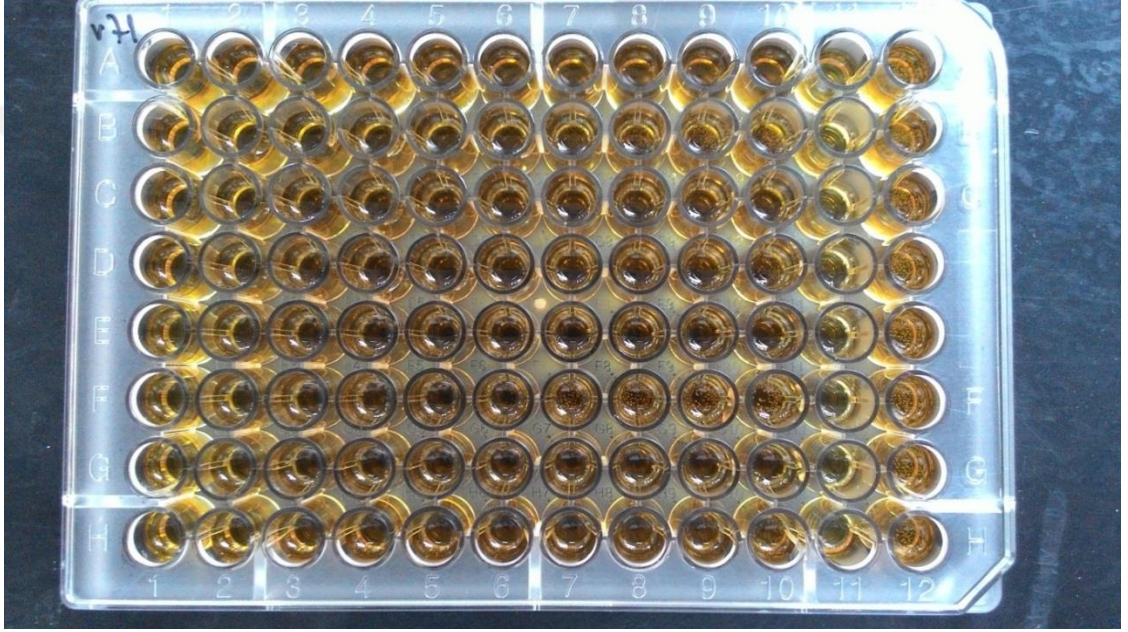


glutamin içeren RPMI 1640 sıvı besiyeri içine eklenerek yoğunluğu  $5 \times 10^4$  cfu/ml olan maya süspansiyonu hazırlandı (133).

İnokulasyon işlemi: İlk olarak mikroplaklardaki her bir kuyucuğa 100 µl L-glutamin içeren RPMI 1640 sıvı besiyeri konuldu. Daha sonra antifungal ilaçların çift kat sulandırılmalarını yapmak amacıyla ilk kuyucuklara 100 µl ilaç süspansiyonlarından konuldu ve ilk kuyucuklardan 100 µl alınıp ikinci kuyucuklara konuldu, ikinci kuyucuktan 100 µl alınıp üçüncü kuyucuklara konuldu ve bu şekilde son iki kuyucuğa kadar devam edilerek en son alınan 100 µl dışarı atıldı. Buna göre antifungal ilaçların konsantrasyon aralıkları amfoterisin B için 0,03-16 µg/ml, flukonazol için 0,25-128 µg/ml, vorikonazol için 0,03-16 µg/ml, kaspofungin için 0,06-32 µg/ml oldu. En son olarak, sondan bir önceki kuyucuk hariç her bir kuyucuğa 100 µl maya süspansiyonu ilave edildi. İlaç ve maya süspansiyonu içermeyen sondan bir önceki kuyucuk besiyeri kontrol, ilaç içermeyen son kuyucuk ise mikroorganizma kontrol kuyucuğu olarak kullanıldı (133). Aynı işlem ikinci kez melatoninle birlikte yapıldı. Kuyucuklara eklenen 100 µl ilaç süspansiyonlarının 50 µl'si melatonin, 50 µl'si antifungal ilaç olacak şekilde ayarlandı. Yarı yarıya süspansiyon etmeye bağlı olarak antifungal ilaçların konsantrasyonlarının azalmaması için son konsantrasyonları bir üst dilüsyondan hazırlandı.

İnkübasyon ve MİK değerlerinin saptanması: Mikroplaklar 35 °C'de 48 saat inkübe edildi. Mikroorganizma kontrolünde (son kuyucuk) üreme olduğu ve besiyeri kontrolünde (sondan bir önceki kuyucuk) üreme olmadığı tespit edildikten sonra, MİK değerleri CLSI'nin önerdiği kriterlere göre saptandı. Amfoterisin B ve kaspofungin için üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon, flukonazol ve vorikonazol için üreme kontrol çukuruna göre bulanıklığı belirgin (~ % 50) azaltan en düşük konsantrasyon MİK olarak tespit edildi (Şekil 7) (133). Direnç profili flukonazol, vorikonazol ve kaspofungin için CLSI tarafından önerilen sınır değerler göz önüne alınarak belirlendi. Buna göre flukonazol için MİK  $\leq 8$  µg/ml duyarlı, 16-32 µg/ml doza bağımlı duyarlı,  $\geq 64$  µg/ml dirençli olarak; vorikonazol için MİK  $\leq 1$  µg/ml duyarlı, 2 µg/ml doza bağımlı duyarlı,  $\geq 4$  µg/ml dirençli olarak kabul edildi.

Kaspofungin için *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* türlerinde MİK  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/ml}$  duyarlı,  $0,5$   $\mu\text{g/ml}$  orta duyarlı,  $> 0,5$   $\mu\text{g/ml}$  dirençli olarak; *C. glabrata*'da MİK  $\leq 0,125$   $\mu\text{g/ml}$  duyarlı,  $0,25$   $\mu\text{g/ml}$  orta duyarlı,  $> 0,25$   $\mu\text{g/ml}$  dirençli olarak; *C. parapsilosis*'te  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  duyarlı,  $4$   $\mu\text{g/ml}$  orta duyarlı,  $> 4$   $\mu\text{g/ml}$  dirençli olarak kabul edildi. Amfoterisin B için belirli bir yorumlayıcı sınır değer olmamasına rağmen *Candida* türlerinin % 94-99'unun  $1$   $\mu\text{g/ml}$  amfoterisin B konsantrasyonunda inhibe olmaları göz önüne alınarak direnç profili değerlendirildi (5,133).



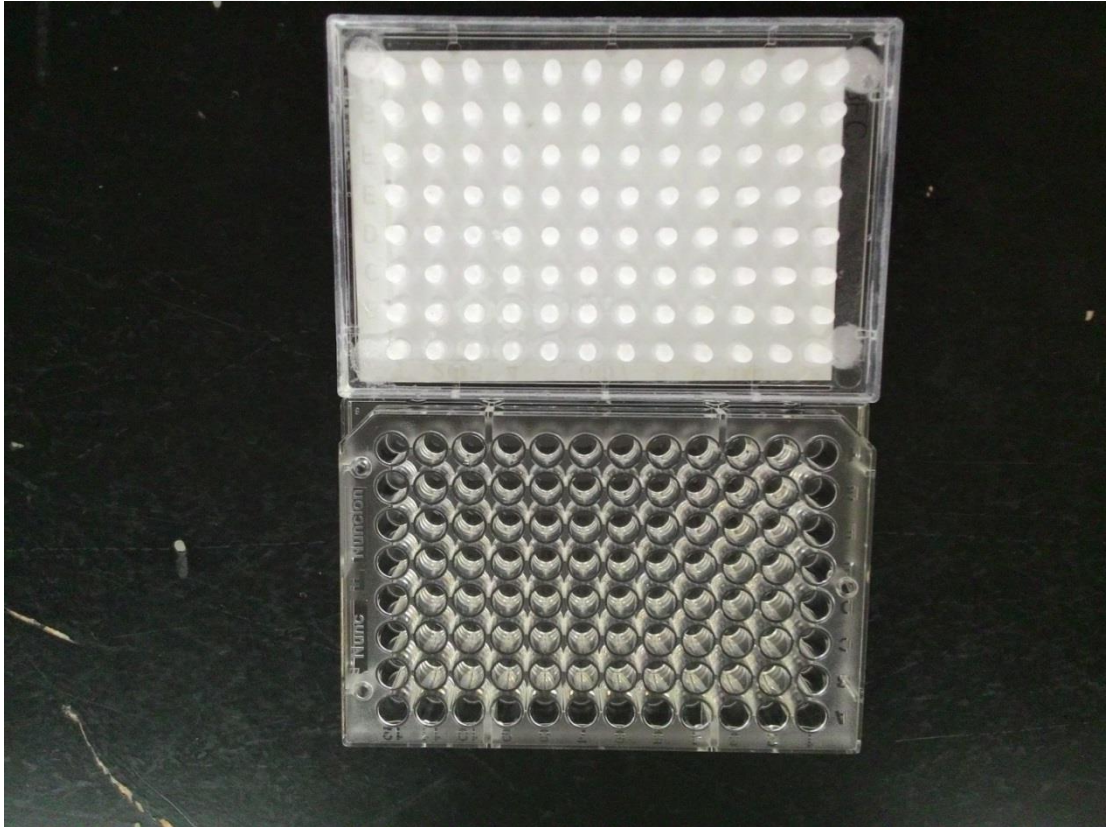
Şekil 7. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK tayini. A, B, C ve D sırasında bulunan kuyucuklarda sırasıyla amfoterisin B, flukonazol, kaspofungin ve vorikonazol; E, F, G ve H sırasında ise bu antifungallerin melatonin ile kombiasyonlarının 10. Sütuna kadar çift kat sulandırımıları mevcuttur. 11. sütun besiyeri kontrol, 12. sütun ise mikroorganizma kontrol çukurlarını içermektedir.

### 3.5. Biyofilm Varlığında Antifungal Duyarlılık Testi

Orta ve kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu saptanmış *Candida* suşlarının biyofilm varlığında in vitro antifungal duyarlılıklarının tespitinde MBEK değerini saptayan CBY kullanıldı (196).

#### 3.5.1. CBY

*Candida* suşlarının biyofilm formlarına karşı antifungal ilaçların MBEK değerleri MBEC Assay™ for High-throughput Screening (Innovotech Inc, Canada) testi ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda tespit edildi. Bu testte kullanılan mikroplaklar iki kısımdan oluşmaktadır. Üst kısım, üzerinde 96 adet çıkıntı olan polistiren bir kapak olup, bu çıkıntılar testin ikinci kısmını oluşturan 96 kuyucuklu plağa oturmaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. MBEC Assay™ for High-throughput Screening testinde kullanılan 96 kuyucuklu özel çıkıntılı kapaklı mikroplak.

Antifungal ilaçlar: Sıvı mikrodilüsyon yönteminde test edilen ilaçların aynısı kullanıldı.

Diğer Kimyasallar: Sıvı mikrodilüsyon yönteminde kullanılan kimyasallara ilaveten, nötralizan besiyerinin hazırlanabilmesi için L-histidin (ChemBio, Türkiye), L-sistein (SRLChem, India), indirgenmiş glutatyon (Sigma Aldrich, USA), saponin (Santa Cruz Biotechnology, USA) ve tween-80 (Merck, USA) 'in saf etken maddeleri kullanıldı.

Besiyeri: Besiyeri olarak L-glutamin içeren RPMI 1640 hazır sıvı besiyeri ve nötralizan besiyeri kullanıldı. Nötralizan olarak kullanılan besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlandı: 1,0 g L-histidin, 1,0 g L-sistein, 2,0 g indirgenmiş glutatyon, distile su ile 20 ml'ye tamamlanıp milipor filtre ile sterilize edildi. Daha sonra SDB besiyeri hazırlanıp, bir litre besiyerine 20 g saponin ve 10 g tween-80 eklendi. Besiyerinin pH'sı  $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlanıp her 20 ml besiyerine 500 µl nötralizan eklenerek kullanıldı.

Antifungal ilaçların ve melatoninin sulandırımı: Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle aynı şekilde hazırlandı.

Maya süspansiyonlarının hazırlanması: Test edilecek suşların SDA'da saf kültürleri elde edildikten sonra 24 saatlik kültüründen birkaç koloni alınarak steril serum fizyolojik içinde homojen süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyon vortekslelendikten sonra bulanıklığı spektrofotometrik olarak 530 nm'de McFarland 1 ( $3 \times 10^8$  cfu/ml) bulanıklığına ayarlandı. Daha sonra bu süspansiyonun 1 ml'si 29 ml BHIB ile karıştırılıp 30 kat sulandırılarak yoğunluğu  $1 \times 10^7$  cfu/ml olan maya süspansiyonu hazırlandı.

İnokulasyon işlemi: Biyofilm oluşturmak amacıyla, hazırlanan maya süspansiyonundan her bir kuyucuğa 150 µl aktararak çıkıntılı kapak kısmı bu mikroplak üzerine yerleştirildi. Daha sonra çalkalayıcı tablada  $9-16^\circ$  eğimde ve dakikada 3-5 kez sallanacak şekilde  $35^\circ\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edildi. Başka bir 96 kuyucuklu mikroplakta, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle aynı şekilde, her kuyucuğa 100 µl L-glutamin içeren RPMI 1640 sıvı besiyeri eklendi; ardından ilk kuyucuğa 100 µl antifungal ilaçlardan eklenerek çift kat

sulandırılmaları yapıldı. İnkübasyon sonrası biyofilm oluşumu sağlanmış mikroplağın çıkıntılı kapak kısmı, antifungal ilaçların sulandırılmalarını içeren plağa geçirilerek 35°C'de 48 saat inkübe edildi. Daha sonra kapak kısmı steril serum fizyolojik ile iki kez yıkandı ve her kuyucukta 200 µl antifungal ilaçlar için nötralizan etki gösteren besiyeri bulunan bir başka mikroplağa kapatıldı. Nötralizan besiyeri ile biyofilm-antifungal kompleksinin iyice karışabilmesi için, mikroplak, su içine batması engellenecek şekilde ultrasonik temizleyiciye (Getinge, Sweden) yerleştirilerek 30 dakika inkübe edildi. Ultrasonik temizleyicide inkübasyonu tamamlanan mikroplağın çıkıntılı kapağı çıkarılarak yerine düz bir kapak kapatıldı. Aynı işlemler melatonin varlığında tekrar yapıldı.

İnkübasyon ve MBEK değerlerinin saptanması: Mikroplaklar 35°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, makroskopik olarak biyofilm oluşumunu durduran en düşük ilaç konsantrasyonu MBEK olarak değerlendirildi (Şekil 9). Direnç profili sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle aynı şekilde belirlendi.



Şekil 9. CBY ile MBEK tayini. A, B, C ve D sırasında bulunan kuyucuklarda sırasıyla amfoterisin B, flukonazol, kaspofungin ve vorikonazol; E, F, G ve H sırasında ise bu antifungallerin melatonin ile kombiasyonlarının 10. Sütuna

kadar çift kat sulandırmaları mevcuttur. 11. sütun besiyeri kontrol, 12. sütun ise mikroorganizma kontrol çukurlarını içermektedir.

### 3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Antifungal ilaçlar ile melatoninin kombine edilmesinin elde edilen MİK ve MBEK değerlerinde anlamlı bir fark oluşturup oluşturmadığını analiz etmek için Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) programının 15,0 sürümünde bulunan Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi; biyofilm oluşumu açısından *C. albicans* ve non-albicans *Candida*lar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığını analiz etmek için Ki-Kare testi kullanıldı.  $P < 0,05$  değeri anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin değişik kliniklerinden Mikrobiyoloji Laboratuvarlarına gönderilen örneklerden izole edilen 350 adet *Candida* suşu değerlendirmeye alındı.

Çalışmaya dahil edilen 350 adet *Candida* suşunun 121'i (% 34,5) idrar, 83'ü (% 23,7) vajinal sürüntü, 69'u (% 19,7) solunum, 62'si (% 17,7) kan, 10'u (% 2,8) tırnak, 5'i (% 1,4) doku örneklerinden elde edildi.

Germ tüp testi, mısır unu-tween 80 agardaki mikroskopik görünüm ve Vitek 2 otomatize sistem yardımı ile tür düzeyinde tanımlanan 350 *Candida* suşundan 227'sinin (% 64,8) *C. albicans*, 55'inin (% 15,7) *C. glabrata*, 30'unun (% 8,6) *C. tropicalis*, 19'unun (% 5,4) *C. parapsilosis*, 9'unun (% 2,6) *C. kefyr*, 6'sinin (% 1,7) *C. guilliermondii*, 2'sinin (% 0,6) *C. dubliniensis*, 1'inin (% 0,3) *C. krusei*, 1'inin (% 0,3) *C. lusitaniae* olduğu saptandı. İzole edilen *Candida* türleri ile bu türlerin örneklere göre dağılımı Tablo 3'te gösterildi.

**Tablo 3.** İzole edilen *Candida* türleri ve türlerin örneklere göre dağılımı.

<i>Candida</i> Türü	İdrar	VS	Solunum	Kan	Tırnak	Doku	Toplam	%
<i>C. albicans</i>	75	49	56	35	7	5	227	64,8
<i>C. glabrata</i>	17	30	4	3	1	-	55	15,7
<i>C. tropicalis</i>	21	2	3	2	2	-	30	8,6
<i>C. parapsilosis</i>	1	-	-	18	-	-	19	5,4
<i>C. kefyr</i>	2	1	3	3	-	-	9	2,6
<i>C. guilliermondii</i>	4	1	-	1	-	-	6	1,7
<i>C. dubliniensis</i>	-	-	2	-	-	-	2	0,6
<i>C. krusei</i>	-	-	1	-	-	-	1	0,3
<i>C. lusitaniae</i>	1	-	-	-	-	-	1	0,3
Toplam	121	83	69	62	10	5	350	100

VS: Vajinal sürüntü

Çalışmaya dahil edilen örneklerin; 127'si (% 36,3) poliklinik, 126'sı (% 36) servis, 97'si (% 27,7) yoğun bakım ünitesinden gönderilmiş örnekler olup aynı hastaya ait tek bir örnek çalışmaya dahil edildi. *Candida* türlerinin kliniklere göre dağılımı Tablo 4'te gösterildi.

**Tablo 4.** *Candida* türlerinin kliniklere göre dağılımı.

<i>Candida</i> Türü	P	S	YBÜ	Toplam
<i>C. albicans</i>	73	87	67	227
<i>C. glabrata</i>	35	9	11	55
<i>C. tropicalis</i>	13	8	9	30
<i>C. parapsilosis</i>	-	15	4	19
<i>C. kefyr</i>	3	5	1	9
<i>C. guilliermondii</i>	2	1	3	6
<i>C. dubliniensis</i>	1	1	-	2
<i>C. krusei</i>	-	-	1	1
<i>C. lusitaniae</i>	-	-	1	1
Toplam	127	126	97	350

P: Poliklinik, S: Servis, YBÜ: Yoğun bakım ünitesi.

MMP yöntemi ile biyofilm formasyonu araştırılan 350 suşun 34'ünde (% 9,7) biyofilm oluşumu gözlemlendi. Bu 34 suşun 19'unda zayıf pozitif, 4'ünde orta pozitif, 11'inde kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu tespit edildi ve suşların 8'inin poliklinik, 20'sinin servis, 6'sının yoğun bakım ünitesi kökenli olduğu gözlemlendi (Tablo 5).

