ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAĞDAT– IRAK'TA VAJİNAL CANDİDASİSDE İZOLE EDİLEN CANDİDA ALBİCANS İZOLATLARININ BAZI VİRÜLANSLI GENLERİNİN TÜM GENOM SEKANSLAMA YÖNTEMİNE DAYALI KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK ANALİZİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Rafal Abdulhadi Kadhim AL-NASSER

BİOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Rafal Abdulhadi Kadhim AL-NASSER tarafından hazırlanan **"Bağdat – Irak'ta Vajinal Candidasisde İzole Edilen Candida Albicans İzolatlarının Bazı Virülanslı Genlerinin Tüm Genom Sekanslama Yöntemine Dayalı Karşılaştırmalı Genomik Analizi Üzerine Araştırmalar"** adlı tez çalışması 31/01/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi İlker ŞİMŞEK

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ahmed Ali MHAWESH

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof Dr. Oğuz KUL
Kırıkkale Üviversitesi Veteriner Fakültesi
Patoloji ABD Başkanı

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İlker ŞİMŞEK (Danışman)
Çankırı Karatekin Üniversitesi
Eldivan SHMYO Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Çankırı Karatekin Üniversitesi
Eldivan SHMYO Veterinerlik Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Bağdat – Irak'ta Vajinal Candidasisde İzole Edilen Candida Albicans İzolatlarının Bazı Virülanslı Genlerinin Tüm Genom Sekanslama Yöntemine Dayalı Karşılaştırmalı Genomik Analizi Üzerine Araştırmalar**" konulu tezin bana ait özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (31/01/2022).

Rafal Abdulhadi Kadhim AL-NASSER

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAĞDAT– IRAK'TA VAJİNAL CANDİDASISDE İZOLE EDİLEN CANDİDA ALBİCANS İZOLATLARININ BAZI VİRÜLANSLI GENLERİNİN TÜM GENOM SEKANSLAMA YÖNTEMİNE DAYALI KARŞILAŞTIRMALI GENOMİK ANALİZİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Rafal Abdulhadi Kadhim AL-NASSER

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İlker ŞİMŞEK
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ahmed Ali MHAWESH

Bu çalışma, Irak'ta kadınlarda vulvovajinite neden olan en büyük etken olan patojen *C. albicans*'ın prevalansını araştırmayı amaçlamıştır. Bunun için moleküler epidemiyolojik bir çalışma yapılmıştır. Çalışma, Irak'taki dış kliniklerden ve İmam Hüseyin Eğitim Hastanesi'den, 7/12/2020-3/5/2021 tarihleri arasında, vulvovajinit hastası farklı yaşlardaki elli kadını kapsamaktadır. Elli vajinal örnekten ikisi, seçici diferansiyel Candida besiyeri yani HiChromAgar üzerinde farklı kolonyal morfolojilerine göre *C. albicans*'ın varlığını gösterdi. Ek olarak, bu iki suşun ışık mikroskobu altında incelenmesi, Candida spp.'nin tipik morfolojik özelliklerini ortaya çıkardı. Gram boyama kullanarak HiChromAgar üzerinde *C. albicans* olarak varsayılan tanımlamaya sahip iki açık yeşil koloninin, VITEK®2 sisteminin sonuçlarına göre *C. albicans* olduğu kanıtlanmıştır. Araştırma kapsamındaki quest *C. albicans* suşlarının moleküler tanımlaması, *C. albicans*'ı albicans olmayan Candida spp.'den ayıran 175 bp'lik farklı bir bant boyutuna sahip CAL5 ve NL4CAL adlı spesifik bir *C. albicans* primer seti kullanılarak doğrulandı. Şüpheli iki suş, *C. albicans* suşu Vag-1 ve *C. albicans* suşu Vag-2 olarak belirlendi. Moleküler epidemiyoloji açısından, iki *C. albicans* suşu Vag-1 ve Vag-2, MLST (Multilokus sekans tiplendirme) yaklaşımı kullanılarak bir suş düzeyinde tiplendi. PubMLST veri tabanında yayınlanan şema, korunan housekeeping genlerini kodlayan yedi konsensüs lokusu kullanıldı: AAT1a, ACC1, SYA1, MP1b, ZWF1b, VPS13 ve ADP1. İki şüpheli *C. albicans* suşunun MLST tiplemesinin sonuçları, iki yeni *C. albicans* suşunun var olma olasılığını ortaya çıkarabilir.