**Tablo 5.** Biyofilm oluşumunun kliniklere göre dağılımı.

Klinikler	Zayıf Pozitif	Orta Pozitif	Kuvvetli Pozitif	Toplam
Poliklinik	4	1	3	8
Servis	11	3	6	20
YBÜ	4	-	2	6
Toplam	19	4	11	34

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi



Biyofilm oluşumunun *Candida* türlerine göre dağılımı ise Tablo 6'da gösterildi. Tür düzeyinde incelendiğinde *C. albicans*'ta biyofilm oluşumu % 2,6, Non-albicans *Candida* türlerinde ise % 22,7 olarak saptandı. Biyofilm oluşturma açısından iki grup karşılaştırıldığında p:0,001 olarak tespit edildi ve istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark bulundu. Non-albicans *Candida* türleri arasında en sık biyofilm oluşumu % 50 oranla *C. guilliermondii*'de görüldü. Bunu *C. kefyr* (% 44,4), *C. tropicalis* (% 40), *C. parapsilosis* (% 15,7) ve *C. glabrata* (% 10,9) izledi. *C. dubliniensis*, *C. krusei* ve *C. lusitaniae* türlerinde biyofilm oluşumu gözlenmedi.

**Tablo 6.** Biyofilm oluşumunun *Candida* türlerine göre dağılımı.

<i>Candida</i> Türü	(n)	Zayıf Pozitif	Orta Pozitif	Kuvvetli Pozitif	Toplam(%)
<i>C. albicans</i>	(227)	3	1	2	6 (2,6)
<i>C.glabrata</i>	(55)	5	1	-	6 (10,9)
<i>C. tropicalis</i>	(30)	4	2	6	12 (40)
<i>C.parapsilosis</i>	(19)	2	-	1	3 (15,7)
<i>C. kefyr</i>	(9)	3	-	1	4 (44,4)
<i>C. guilliermondii</i>	(6)	2	-	1	3 (50)
<i>C. dubliniensis</i>	(2)	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	(1)	-	-	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	(1)	-	-	-	-
Toplam	(350)	19	4	11	34 (9,7)

Biyofilm formasyonu görülen 34 suşun 13'ünün idrar, sekizinin kan, sekizinin solunum, dördünün vajinal sürüntü, birinin tırnak örneklerinden izole edilen *Candida* türleri olduğu saptandı. Örnekler tek tek değerlendirildiğinde en sık kan kültürlerinde (% 12,9) biyofilm oluşumu tespit edildi, bunu solunum (% 11,5), tırnak (% 10), idrar (% 5,8) ve vajinal sürüntü (% 4,8) örnekleri takip etti. Doku örneklerinde biyofilm oluşumu gözlenmedi. (Tablo 7).

**Tablo 7.** Biyofilm oluşumunun örneklerle göre dağılımı.

Örnek Türü	(n)	Biyofilm Oluşturan Suşlar (%)
İdrar	(221)	13 (5,8)
Vajinal sürüntü	(83)	4 (4,8)
Solunum	(69)	8 (11,5)
Kan	(62)	8 (12,9)
Tırnak	(10)	1 (10)
Doku	(5)	-
Toplam	(350)	34 (9,7)

Orta ve kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu saptanmış, üç *C. albicans*, sekiz *C. tropicalis* ve birer adet *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* ve *C. guilliermondii* olmak üzere toplam 15 suşun planktonik formunda amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve kaspofungin tek başına ve melatonin ile kombinasyonlarının MİK değerleri CLSI M27-A3 kriterlerine uygun olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile araştırıldı. Saptanan MİK değerleri Tablo 8, 9, 10 ve 11’de gösterildi.

Amfoterisin B’ye karşı in vitro duyarlılığın araştırılmasında sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değerleri, *C. albicans* suşlarında 0,125 µg/ml, 0,06 µg/ml ve 0,03 µg/ml olarak saptandı; melatonin varlığında MİK değerlerinde değişiklik olmadı. *C. tropicalis* suşlarının birinde 0,25 µg/ml, ikisinde 0,125 µg/ml, ikisinde 0,06 µg/ml ve üçünde 0,03 µg/ml olarak saptandı; melatonin varlığında MİK değeri 0,06 µg/ml olan suşlardan birinde 0,03 µg/ml’ye düşüş gözlemlendi. *C. kefyr* suşunda 0,125 µg/ml, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* suşlarında ise 0,03 µg/ml olarak saptandı; melatonin varlığında MİK değerlerinde değişiklik olmadı. Amfoterisin B için belirlenmiş bir sınır değer olmasa da MİK değerleri ≤0,25 µg/ml olduğu için tüm suşlar duyarlı olarak değerlendirildi.

**Tablo 8.** *Candida* türlerinin sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile saptanan MİK değerleri.

Suşlar (n)	Antifungal İlaçlar	MİK Aralığı (µg/ml)	Melatonin Varlığında MİK Aralığı (µg/ml)
<i>C. albicans</i> (3)	Amfoterisin B	0,03-0,125	0,03-0,125
	Flukonazol	2	0,5-1
	Vorikonazol	0,06-2	0,06-0,125
	Kaspofungin	0,06-32	0,06-8
<i>C. tropicalis</i> (8)	Amfoterisin B	0,03-0,25	0,03-0,25
	Flukonazol	0,5-16	0,25-4
	Vorikonazol	0,03-0,25	0,03-0,125
	Kaspofungin	0,06-0,25	0,06-0,125
Diğer Türler* (4)	Amfoterisin B	0,03-0,125	0,03-0,125
	Flukonazol	1-4	0,5-4
	Vorikonazol	0,03-0,125	0,03-0,125
	Kaspofungin	0,06-32	0,06-8

\**C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*

Flukonazole karşı in vitro duyarlılığın araştırılmasında sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değerleri, üç *C. albicans* suşunda da 2 µg/ml olarak saptandı; melatonin varlığında ikisinde 1 µg/ml, birinde ise 0,5 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi. *C. tropicalis* suşlarının birinde 16 µg/ml, üçünde 4 µg/ml, birinde 2 µg/ml, birinde 1 µg/ml, ikisinde ise 0,5 µg/ml olarak saptandı; MİK değeri 16 µg/ml olan *C. tropicalis* suşu doza bağımlı duyarlı olarak tespit edildi ve melatonin varlığında 2 µg/ml'ye düşüş gözlenerek duyarlı hale geldi, ayrıca MİK değeri 4 µg/ml olan suşlardan birinde 2 µg/ml'ye, 2 µg/ml olanda 1 µg/ml'ye, 1 µg/ml olanda 0,5 µg/ml'ye, 0,5 µg/ml olan iki suşta ise 0,25 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi. *C. kefyr* ve *C. glabrata* suşlarında 4 µg/ml, *C. parapsilosis* suşunda 2 µg/ml, *C. guilliermondii* suşunda ise 1 µg/ml olarak

saptandı; melatonin varlığında *C. kefyr* ve *C. guilliermondii*'de birer dilüsyon düşüş gözlenerek yeni değerler sırasıyla 2 µg/ml ve 0,5 µg/ml olarak kaydedildi.

**Tablo 9.** *C. albicans* suşlarının dört antifungal için MİK değerleri.

Suş No	Antifungal İlaçlar	MİK Değeri (µg/ml)	Duyarlılık Profili	Melatonin Varlığında MİK Değeri (µg/ml)	Duyarlılık Profili
1	Amfoterisin B	0,06	S	0,03	S
	Flukonazol	2	S	1	S
	Vorikonazol	0,125	S	0,06	S
	Kaspofungin	0,06	S	0,06	S
2	Amfoterisin B	0,125	S	0,125	S
	Flukonazol	2	S	1	S
	Vorikonazol	2	SDD	0,125	S
	Kaspofungin	32	R	8	R
3	Amfoterisin B	0,03	S	0,03	S
	Flukonazol	2	S	0,5	S
	Vorikonazol	0,06	S	0,06	S
	Kaspofungin	0,06	S	0,06	S

R: Dirençli. S: Duyarlı. SDD: Doza bağımlı duyarlı.

**Tablo 10. *C. tropicalis* suşlarının dört antifungal için MİK değerleri.**

Suş No	Antifungal İlaçlar	MİK Değeri (µg/ml)	Duyarlılık Profili	Melatonin Varlığında MİK Değeri (µg/ml)	Duyarlılık Profili
1	Amfoterisin B	0,03	S	0,03	S
	Flukonazol	4	S	4	S
	Vorikonazol	0,125	S	0,03	S
	Kaspofungin	1	R	0,125	S
2	Amfoterisin B	0,03	S	0,03	S
	Flukonazol	0,5	S	0,25	S
	Vorikonazol	0,03	S	0,03	S
	Kaspofungin	0,06	S	0,06	S
3	Amfoterisin B	0,25	S	0,25	S
	Flukonazol	16	SDD	2	S
	Vorikonazol	0,25	S	0,125	S
	Kaspofungin	0,06	S	0,06	S
4	Amfoterisin B	0,03	S	0,03	S
	Flukonazol	0,5	S	0,25	S
	Vorikonazol	0,03	S	0,03	S
	Kaspofungin	0,06	S	0,06	S
5	Amfoterisin B	0,125	S	0,125	S
	Flukonazol	4	S	2	S
	Vorikonazol	0,125	S	0,06	S
	Kaspofungin	0,25	S	0,125	S
6	Amfoterisin B	0,06	S	0,03	S
	Flukonazol	1	S	0,5	S
	Vorikonazol	0,06	S	0,06	S
	Kaspofungin	0,125	S	0,06	S
7	Amfoterisin B	0,125	S	0,125	S
	Flukonazol	2	S	1	S
	Vorikonazol	0,125	S	0,125	S
	Kaspofungin	0,06	S	0,06	S
8	Amfoterisin B	0,06	S	0,06	S
	Flukonazol	4	S	4	S
	Vorikonazol	0,25	S	0,06	S
	Kaspofungin	0,06	S	0,06	S

R: Dirençli. S: Duyarlı. SDD: Doza bağımlı duyarlı.

Vorikonazole karşı in vitro duyarlılığın araştırılmasında sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değerleri, *C. albicans* suşlarında 2 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0,06 µg/ml olarak saptandı; MİK değeri 2 µg/ml olan suş doza bağımlı duyarlı olarak değerlendirildi ve melatonin varlığında 0,125 µg/ml'ye düşüş gözlenerek duyarlı hale geldi, ayrıca MİK değeri 0,125 µg/ml olan suşta 0,06 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi. *C. tropicalis* suşlarının ikisinde 0,25 µg/ml, üçünde 0,125 µg/ml, birinde 0,06 µg/ml, ikisinde ise 0,03 µg/ml olarak saptandı; melatonin varlığında MİK değeri 0,25 µg/ml olan iki suştan birinde 0,125 µg/ml'ye, diğerinde 0,06 µg/ml'ye, MİK değeri 0,125 µg/ml olan iki suştan birinde 0,06 µg/ml'ye, diğerinde 0,03 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi. *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* suşlarında 0,06 µg/ml, *C. kefyr* suşunda 0,125 µg/ml ve *C. guilliermondii* suşunda 0,03 µg/ml olarak saptandı; melatonin varlığında MİK değeri 0,06 µg/ml olan *C. glabrata* suşunda 0,03 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi.

Kaspofungine karşı in vitro duyarlılığın araştırılmasında sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değerleri, *C. albicans* suşlarının birinde 32 µg/ml, ikisinde ise 0,06 µg/ml olarak saptandı, MİK değeri 32 µg/ml olan suş dirençli olarak değerlendirildi ve melatonin varlığında 8 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi. *C. tropicalis* suşlarının beşinde 0,06 µg/ml, diğer üçünde ise 1 µg/ml, 0,25 µg/ml ve 0,125 µg/ml olarak saptandı; MİK değeri 1 µg/ml olan suş dirençli olarak değerlendirildi ve melatonin varlığında 0,125 µg/ml'ye düşüş gözlenerek duyarlı hale geldi; ayrıca MİK değeri 0,25 µg/ml olanda 0,125 µg/ml'ye ve 0,125 µg/ml olanda ise 0,06 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi. *C. kefyr* suşunda MİK değeri 32 µg/ml olarak saptandı ve dirençli olarak değerlendirildi, melatonin varlığında ise 8 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi; birer adet *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* suşlarında ise 0,06 µg/ml olarak saptandı ve melatonin varlığında MİK değerlerinde değişiklik olmadı.

**Tablo 11.** Diğer *Candida* türlerinin dört antifungal için MİK değerleri.

Suş No	Antifungal İlaçlar	MİK Değeri (µg/ml)	Duyarlılık Profili	Melatonin Varlığında MİK Değeri (µg/ml)	Duyarlılık Profili
1	Amfoterisin B	0,03	S	0,03	S
	Flukonazol	4	S	4	S
	Vorikonazol	0,06	S	0,03	S
	Kaspofungin	0,06	S	0,06	S
2	Amfoterisin B	0,03	S	0,03	S
	Flukonazol	2	S	2	S
	Vorikonazol	0,06	S	0,06	S
	Kaspofungin	0,06	S	0,06	S
3	Amfoterisin B	0,125	S	0,125	S
	Flukonazol	4	S	2	S
	Vorikonazol	0,125	S	0,125	S
	Kaspofungin	32	R	8	R
4	Amfoterisin B	0,03	S	0,03	S
	Flukonazol	1	S	0,5	S
	Vorikonazol	0,03	S	0,03	S
	Kaspofungin	0,06	S	0,06	S

1. *C. glabrata*, 2. *C. parapsilosis*, 3. *C. kefyr*, 4. *C. guilliermondii*.

R: Dirençli. S: Duyarlı.

Çalışılan bütün suşlar, amfoterisin B için MİK değeri  $\leq 0,25$  µg/ml olduğu için duyarlı olarak değerlendirilirken; idrar örneğinden izole edilen *C. tropicalis* suşlarından biri flukonazole karşı doza bağımlı duyarlı, balgam örneğinden izole edilen bir *C. albicans* suşu da vorikonazole karşı doza bağımlı duyarlı ve kaspofungine dirençli, birer adet *C. tropicalis* (idrar) ve *C.*

*kefyr* (balgam) suşu ise kaspofungine karşı dirençli olarak saptandı. Antifungallere karşı doza bağımlı duyarlı ve dirençli olan suşların hepsinde, melatonin varlığında MİK değerlerinde düşüş gözlemlendi. Sadece kaspofungine dirençli olan suşlardan iki tanesi MİK değeri düşmesine rağmen halen dirençli olarak değerlendirilirken; diğer doza bağımlı duyarlı ve dirençli suşlar duyarlı hale geldi.

Melatonin varlığında 15 suşun 11'inde olmak üzere en fazla flukonazol MİK değerlerinde düşüş gözlemlendi. Bunu vorikonazol (yedi), kaspofungin (beş) ve amfoterisin B (iki) izledi. Flukonazol ile diğer antifungaller, melatonin varlığında MİK değerlerinde görülen düşüş açısından karşılaştırıldığında  $p:0,008$  olarak tespit edildi ve istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark saptandı. *C. parapsilosis* dışında kalan tüm suşlarda en az bir antifungal ilacın MİK değerinde değişiklik gözlemlendi.

Melatonin varlığında MİK değerlerinde görülen düşüş açısından antifungal ajanlar tek tek karşılaştırıldığında; amfoterisin B'nin tek başına ve melatonin ile kombinasyonu sonucu elde edilen MİK değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, diğer üç antifungalın MİK değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görüldü.

Orta ve kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu saptanmış, üç *C. albicans*, sekiz *C. tropicalis* ve birer adet *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* ve *C. guilliermondii* olmak üzere toplam 15 suşun biyofilm oluşturmuş formunda amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve kaspofungin tek başına ve melatonin ile kombinasyonlarının MBEK değerleri CBY kullanılarak MBEC Assay™ for High-throughput Screening testi ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda araştırıldı. Saptanan MBEK değerleri Tablo 12, 13, 14, 15 ve 16'da gösterildi.



**Tablo 12.** *Candida* türlerinin CBY ile saptanan MBEK değerleri.

Suşlar (n)	Antifungal İlaçlar	MBEK Aralığı (µg/ml)	Melatonin Varlığında MBEK Aralığı (µg/ml)
<i>C. albicans</i> (3)	Amfoterisin B	>16	8 - >16
	Flukonazol	16 - >128	16 - >128
	Vorikonazol	8 - >16	8 - 16
	Kaspofungin	16 - >32	16
<i>C. tropicalis</i> (8)	Amfoterisin B	16 - >16	4 - >16
	Flukonazol	128 - >128	32 - >128
	Vorikonazol	4 - >16	2 - >16
	Kaspofungin	8 - >32	8 - >32
Diğer Türler* (4)	Amfoterisin B	16 - >16	4 - >16
	Flukonazol	32 - >128	32 - >128
	Vorikonazol	0,125 - 16	0,06 - 16
	Kaspofungin	32 - >32	4 - >32

\**C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*.

Amfoterisin B'ye karşı biyofilm varlığında duyarlılığın araştırılmasında CBY ile saptanan MBEK değerleri, *C. albicans* suşlarında >16 µg/ml olarak tespit edildi; melatonin varlığında iki suşta 8 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi. *C. tropicalis* suşlarının altısında >16 µg/ml, ikisinde 16 µg/ml olarak belirlendi; melatonin varlığında MBEK değeri >16 µg/ml olan suşlardan birinde 8 µg/ml, 16 µg/ml olanda ise 4 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi. *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ve *C. kefyr* suşlarında >16 olarak saptandı; melatonin varlığında sadece *C. parapsilosis* MBEK değerinde >16 µg/ml'den, 16 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi. *C. guilliermondii* suşunda ise 16 µg/ml olarak belirlendi; melatonin varlığında 4 µg/ml'ye düşüş tespit edildi. Amfoterisin B için belirlenmiş bir sınır değeri

olmasa da MBEK değerleri çok yüksek olduğu için bütün suşlar dirençli olarak değerlendirildi.

**Tablo 13.** *C. albicans* suşlarının dört antifungal için MBEK değerleri.

Suş No	Antifungal İlaçlar	MBEK Değeri ( $\mu\text{g/ml}$ )	Duyarlılık Profili	Melatonin Varlığında MBEK Değeri ( $\mu\text{g/ml}$ )	Duyarlılık Profili
1	Amfoterisin B	>16	R	>16	R
	Flukonazol	>128	R	>128	R
	Vorikonazol	>16	R	>16	R
	Kaspofungin	32	R	16	R
2	Amfoterisin B	>16	R	8	R
	Flukonazol	>128	R	64	R
	Vorikonazol	8	R	8	R
	Kaspofungin	>32	R	16	R
3	Amfoterisin B	>16	R	8	R
	Flukonazol	16	SDD	16	SDD
	Vorikonazol	>16	R	8	R
	Kaspofungin	16	R	16	R

SDD: Doza bağımlı duyarlı. R: Dirençli.

Flukonazole karşı biyofilm varlığında duyarlılığın araştırılmasında CBY ile saptanan MBEK değerleri, *C. albicans* suşlarının ikisinde >128  $\mu\text{g/ml}$ , birinde 16  $\mu\text{g/ml}$  olarak belirlendi; melatonin varlığında MBEK değeri >128  $\mu\text{g/ml}$  olan suşlardan birinde 64  $\mu\text{g/ml}$ 'ye düşüş gözlendi. *C. tropicalis* suşlarının yedisinde MBEK değeri >128  $\mu\text{g/ml}$ , birinde 128  $\mu\text{g/ml}$  olarak saptandı; melatonin varlığında MBEK değeri >128  $\mu\text{g/ml}$  olan suşlardan ikisinde 32  $\mu\text{g/ml}$ 'ye düşüş gözlenerek doza bağımlı duyarlı hale geldi. *C. glabrata* ve *C. kefyr*'de >128  $\mu\text{g/ml}$  olarak saptanan MBEK değeri, *C.*

*parapsilosis* ve *C. guilliermondii*'de 32 µg/ml olarak tespit edildi; melatonin varlığında sadece *C. kefyr*'in MBEK değerinde 32 µg/ml'ye düşüş gözlenerek doza bağımlı duyarlı olarak rapor edildi. On beş suşun tamamı değerlendirildiğinde melatonin yokken MBEK değeri 16 µg/ml olan bir *C. albicans* ve 32 µg/ml olan *C. parapsilosis* ve *C. guilliermondii* suşları doza bağımlı duyarlı, diğer suşlar dirençli olarak değerlendirildi.

Vorikonazole karşı biyofilm varlığında duyarlılığın araştırılmasında CBY ile saptanan MBEK değerleri, *C. albicans* suşlarının ikisinde >16 µg/ml, birinde 8 µg/ml olarak tespit edildi; melatonin varlığında MBEK değeri >16 µg/ml olan iki suшта sırasıyla 16 µg/ml ve 8 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi. *C. tropicalis* suşlarının üçünde >16 µg/ml, üçünde 16 µg/ml, ikisinde 4 µg/ml olarak saptandı; melatonin varlığında MBEK değeri >16 olan iki suшта sırasıyla 2 µg/ml ve 16 µg/ml'ye, 16 µg/ml olan suшта ise 4 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi. MBEK değeri 2 µg/ml'ye düşen suş doza bağımlı duyarlı olarak değerlendirildi. *C. glabrata* ve *C. kefyr*'de 16 µg/ml, *C. parapsilosis*'te 8, *C. guilliermondii*'de 0,125 µg/ml olarak saptanan MBEK değerlerinde, melatonin varlığında *C. parapsilosis*'te 4 µg/ml, *C. guilliermondii*'de 0,03 µg/ml'ye geriledi. On beş suşun tamamı değerlendirildiğinde melatonin yokken sadece MBEK değeri 0,125 µg/ml olan *C. guilliermondii* duyarlı, diğer suşlar dirençli olarak kabul edildi.

Kaspofungine karşı biyofilm varlığında duyarlılığın araştırılmasında CBY ile saptanan MBEK değerleri, *C. albicans* suşlarında >32 µg/ml, 32 µg/ml ve 16 µg/ml olarak belirlendi, melatonin varlığında MBEK değeri >32 µg/ml ve 32 µg/ml olan suşlarda 16 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi. *C. tropicalis* suşlarının dördünde >32 µg/ml, üçünde 32 µg/ml ve birinde 8 µg/ml olarak tespiti edildi, melatonin varlığında MBEK değeri >32 µg/ml olan suşların ikisinde ve 32 µg/ml olan suşların üçünde 16 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi. *C. glabrata*, *C. kefyr* ve *C. guilliermondii*'de >32 µg/ml, *C. parapsilosis*'te 32 µg/ml olarak değerlendirilen MBEK değerinde; melatonin varlığında *C. kefyr*'de 16 µg/ml'ye, *C. guilliermondii*'de 4 µg/ml'ye ve *C. parapsilosis*'te 8 µg/ml'ye düşüş gözlemlendi. Suşların tamamı dirençli olarak değerlendirildi.

**Tablo 14. *C. tropicalis* suşlarının dört antifungal için MBEK değerleri.**

Suş No	Antifungal İlaçlar	MBEK Değeri (µg/ml)	Duyarlılık Profili	Melatonin Varlığında MBEK Değeri (µg/ml)	Duyarlılık Profili
1	Amfoterisin B	>16	R	>16	R
	Flukonazol	>128	R	>128	R
	Vorikonazol	>16	R	>16	R
	Kaspofungin	>32	R	>32	R
2	Amfoterisin B	>16	R	>16	R
	Flukonazol	>128	R	>128	R
	Vorikonazol	16	R	16	R
	Kaspofungin	32	R	16	R
3	Amfoterisin B	16	R	4	R
	Flukonazol	>128	R	32	SDD
	Vorikonazol	>16	R	2	SDD
	Kaspofungin	8	R	8	R
4	Amfoterisin B	>16	R	>16	R
	Flukonazol	>128	R	>128	R
	Vorikonazol	16	R	16	R
	Kaspofungin	32	R	16	R
5	Amfoterisin B	>16	R	>16	R
	Flukonazol	>128	R	>128	R
	Vorikonazol	>16	R	16	R
	Kaspofungin	>32	R	16	R
6	Amfoterisin B	>16	R	8	R
	Flukonazol	>128	R	32	SDD
	Vorikonazol	4	R	4	R
	Kaspofungin	16	R	16	R
7	Amfoterisin B	16	R	16	R
	Flukonazol	128	R	128	R
	Vorikonazol	4	R	4	R
	Kaspofungin	32	R	16	R
8	Amfoterisin B	>16	R	>16	R
	Flukonazol	>128	R	>128	R
	Vorikonazol	16	R	4	R
	Kaspofungin	>32	R	>32	R

SDD: Doza bağımlı duyarlı. R: Dirençli.

**Tablo 15.** Diğer *Candida* trlerinin drt antifungal iin MBEK değerleri.

Suş No	Antifungal İlaçlar	MBEK Değeri( $\mu\text{g/ml}$ )	Duyarlılık Profili	Melatonin Varlığında MBEK Değeri ( $\mu\text{g/ml}$ )	Duyarlılık Profili
1	Amfoterisin B	>16	R	>16	R
	Flukonazol	>128	R	>128	R
	Vorikonazol	16	R	16	R
	Kaspofungin	>32	R	>32	R
2	Amfoterisin B	>16	R	16	R
	Flukonazol	32	SDD	32	SDD
	Vorikonazol	8	R	4	R
	Kaspofungin	32	R	8	R
3	Amfoterisin B	>16	R	>16	R
	Flukonazol	>128	R	32	SDD
	Vorikonazol	16	R	16	R
	Kaspofungin	>32	R	16	R
4	Amfoterisin B	16	R	4	R
	Flukonazol	32	SDD	32	SDD
	Vorikonazol	0,125	S	0,06	S
	Kaspofungin	>32	R	4	R

1. *C. glabrata*, 2. *C. parapsilosis*, 3. *C. kefyr*, 4. *C. guilliermondii*.

R: Dirençli. S: Duyarlı. SDD: Doza bağımlı duyarlı.

**Tablo 16.** Antifungallerin tek başına melatonin ile kombinasyonları sonucu elde edilen MİK ve MBEK değerleri.

<i>Candida</i> Türü	MİK								MBEK								Biyofilm
	A	A+M	F	F+M	V	V+M	K	K+M	A	A+M	F	F+M	V	V+M	K	K+M	
<i>C. albicans</i>	0,06	0,03	2	1	0,125	0,06	0,06	0,06	>16	>16	>128	>128	>16	16	32	16	+++
<i>C. albicans</i>	0,125	0,125	2	1	2	0,125	32	8	>16	8	>128	64	8	8	>32	16	+++
<i>C. albicans</i>	0,03	0,03	2	0,5	0,06	0,06	0,06	0,06	>16	8	16	16	>16	8	16	16	++
<i>C. tropicalis</i>	0,03	0,03	4	4	0,125	0,03	1	0,125	>16	>16	>128	>128	>16	>16	>32	>32	+++
<i>C. tropicalis</i>	0,03	0,03	0,5	0,25	0,03	0,03	0,06	0,06	>16	>16	>128	>128	16	16	32	16	++
<i>C. tropicalis</i>	0,25	0,25	16	2	0,25	0,125	0,06	0,06	16	4	>128	32	>16	2	8	8	+++
<i>C. tropicalis</i>	0,03	0,03	0,5	0,25	0,03	0,03	0,06	0,06	>16	>16	>128	>128	16	16	32	16	++
<i>C. tropicalis</i>	0,125	0,125	4	2	0,125	0,06	0,25	0,125	>16	>16	>128	>128	>16	16	>32	16	+++
<i>C. tropicalis</i>	0,06	0,03	1	0,5	0,06	0,06	0,125	0,06	>16	8	>128	32	4	4	>32	16	+++
<i>C. tropicalis</i>	0,125	0,125	2	1	0,125	0,125	0,06	0,06	16	16	128	128	4	4	32	16	+++
<i>C. tropicalis</i>	0,06	0,06	4	4	0,25	0,06	0,06	0,06	>16	>16	>128	>128	16	4	>32	>32	+++
<i>C. parapsilosis</i>	0,03	0,03	2	2	0,06	0,06	0,06	0,06	>16	16	32	32	8	4	32	8	+++
<i>C. kefyr</i>	0,125	0,125	4	2	0,125	0,125	32	8	>16	>16	>128	32	16	16	>32	16	+++
<i>C. guilliermondii</i>	0,03	0,03	1	0,5	0,03	0,03	0,06	0,06	16	4	32	32	0,125	0,06	>32	4	+++
<i>C. glabrata</i>	0,03	0,03	4	4	0,06	0,03	0,06	0,06	>16	>16	>128	>128	16	16	>32	>32	++

A: Amfoterisin B, F: Flukonazol, K: Kaspofungin, M: Melatonin, V: Vorikonazol.

Amfoterisin B MBEK değeri  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$  olduğu için 15 suşun tamamı amfoterisin B'ye dirençli olarak saptanırken; flukonazole suşların üçü doza bağımlı duyarlı (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*), diğerleri dirençli; vorikonazole sadece *C. guilliermondii* duyarlı, diğerleri dirençli; kaspofungine ise tüm suşlar dirençli olarak değerlendirildi. Tüm antifungaller için, melatonin varlığında MBEK değerlerinde dūşūş gōzlenirse de sadece flukonazol MBEK değeri  $>128$   $\mu\text{g/ml}$  olup dirençli olarak değerlendirilen üç suşun (iki *C. tropicalis*, bir *C. kefyr*) MBEK değeri 32  $\mu\text{g/ml}$ 'ye ve vorikonazol MBEK değeri 16  $\mu\text{g/ml}$  olup dirençli olarak değerlendirilen bir *C. tropicalis* suşunun MBEK değeri 2  $\mu\text{g/ml}$ 'ye dūşerek doza bağımlı duyarlı hale geldi; ancak diğer suşların direnç profilinde değişiklik olmadı.

Melatonin varlığında 15 suşun 10'unda olmak üzere en fazla kaspofungin MBEK değerlerinde dūşūş gōzlendi. Bunu amfoterisin B (yedi), vorikonazol (yedi) ve flukonazol (beş) izledi. Antifungaller, melatonin varlığında MBEK değerlerinde gōrūlen dūşūş açısından karşılaştırıldığında  $p:0,33$  olarak tespit edildi ve istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark saptanmadı. *C. tropicalis* suşlarından biri ve *C. glabrata* dıőında kalan tüm suşlarda en az bir antifungal ilacın MBEK değerinde değişiklik gōzlendi.

Melatonin varlıęında MBEK deęerlerinde gōrūlen dūşūş açısından antifungal ajanlar tek tek karşılaştırıldıęında; flukonazolūn tek başına ve melatonin ile kombinasyonu sonucu elde edilen MBEK deęerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, dięer üç antifungalın MBEK deęerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir dūşūş gōrūldü.

## 5. TARTIŞMA

Sağlıklı bireylerde gastrointestinal sistem, üst solunum yolları, vajen ve derinin normal flora elemanı olarak bulunabilen *Candida* türleri, immun sistemi baskılanmış kişilerde fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır (234). *Candida* suşlarının genotiplendirmesi esas alınarak yapılan çalışmalarda, pek çok ciddi kandidoz olgusundan endojen kolonizasyonun sorumlu olduğu gösterilmiştir (235). Ancak sağlık çalışanlarının cildinde taşınıp insandan insana geçiş ile hastane ortamından da kazanılabilir. Sağlam deri, *Candida* türlerinin invazyonunu önleyen en etkili bariyerdir. İntravasküler kateter, yanık ve ülserasyon gibi cildin bütünlüğünü bozan herhangi bir durum, sağlıklı bireylerde bile, cildin bu bariyer etkisini ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca antimikrobiyal ajan kullanımı, gastrointestinal kanaldaki bakteriyel mikroflorayı elimine ederek mantarların seçilip çoğalmasına ve sonuçta hastanede yatan hastada invaziv hastalık oluşumuna yol açmaktadır (236). Fungal enfeksiyonlarda ilk sırayı *C. albicans* almakla birlikte, antifungal tedaviye daha zor yanıt veren *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitanae*, *C. krusei* gibi türlerle karşılaşma oranı giderek artmaktadır. Bu nedenle türlerin identifikasyonu ve direnç profillerinin belirlenmesi önem taşımaktadır (237).

Mantarlar ökaryotik hücre yapısında oldukları için bu etkenlerle oluşabilecek enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek sınırlı sayıda ilaç mevcuttur. Son yıllarda antifungal ilaç seçeneklerinde artış olmasına rağmen, bu ilaçların sınırlı etki spektrumları veya ciddi toksik yan etkileri nedeniyle invaziv fungal enfeksiyonların tedavisinde hala sorunlar yaşanmakta ve yüksek mortalite oranları gözlenmektedir. Son zamanlarda *Candida* enfeksiyonlarının patogenezi açıklamak ve *Candida* türlerine karşı yeni ilaç geliştirmek amacı ile yapılan çalışmalarda, konağa ait savunma sistemlerinin yanı sıra *Candida* türlerine ait virulans faktörlerinin de önemi belirtilmektedir (238). Özellikle biyofilm varlığında *Candida* türlerinin tedavisi oldukça zorlaşmaktadır. Çünkü biyofilm mikroorganizmaların fiziksel veya kimyasal etkilerle yüzeylerden kopmalarına engel olarak kolonizasyon oluşumuna,



konak immün sistemine ve antimikrobik ajanlara karşı direnç geliştirmesine neden olmaktadır. Bu nedenle yeni antifungal ilaç geliştirme çalışmaları önem kazanmaktadır.

Gastrointestinal sistem, st solunum yolları, vajen ve derinin normal flora elemanı olarak bulunan *Candida* cinsi mayalar, mukozal kolonizasyondan, multiorgan tutulumuna kadar geniş bir yelpazede yer alan enfeksiyonlara neden olabilirler.

Dünya çapında yapılan çalışmalara bakıldığında Johnson ve ark.'nın (239) 1763 adet *Candida*'ya karşı vorikonazol, itrakonazol, flukonazol ve amfoterisin B'nin in vitro aktivitelerini araştırdıkları çalışmada, örneklerin % 72'sinin kan ve kateter, % 8'inin orofarinks, % 6'sının idrar, % 4'ünün abdominal organ, % 3'ünün özofagus, % 3'ünün doku, %2'sinin bronkoalveolar lavaj, % 1,5'inin biyopsi, % 0,5'inin feçes kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir. Diekema ve ark. (240) ise Kuzey ve Latin Amerika, Avrupa, Asya ve Pasifik ülkelerinden toplanan 7191 adet *Candida* ile yaptıkları çalışmada, örneklerin % 65'inin kan, % 10'unun doku, % 9'unun apse, % 6'sının periton sıvıvısı, % 10'unun diğer örneklerden olduğunu rapor etmişlerdir.

Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde ise ksz ve ark. (241) farklı *Candida* türlerindeki fosfolipaz ve proteinaz aktivitesini araştırdıkları çalışmada örneklerin % 24'ünün idrar, % 23'ünün feçes, % 21'inin solunum, % 18'inin oral, % 14'ünün deri kaynaklı olduğu bildirilmiş olup başka bir çalışmada ise örneklerin % 41'i kan, % 20'si idrar, % 19'u solunum, % 12'si yara, % 8'i BOS ve periton olarak raporlanmıştır (242). Temiz ve ark.'nın (243) alışmasında ise örneklerin % 54' yara, % 33' idrar, % 7'si kan, % 6'sı ise balgam olarak tespit edilmiştir. Yatan hasta örneklerinden izole edilen *Candida* izolatlarının incelendiği bir çalışmada ise örneklerin % 64' idrar, % 20'si kan, %8'i solunum, % 3' yara, % 5'i diğer örnekler olarak bildirilmiştir (244). Çekin ve ark.'nın (245) yaptığı bir çalışmada örneklerin % 46'sı idrar, % 37'si kan, % 11'i balgam, % 5'i apse, % 1'i diğer örnekler olarak; başka bir

çalışmada örneklerin % 65'i idrar, % 24'ü kan, % 9'u solunum, % 2'si yara kaynaklı olarak rapor edilmiştir (246).

Çalışmamıza dahil ettiğimiz 350 adet *Candida* suşunun % 34,5'i idrar, 23,7'si vajinal sürüntü, % 19,7'si solunum, % 17,7'si kan, % 2,8'si tırnak ve % 1,4'ü doku örneklerinden elde edilmiştir. Literatüre baktığımızda elde ettiğimiz verilerin diğer çalışmalarla kısmen uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bu kısmi uyumun nedeni ise çalışmamıza servis ve yoğun bakımdan gelen örneklere ilave olarak poliklinikten gelen örneklerin de dahil edilmesinin etkisi olabileceği düşünülmüştür.

Günümüzde *Candida* enfeksiyonlarının hızla arttığı bilinmektedir ve tür tayini yapmak ampirik tedavi için önem arz etmektedir (247). *Candida*'ların neden olduğu enfeksiyonlarda, *C. albicans* en sık izole edilen tür olmakla birlikte; son yıllarda non-albicans *Candida* türlerinin sıklığında da bir artış olduğu yapılan çalışmalar sonucu gösterilmiştir (246).

Dünya çapında yapılan çalışmalar incelendiğinde Johnson ve ark. (239) çalışmalarında 1763 *Candida* suşunu, % 51,4 *C. albicans*, % 16,4 *C. glabrata*, % 13,7 *C. tropicalis*, % 10,2 *C. parapsilosis*, % 2,4 *C. krusei* ve % 2,4 diğer non-albicans *Candida* türleri olarak tespit etmişlerdir. *Candida* türlerine karşı vorikonazol etkisinin küresel değerlendirmesinin araştırıldığı bir çalışmada ise tür dağılımı % 53 *C. albicans*, % 14 *C. glabrata*, % 14 *C. parapsilosis*, % 12 *C. tropicalis*, % 3 *C. krusei* ve % 4 *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis*, *C. lipolytica*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides* ve *C. intermedia* türlerini de içeren diğer non-albicans *Candida*'lar olarak tanımlanmıştır (240). Lovero ve ark.'nın (248) yenidoğan yoğun bakım ünitesinde kandidemi epidemiyolojisini araştırdıkları çalışmada örneklerin % 47'si *C. albicans*, % 44'ü *C. parapsilosis*, % 5'i *C. guilliermondii*, % 4'ü *C. glabrata* olarak tespit edilmiştir. Erişkin hastalarda kandidemi etkenlerinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise en sık dört etken olarak *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* izole edilmiştir (249). Kim ve ark.'nın (250) 2508 suş ile yaptıkları çalışmada tür dağılımı % 48,6 *C. albicans*, % 16,6 *C. glabrata*, % 12,2 *C. utilis*, % 12 *C. tropicalis*, % 4,6 *C.*

*parapsilosis*, % 6 diğer non-*albicans* *Candida*'lar şeklinde raporlanmıştır. Global antifungal surveyans programı çerçevesinde Pfaller ve ark.'nın (251,252) 2004 ve 2009 yıllarında yaptıkları iki ayrı çalışmada da en sık olarak *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* türleri izole edilmiştir.

Ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde ise Çalışkan ve ark.'nın (253) kan kültürlerinden izole ettikleri 58 *Candida* suşu ile yaptıkları çalışmada suşların % 57'si *C. albicans*, % 14'ü *C. parapsilosis*, % 14'ü *C. tropicalis*, % 10'u *C. glabrata*, % 5'i *C. guilliermondii* olarak saptanmıştır. Kan kültürlerinin incelendiği başka bir çalışmada ise 97 suşun % 68'i *C. albicans*, % 15'i *C. parapsilosis*, % 9'u *C. glabrata*, % 4'ü *C. krusei*, % 3'ü *C. tropicalis* ve % 1'i *C. pelliculosa* olarak tanımlanmıştır (254). Aydemir ve ark.'nın (255) kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin tanımlanmasında peptid nükleik asit floresan in situ hibridizasyon yöntemini değerlendirdikleri çalışmada suşların % 38'i *C. albicans*, % 24'ü *C. glabrata*, % 10'u *C. parapsilosis*, % 10'u *C. kefir*, % 8'i *C. krusei*, % 4'ü *C. guilliermondii*, % 4'ü *C. tropicalis* ve % 2'si *C. lusitanae* olarak tanımlanmıştır. Etiz ve ark.'nın (256) kan kültürlerini inceledikleri bir çalışmada sırasıyla en sık olarak *C. parapsilosis* (% 34), *C. albicans* (% 28), *C. tropicalis* (% 16), *C. glabrata* (% 10) izole edilmiştir. Kaya ve ark.'nın (257) 2010 yılında çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri 103 *Candida* suşunda Vitek 2 sistemi ile tür tayini ve antifungal direncini değerlendirdikleri çalışmada % 62 *C. albicans*, % 21 *C. glabrata*, % 6 *C. tropicalis*, % 4 *C. parapsilosis*, % 7 diğer non-*albicans* *Candida* türleri (*C. dubliniensis*, *C. kefir*, *C. krusei*, *C. norvegensis*, *C. lusitanae*) olarak tanımlanmıştır. Çıkman ve ark.'nın (242) çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri *Candida*'ların tür dağılımı, % 67 *C. albicans*, % 17 *C. parapsilosis*, % 7 *C. glabrata*, % 5 *C. tropicalis* ve % 4 diğer türler şeklindedir. Temiz ve ark. (243) yaptıkları çalışmada ise suşları % 71 *C. albicans*, % 9 *C. tropicalis*, % 9 *C. glabrata*, % 7 *C. parapsilosis*, % 4 diğer türler olarak tanımlamışlardır. Başka bir çalışmada ise en sık etken olarak % 66 oranıyla *C. albicans* bulunmuştur; bunu *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. kefir* izlemiştir (241). Yıldırım ve ark.'nın (258) hastane personelinde *Candida* taşıyıcılığını

araştırdığı çalışmada suşların % 38'i *C. parapsilosis*, % 26'sı *C. tropicalis*, % 23'ü *C. albicans*, % 11'i *C. kefir* ve % 2'si *C. globosa* olarak tanımlanmıştır. Antimikrobiyal el antiseptiği kullananlarda *Candida* taşıyıcılığının araştırıldığı bir çalışmada ise suşların % 46'sı *C. tropicalis*, % 36'sı *C. parapsilosis*, % 13'ü *C. albicans* ve % 4'ü *C. kefir* olarak rapor edilmiştir (259). Yapılan birçok çalışmada oranlar değişmekle birlikte en sık saptanan etken *C. albicans* olup bunu *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* takip etmektedir (244,245,260-262).

Germ tüp testi, mısır unu-tween 80 agardaki mikroskopik görünüm ve Vitek 2 otomatize sistem yardımı ile çalışmamıza dahil ettiğimiz 350 *Candida* suşunun % 64,8'i *C. albicans*, % 15,7'si *C. glabrata*, % 8,6'sı *C. tropicalis*, % 5,4'ü *C. parapsilosis*, % 2,6'sı *C. kefir*, % 1,7'si *C. guilliermondii*, % 0,6'si *C. dubliniensis*, % 0,3'ü *C. krusei* ve % 0,3'ü *C. lusitanae* olarak tanımlanmıştır. Yapılan diğer çalışmaları incelediğimizde, çalışmamızla uyumlu olarak *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* izole edilen en sık dört etken olarak raporlanmıştır. Bazı çalışmalarda *C. parapsilosis* oranlarında artış görülmektedir. Bunun nedeni ise özellikle o çalışmalarda değerlendirmeye alınan örneklerin kan kültürü olmasından veya sağlıklı kişilerde taşıyıcılığın araştırılmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Çünkü *C. parapsilosis* kandidemilerin ve kateter ilişkili enfeksiyonların önemli bir etkeni ve aynı zamanda sağlık personelinin ellerinden en sık izole edilen *Candida* türüdür (57).

*Candida*'ların neden olduğu enfeksiyonlar yüzeysel ve invaziv olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Yüzeysel enfeksiyonlar daha çok toplum kökenli olduğu halde, invaziv enfeksiyonlar en sık yoğun bakım ünitelerinde olmakla birlikte hastanede diğer servislerde yatan hastalarda da sık görülebilmektedir (2).

Yapılan çalışmaları incelediğimizde; Karadaban (18) yatan hastalardan izole edilen *Candida* suşlarını değerlendirdiği tez çalışmasında örneklerin % 56'sının servis, % 44'ünün ise yoğun bakım ünitesinden gönderildiğini belirtmiştir. Başka bir çalışmada ise örneklerin % 54'ü yoğun

bakım ünitesi, % 41'i servis, % 5'i poliklinik kaynaklı olduğu rapor edilmiştir (246). Yatan hasta örneklerinin değerlendirildiği bir çalışmada yoğun bakım ünitelerinden gelen örneklerin oranı % 57, servislerden gelen örneklerin oranı ise % 43 olarak saptanmıştır (244). Yapılan diğer çalışmalarda yoğun bakım ünitelerinden gelen örneklerin oranı sırasıyla % 43 ve % 70, servislerden gelen örneklerin oranı ise % 57 ve % 30 olarak tayin edilmiştir (245,256).

Çalışmamızda ise örneklerin % 36,3'ü poliklinik, % 36'sı servis, % 27,7'si yoğun bakım ünitesinden gönderilmiştir. Literatürdeki çalışmalar değerlendirildiğinde yoğun bakım ünitelerinden yollanan örneklerin çoğunlukta olduğu görülmektedir. Çalışmamızda ise oranlar birbirine yakın olmakla birlikte poliklinik kökenli örnekler ilk sırada yer almaktadır. Diğer çalışmalarda genel anlamda hem yatan hastalar hem de kan kültürleri değerlendirildiği için yoğun bakım ünitesi kaynaklı örneklerin oranında artış görülmektedir. Çalışmamızda ise özellikle üroloji polikliniğinden gönderilen idrar ve kadın hastalıkları ve doğum polikliniğinden gönderilen vajinal sürüntü örneklerinin değerlendirmeye dahil edilmesinin poliklinik kaynaklı örneklerin oranında artışa neden olduğu düşünülmüştür.

*Candida* larda biyofilm üretimi aderans ve kolonizasyonda rol oynayan, *Candida*'yı konağın savunma mekanizmalarından koruyan önemli bir virulans faktörüdür (178). Ayrıca, antifungal ilaçların biyofilm matriksine iyi penetre olamaması, biyofilm içindeki hücrelerin daha yavaş üremesi ve hücrelerin yüzeyinde meydana gelen değişiklikler nedeniyle antifungal ilaçlara karşı direnç gelişimi görülebilmektedir (187,188). Biyofilm oluşumunu gözlemek amacıyla kullanılan modifiye tüp aderans (MTA) yöntemi, MMP yöntemi, kongo kırmızılı BHIA yöntemi, tetrazolium tuzu redüksiyon yöntemi, scanning elektron mikroskopta görüntüleme gibi pek çok yöntem vardır (178).

Shin ve ark. (263) nonnötrojenik hastalardan izole edilen *Candida* cinsi mayaların biyofilm oluşturma özelliklerini araştırdıkları çalışmada; biyofilm oluşumunu *C. albicans* suşlarında % 8 olarak saptarken, bu oranın non-albicans *Candida* suşlarına göre anlamlı derecede düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Goel ve Mittal (264) kan kültüründe üreyen 100 adet *Candida*

cinsi mayada biyofilm formasyonunu araştırdığı çalışmada biyofilm pozitiflik oranını % 41 olarak saptamıştır. Tumbarello ve ark. (265) 2000-2004 yılları arasında yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen *Candida* cinsi mayalarda MMP yöntemi ile biyofilm oluşturma özelliklerini araştırdıkları çalışmada incelenen biyofilm oluşturma oranını % 22,6 olarak bulmuşlardır. Biyofilm oluşturma özelliğinin ise en fazla *C. tropicalis*'te (% 71,4) bulunduğunu bildirmişlerdir. Kateter kanından izole edilen *C. parapsilosis* suşlarında biyofilm oluşumunun araştırıldığı çalışmada ise oran % 80 olarak tespit edilmiştir (266).

Yücesoy ve Karaman (267) 156 *Candida* suşunu dahil ettikleri çalışmada biyofilm pozitifliğini % 27,6 olarak tespit etmişlerdir. Tr düzeyinde incelediklerinde ise bu oran *C. albicans* için % 25, *C. tropicalis* için % 43, *C. parapsilosis* ve *C. glabrata* için % 17 olarak belirlenmiştir. Gökçe ve ark. (268) *C. albicans* suşlarında biyofilm varlığını araştırdıkları çalışmada, biyofilm oluşumunu % 11,8 olarak rapor etmişlerdir. Demirbilek ve ark. (269) MMP yöntemiyle *Candida* türlerinde biyofilm oluşumunu araştırdıkları çalışmada, biyofilm üretimini *C. albicans* suşlarında % 23, non-albicans *Candida* suşlarında % 41 olarak bulmuşlardır. Biyofilm oluşturma açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulurlarken; diğer örneklerle karşılaştırıldığında kan kültürlerinden izole edilen suşlarda biyofilm varlığının daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Üriner *Candida* izolatlarının biyofilm yapabilme özelliğinin değerlendirildiği bir çalışmada, biyofilm pozitiflik oranı % 24 olarak bulunmuş ve en sık *C. tropicalis* ve *C. albicans* türlerinde biyofilm oluşumu gözlenmiştir (270). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarında MTA yöntemiyle biyofilm oluşumunun araştırıldığı çalışmada, suşların % 15'inde pozitiflik saptanmış ve en sık biyofilm oluşturan tür *C. guilliermondii* olarak belirlenmiştir (271). zperin (272) eşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* cinsi mayalarda biyofilm oluşumunu araştırdığı çalışmada biyofilm oluşumunu % 11,11 olarak saptamış ve suşların dördünün zayıf pozitif, ikisinin kuvvetli pozitif aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada suşların % 52'sinin biyofilm ürettiği saptanmıştır. Aynı çalışmada biyofilm pozitiflik oranı *C. albicans*'da %

63, non-albicans *Candida* türlerinde % 35 olarak kaydedilmiştir. En sık olarak idrar, kan ve balgam örneklerinde biyofilm oluşumu görülmüştür (273). Yıldırım ve ark. (274) enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Candida* suşlarının virülans faktörlerini araştırdıkları çalışmada, *C. albicans* suşlarının % 17'sinde, non-albicans *Candida* suşlarının ise % 33'ünde biyofilm aktivitesi saptanmış ve en sık vajinal sürüntü, idrar ve kan-kateter örneklerinde pozitiflik tespit etmişlerdir. Hilmioğlu ve ark. (275). kongo kırmızılı BHIA yöntemi ile 215 *Candida* suşunu dahil ettikleri çalışmada biyofilm pozitiflik oranını kan kültüründe % 52, idrar örneğinde % 51,1 vajinal sürüntüde % 60 ve ağız sürüntü örneğinde % 45 ve toplamda % 53 olarak saptamışlardır. Kongo kırmızılı BHIA'da biyofilm açısından test edilen 100 *C. albicans* suşunun dahil edildiği bir çalışmada suşların 48'i biyofilm oluşumu açısından pozitif bulunmuştur. Suşlar arasında en yüksek biyofilm aktivitesi idrar (% 52,5) ve kan (% 50) örneklerinde gözlenirken; biyofilm aktiviteleri yönünden klinik örneklerin alındığı yerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (276).

Çalışmamızda MMP yöntemi ile biyofilm formasyonu aranan 350 adet *Candida* suşunun 34'ünde (% 9,7) biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Bu 34 suşun 19'unda zayıf pozitif, dördünde orta pozitif, 11'inde kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Tür düzeyinde incelendiğinde *C. albicans*'ta biyofilm oluşumu % 2,6, non-albicans *Candida* türlerinde ise % 22,7 olarak saptanmıştır. Biyofilm oluşturma açısından iki grup karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Non-albicans *Candida* türleri arasında en sık biyofilm oluşumu % 50 oranla *C. guilliermondii*'de görülürken; bunu *C. kefyr* (% 44,4), *C. tropicalis* (% 40), *C. parapsilosis* (% 15,7) ve *C. glabrata* (% 10,9) izlemiştir. *C. dubliniensis*, *C. krusei* ve *C. lusitaniae* türlerinde biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Biyofilm formasyonu görülen 34 suşun örnek dağılımına bakıldığında en sık kan kültürlerinde (% 12,9) biyofilm oluşumu tespit edilirken; bunu solunum (% 11,5), tırnak (% 10), idrar (% 5,8) ve vajinal sürüntü (% 4,8) örnekleri takip etmiştir. Doku örneklerinde biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olarak, çalışmamızda tespit ettiğimiz biyofilm

pozitiflik oranları, *C. albicans*'a kıyasla, non-*albicans Candida* türlerinde daha fazla gözlenmiştir. Bütün suşları birlikte değerlendirdiğimizde saptadığımız biyofilm pozitiflik oranı diğer çalışmalara göre daha düşük kalmaktadır. Çalışmamıza dahil ettiğimiz örneklerin çoğunlukla poliklinik kökenli olması, kan örneklerinin az sayıda olması, ayrıca enfeksiyon ve kolonizasyon ayırımı yapmaksızın bütün suşların değerlendirmeye alınması biyofilm pozitiflik oranının düşük çıkmasının sebebi olarak düşünülmüştür. Çünkü biyofilm özellikle santral venöz kateter, üriner kateter, eklem protezi, arteriyovenöz fistül, periton diyaliz kateteri, yapay kalp kapakçığı, pacemaker ve ventriküloperitoneal şant gibi yabancı cisim varlığında ve uzun süre hastanede yatarak tedavi gerektiren durumlarda mikroorganizmaların devreye soktuğu bir virulans faktörüdür (277). Yapılan diğer çalışmaları değerlendirdiğimizde en sık biyofilm oluşumu görülen non-*albicans Candida* türleri *C. tropicalis* ve *C. guilliermondii* olarak sıralanmıştır. Çalışmamızda ise sırasıyla en sık *C. guilliermondii*, *C. kefyr* ve *C. tropicalis*'te biyofilm oluşumu saptanarak diğer çalışmalarla uyumlu olduğu gözlenmiştir. Örnek bazında değerlendirme yaptığımızda diğer çalışmalarla uyumlu olarak en sık kan örneklerinde biyofilm oluşumu saptanmıştır.

Son yıllarda *Candida* enfeksiyonlarında görülen artış nedeniyle pek çok yeni antifungal ajan kullanıma girmiştir. Özellikle antifungal ajanların sık kullanılması, *C. albicans* dışındaki türlerde ve antifungal ajanlara dirençte artışa neden olmuştur. Bütün bunların sonucu olarak antifungal ajanların in vitro duyarlılıklarını ölçen testlerin önemi artmıştır (278,279).

Rautemaa ve ark. (280) flukonazole azalmış duyarlılık gösteren *C. albicans* suşlarında çeşitli antifungallerin duyarlılık profillerini inceledikleri çalışmada flukonazole duyarlı suşlardaki amfoterisin B, vorikonazol ve kaspofungin MİK aralıklarını sırasıyla 0,25-0,75 µg/ml, 0,007-0,12 µg/ml, 0,007-0,06 µg/ml olarak bulurken; aynı değerleri flukonazole doza bağımlı duyarlı suşlar için 0,25-0,75 µg/ml, 0,12-1 µg/ml, 0,007-0,06 µg/ml olarak saptamışlardır. Godoy ve ark. (281) kan kültürlerinden izole ettikleri *Candida* suşlarının antifungal duyarlılıklarını sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırarak,



MİK aralığını; amfoterisin B için *C. albicans*'ta 0,125-1 µg/ml, *C. tropicalis*'te 0,25-1 µg/ml, *C. parapsilosis*'te 0,25-1 µg/ml, *C. glabrata*'da 0,5-1 µg/ml; flukonazol için *C. albicans*'ta 0,125-0,5 µg/ml, *C. tropicalis*'te 0,125-0,5 µg/ml, *C. parapsilosis*'te 0,125-2 µg/ml, *C. glabrata*'da 2-8 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Rubio ve ark. (282) vorikonazolün *Candida* suşlarına karşı antifungal etkinliğini sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırarak MİK aralıklarını *C. albicans* için ≤0,015- 0,03 mg/l, *C. tropicalis* için ≤0,015-0,06 mg/l, diğer non-*albicans Candida* türleri için 0,015-1 mg/l olarak tespit etmişlerdir. Swinne ve ark. (283) çoğunluğunu kan kültüründen izole ettikleri 193 non-*albicans Candida* suşunun antifungal duyarlılıklarını sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırdıkları çalışmada MİK aralıklarını; amfoterisin B için 0,25-2 µg/ml, flukonazol için 0,13-64 µg/ml, vorikonazol için 0,008-16 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. *C. parapsilosis*'e karşı beş antifungal ilacın etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada MİK aralığı amfoterisin B ve flukonazol için 0,5-2 µg/ml, vorikonazol için 0,015-0,12 olarak rapor edilmiştir (284). Hollanbaugh (285) *C. parapsilosis* suşlarının kaspofungine duyarlılığını araştırdığı çalışmada MİK aralığını 0,12-1 µg/ml olarak belirtmiştir. Mitchell ve ark. (286) yaptıkları bir çalışmada *Candida* suşlarının kaspofungine karşı antifungal duyarlılığını Flow Cyrometry ile araştırmışlar ve bunu CLSI M27-A2 sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırmışlardır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle elde ettikleri sonuçlara bakıldığında MİK aralıkları, *C. albicans*'ta 0,25-1 µg/ml, *C. tropicalis*'te 0,25-0,5 µg/ml, diğer non-*albicans Candida* türlerinde 0,25-1 µg/ml olarak tespit etmişlerdir. Kumar ve ark. (287) yaptıkları çalışmada amfoterisin B, flukonazol ve vorikonazol için MİK aralığını sırasıyla 0,12-1 µg/ml, 0,12-64 µg/ml ve 0,03-0,25 µg/ml olarak saptamışlardır. Aynı çalışmada suşların hepsi amfoterisin B'ye karşı düşük MİK değerlerine sahip olup duyarlı olarak raporlanırken, flukonazole dirençli iki suş, doza bağımlı duyarlı altı suş, vorikonazole doza bağımlı duyarlı dört suş belirlenmiştir.