2021, 104 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Candida albicans, Tüm genom sekanslama, Genomik analiz

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATIONS IN TO WHOLE-GENOME SEQUENCE BASED COMPARATIVE GENOMIC ANALYSIS OF SOME VIRULENCE-ASSOCIATED GENES OF CANDIDA ALBICANS ISOLATES FROM VAGINAL CANDIDASIS IN BAGHDAD-IRAQ

Rafal Abdulhadi Kadhim AL-NASSER

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Asst. Prof. Dr. İlker ŞİMŞEK
Co-Advisor: Asst. Prof. Ahmed Ali MHAWESH

This work aimed to study the prevalence of the pathogen *C. albicans*, the most causative agent of vulvovaginitis in women, among female patients suffering from vulvovaginitis in Iraq. To answer this question, a molecular epidemiological study was conducted. The study encompassed fifty women of different ages suffering from vulvovaginitis, collected from external clinics, Imam Hussein Theaching hospital, Iraq from 7/12/2020, to 3/5/2021. Two out of fifty vaginal samples showed the presence of *C. albicans* according to their distinct colonial morphology on the selective differential Candida medium namely HiChromAgar. Additionally, the examination of these two strains under light microscope did reveal the typical morphological features of Candida spp. using Gram-stain. The two light green colonies of with presumptive identification as *C. albicans* on HiChromAgar was proved to be *C. albicans* based on the results of VITEK®2 system. The molecular identification of the quest *C. albicans* strains under study was further confirmed using a specific *C. albicans* primer set namely CAL5 and NL4CAL with a distinct band size of 175 bp discriminating *C. albicans* from non-albicans Candida spp. The two questionable strains were designated as *C. albicans* strain Vag-1 and *C. albicans* strain Vag-2. From the molecular epidemiology point of view, the two *C. albicans* strains Vag-1 and Vag-2 were typed on a strain level using the approach namely MLST (Multilocus Sequence Typing). The scheme published in the PubMLST database was employed using a seven consensus loci encoding for conserved house-keeping genes namely: AAT1a, ACC1, SYA1, MP1b, ZWF1b, VPS13, and ADP1. The results of MLST typing of the two questionable *C. albicans* strains might reveal the likely of the presence of two novel *C. albicans* strains.

2021, 104 page

Keywords: Candida albicans, Whole genome sequencing, Genomic analysis

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Babamın desteği, günlerimin ışığı ve ilim arayışında rol modelim, hayatımın her aşamasında bana destek olan, hayatımın tüm zorluklarına göğüs geren, kalbimin saadeti anneme ve en değerli insanlara. Çalışmanın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, her türlü yardımını esirgemeyen, her zaman destekleyen, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım, büyük bir anlayış gösteren ve hiç kırmayan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi İlker ŞİMŞEK ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmed Ali MHAWESH'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Rafal Abdulhadi Kadhim AL-NASSER

Çankırı, Ocak 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. CANDİDA ALBİCANS **3**
2.1 Genel Bilgiler **3**
2.2 Patojenite ve Virülans Faktörleri **4**
2.2.1 Polimorfizm **5**
2.2.2 Adezyon ve hücre istilası **6**
2.2.3 Temas algılama ve tigmotropizm **8**
2.2.4 Hidrolaz salgılaması **9**
2.2.5 pH algılama ve düzenleme **10**
2.2.6 Metabolik adaptasyon **11**
2.2.7 Çevresel stres tepkisi **13**
2.2.8 Isı şok proteinleri **15**
2.3 Biyofilm Oluşumu ve Genetik Özellikleri **17**
2.3.1 Biyofilm oluşumu **18**
2.3.2 Biyofilm oluşumunun genetiği **21**
2.3.3 Biyofilm oluşumu ve antibiyotik direnci **25**
3. MALZEME VE YÖNTEM **27**
3.1 Materyaller **27**
3.1.1 Ekipman ve aletler **27**
3.1.2 Kimyasallar **27**
3.1.3 Kitler **28**
3.1.4 Kültür ortamı **30**
3.1.5 Antibiyotik diskleri **30**