Kurt ve ark. (288) kan kültürlerinden izole ettikleri *Candida* suşlarının antifungal duyarlılığını sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırmışlar ve bütün suşlar için MİK aralığı, amfoterisin B için; 0,25-1 µg/ml, flukonazol için 0,125-

64 µg/ml, olarak bildirmişlerdir. Bütün suşları amfoterisin B'ye duyarlı olarak tespit etmişler, flukonazol içinse *C. krusei*'de görülen doğal direnç dışında kalan bütün suşları duyarlı olarak rapor etmişlerdir. Karabıçak ve Alem (289) yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole edilen 140 adet *Candida* suşunun triazol grubu antifungallere karşı sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle duyarlılıklarını belirledikleri çalışmada, MİK aralığını flukonazol için; *C. albicans*'ta 0,125-64 µg/ml, *C. tropicalis*'te 0,125-2 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 0,125-64 µg/ml olarak; vorikonazol için; *C. albicans*'ta 0,015-16 µg/ml, *C. tropicalis*'te 0,015-1 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 0,015-2 µg/ml olarak saptamışlardır. Arıkan ve ark. (290) 63 maya izolatu ile yapmış oldukları bir çalışmada, amfoterisin B MİK aralığının 0,06-168 µg/ml arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise flukonazol MİK aralığı 0,2-64 µg/ml olarak tespit edilmiştir (291). Toprak ve ark. (292) kan kültüründen izole ettikleri *Candida* suşlarının tümünü, makrodilüsyon yöntemi ile amfoterisin B'ye duyarlı bulmuşlar, flukonazole doğal dirençli kabul edilen *C. krusei* dışındaki tüm *Candida* suşlarını da flukonazole duyarlı bulmuşlardır. Ancak bu çalışmada *C. glabrata* izole edilen türler arasında yer almamaktadır. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin amfoterisin B ve flukonazole in vitro duyarlılıklarının araştırıldığı bir çalışmada, MİK aralığı amfoterisin B için; *C. albicans*'ta 0,002-0,5 µg/ml, *C. tropicalis*'te 0,012-0,25 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 0,016-1 µg/ml olarak; flukonazol için; *C. albicans*'ta 0,064-8 µg/ml, *C. tropicalis*'te 0,5-2 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 0,125-64 µg/ml olarak belirlenmiştir. Aynı çalışmada tüm suşlar amfoterisin B'ye duyarlı bulunurken, flukonazole duyarlılıkları incelendiğinde altı (% 66,7) doza bağımlı duyarlı, bir (% 11,1) tane de dirençli *C. glabrata* suşu dışında tüm suşların duyarlı olduğu saptanmıştır (254). Karakoç ve ark. (293) yaptıkları çalışmada mikrodilüsyon yöntemiyle flukonazol için doza bağımlı duyarlı, üçü *C. albicans*, üçü *C. tropicalis*, ikisi *C. glabrata* olmak üzere sekiz *Candida* suşu, dirençli bir *C. albicans* suşu tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda orta ve kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu saptanmış 15 *Candida* suşunun planktonik formunda amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve kaspofungine karşı in vitro antifungal duyarlılıkları CLSI M27-A3 kriterlerine uygun olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılarak MİK değerleri belirlenmiştir. MİK aralıkları amfoterisin B için *C. albicans*'ta 0,03-0,125 µg/ml, *C. tropicalis*'te 0,03-0,25 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 0,03-0,125; flukonazol için *C. albicans*'ta 2 µg/ml, *C. tropicalis*'te 0,5-16 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 1-4 µg/ml; vorikonazol için *C. albicans*'ta 0,06-2 µg/ml, *C. tropicalis*'te 0,03-0,25 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 0,03-0,125 µg/ml; kaspofungin için *C. albicans*'ta 0,06-12 µg/ml, *C. tropicalis*'te 0,06-0,25 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 0,06-32 µg/ml olarak saptanmıştır. Çalışılan bütün suşlar, amfoterisin B MİK değeri  $\leq 0,25$  µg/ml olduğu için duyarlı olarak değerlendirilirken; *C. tropicalis* suşlarından biri flukonazole karşı doza bağımlı duyarlı, bir *C. albicans* suşu da vorikonazole karşı doza bağımlı duyarlı ve kaspofungine dirençli, birer adet *C. tropicalis* ve *C. kefyr* suşu ise kaspofungine karşı dirençli olarak tespit edilmiştir. Saptadığımız MİK değerleri diğer çalışmalarla uyumlu olmakla birlikte; coğrafik bölge ve zaman farkından dolayı küçük farklılıklar dikkat çekmektedir. Ayrıca yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu çok sayıda *Candida* suşu dahil edilerek değerlendirilmiştir. Çalışmamızda ise sadece orta ve kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu gözlenmiş 15 suş için antifungal duyarlılıklarının belirlenmesinin, bölgemizdeki gerçek direnç profilini yansıtmadığı düşünülmüştür.

Antifungal ilaçların biyofilm matriksine iyi penetre olamaması, biyofilm içindeki hücrelerin daha yavaş üremesi ve hücrelerin yüzeyinde meydana gelen değişiklikler, biyofilm içinde bulunan *Candida*'ların antifungal ilaçlara daha dirençli olmasının nedenleri arasındadır (187,188). Mikroorganizmaların planktonik formlarına göre saptanan antimikrobiyal duyarlılıkları ile biyofilm enfeksiyonları tedavi edilememektedir. Bu nedenle, biyofilm oluşturan klinik izolatların in vitro duyarlılıklarının saptanması önem arz etmektedir (194,195).

Melo ve ark. (294) klinik örneklerden izole ettikleri *Candida* türlerinde biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılığı araştırdıkları çalışmada, MBEK aralığını, amfoterisin B için *C. albicans*'ta 1 µg/ml, *C. tropicalis*'te 1-2 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 1 - >16 µg/ml; flukonazol için *C. albicans* ve *C. tropicalis*'te >2048 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 256 - >2048 µg/ml olarak saptamışlardır. Shuford ve ark. (295) biyofilm formundan ayrılmış sesil hücrelerin antifungal duyarlılığını araştırdıkları çalışmada MİK aralığını amfoterisin B, vorikonazol ve kaspofungin için sırasıyla 2-8 µg/ml, >256 µg/ml, 2-8 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Biyofilm formundan ayrılmış sesil hücrelerin antifungal duyarlılığının araştırıldığı başka bir çalışmada MİK aralığı amfoterisin B için *C. albicans*'ta 1 - >32 µg/ml, *C. tropicalis*'te 1 - >32 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 0,5 - >32 µg/ml; flukonazol için bütün *Candida* türlerinde >1024 µg/ml; kaspofungin için *C. albicans*'ta 0,5-1 µg/ml, *C. tropicalis*'te >16 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 0,5 - >16 µg/ml olarak rapor edilmiştir (296). Kuhn ve ark. (297) *C. albicans* ve *C. parapsilosis* biyofilmlerinin antifungal duyarlılıklarını araştırdıkları çalışmada, lipozomal amfoterisin B'nin *C. albicans* biyofilmleri üzerine, planktonik formların MİK değerlerine benzer inhibitör aktivite gösterdiğini saptamışlardır. Aynı çalışmada, vorikonazolün planktonik formlara karşı inhibitör etki gösterirken biyofilm formları etkilemediği gözlenmiştir. Hawser ve Douglas (187) yaptıkları çalışmada biyofilm varlığında MİK değerlerinde 30-2000 kat arasında artış olduğunu tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, CBY ile biyofilm ve planktonik formların antibiyotik duyarlılıkları arasında 100-1000 kat fark bulunduğu bildirilmiştir (196).

Onurdağ ve ark. (195) *Candida* türlerinin biyofilm oluşturan ve planktonik formlarının antifungal ajanlara karşı in vitro duyarlılıklarını araştırmışlardır ve MBEK değerini amfoterisin B için *C. albicans*'ta 32 µg/ml, *C. tropicalis*'te 256 µg/ml, *C. parapsilosis*'te 64 µg/ml; flukonazol için bütün türlerde >512 µg/ml olarak saptamışlardır.

Çalışmamızda orta ve kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu saptanmış, 15 suşun biyofilm oluşturmuş formunda amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve kaspofungin MBEK değerleri CBY kullanılarak MBEC Assay™ for High-throughput Screening testi ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda araştırılmıştır. MBEK aralıkları amfoterisin B için *C. albicans*'ta >16 µg/ml, *C. tropicalis*'te ve diğer non-albicans *Candida* türlerinde 16 - >16 µg/ml; flukonazol için *C. albicans*'ta 16 - >128 µg/ml, *C. tropicalis*'te 128 - >128 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 32 - >128 µg/ml; vorikonazol için *C. albicans*'ta 8 - >16 µg/ml, *C. tropicalis*'te 4 - >16 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 0,125-16 µg/ml; kaspofungin için *C. albicans*'ta 16 - >32 µg/ml, *C. tropicalis*'te 8 - >32 µg/ml, diğer non-albicans *Candida* türlerinde 32 - >32 µg/ml olarak saptanmıştır. Amfoterisin B MBEK değeri ≥16 µg/ml olduğu için 15 suşun tamamı amfoterisin B'ye dirençli olarak değerlendirilirken; flukonazole suşların üçü doza bağımlı duyarlı (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*), diğerleri dirençli; vorikonazole sadece *C. guilliermondii* duyarlı, diğerleri dirençli; kaspofungine ise tüm suşlar dirençli olarak saptanmıştır. Özellikle flukonazol ve vorikonazol için saptadığımız MBEK değerleri diğer çalışmalarla uyum göstermiştir. Ancak amfoterisin B ve kaspofungin MBEK değerleri bazı çalışmalara kıyasla, çalışmamızda daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu durumun, çalışmamıza sadece biyofilm oluşumu gözlenmiş 15 suşun dahil edilmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Biyofilm varlığında antifungal ilaçlara duyarlılığın azalması sonucu iyice zorlaşan *Candida* enfeksiyonu tedavisi için yeni strateji arayışları ön plana çıkmaktadır. Literatür incelendiğinde pek çok maddenin antifungal etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar dikkat çekmektedir (6,227,298,299). Melatonin, serbest radikal süpürücü olması, antioksidan enzim indükleyici etkisi, immun sistem fonksiyonlarındaki pozitif düzenleyici olması, inflamasyonu inhibe edici rolü ve programlanmış hücre ölümündeki regülatör fonksiyonları nedeniyle enfeksiyonlara karşı koruyucu etki göstermektedir (218). Ayrıca antioksidanlar içerisinde, melatoninin en güçlü radikal tutucu olduğu öne sürülmektedir ve dolayısıyla melatonine olan ilgi giderek

artmaktadır (6). Melatoninin tüm bu özelliklerinden dolayı *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde yeni bir strateji olabileceği düşünülmektedir.

Yang ve ark. (227) yaptıkları çalışmada melatoninin *C. parapsilosis* biyofilmini inhibe ettiğini gözlemiş ve melatoninin biyofilm ilişkili fungal enfeksiyonlarda kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Yavuz ve ark. (6) ise *Candida* sespsisine melatoninin etkisini araştırdıkları çalışmada, antifungal tedaviye immun regülatör fonksiyonu nedeniyle melatonin eklenmesinin, invaziv *Candida* enfeksiyonunda terapötik etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

Melatonin dışında birçok maddenin antifungal etkinliği araştırılmıştır. Ahmad ve ark. (300) gümüş nanopartiküllerinin amfoterisin B MİK değerlerine etkisini araştırdıkları çalışmada, tek başına amfoterisin B MİK değerlerini *C. albicans* ve *C. tropicalis* için sırasıyla 125 µg/ml ve 62,5 µg/ml olarak; amfoterisin B'ye gümüş nanopartiküllerinin eklenmesiyle aynı değerleri 5 µg/ml ve 1,5 µg/ml olarak saptamışlardır. Ayrıca fungal enfeksiyon tedavisinde nanopartiküllerle kaplı amfoterisin B kullanımının tedavi maliyetini ve ilaca bağlı ciddi yan etkileri azaltacağını; dolayısıyla güvenli, etkili ve ekonomik bir antifungal tedavi alternatifi olacağını savunmuşlardır. *C. albicans*'a karşı flukonazol ve glycyrol'un sinerjistik etkisinin araştırıldığı çalışmada, MİK değerlerinde dört kat düşüş gözlenmiştir (301). Kekik, rezene, karanfil, çam, adaçayı, melisa ve lavanta bitkilerine ait esansiyel yağların antifungal etkisinin araştırıldığı, *C. albicans*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* türlerinden oluşan 46 izolatın dahil edildiği çalışmada; flukonazol ve vorikonazol ile karşılaştırıldığında esansiyel yağlara ait MİK değerlerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir (302). Stearidonik asit ile amfoterisin B'nin *C. albicans* ve *C. dubliniensis* biyofilmi üzerine sinerjistik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, düşük konsantrasyonda amfoterisin B ve stearidonik asit kombinasyonunun biyofilmi inhibe ettiği gözlenmiş; ayrıca *C. albicans* biyofilmini inhibe eden kombinasyonda amfoterisin B konsantrasyonunun, *C. dubliniensis* biyofilmini inhibe eden kombinasyonda ise stearidonik asit konsantrasyonunun yüksek olduğu saptanmış. Bu durumun iki türün hücre

duvar yapılarının farklı olmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (303). Kumar ve ark. (304) *Acorus calamus* (hint kamışı) bitkisinden elde ettikleri  $\infty$ -asaron ve  $\beta$ -asaron maddelerinin antifungal etkisini araştırdıkları çalışmada;  $\infty$ -asaron'un amfoterisin B ve flukonazol MİK değerini *C. albicans*'ta 1  $\mu\text{g/ml}$ 'den sırasıyla 0,03  $\mu\text{g/ml}$  ve 0,06  $\mu\text{g/ml}$ 'ye, *C. tropicalis*'te ise sırasıyla 2  $\mu\text{g/ml}$ 'den 0,25  $\mu\text{g/ml}$ 'ye, 1  $\mu\text{g/ml}$ 'den 0,12  $\mu\text{g/ml}$ 'ye düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Aynı sinerjistik etki  $\beta$ -asaron için de kaydedilmiştir;  $\beta$ -asaron amfoterisin B ve flukonazol MİK değerini *C. albicans*'ta sırasıyla 2  $\mu\text{g/ml}$ 'den 0,06  $\mu\text{g/ml}$ 'ye, 1  $\mu\text{g/ml}$ 'den 0,03  $\mu\text{g/ml}$ 'ye; *C. tropicalis*'te ise her iki antifungal için 2  $\mu\text{g/ml}$ 'den 0,03  $\mu\text{g/ml}$ 'ye düşürdüğü gözlenmiştir. Ayrıca aynı çalışmada  $\infty$ -asaron ve  $\beta$ -asaron'un antifungallerle kombine edilmesinin biyofilm varlığında MİK değerlerinde düşüş yaptığı da tespit edilmiştir. Özellikle  $\beta$ -asaron ve flukonazol kombinasyonunun *C. tropicalis* biyofilmi üzerine kayda değer bir inhibitör etkisinin olduğu belirtilmiştir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise gargaraların in vitro antifungal etkileri araştırılmış; setilpiridinium klorid ve heksetidinin özellikle *C. albicans*'a karşı diğer ürünlerden daha etkili olduğu, ancak klorheksidinin tüm türler üzerine en etkili ürün olduğu, sanguinarinenin ise zayıf etki gösterdiği tespit edilmiştir (305).

Çalışmamızda orta ve kuvvetli pozitif biyofilm oluşumu saptanmış, 15 suşun planktonik formunda amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve kaspofunginin tek başına ve melatonin ile kombinasyonlarının MİK değerleri CLSI M27-A3 kriterlerine uygun olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Tüm suşlar değerlendirildiğinde, melatonin varlığında 15 suşun 11'inde olmak üzere en fazla flukonazol MİK değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Bunu vorikonazol (yedi), kaspofungin (beş) ve amfoterisin B (iki) izlemiştir. Flukonazol ile diğer antifungaller, melatonin varlığında MİK değerlerinde görülen düşüş açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır. *C. parapsilosis* dışında kalan tüm suşlarda en az bir antifungal ilacın MİK değerinde değişiklik tespit edilmiştir. Melatonin varlığında MİK değerlerinde görülen düşüş açısından antifungal

ajanlar tek tek karşılaştırıldığında; amfoterisin B'nin tek başına ve melatonin ile kombinasyonu sonucu elde edilen MİK değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, diğer üç antifungalın MİK değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmüştür. Dirençli suşlar incelendiğinde ise; *C. tropicalis* suşlarından birinin flukonazol MİK değeri 16 µg/ml olarak saptanmış ve doza bağımlı duyarlı olarak tespit edilmiştir; aynı suşta melatonin varlığında MİK değeri 2 µg/ml'ye düşmüş ve duyarlı hale gelmiştir. *C. albicans* suşlarından birinde ise vorikonazol MİK değeri 2 µg/ml (doza bağımlı duyarlı), kaspofungin MİK değeri 32 µg/ml (dirençli) olarak saptanmıştır; melatonin varlığında MİK değerlerinde sırasıyla 0,125 µg/ml ve 8 µg/ml'ye düşüş gözlenmiştir, bu durumda izolat vorikonazole duyarlı hale gelirken, kaspofungin direnci devam etmiştir. Ayrıca kaspofungin MİK değeri sırasıyla 1 µg/ml ve 32 µg/ml olan birer adet *C. tropicalis* ve *C. kefyr* suşları dirençli olarak değerlendirilmiş olup; melatonin varlığında 0,125 µg/ml ve 8 µg/ml'ye düşüş gözlenmiştir; bu durumda *C. tropicalis* duyarlı hale gelirken, *C. kefyr*'de direnç devam etmiştir.

Planktonik formda araştırılmış olan antifungal duyarlılık, aynı suşların biyofilm formuna da uygulanmıştır. Bu amaçla, amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol ve kaspofungin tek başına ve melatonin ile kombinasyonlarının MBEK değerleri CBY kullanılarak MBEC Assay™ for High-throughput Screening testi ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda araştırılmıştır. Melatonin varlığında 15 suşun 10'unda olmak üzere en fazla kaspofungin MBEK değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Bunu amfoterisin B (yedi), vorikonazol (yedi) ve flukonazol (beş) izlemiştir. Antifungaller, melatonin varlığında MBEK değerlerinde görülen düşüş açısından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. *C. tropicalis* suşlarından biri ve *C. glabrata* dışında kalan tüm suşlarda en az bir antifungal ilacın MBEK değerinde değişiklik saptanmıştır. Melatonin varlığında MBEK değerlerinde görülen düşüş açısından antifungal ajanlar tek tek karşılaştırıldığında; flukonazolün tek başına ve melatonin ile kombinasyonu sonucu elde edilen MBEK değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken, diğer üç antifungalın MBEK değerlerinde istatistiksel olarak



anlamli bir dūşūş görülmüştür. Melatonin varliđında MBEK deđerlerinde dūşūş gözlense de sadece flukonazol MBEK deđeri >128 µg/ml olup dirençli olarak deđerlendirilen üç suşun (iki *C. tropicalis*, bir *C. kefyr*) MBEK deđerleri 32 µg/ml'ye ve vorikonazol MBEK deđerleri 16 µg/ml olup dirençli olarak deđerlendirilen bir *C. tropicalis* suşunun MBEK deđerleri 2 µg/ml'ye dūşerek doza bađımlı duyarlı hale gelmiştir; ancak diđer suşların direnç profilinde deđişiklik olmadığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada, melatoninin, *Candida*'ların planktonik formunda MİK, biyofilm formunda ise MBEK değerlerini dūşürdüđü gözlense de, özellikle planktonik formlara daha etkin olduğu saptanmıştır. Planktonik formda en etkin kombinasyon flukonazol ile sağlanırken, biyofilm formunda kombinasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamli bir fark saptanmamıştır.

Sonuç olarak, antifungallerle kombine edilmesi sonucu MİK ve MBEK deđerlerinde görülen dūşūş, melatoninin *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde yeni bir alternatif olabileceđini göstermektedir. Ancak, bu alandaki çalıřmalar sınırlı olduđu için melatoninin bu etkisinin yapılacak yeni çalıřmalarla desteklenmesi gerektiđi dūşünülmüştür.

## 6. SONUÇLAR

*Candida*'lar özellikle immunsupresyon durumlarında önemli morbidite ve mortalite sebebi olabilen fırsatçı patojenlerdir. Son zamanlarda *Candida* enfeksiyonlarının patogenezi açıklamak amacı ile yapılan çalışmalarda, *Candida* türlerine ait virulans faktörlerinin önemi belirtilmektedir. Konak immün sistemine ve antimikrobik ajanlara karşı direnç gelişimine neden olduğu için, önemli bir virülans faktörü olan biyofilm, *Candida* türlerinin tedavisini zorlaştırmaktadır. Antioksidan etkiye ve immunmodulatör özelliğe sahip olduğu için melatoninin, *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde alternatif ajan olabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla; klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarının planktonik ve biyofilm formlarında, melatoninin antifungal duyarlılığa etkisinin araştırıldığı çalışmamızda sonuç olarak;

1. Çalışmamızda *Candida* izole edilen en sık dört klinik örnek sırasıyla idrar (% 34,5), vajinal sürüntü (% 23,7), solunum (% 19,7) ve kan (% 17,7) olarak tespit edilmiştir.

2. *C. albicans* (% 64,8), *C. glabrata* (% 15,7), *C. tropicalis* (% 8,6) ve *C. parapsilosis* (%5,4) izole edilen en sık dört etken olarak raporlanmıştır.

3. Çalışmaya dahil edilen örneklerin gönderildiği klinikler sıklık sırasına göre poliklinik, (% 36,3), servis (% 36) ve yoğun bakım ünitesi (% 27,7) olarak belirlenmiştir.

4. Biyofilm oluşumu tüm suşlarda % 9,7, tür düzeyinde incelendiğinde *C. albicans*'ta % 2,6, Non-*albicans Candida* türlerinde ise % 22,7 olarak saptanmıştır. Biyofilm oluşumu açısından iki grup karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. Örnek düzeyinde incelendiğinde ise en sık kan kültürlerinde biyofilm oluşumu gözlenmiştir.

5. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile MİK aralıkları amfoterisin B için 0,03-0,25 µg/ml; flukonazol için 0,5-16 µg/ml; vorikonazol için 0,03-2 µg/ml,

kaspofungin için 0,06-32 µg/ml olarak saptanmıştır. Amfoterisin B'ye bütün suşlar duyarlı; flukonazole *C. tropicalis* suşlarından biri karşı doza bağımlı duyarlı; vorikonazole bir *C. albicans* suşu doza bağımlı duyarlı, kaspofungine birer adet *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. kefyr* suşu dirençli olarak tespit edilmiştir.

6. CBY ile MBEK aralıkları amfoterisin B için 16 - >16 µg/ml; flukonazol için 16 - >128 µg/ml; vorikonazol için 0,125 - >16 µg/ml; kaspofungin için 8 - >32 µg/ml olarak saptanmıştır. Amfoterisin B ve kaspofungine bütün suşlar dirençli; flukonazole suşların üçü doza bağımlı duyarlı (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*), diğerleri dirençli; vorikonazole sadece *C. guilliermondii* duyarlı, diğerleri dirençli olarak saptanmıştır.

7. Melatonin varlığında MİK değerlerinde düşüş gözlenirse de, özellikle dirençli suşlar incelendiğinde; sadece kaspofungine dirençli olan suşlardan iki tanesi MİK değeri düşmesine rağmen halen dirençli olarak değerlendirilirken; diğer doza bağımlı duyarlı ve dirençli suşlar duyarlı hale gelmiştir.

8. Melatonin varlığında MBEK değerlerinde düşüş gözlenirse de; sadece flukonazole dirençli olan üç suş ve vorikonazole dirençli olan bir suş doza bağımlı duyarlı hale gelmiştir; ancak diğer suşların direnç profilinde değişiklik olmadığı belirlenmiştir.

9. Bu çalışmada, melatoninin, *Candida*'ların planktonik formunda MİK, biyofilm formunda ise MBEK değerlerini düşürdüğü gözlenirse de, özellikle planktonik formlara daha etkin olduğu saptanmıştır. Planktonik formda en etkin kombinasyon flukonazol ile sağlanırken, biyofilm formunda kombinasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

10. Antifungallerle kombine edilmesi sonucu MİK ve MBEK değerlerinde görülen düşüş, melatoninin *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde yeni bir alternatif olabileceğini göstermektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Ener B. Mantar infeksiyonlarında klinikten laboratuvara tanı sorunları. *Ankem derg.* 1998;12(3):248-252.
2. Yücel A, Kantarcioğlu AS. Hastane kaynaklı mantar infeksiyonlarının epidemiyolojisi. *Cerrahpaşa J Med.* 2001;32(4):259-269.
3. Birinci A, Çekiç Cihan Ç, Bilgin K, Acuner Ç, Durupınar B. *Candida* türlerinde slime üretiminin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2005;35(3):163-166.
4. Kuştimur S. *Candida*'da virulans faktörleri. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s.145-150. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, İzmir, 4-6 Mayıs 1999.
5. Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing: Technical advances and potential clinical applications. *Clin Infect Dis.* 1997;24(5):776-784.
6. Yavuz T, Kaya D, Behcet M, Ozturk E, Yavuz O. Effects of melatonin on *Candida* sepsis in an experimental rat model. *Adv Ther.* 2007;24(1):91-100.
7. Barnett JA. A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast.* 2004;21(14):1141-1193.
8. Yarar M. Klinik materyallerden izole edilen *Candida albicans* suşlarında SAP genlerinin araştırılması. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi, Denizli 2014.
9. Moran G, Coleman D, Sullivan D. An introduction to the medically important *Candida* species. Ed: Calderone RA, Clancy CJ, *Candida and Candidiasis* 1st Ed. pp. 23-62, ASM Press, Washington DC, USA, 2002.

10. Reiss E. Candidiasis and less common yeast genera. Ed: Reiss E, Shadomy HJ, Lyon GM, Fundamental Medical Mycology. pp. 249-301, Wiley-Blackwell, New York, USA, 2012.
11. Hazen KC, Howell SA. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. Ed: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, Manual of Clinical Microbiology Vol. 2 9th Ed. pp. 1762-1788, ASM Press, Washington DC, USA, 2007.
12. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007;20(1):133-163.
13. Vazquez JA, Sobel JD. Candidiasis. Ed: Dismuke WE, Pappas PG, Sobel JD, Clinical Mycology. pp. 143-187, Oxford University Press, New York, USA, 2003.
14. Mycology. Ed: Winn WJ, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL, Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Ed. pp. 1151-1243, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2006.
15. Gürbüz M. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* kökenlerinin moleküler analizi. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi, Denizli 2008.
16. Çerikçioğlu N. *Candida* türleri. Ed: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2. pp. 2411-2426, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Türkiye, 2008.
17. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ng KP, Colombo A, Finkelstein J, Barnes R, Wadula J; Global Antifungal Surveillance Group. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: a global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. J Clin Microbiol. 2008;46(3):842-849.

18. Karadaban K. Hastanede yatan hastalardan enfeksiyon etkeni olarak soyutlanan *Candida* suşlarının tiplendirilmesi ve antifungal ilaçlara karşı duyarlılıklarının e-test yöntemi ile araştırılması. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları Ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi, Elazığ 2011.
19. Ryan KJ. Pathogenic Fungi. Ed: Ryan KJ, Ray CG, Sherris Medical Microbiology 5th Ed. pp. 693-737, McGrawHill Medical, New York, USA 2010.
20. Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62(1):130-180.
21. Dignani MC, Solomkin JS. *Candida*. Ed: Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA, Clinical Mycology 2nd Ed. pp. 197-219, Churchill Livingstone Elsevier, London, UK 2009.
22. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. Microbiological Reviews. 1991;55(1):1-20.
23. Ener B. *Candida* ve benzer mayalar. Ed: Yenen OŞ, Tıbbi Mikrobiyoloji. pp. 642-645, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Türkiye 2010.
24. Tümbay E. Fırsatçı mikozlar. Ed: Başustaoğlu AC, Tıbbi Mikrobiyoloji 6. Baskı. pp. 751-774, Atlas Kitapçılık, Ankara, Türkiye 2010.
25. Edwards JE. *Candida* species. Ed: Mandel GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 6th Ed. pp. 2938-2958, Churchill Livingstone, Philadelphia, USA 2005.
26. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida*'ların patojenlik belirtgenleri. Cerrahpasa J Med. 2000;31(3):172-186.

27. İnci R. *Candida* infeksiyonlarının patogenezinde konağın rolü. *Candida* Mikrobiyolojisi Ve İnfeksiyonları Simpozyumu Bildiri Kitabı, s.71-83. *Candida* Mikrobiyolojisi Ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir, 21-22 Haziran 2002.
28. Öztaş M. *Pityriasis versicolor* ve *Candida* infeksiyonları. 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s.85-89. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Ankara, 19-21 Haziran 2001.
29. Ener B. *Candida* infeksiyonlarının patogenezi: etkenin rolü. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Bildiri Kitabı, s.65-70. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir, 21-22 Haziran 2002.
30. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. Trends Microbiol. 2011;19(5):241-247.
31. Pittet D, Li N, Woolson RF, Wenzel RP. Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial blood-stream infections: A 6-year validated, population-based model. Clin Infect Dis. 1997;24(6):1068-1078.
32. Özcan SK. Tıbbi gereçlerle ilişkili *Candida* biyofilm ve enfeksiyonları. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 2007;27(4):589-600.
33. Howard DH. Acquisition, transport and storage of iron by pathojenik fungi, Clin Microbiol Rev. 1999;12(3):394-404.
34. Ismail A, Bedell GW, Lupan DM. Siderophore production by the pathogenic yeast, *Candida albicans*. Biochem Biophys Res Commun. 1985;130(2):885-891.
35. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. Microbiology. 2001;147(8):1997-2005.
36. Akbaş E, Karabıçak N, Güvener E. *Candida* türlerinde salgısal asid proteinaz varlığının araştırılması. Klimik Derg. 1997;10(3):127-129.

37. Zepelin MB, Meyer I, Thomssen R, Würzner R, Sanglard D, Telenti A: HIV Protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. J Invest Dermatol. 1999;113(5):747-751.
38. Odds FC. Presidential address. *Candida albicans*, the life and times of a pathogenic yeast. J Med Vet Mycol.1994;32(1):1-8.
39. Magee BB, Hube B, Wright RJ, Sullivan PJ, Magee PT. The genes encoding the secreted aspartyl proteinase of *Candida albicans* constitute a family with at least three members. Infect Immun. 1993;61(8):3240-3243.
40. Çerikçioğlu N. Mantarlarda Virulans Faktörleri. Ankem Derg. 2012;26(Ek 2):261-269.
41. Ghannoum MA: Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis, Clin Microbiol Rev. 2000;13(1):122-143.
42. Soydan S. Değişik klinik örneklerden soyutlanan *Kandida* türlerinde virülans faktörlerinden proteinaz, fosfolipaz ve esteraz aktivitelerinin araştırılması. Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık tezi, Elazığ 2005.
43. Stehr F, Felk A, Kretschmar M, Schaller M, Schafer W, Hube B. Extracellular hydrolytic enzymes and their relevance during *Candida albicans* infections. Mycoses. 2000;43(Ek 2):17-21.
44. Tsuboi R, Komatsuzaki H, Ogawa H. Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. Infect Immun. 1996;64(8):2936-2940.
45. Arıkan S, Sancak B, Haşçelik G, Günalp A. *Candida albicans* izolatlarında fosfolipaz aktivitesinin saptanması. Flora. 1998;3(4):240-243.
46. Ghannoum MA, Abu-Elteen KH. Patogenicity determinants of *Candida*. Mycoses. 1990;33(6):268-282.



47. Kiraz N. *Candida* türlerinde fenotipik ve genotipik tiplendirme. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s.125-135. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi İzmir, 4-6 Mayıs 1999.
48. Soll DR. High-frequency switching in *Candida albicans*. Clin Microbiol Rev. 1992;5(2):183-203.
49. Kiraz N, Anđ N, Akgün Y, Erturan Z. Phenotypic variation and antifungal susceptibility patterns of *Candida albicans* strains isolated from neutropenic patients. Mycoses. 2000;43(3-4):119-123.
50. Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: tthe evolution of phenotypic plasticity. Acta Tropica. 2002;81(2):101-110.
51. Critchley IA, Douglas JL. Isolation and partial characterization of an adhesin from *Candida albicans*. J Gen Microbiol. 1987;133:629-636.
52. Kuştimur S. Kandida patogenezinde rol oynayan faktörler. Mikrobiyol Bul. 1994;28:175-181.
53. Ener B, Douglas LJ. Correlation between cell-surface hydrophobicity of *Candida albicans* adhesion to buccal epithelial cells. Fems Microbiol Letter. 1992;99(1):37-42.
54. Arıkan S. Mantarlarda pleomorfizm. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s.77-86. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Bodrum 27-30 Mayıs 2003.
55. Larone DH. Yeasts and yeastlike organisms. Ed: Larone DH, Medically Important Fungi A Guide To Identification 35th Ed. pp. 117-154, ASM Press, Washington DC, USA, 2011.
56. Segal E, Elad D. Candidiasis. Ed: Merz W, Hay R, Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections Medical Mycology 10th Ed. pp. 579-623, Hodder Arnold, London, UK, 2005.

57. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Jpn J Med Mycol.* 2007;48(1):1-12.
58. Metin DY. Antifungal ilaçlar. Ed: Başustaoğlu AC. *Tıbbi Mikrobiyoloji* 6. Baskı. pp. 701-713, Atlas Kitapçılık, Ankara, Türkiye 2010.
59. Achkar JM, Fries BC. *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(2):253-273.
60. Richardson M, Lass-Flörl C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Ek 4):5-24.
61. Miceli MH, Diaz JA, Lee AS. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(2):142-151.
62. Dufresne SF, Marr KA, Sydnor E, Staab JF, Karp JE, Lu K, Zhang SX, Lavallée C, Perl TM, Neofytos D. Epidemiology of *Candida kefyr* in patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol.* 2014;52(6):1830-1837.
63. Tüzün Y, Serdaroğlu S. Kandidiasis. Ed: Tüzün Y, Gürer MA, Serdaroğlu S, Oğuz O, Aksungur VL, *Dermatoloji* 1.Cilt 3. Baskı. pp. 360-362, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, Türkiye, 2008.
64. McDonnell GE. Antiseptics and antiseptis. Ed: McDonnell GE, *Antiseptis, Disinfection, and Sterilization: Types, Action, and Resistance.* pp. 149-163, ASM Press, Washington DC, USA, 2007.
65. Pappas PG1, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE Jr, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(5):503-535.
66. İnan D. Kütanöz-subkütanöz fungal infeksiyonlar. Ed: Arman D, Odabaşı Z, *Fungal İnfeksiyonlar ve Tedavisi.* pp. 53-61, Bilimsel Tıp Kitabevi, Ankara, Türkiye, 2009.

67. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. Lancet. 2007;369(9577):1961-1971.
68. Tümbay E. *Candida* türleri. Ed: Ustaçelebi Ş, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. pp. 1081-1086, Güneş Kitabevi, Ankara,Türkiye, 1999.
69. Uzun Ö. Nozokomiyal hematogen kandidiyazis. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Bildiri Kitabı, s.117-124. *Candida* Mikrobiyolojisi Ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir, 21-22 Haziran 2002.
70. Azap A. Hematojen yayımlı fungal enfeksiyonlar. Ed: Arman D, Odabaşı Z, Fungal İnfeksiyonlar ve Tedavisi. pp. 95-104, Bilimsel Tıp Kitabevi, Ankara, Türkiye, 2009.
71. Blumberg HM1, Jarvis WR, Soucie JM, Edwards JE, Patterson JE, Pfaller MA, Rangel-Frausto MS, Rinaldi MG, Saiman L, Wiblin RT, Wenzel RP; National Epidemiology of Mycoses Survey(NEMIS) Study Group. Risk factors for *Candida* bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. Clin Infect Dis. 2001; 33(2): 177-186.
72. Akalın H. Kandidemilerde risk faktörleri ve risk değerlendirmesi. ANKEM Derg. 2008;22(Ek 2):270-274.
73. Uzun Ö. Yoğun bakım ünitesinde fungal infeksiyonlara yaklaşım. Yoğun Bakım Dergisi. 2003;3(2):135-144.
74. Willke A. Kandidemi: Nasıl değerlendirilmeli ne yapılmalı. İnfeksiyon Dergisi. 2007; 21:117-122.
75. Kauffman CA, Fisher JF, Newman CA. *Candida* urinary tract infections-diagnosis. Clin Infect Dis. 2011;52(6):452-456.
76. Fisher JF, Sobel JD, Kauffman CA. *Candida* urinary tract infections-treatment. Clin Infect Dis. 2011; 52(6):457-466.

77. Haron E, Vartivarian S, Anaissie E, Dekmezian R, Bodey GP. Primary *Candida* pneumonia. Experience at a large cancer center and review of the literature. *Medicine*. 1993;72(3):137-142.
78. Çaylan R, Arslan T. Santral sinir sistemi fungal infeksiyonları. Ed: Arman D, Odabaşı Z, Fungal İnfeksiyonlar ve Tedavisi. pp. 85-90, Bilimsel Tıp Kitabevi, Ankara, Türkiye, 2009.
79. Odabaşı Z, Tigen ET. Fungal göz infeksiyonları ve tedavileri. Ed: Arman D, Odabaşı Z, Fungal İnfeksiyonlar ve Tedavisi. pp. 91-93, Bilimsel Tıp Kitabevi, Ankara, Türkiye, 2009.
80. Koç NA. Klinik örnek seçimi, alınması ve gönderilmesi. 1. Ulusal Tıbbi Mikoloji Simpozyumu, Geleneksel ve Yeni Tanı Yöntemleri Bildiri Kitabı, s.3-8. 1. Ulusal Tıbbi Mikoloji Simpozyumu, İzmir, 26-27 Nisan 2013.
81. Yeğenoğlu Y. İnvaziv mantar hastalıklarının mikolojik tanısı. *İst Tıp Fakültesi Dergisi*. 2007;70:23-38.
82. Kuştimur S. *Candida* türlerinin identifikasyonu. Tıbbi Önemi Olan Fungal Etkenlerin Tanımlanması Uygulamalı Eğitimi Kurs Kitabı. s.69-83, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, 3-7 Haziran 2013.
83. Hilmioğlu S. *Candida* enfeksiyonlarının laboratuvar Tanısı: klasik tanıda izlenecek yol ne olmalı? *Candida Mikrobiyolojisi Ve İnfeksiyonları Simpozyumu Bildiri Kitabı*, s.125-131. *Candida Mikrobiyolojisi Ve İnfeksiyonları Simpozyumu*, Eskişehir, 21-22 Haziran 2002.
84. Kiraz N. İnsanda hastalık yapan mantarlar. Ed: Kiraz N, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ders Kitabı 2. Cilt. pp. 1367-1373. İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi, İstanbul, Türkiye, 2011.
85. Yıldırım ŞT. Mantar hastalıklarının laboratuvar tanısı. Ed: Başustaoğlu AC, Tıbbi Mikrobiyoloji 6. Baskı. pp. 689-699, Atlas Kitapçılık, Ankara, Türkiye 2010.