3.1.6 Konular **30**
3.2 Yöntemler **31**
3.2.1 Bilgilendirilmiş onay **31**
3.2.2 Numunelerin toplanması **31**
3.2.3 Toplanan klinik örneklerden patojen candida türlerinin izolasyonu **31**
3.2.4 Klinik örneklerden candida albicans tanımlama şeması **32**
3.2.5 Tanılama ortamının hazırlanması **32**
3.2.6 Gram boyama **33**
3.2.7 VITEK®2 sistemi **34**
3.2.8 Antifungal biyogram testleri **35**
3.2.9 Moleküler teknikler **36**
4. BULGULAR **43**
4.1 Vajinal Klinik Örneklerin Şüpheli Patojenleri **43**
4.2 Şüpheli Patojenin Candida Olarak Olası Tanımlaması **43**
4.3 Işık Mikroskobunda *C. albicans*'ın Morfolojik Özellikleri **45**
4.4 *C. albicans*'ın VITE K ®2 Sistemi İle Doğrulayıcı Tanımlaması **46**
4.5 Vajinal Numunenin Patojenik *C. albicans* Suşlarının Antibiyogramı **47**
4.6 *C. albicans* Patojenik Suşlarının Moleküler Tanımlanması **47**
4.7 *C. albican* Suşu Vag-1 ve *C. albicans* Suşu Vag-2 için MLST **48**
4.7.1 *C. albicans* vajinal suşlarının 7 lokus housekeeping genlerinin PCR amplifikasyonu **48**
4.7.2 *C. albicans* vajinal suşlarının 7 lokus housekeeping genlerinin nükleotid dizileri ve alel tayini **53**
4.7.3 *C. albicans* vajinal patojenik suşları için kombinasyon alelik profili: Vag-1 ve Vag-2 ..... **68**
4.7.4 *C. albicans* vajinal patojenik suşları için ST profilinin belirlenmesi: Vag-1 & Vag-2 ..... **68**
5. TARTIŞMA **72**
6. SONUÇ **79**
KAYNAKLAR **80**
EKLER **101**
ÖZGEÇMİŞ **104**

SİMGELER DİZİNİ

C. albicans	Candida albicans
Candida spp	Candida türleri
DNA	Deoksiribo nükleik asit
MLST	Multilokus sekans tiplendirme
NCAC	Candida albicans olmayan candida türleri
PCR	Polimeraz zincir reaksionu
R	Dayanıklı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
S	Duyarlı
ST	Sekans tipi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 Vajinal klinik örneklerden elde edilen maya kolonilerini gösteren SDA plakası 43
Şekil 4.2 Elli klinik vajinal örnekte *C. albicans*'ın dağılım sıklığı. Doldurulan alan: albicans olmayan Candida suşları (%96). Boş alan: *C. albicans* suşları (%4) 44
Şekil 4.3 Bu çalışmada vajinal klinik örnekten elde edilen *C. albicans*'ın farklı morfolojik özelliklerini gösteren HiCrome™ candida differential agar plakası 44
Şekil 4.4 Işık mikroskobu altında gram boyama ile boyanmış tipik *C. albicans* suşu. Fotoğraf, yağa daldırmalı merceğin altında çekilmiştir 45
Şekil 4.5 Tahmini olarak tanımlanmış iki *C. albicans* suşu için VITE K ®2 sistemi tarafından yürütülen biyokimyasal testlerin bir profili 46
Şekil 4.6 İki vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşunun genomik DNA'sından amplifiye edilen 175 bp'lik PCR ürünlerini gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA toplayıcı 48
Şekil 4.7 Quest iki patojenik vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan TTAa1 lokusunun PCR amplifikasyonunu gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA merdiveni 49
Şekil 4.8 Quest iki patojenik vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan ACC1 lokusunun PCR amplifikasyonunu gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA merdiveni 49
Şekil 4.9 Quest iki patojenik vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan ADP1 lokusunun PCR amplifikasyonunu gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA merdiveni 50
Şekil 4.10 Quest iki patojenik vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan lokus MPIb'nin PCR amplifikasyonunu gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA merdiveni 50
Şekil 4.11 Quest iki patojenik vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan SYA1 lokusunun PCR amplifikasyonunu gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA merdiveni 51
Şekil 4.12 Quest iki patojenik vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan VPS13 lokusunun PCR amplifikasyonunu gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA merdiveni 51
Şekil 4.13 Quest iki patojenik vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan ZWF1b lokusunun PCR amplifikasyonunu gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA merdiveni 52
Şekil 4.14 *C. albicans* suşlarının yazılması için PubMLST çevrimiçi sayfasının ekran görüntüsü 7 lokus housekeeping genleri için nükleotid dizileri ve *C. albicans* Vag-1 suşu için lokus alel 53

Şekil 4.15 *C. albicans* suşu Vag-1'in AAT1a sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğu için basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir ... 54
Şekil 4.16 *C. albicans* suşu Vag-1'in ACC1 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veri tabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğu için basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir ... 55
Şekil 4.17 *C. albicans* suşu Vag-1'in SYA1 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğu için basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir ... 56
Şekil 4.18 PubMLST veritabanı sunucusunda, *C. albicans* suşu Vag-1'in MPb1 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğu için basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir 57
Şekil 4.19 *C. albicans* suşu Vag-1'in ZWF1b sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğundan, basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir . 58
Şekil 4.20 *C. albicans* suşu Vag-1'in VPS13 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğu için basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir ... 59
Şekil 4.21 *C. albicans* suşu Vag-2'nin AAT1a sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğu için basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir ... 61
Şekil 4.22 *C. albicans* suşu Vag-2'nin ACC1 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğu için basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir ... 62
Şekil 4.23 PubMLST veritabanı sunucusunda, *C. albicans* suşu Vag-2'nin MPb1 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğundan, basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir . 63
Şekil 4.24 An alignment at the PubMLST database server between SYA1 query of *C. albicans* strain Vag-2 and the returned reference sequence is shown rather than a simple list of differences because there are gaps in the alignment.... 64
Şekil 4.25 *C. albicans* suşu Vag-2'nin ZWF1b sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğundan, basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir . 65
Şekil 4. 26 *C. albicans* suşu Vag-2'nin ADP1 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğundan, basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir . 66
Şekil 4. 27 *C. albicans* suşu Vag-2'nin VPS13 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğundan, basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir . 67
Şekil 4.28 Verilen *C. albicans* suşları için ST aramak için PubMLST çevrimiçi sayfasının ekran görüntüsü 69

Şekil 4.29 Vag-1 suşunun sorgu allelik kombinasyon profili için PubMLST veritabanını aramak için ST kayıtlarının bir çıktısı: 143 ST kaydından ilk 25 ST kaydı 70
Şekil 4.30 Vag-2 soyunun sorgu alelik kombinasyon profili için PubMLST veritabanını aramak için 24 ST kaydının çıktısı.....71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan ekipman ve alet 27
Çizelge 3.2 Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve reaktifler 28
Çizelge 3.3 Mikrobiyolojik kitler ve moleküler biyoloji kitleri 29
Çizelge 3.4 Bu çalışmada kullanılan kültür besiyeri 30
Çizelge 3. 5 Bu çalışmada kullanılan Antibiyotik Disklerin listesi 30
Çizelge 3.6 *C. albicans* MLST için gene özel primer dizisi, PCR tarifi, PCR koşulları ve 7 lokus (temizlik genleri) için PCR uzunluğu 40
Çizelge 4.1 Vajinal sürüntülerden izole edilen *C. albicans* suşu Vag-1 ve *C. albicans* suşu Vag-2 için antibiyotik duyarlılık profili 47