86. Kiraz N. *Candida* türlerinin mikroskopik görünüşleri, identifikasyonunda çimlenme borusu testi ve mısır unu-tween 80 agardaki lam kültürü. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Öncesi Kurs Kitabı, s.22-28. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 3-7 Kasım 2012.

87. Ener B. *Candida* türlerinin identifikasyonunda fermentasyon-asimilasyon testleri ve otomatize sistemler. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Öncesi Kurs Kitabı, s.29-32. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Kuşadası, 3-7 Kasım 2012.

88. Kalkancı A. mikoizların serolojik tanısında yenilikler. 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s.31-32. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Konya, 3-6 Mayıs 2005.

89. Sarıbaş Z, Arıkan S. Patojen mantarların moleküler yöntemlerle saptanması ve tanımlanması. Ed: Ustaçelebi Ş. Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. pp. 551- 559. Palme Yayıncılık, Ankara, Türkiye, 2006.

90. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev 1996;9(4):499-511.

91. Sullivan DJ, Coleman DC. Molecular approaches to identification and typing of candida species. Ed: Calderone RA, *Candida and Candidiasis* 1st Ed. pp. 427- 441. ASM Press, Washington DC, USA, 2002.

92. Saraçlı MA. Mikoizların moleküler tanısı: neredeyiz? 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s.33-45. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Konya, 3-6 Mayıs 2005.

93. Koç N. Mantarların genotiplendirme çalışmalarında güncel durum. 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s.49-54. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 24-28 Haziran 2008.

94. Sürücüoğlu S. Sistemik azoller ve amfoterisin B'nin yeni formülasyonları 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s.183-

186. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, İzmir, 4-6 Mayıs 1999.

95. Doğruman AI F. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılığının belirlenmesinde standart makrodilüsyon ile e test yöntemlerinin karşılaştırılması. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Erzurum 2000.

96. Yuluğ N. Antifungal duyarlılık testleri ve antifungal ajanların önemi. III. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik Laboratuar Uygulamaları ve Yenilikler Bildiri Kitabı, s.115-117. Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik Laboratuar Uygulamaları ve Yenilikler, Kuşadası, 16-22 Mayıs 1997.

97. Uzun Ö. Sistemik etkili antifungal ilaçlar. Ed: Akalın E, Klinik Uygulamada Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar. pp. 273-298, Güneş Kitabevi, Ankara, Türkiye, 1994.

98. Wingard JR. Infections due to resistant *Candida* species in patients with cancer who are receiving chemotherapy. *Clinical Infectious Diseases*. 1994;19(1):49-53.

99. Odds FC, Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*. 2003 Jun;11(6):272-279.

100. Arıkan S. Antifungal ajanlar. Ed: Başustaoğlu AC, Klinik Mikrobiyoloji. pp. 1949-1960, Atlas Kitabevi, Ankara, Türkiye, 2009.

101. İnci R. Antifungal ilaçlar, Ed: Ustaçelebi Ş, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. pp. 1115-1158, Güneş Kitabevi, Ankara, Türkiye, 1999.

102. Akins RA. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2005;43(4):285-318.

103. Arıkan S, Rex JH. Resistance to antifungal agents. Ed: Merz WG, Hay RJ, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections Medical Mycology 10th Ed. pp. 198-181, ASM Pres. Washington DC, USA, 2005.

104. Klepser ME. *Candida* resistance and its clinical relevance. *Pharmacother* 2006;26(6):68-75.
105. Yücesoy M. *Candida* türlerinde antifungal direnç mekanizmaları. 4. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s.46-58. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Konya, 3-6 Mayıs 2005.
106. Kalkancı A. Yeni antifungaller ve direnç mekanizmaları. 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s.272-284. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, Bodrum, 27-30 Mayıs 2003.
107. Onyewu C, Blankenship JR, Del Poeta M, Heitman J. Ergosterol biosynthesis inhibitors become fungicidal when combined with calcineurin inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(3):956-964.
108. Kayaalp O. Antifungal antibiyotikler ve diğer antifungal ilaçlar. Ed: Kayaalp O, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. pp. 293-302, Feryal Matbaası, Ankara, Türkiye, 1998.
109. Pfaller MA, Diekema DJ, International Fungal Surveillance Participant Group. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin. Microbiol. Infect*. 2004;10(Ek 1):11-23.
110. Panizo MM, Reviakina V, Dolande M, Selgrad S. *Candida* spp. in vitro susceptibility profile to four antifungal agents: resistance surveillance study in Venezuelan strains. *Medical Mycology*. 2009;47(2):137-143.
111. Kebudi R. Yeni antifungaller. *Ankem Dergisi*. 2007;21(Ek 2):210-215.
112. Giri S, Kindo AJ. A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian J Med Microbiol* 2012;30(3):270-278.
113. Özcan SK, Mutlu B, DüNDAR D, Willke A. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* spp. suşlarının antifungal ilaçlara karşı duyarlılıklarının

belirlenmesinde buyyon mikrodilüsyon ile e-test yöntemlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul. 2010;44(2):263-271.

114. Pfaller MA, Andes D, Arendrup MC, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Alexander BD, Brown SD, Chaturvedi V, Fowler CL, Ghannoum MA, Johnson EM, Knapp CC, Motyl MR, Ostrosky-Zeichner L, Walsh TJ. Clinical breakpoints for voriconazole and *Candida* spp. revisited: review of microbiologic, molecular, pharmacodynamic, and clinical data as they pertain to the development of species-specific interpretive criteria. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;70(3):330-343.

115. Arıkan S. *Candida* infeksiyonlarının tedavisinde duyarlılık testlerinin önemi. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu Bildiri Kitabı, s. 161-167. *Candida* Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu, Eskişehir, 21-22 Haziran 2002.

116. Erdal MS, Özhan G, Mat MC, Özsoy Y, Güngör S. Colloidal nanocarriers for the enhanced cutaneous delivery of naftifine: characterization studies and in vitro and in vivo evaluations. Int J Nanomedicine. 2016;11:1027-1037.

117. Arıkan S, Sancak B, Haşçelik G. In vitro activity of capsosfungin compared to amphotericin B, fluconazole, and itraconazole against *Candida* strains isolated in a Turkish University Hospital. Med Mycol. 2005;43(2):171-178.

118. Metin DY. Ekinokandinler ve yeni azoller. İnfeksiyon Dergisi. 2007;21:185-187.

119. Hector RF, Zimmer BL, Pappagianis D. Evaluation of nikkomycins X and Z in murine models of coccidioidomycosis, histoplasmosis, and blastomycosis. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34(4):587-593.

120. Nix DE, Swezey RR, Hector R, Galgiani JN. Pharmacokinetics of nikkomycin Z after single rising oral doses. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(6):2517-2521.



121. Brun YF, Dennis CG, Greco WR, Bernacki RJ, Pera PJ, Bushey JJ, Youn RC, White DB, Segal BH.. Modeling the combination of amphotericin b, micafungin, and nikkomycin z against *Aspergillus fumigatus* in vitro using a novel response surface paradigm. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(5):1804-1812.
122. Tully TP, Bergum JS, Schwarz SR, Durand SC, Howell JM, Patel RN, Cino PM. Improvement of sordarin production through process optimization: combining traditional approaches with DOE. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2007;34(3):193-202.
123. Serrano-Wu MH, St Laurent DR, Mazzucco CE, Stickle TM, Barrett JF, Vyas DM, Balasubramanian BN. Oxime derivatives of sordaricin as potent antifungal agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2002;12(6):943-946.
124. Basilio A, Justice M, Harris G, Bills G, Collado J, de la Cruz M, Diez MT, Hernandez P, Liberator P, Nielsen kahn J, Pelaez F, Platas G, Schmatz D, Shastry M, Tormo JR, Andersen GR, Vicente F. The discovery of moriniafungin, a novel sordarin derivative produced by *Morinia pestalozzioides*. *Bioorg Med Chem.* 2006;14(2):560-566.
125. Herreros E, Martinez CM, Almela MJ, Marriott MS, De Las Heras FG, Gargallo-Viola D. Sordarins: in vitro activities of new antifungal derivatives against pathogenic yeasts, *Pneumocystis carinii*, and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(11):2863-2869.
126. Vicente MF, Basilio A, Cabello A, Pelaez F. Microbial natural products as a source of antifungals. *Clin Microbiol Infect.* 2003;9(1):15-32.
127. Cuenca-Estrella M, Mellado E, Diaz-Guerra TM, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. Azasordarins: susceptibility of fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant clinical isolates of *Candida* spp. to GW 471558. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(6):1905-1907.
128. Serrano-Wu MH, Laurent DR, Carroll TM, Dodier M, Gao Q, Gill P, Quesnelle C, Marinier A, Mazzucco CE, Regueiro-Ren A, Stickle TM, Wu D,

Yang H, Yang Z, Zheng M, Zoeckler ME, Vyas DM, Balasubramanian BN. Identification of a broad-spectrum azasordarin with improved pharmacokinetic properties. *Bioorg Med Chem Lett*. 2003;13(8):1419-1423.

129. Petraitis V, Petraitiene R, Kelaher AM, Sarafandi AA, Sein T, Mickiene D, Bacher J, Groll AH, Walsh TJ. Efficacy of PLD-118, a novel inhibitor of *Candida* isoleucyl-tRNA synthetase, against experimental oropharyngeal and esophageal candidiasis caused by fluconazole-resistant *C. albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(10):3959-3967.

130. Yeates C. Icofungipen (PLIVA). *Curr Opin Investig Drugs*. 2005;6(8):838-844.

131. Petraitiene R, Petraitis V, Kelaher AM, Sarafandi AA, Mickiene D, Groll AH, Sein T, Bacher J, Walsh TJ. Efficacy, plasma pharmacokinetics, and safety of icofungipen, an inhibitor of *Candida* isoleucyl-tRNA synthetase, in treatment of experimental disseminated candidiasis in persistently neutropenic rabbits. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(5):2084-2092.

132. Çerikçioğlu N. Antifungal duyarlılık testleri. 7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Bildiri Kitabı, s. 93-104. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, İstanbul, 13-15 Nisan 2006.

133. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved Standard-3rd Ed Document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.

134. Hospenthal DR, Murray CK, Rinaldi MG. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;48(3):153-160.

135. Espinel A. Duyarlılık Test Yöntemleri: Mayalar ve Küfler. Ed: Başustaoğlu AC, Klinik Mikrobiyoloji. pp. 1972-1986. Atlas Kitabevi, Ankara, Türkiye, 2009.

136. Zobell C, Anderson DQ, Smith WW. The bacteriostatic and bactericidal action of great salt lake water. *J Bacteriol.* 1937;33(3):253-262.
137. Jones HC, Roth IL, Sanders WM. Electron microscopic study of a slime layer. *J. Bacteriol.* 1969;99(1):316-325.
138. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284(5418):1318-1322.
139. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl Bacteriol.* 1993;75(6):499-511.
140. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Inf Disease.* 2002;8(9):881-890.
141. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-193.
142. Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;12(3):185-190.
143. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 1995;49:711-745.
144. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):999-1007.
145. Zhang LH. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci.* 2003;8(5):238-244.
146. Bothwell MR, Smith AL, Phillips T. Recalcitrant otorrhea due to *Pseudomonas* biofilm. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129(5):599-601.
147. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharites: a strong and sticky framework. *Microbiology.* 2001;147(1):3-9.

148. Stickler D. Biofilms. *Curr Op in Microbiol.* 1999; 2(3): 270-275.
149. Leriche V, Sibille P, Carpenter B. Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(5):1851-1856.
150. Allison DG, Ruiz B, SanJose C, Jaspe A, Gilbert P. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;167(2):179-184.
151. Hussain M, Wilcox MH, White PJ. The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *Microbiol Rev.* 1993; 10(3-4): 191-207.
152. Vuong C, Otto M. *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb Infect.* 2002;4(4):481-489.
153. Salwiczek M, Qu Y, Gardiner J, Strugnell RA, Lithgow T, McLean KM, Thissen H. Emerging rules for effective antimicrobial coatings. *Trends Biotechnol.* 2014;32(2):82-90.
154. Şahin R. *Staphylococcus aureus* suşlarında biyofilm üretimi, biyofilm pozitif ve negatif suşların genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi, Denizli 2007.
155. Wright KJ, Seed PC, Hultgren SJ. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell Microbiol.* 2007;9(9):2230–2241.
156. Romanova IuM, Gintsburg AL. Bacterial biofilms as a natural form of existence of bacteria in environment and host organism. *Zh Mikrobiol Epidemiol Ğmmunobiol.* 2011;3:99-109.
157. Stewart PS. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol.* 2003;185(5):1485-1491.

158. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissue. *Ann Rev Microbiol.* 1994;48:585-617.
159. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):847-867.
160. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:49-79.
161. Jefferson KK, Pier DB, Goldmann DA, Pier GB. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2004;186(8):2449-2456.
162. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 1998;280(5361):295-298.
163. Holland SP, Mathias RG, Morck DW, Chiu J, Slade SG. Diffuse lamellar keratitis related to endotoxins released from steriliser reservoir biofilms. *Ophthalmology.* 2000;107(7):1227-1233.
164. Rioufol C, Devys C, Meunier G, Perraud M, Goulet D. Quantitative determination of endotoxins released by bacterial biofilms. *J Hosp Infect.* 1999;43(3):203-209.
165. Vincent FC, Tibi AR, Darbord JC. A bacterial biofilm in a hemodialysis system. Assessment of disinfection and crossing of endotoxin. *ASAIO Trans.* 1989;35(3):310-313.
166. Meluleni GJ, Grout M, Evans DJ, Pier GB. Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoïd exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. *J Immunol.* 1995;155(4):2029-2038.

167. Shiau AL, Wu CL. The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. *Microbiol Immunol.* 1998;42(1):33-40.
168. Ward KH, Olson ME, Lam K, Costerton JW. Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. *J Med Microbiol.* 1992;36(6):406-413.
169. Yasuda H, Ajiki Y, Aoyama J, Yokota T. Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in-vitro bacterial biofilm models. *J Med Microbiol.* 1994;41(5):359-367.
170. Hausner M, Wuertz S. High Rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(8):3710- 3713.
171. Roberts AP, Pratten J, Wilson M, Mullany P. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397, in a model oral biofilm. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;177(1):63-66.
172. Labbate M, Qeck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M, Kjelleberg S. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol.* 2004;186(3):692-698.
173. Lynch MJ, Swift S, Kirke DF, Keevil CW, Dodd CE, Williams P. The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ Microbiol.* 2002;4(1):18-28.
174. Saraçlı MA. "Quorum sensing": Mikro-organizmalar iletişim mi kuruyor? *Gülhane Tıp Derg.* 2006;48(4):244-250.
175. Sakuragi Y, Kolter R. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacterio.* 2007;189(14):5383-5386.
176. Altun HU, Şener B. Biyofilm enfeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Derg.* 2008;39:82-88.

177. Hogan DA. Talking to Themselves: Autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryot Cell* 2006;5(4):613-619.
178. Cengiz SA, Us E, Cengiz AT. Slime faktörünün klinikteki yeri ve önemi. *İnönü Üni Tıp Fak Derg.* 2006;13(3):193-197.
179. Pace JL, Rupp ME, Finch RG. Biofilms, Infection and Antimicrobial Therapy. Ed: Hawser S, Islam K, *Candida*. pp.171-84. Taylor and Francis Group, Florida, USA, 2006.
180. Kojie EM, Darouiche RO. *Candida* infections of medical devices. *Clin. Microbiol Rev.* 2004;17(2):255-267.
181. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In-vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arc Oral Biol.* 2007;52(8):761-767.
182. Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by *Candida* Species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immu.* 1994;62(3):3915-3921.
183. Parahitiyawa NB, Samaranayake YH, Samaranayake LP, Ye J, Tsang PW, Cheung BP, Yau JY, Yeung SK. Interspecies variation in *Candida* biofilm formation studied using the Calgary biofilm device. *APMIS.* 2006;114(4):298-306.
184. Nikawa H, Hamada T, Yamamoto T, Kumagai H. Effects of salivary or serum pellicles on the *Candida albicans* growth and biofilm formation on soft lining materials in vitro. *J Oral Rehabil.* 1997;24(8):594-604.
185. Baillie GS, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(8):1900-1905.
186. Al-Fattani MA, Douglas LJ. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *J Med Microbiol.* 2005;55(8):999-1008.

187. Hawser SP, Douglas LJ. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(9):2128-2131.
188. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Meiller TF. Fungal biofilms and drug resistance. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(1):14-19.
189. Baillie GS, Douglas LJ. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilm. *J Med Microbiol.* 1999;48(7):671-679.
190. Mukherjee PK, Chandra J, Kuhn DM, Ghannoum MA. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun.* 2003;71(8):4333-4340.
191. Garcia-Sanchez S, Aubert S, Iraqui I, Janbon G, Ghigo JM, d'Enfert C. *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot Cell.* 2004;3(2):536-545.
192. Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and characterization of an in-vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun.* 2004;72(10):6023-6031.
193. LaFleur MD, Kumamoto CA, Lewis K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(11):3839-3846.
194. Pantanella F, Valenti P, Frioni A, Natalizi T. Biotimer assay, a new method for counting *Staphylococcus* spp. in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm. *J Microbiol Methods.* 2008;75(3):478-484.
195. Kaynak Onurdağ F, Özgen S, Abbasoğlu U, Gürcan İS. *Candida* türlerinin biyofilm oluşturan ve planktonik formlarının antifungal ajanlara karşı in vitro duyarlılıklarının araştırılmasında iki farklı yöntemin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44(4):619-631.



196. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* 1999;37(6):1771-1776.
197. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res.* 2002;66(2):86-92.
198. Altun A, Vardar A, Altun BU. Melatonin and the cardiovascular system. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2001;1(4):283-288.
199. Reiter RJ. The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev.* 1980;1(2):109-131.
200. Brzezinski A: Melatonin in humans. *N Engl J Med.* 1997;336(3):186-195.
201. Sugden D, Chong NW. Pharmacological identity of 2-[125i]iodomelatonin binding sites in chicken brain and sheep pars tuberalis. *Brain Res.* 1991;539(1):151-154.
202. Underwood H. The pineal and melatonin: Regulators of circadian function in lower vertebrates. *Experientia.* 1990;46(1):120-128.
203. Vijayalaxmi, Thomas CR, Jr., Reiter RJ, Herman TS. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *J Clin Oncol.* 2002;20(10):2575-2601.
204. Malhotra S, Sawhney G, Pandhi P. The therapeutic potential of melatonin: a review of the science. *MedGenMed.* 2004;6(2):46.
205. Rogerio F, de Souza Queiroz L, Teixeira SA, Oliveira AL, de Nucci G, Langone F. Neuroprotective action of melatonin on neonatal rat motoneurons after sciatic nerve transection. *Brain Res.* 2002;926(1-2):33-41.
206. Acuna-Castroviejo D, Escames G, Macias M, Munoz Hoyos A, Molina Carballo A, Arauzo M, Montes R. Cell protective role of melatonin in the brain. *J Pineal Res.* 1995;19(2):57-63.