1. GİRİŞ

Candida albicans (C. albicans), yüksek mortalite oranları ile ilişkili olan fungemi ve yaygın kandidiyazis için önde gelen etiyolojik ajandır. Hastalık Kontrol Merkezi tarafından sağlanan istatistiklere göre, *C. albicans,* ABD'de hastanede yatan hastalar arasında kan dolaşımı enfeksiyonlarından en sık izole edilen üçüncü mikroorganizmadır. Bu ökaryotik mikrobun yüzeysel deri ve tırnak enfeksiyonlarından, oral ve vajinal kandidiyazise ve daha ciddi invaziv kandidemiye ve derin organ enfeksiyonlarına kadar sayısız enfeksiyonuna neden olması, kısmen virülans faktörlerinden ve morfolojisinden kaynaklanmaktadır. Diğer mantarların çoğundan farklı olarak, *C. albicans,* in vivo çevre ortamına veya in vitro kültür koşullarına bağlı olarak maya, psödohipal ve hifal formlarda bulunabilir.

Bu mantar, intravenöz kateterler, idrar sondaları, kalp pilleri ve biyolojik sıvılarda veya organlarla temas halinde olan diğer ekipmanlar ve tıbbi cihazlardaki biyofilmlerde büyüyebilir. İnvaziv kandidiyazisi tedavi eden klinisyenlerin karşılaştığı büyük bir sorun, *Candida sp.* tarafından sergilenen gelişmiş antifungal ilaç direncidir. Gerçekten de, *C. albicans* biyofilm hücrelerinin, planktonik, biyofilm olmayan hücrelerden 1000 kata kadar daha fazla ilaç direnci sergiledikleri birçok çalışmada rapor edilmiştir. Küresel olarak, tıbbi cihazla ilişkili kandidiyazisin etkisi, genellikle rutin antifungal tedavilere karşı dirençli olan bu enfeksiyonlara atfedilen yüksek mortalite ve morbidite oranları göz önüne alındığında inkar edilemez derecede ciddidir.

Candida türleri ve en baskın olarak *C. albicans,* kadınlarda vulvovajinal kandidiyazise (VVC) neden olan vajinal enfeksiyonların önde gelen nedenlerinden birinden sorumlu mantar patojenleridir (Sobel 1985). *C. albicans,* belirgin semptomları olmayan kadınların vajinal salgılarında yaygın olarak saptanmasına rağmen (Sobel 1988), mantar morfolojik geçişini ve ardından VVC ile ilişkili proinflamatuar immün aktivasyonu tetikleyen mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak enfeksiyon sırasında aktive olan fosfolipazlar ve proteolitik enzimler gibi bilinen virülans faktörleri iyi çalışılmıştır (Naglik *et al.* 2003, Schaller *et al.* 2003, Lian and Liu 2007, Sobel 1997). Tekrarlayan VVC'li kadınlardan elde edilen *C. albicans* izolatlarının uzunlamasına karyotiplenmesi,

Candida'nın vajinada kolonizasyonunun, genetik mikroevrim geçiren tek bir suşun kalıcılığını yansıttığını düşündürmektedir (Vazquez *et al.* 1994). Ancak, *C. albicans*'ın vajinal izolatları için tam genom dizilerini kullanan karşılaştırmalı genomik analizler şu anda eksiktir. VVC ile ilişkili fenotiplere katkıda bulunabileceğinden, kommensalizm ve/veya patojenite ile ilgili genlerdeki genetik varyasyonları araştırmak önemlidir. Broad Enstitüsü'nde 2014 yılında yürütülen bir araştırma, farklı anatomik bölgelerden 21 klinik *C. albicans* izolatının genetik ve fenotipik varyasyonunu araştırılmıştır (Hirakawa *et al.* 2015). Analizleri, *C. albicans*'ın genel durumu ve büyüme hızı üzerinde sonuçları olan anöploidi, heterozigotluk kaybı ve tek nükleotid polimorfizmi (SNP) dâhil olmak üzere çeşitli genetik varyasyon türlerini ortaya çıkardı. Bu izolatlardan ikisi vajinal sürüntülerden toplanmıştı ve bugüne kadar *C. albicans'*ın vajinal izolatları için yayınlanmış tek tam genom dizileridir. Vajinada bulunan *C. albicans'*taki genomik çeşitliliğin daha fazla araştırılması, VVC'nin gelişimini ve tedavisini etkileyebilecek altta yatan varyasyonu anlamamız açısından önemlidir.