207. Cardinali DP, Vacas MI. Cellular and molecular mechanisms controlling melatonin release by mammalian pineal glands. *Cell Mol Neurobiol.* 1987;7(4):323-337.
208. Sirotkin AV, Schaeffer HJ. Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. *J Endocrinol.* 1997;154(1):1-5.
209. Atik B, Erkutlu I, Tercan M, Buyukhatipoglu H, Bekerecioglu M, Pence S. The effects of exogenous melatonin on peripheral nerve regeneration and collagen formation in rats. *J Surg Res.* 2011;166(2):330-336.
210. Turgut M, Kaplan S, Unal BZ, Bozkurt M, Yuruker S, Yenisey C, Sahin B, Uyanıkgil Y, Baka M. Stereological analysis of sciatic nerve in chickens following neonatal pinealectomy: an experimental study. *J Brachial Plex Peripher Nerve Inj.* 2010;5:10.
211. Ozler M, Simsek K, Ozkan C, Akgul EO, Topal T, Oter S, Korkmaz A. Comparison of the effect of topical and systemic melatonin administration on delayed wound healing in rats that underwent pinealectomy. *Scand J Clin Lab Invest.* 2010;70(6):447-452.
212. Laste G, de Macedo IC, Ripoll Rozisky J, Ribeiro da Silva F, Caumo W, Torres IL. Melatonin administration reduces inflammatory pain in rats. *J Pain Res.* 2012;5:359-362.
213. Vidor LP, Torres IL, de Souza IC, Fregni F, Caumo W. Analgesic and sedative effects of melatonin in temporomandibular disorders: a double-blind, randomized, parallelgroup, placebo-controlled study. *J Pain Symptom Manage.* 2013;46(3):422-432.
214. Klatz R, Goldman R Stopping the clock: Dramatic breakthroughs in anti-aging and age reversal techniques 2nd Ed. pp. 1-416. Random House Publishing Group, New York, USA, 1997.

215. Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci.* 1994;55(24):455-460.
216. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res.* 1997;29(8):363-372.
217. Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic Biol Med.* 1996;21(3):307-315.
218. Boga JA, Coto-Montes A, Rosales-Corral SA, Tan D, Reiter RJ. Beneficial actions of melatonin in the management of viral infections: a new use for this “molecular handyman?” *Rev Med Virol.* 2012;22(5):323-338.
219. Maestroni GJM. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Exp Opin Invest Drugs.* 2001;10(3):467-476.
220. Garcia-Mauriño S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Rafii-El-Idrissi M, Sanchez-Margalet V, Goberna R, Guerrero JM. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. *J Immunol.* 1997;159(2):574-581.
221. Garcia-Mauriño S, Pozo D, Calvo JR, Guerrero JM. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J Pineal Res.* 2000;29(3):129-137.
222. Park SJ, Tokura H. Bright light exposure during the daytime affects circadian rhythms of urinary melatonin and salivary immunoglobulin A. *Chronobiol Int.* 1999;16(3):359-371.
223. Currier NL, Sun LZ, Miller SC. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non specific immunity. *J Neuroimmunol.* 2000;104(2):101-108.

224. Vermuelen M, Palermo M, Giordano M. Neonatal pinealectomy impairs murine antibody dependent cellular cytotoxicity. *J Neuroimmunol.* 1993;43(1-2):97-102.
225. Shirinzadeh H, Yılmaz AD, Yücel N, Altanlar N, Suzen S, Ozden S. Antimicrobial activity of indole-based melatonin analogues. *BMC Proc.* 2012;6(4):27.
226. Terron MP, Cubero J, Barriga C, Ortega E, Rodriguez AB. Phagocytosis of *Candida albicans* and superoxide anion levels in ring dove (*Streptopelia risoria*) heterophils: effect of melatonin. *J of Neuroendocrinology.* 2003;15:1111-1115.
227. Yang HP, Tsangb PC, Tsangc PW. Melatonin inhibits biofilm formation in *Candida parapsilosis*. *J Mycol Med.* 2014;24(4):360-361.
228. Konar VV, Yılmaz Ö, Öztürk AI, Kirbağ S, Arslan M. Antimicrobial and biological effects of bomphos and phomphos on bacterial and yeast cells. *Bioorg Chem.* 2000;28(4):214-225.
229. Jasim TM, Alabbassi MG, Almuqdadi SFH, Kamel JK. Anti-bacterial properties of melatonin against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Iraqi J Pharm Sci.* 2010;19(2):59-63.
230. Tekbas OF, Ogur R, Korkmaz A, Kilic A, Reiter RJ. Melatonin as an antibiotic: new insights into the actions of this ubiquitous molecule. *J Pineal Res.* 2008;44(2):222-226.
231. Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, Cordaro S, Corona G, Trimarchi G, Barberi I. Effects of melatonin treatment in septic newborns. *Pediatr Res.* 2001; 50(6):756–760.
232. Valenza, G, Strasen J, Schäfer F, Frosch M, Kurzai O, Abele-Horn M. Evaluation of new colorimetric Vitek 2 yeast identification card by use of different source media. *J Clin Microbiol.* 2008;46(11): 3784-3787.

233. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Mahdouani K, Bakhrouf A. A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New Microbiologica*. 2010;33(2):137-145.
234. Saran B, Karahan ZC, Ağırbaşlı H, Tekeli A, Aksoy AM. Comparison of different primers used for the genotyping of *Candida albicans* clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA method. *Mikrobiyol Bul*. 2008;42(4):645-654.
235. Trick W. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis*. 2002;35(5):627-630.
236. Pullukçu H. Kandidemi. *Bamçag Bülteni*. 2011;2:1-7.
237. Ener B. İn vitro antifungal duyarlılık testleri: standardizasyon ve klinik önemi. *Mikrobiyol Bul*. 1996;30(4):419-425.
238. 232. Özekinci T, Akpolat N, Mete M, Atmaca S. *Candida* türlerinin in vitro hemolitik aktivitesi. *İnfeksiyon Derg*. 2007;21(4):201-203.
239. Johnson E, Espinel-Ingroff A, Szekelya A, Hockeyc H, Troked P. Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;32(6):511-514.
240. Diekema DJ, Messer SA, Hollis RJ, Boyken L, Tendolkar S, Kroeger J, Jones RN, Pfaller MA. A global evaluation of voriconazole activity tested against recent clinical isolates of *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;63(2):233-236.
241. Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, Yavuz T, Kaya D, Koc AN. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Jpn J Infect Dis*. 2007;60(5):280-283.

242. Çıkman A, Parlak M, Ceylan MR, Gdcoğlu H, Berkaş M. Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan kandidaların tr dağılımı ve antifungal direnci. Van Tıp Derg. 2014;21(1):1-5.
243. Temiz H, Temiz S, Kaya ř. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen kandida türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. Okmeydanı Tıp Derg. 2015;31(1):13-17.
244. Hazırolan G, Yıldırın D, Baran I, Mumcuoğlu İ, Aksu N. Yatan hasta örneklerinden izole edilen *Candida* izolatlarının tür dağılımlarının ve antifungal duyarlılık profillerinin değerlendirilmesi. Turk Hij Den Biyol Derg. 2015;72(1):17-26.
245. Çekin Y, Pekintrk N, Çekin AH. Evaluation of species distribution and antifungal resistance of *Candida* isolates from hospitalized patients. J Clin Anal Med. 2015;6(1):8-11.
246. Tmer S. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi, şanlıurfa 2011.
247. Kaçmaz B, Sipahi AB, Aksoy A. *Candida* türlerinin tanımlanmasında "API ID 32C" ve "RAPID YEAST PLUS" sistemlerinin karşılaştırılması. ANKEM Derg. 2006;20(4):214-216.
248. Lovero G, De Giglio O, Montagna O, Diella G, Divenuto F, Lopuzzo M, Rutigliano S, Laforgia N, Caggiano G, Montagna MT. Epidemiology of candidemia in neonatal intensive care units: a persistent public health problem. Ann Ig. 2016;28(4):282-287.
249. Khatib R, Johnson LB, Fakih MG, Riederer K, Briski L. Current trends in candidemia and species distribution among adults: *Candida glabrata* surpasses *C. albicans* in diabetic patients and abdominal sources. Mycoses. 2016;12:1-6.

250. Kim GY, Jeon JS, Kim JK. Isolation frequency characteristics of *Candida* species from clinical specimens. *Mycobiology*. 2016;44(2):99-104.
251. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Rice C, Tendolkar S, Diekema DJ. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;48(3):201-205.
252. Pfaller MA, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Comparison of results of voriconazole disk diffusion testing for *Candida* species with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *J Clin Microbiol*. 2005;43(10):5208-5213.
253. Çalışkan E, Dede A, Biten Güven G. Kan kültürlerinde saptanan *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *ANKEM Derg*. 2013;27(1):25-30.
254. Atalay MA, Sav H, Demir G, Koç AN. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı ve amfoterisin b ve flukonazole in vitro duyarlılıkları. *Selçuk Tıp Derg*. 2012;28(3):149-151.
255. Aydemir G, Koç AN, Atalay MA. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin tanımlanmasında peptid nükleik asit floresan in situ hibridizasyon (PNA FISH) yönteminin değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2016;50(2):293-299.
256. Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, Yaman A. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımının ve antifungal duyarlılıklarının retrospektif olarak değerlendirilmesi. *ANKEM Derg*. 2015;29(3):105-113.
257. Doğan Kaya S, Partal M, Tellioğlu GD. Klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarında tür tayini ve antifungal direncinin araştırılması. 25. Ankem Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi Bildiri Kitabı, s.12. Ankem

Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti, 28 Nisan-02 Mayıs 2010.

258. Yildirim M, Sahin I, Kucukbayrak A, Ozdemir D, Tefvik Yavuz M, Oksuz S, Cakir S. Hand carriage of *Candida* species and risk factors in hospital personnel. *Mycoses*. 2007;50(3):189-192.

259. Yildirim M, Sahin I, Oksuz S, Sencan I, Kucukbayrak A, Cakir S, Ozaydin C. Hand carriage of *Candida* occurs at lesser rates in hospital personnel who use antimicrobial hand disinfectant. *Scand J Infect Dis*. 2014;46(9):633-636.

260. Sutcu M, Salman N, Akturk H, Dalgıç N, Turel O, Kuzdan C, Kadayifci EK, Sener D, Karbuş A, Erturan Z, Somer A. Epidemiologic and microbiologic evaluation of nosocomial infections associated with *Candida* spp. in children: A multicenter study from Istanbul, Turkey. *Am J Infect Control*. 2016;6553(16):1-5.

261. Gökahmetoğlu G, Mutlu Sarıgüzel F, Koç AN, Behret O, Gökahmetoğlu S, Atalay MA, Elmalı F, Darçın K. Anestezi yoğun bakım ünitesinde yatan hastalarda *Candida* kolonizasyonu ve *Candida* skorunun belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2016;50(3):438-448.

262. Yang L, Su MQ, Ma YY, Xin YJ, Han RB, Zhang R, Wen J, Hao XK. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and ERG11 mutations of *Candida* species isolated from pregnant Chinese Han women. *Genet Mol Res*. 2016;15(2):1-8.

263. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, Suh SP, Ryang DW. Biofilm production by *Candida* species recovered from nonneutropenic patients. comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol*. 2002;40(4):1244-1248.

264. Goel S, Mittal S. Role of non albicans *Candida* spp. and biofilm in neonatal intensive care unit. *Infect Disord Drug Targets*. 2016;16(3):25-30.



265. Tumbarello M, Posteraro B, Treccarichi EM, Fiori B, Rossi M, Porta R, de Gaetano Donati G, La Sorda M, Spanu T, Fadda G, Cauda R, Sanguinetti M. biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. J Clin Microbiol. 2007;45(6):1843-1850.
266. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol. 1994;32(2):452-456.
267. Yücesoy M, Karaman M. *Candida* türlerinin biyofilm üretimi ve antifungal duyarlılık paternleri. Mikrobiyol Bul. 2004;38(1-2):91-98.
268. Gökçe G, Çerikçioğlu N, Yağcı A. acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. Mycopathologia. 2007;164(6):265-269.
269. Demirbilek M, Timurkaynak F, Can F, Azap Ö, Arslan H. Hastane kaynaklı *Candida* türlerinde biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılık paternleri. Mikrobiyol Bul. 2007;41(2):261-269.
270. Aslan H, Gülmez D. Üriner *Candida* izolatlarının biyofilm yapabilme özelliğinin üriner kateter kullanımı ile ilişkisinin araştırılması ve biyofilm varlığında antifungal duyarlılık durumunun değişimi. Mikrobiyol Bul. 2016;50(2):256-265.
271. Dolapçı İ, Tekeli A. Çeşitli *Candida* türlerinde slime faktörü yapımının araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2002;36(3-4):323-328.
272. Özperçin D. Klinik örneklerden soyutlanan *Candida* türlerinde biyofilm oluşumu ve bazı antifungallere duyarlılıklarının incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Tezi, İstanbul 2011.

273. Kuzucu Ç, Çizmeçi Z, Durmaz B. *Candida* türlerinde biyofilm ve fosfolipaz aktivitesinin saptanması. Türk Hij Den Biyol Derg. 2003;60(3):73-76.
274. Yıldırım M, Mumcuoğlu İ, Kurşun Ş, Koldaş K, Yetener V, Balaban N. İnfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Candida albicans* ve non-albicans *Candida* suşlarındaki bazı virulans faktörlerinin karşılaştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2009;39(3-4):62-68.
275. Hilmioğlu S, İlkit M, Çavuşoğlu C, Aydemir Ş, Tümbay E. *Candida* kökenlerinde slaym (slime) üretiminin üç ayrı yöntemle gösterilmesi ve slaym üretiminin kristal viyole reaksiyonu ile ilişkisi. İnfeksiyon Derg. 1999;13:183-186.
276. Arslan U, Fındık D. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virulans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in-vitro araştırılması. İnfeksiyon Derg. 2003;17(4):471-481.
277. Pittet D, Li N, Woolson RF, Wenzel RP. Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial blood-stream infections: a 6 year validated, population-based model. Clin Infect Dis. 1997;24(6):1068-1078.
278. Kuştimur S. Mayaların antifungal duyarlılık testleri. 3. Antimikrobiyal Kemoterapi Günleri Bildiri Kitabı, s.118-121. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Kuşadası, 16-22 Mayıs 1997.
279. Yuluğ N. Antifungal duyarlılık testlerinde standardizasyon girişimleri. 27. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, s. 126-127. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, 7-10 Mayıs 1996.
280. Rautemaa R, Richardson M, Pfaller MA, Perheentupa J, Saxén H. Activity of amphotericin B, anidulafungin, caspofungin, micafungin, posaconazole, and voriconazole against *Candida albicans* with decreased susceptibility to fluconazole from APECED patients on long-term azole treatment of chronic mucocutaneous candidiasis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62(2):182-185.

281. Godoy P, Tiraboschi IN, Severo LC, Bustamante B, Calvo B, Almeida LP, Matta DA, Colombo AL. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(3):401-405.
282. Rubio MC, de Ocariz IR, Gil J, Benito R, Rezusta A. Potential fungicidal effect of voriconazole against *Candida* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2005;25(3):264-267.
283. Swinne D, Watelle M, Nolard N. In vitro activities of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against non *Candida albicans* yeast isolates. *Rev Iberoam Micol*. 2005;22(1):24-28.
284. Szabó Z, Szilágyi J, Tavanti A, Kardos G, Rozgonyi F, Bayeganb S, Majoros L. In vitro efficacy of 5 antifungal agents against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* as determined by time–kill methodology. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;64(3):283-288.
285. Hollanbaugh JL. *Candida* species variability as seen through clinical covariates and drug susceptibility testing. University of Iowa, Pharmacy in the Graduate College PhD thesis, Iowa 2010.
286. Mitchell M, Hudspeth M, Wright A. Flow cytometry susceptibility testing for the antifungal caspofungin. *J Clin Microbiol*. 2005;43(6):2586-2589.
287. Kumar D, Banerjee T, Chakravarty J, Singh SK, Dwivedi A, Tilak R. Identification, antifungal resistance profile, in vitro biofilm formation and ultrastructural characteristics of *Candida* species isolated from diabetic foot patients in Northern India. *Indian J Med Microbiol*. 2016;34(3):308-314.
288. Kurt Ö, Kurt H, Bayar B, Memikoğlu K, Azap A, Tekeli E. Typing and antifungal susceptibility testing of *Candida* strains isolated from the blood cultures of candidemia patients. 12th European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases Abstract Book, s.103. European Congress of Clinical Microbiology and Infection Diseases, Milan, 24-27 April 2002.

289. Karabıçak N, Alem N. *Candida* türlerinin triazol antifungal duyarlılık profilleri: antifungal direncin belirlenmesinde yeni CLSI türe özgü klinik direnç sınır değerleri ve epidemiyolojik eşik değerlerinin uygulanması. *Mikrobiyol Bul* 2016;50(1):122-132.
290. Arıkan S. Antifungal duyarlılık testlerinin klinik önemi. 6. Febril Nötropeni Simpozyumu Bildiri Kitabı, s.49-51. Febril Nötropeni Simpozyumu, Ankara, 24-27 Şubat 2005.
291. Arıkan S. Haşçelik G, Günalp A. Hacettepe Üniversite Hastanesi'nde klinik örneklerden izole edilen maya türleri. *İnfeksiyon Derg* 1998;121:97-102.
292. Toprak NÜ, Erdoğan S, Çelik C, Johansson C. Kan kültürlerinden soyutlanan *Candida* suşlarının amfoterisin b ve flukonazole in vitro duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2003;33:252-256.
293. Karakoç E, Yazgı H, Aktaş AE, Uyanık MH. Çeşitli *Candida* türlerinin iki farklı triazole duyarlılıklarının mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılması. *Eurasian J Med.* 2007;39:173-177.
294. Melo AS, Bizerra FC, Freymüller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol.* 2011;49(3):253-262.
295. Shuford JA, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. In-vitro characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical *Candida albicans* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;57(3):277-281.
296. Choi HW, Shin JH, Jung SI, Park KH, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Species-specific differences in the susceptibilities of biofilms formed by *Candida* bloodstream isolates to echinocandin antifungals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1520-1523.

297. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin b lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(6):1773-1780.
298. Cremer KD, Lanckacker E, Cools TL, Bax M, Brucker KD, Cos P, Cammue BP, Thevissen K. Artemisinins, new miconazole potentiators resulting in increased activity against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(1):421-426.
299. Pemmaraju SC, Pruthi PA, Prasad R, Pruthi V. *Candida albicans* biofilm inhibition by synergistic action of terpenes and fluconazole. *Indian J Exp Biol.* 2013;51(11):1032-1037.
300. Ahmad A, Wei Y, Syed F, Tahir K, Taj R, Khan AU, Hameed MU, Yuan Q. Amphotericin b-conjugated biogenic silver nanoparticles as an innovative strategy for fungal infections. *Microb Pathog.* 2016;99:271-281.
301. Rhew ZI, Han Y. Synergic effect of combination of glycyrol and fluconazole against experimental cutaneous candidiasis due to *Candida albicans*. *Arch Pharm Res.* 2016;29:1-8.
302. Mandras N, Nostro A, Roana J, Scalas D, Banche G, Ghisetti V, Del Re S, Fucale G, Cuffini AM, Tullio V. Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against *Candida albicans* and non-albicans *Candida*. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16(1):330-336.
303. Thibane VS, Kock JL, Van Wyk PW, Ells R, Pohl CH. Stearidonic acid acts in synergism with amphotericin b in inhibiting *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* biofilms in vitro. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;40(3):284-285.
304. Kumar SN, Aravind SR, Sreelekha TT, Jacob J, Kumar BS. Asarones from *Acorus calamus* in combination with azoles and amphotericin b: a novel synergistic combination to compete against human pathogenic *Candida* species in vitro. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015;175(8):3683-3695.

305. Kılıç A, Saraçlı MA, Özyurt M, Saygun I, Başustaoğlu AC. Ağız çalkalama sularının (gargara) in vitro antifungal aktiviteleri. Türk Hij Den Biyol Derg. 2001;58(3):81-86.