Konakçı dokuların insan mantar patojeni *C. albicans* tarafından işgal edilmesi, kandidiaz gelişimi için önemli bir etkendir. Bununla birlikte *C. albicans* suşlarının tümü aynı invaziv ve virülans özelliklerine sahip değildir (Thewes *et al.* 2012). Bu nedenle, *C. albicans* kaynaklı enfeksiyonların, hastaların genetik özelliklerine göre ve coğrafi konumdaki bakteriel etkenlere göre farklılık gösterdiğini düşünmek mümkündür.

Bu çalışmada, Bağdat'taki hastalardan izole edilen *C. albicans* izolatlarının virülanslı genlerinin tüm genom sekanslama yöntemine dayalı karşılaştırmalı genomik analizi yapılmıştır. Gerçekleştirilen bir araştırma ile hem bölgeye özgü hem de her bir hastaya özgü deneysel verilerin sonuçları değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarının spesifik unsurlardan kaynaklı farklılıklar göstereceği değerlendirilmektedir. Bu nedenle çalışmamız, *C. albicans* kaynaklı enfeksiyonların hem Bağdat'ta hem de bu bölgedeki insanlar üzerinde hangi tür spesifik etkiler gösterdiği ve ne gibi özelleştirilmiş sonuçlara yol açtığını ortaya koymuştur.

2. CANDİDA ALBİCANS

2.1 Genel Bilgiler

C. albicans, insanların yaklaşık %65 – 75'inde gastrointestinal ve genitoüriner sistemlerinde, zararsız bir kommensal olarak bulunan bir mantar patojendir. *C. albicans,* hayli fırsatçı bir patojen olması nedeniyle kadınların yaklaşık %70 – 75'i yaşamları boyunca en az bir kez *C. albicans* kaynaklı bir enfeksiyon geçirmektedir. Bununla birlikte, genellikle bağışıklık sistemi zayıf hastalar ve kimi zaman sağlıklı insanlar için dahi *C. albicans*, fırsatçı patojen olarak enfeksiyona neden olmaktadır (Ruhnke and Maschmeyer 2002, Meiller *et al.* 2009, Schulze and Sonnenborn 2009, Sobel 1997).

C. albicans kaynaklı enfeksiyonlar genellikle kandidiyaz olarak adlandırılmaktadır. Kandidiyaz terimi *C. albicans* kaynaklı tüm enfeksiyonlar için kullanılan genel bir addır. Hastalığın ciddiyetine ve şiddetine göre kandidiyaz ikiye ayrılmaktadır. İlki, mukozal enfeksiyonlar ve bu mukozal enfeksiyonlar arasında en iyi bilineni, enfekte olmuş zarlarda beyaz lekeler ile karakterize olan pamukçuktur. Bu tür enfeksiyonlar genellikle, gastrointestinal epitel hücrelerini, vajinal veya orofaringeal mukozayı etkilemektedir. Ayrıca, Vulvo Vajinal Kandidiyaz (VVK), kadınlar arasında oldukça yaygındır ve bazı durumlarda, Tekrarlayan Vulvu Vajinal Kandidiyaz (TVKK) olarak bilinen bu enfeksiyonun tekrar tekrar nüksettiği vakalar görülmektedir. Bununla birlikte, ölüm oranının yaklaşık %30 olduğu ağır hastalık durumlarında, yaşamsal tehdit arz eden sistemik enfeksiyonlar söz konusu olmaktadır (Soll *et al.* 1988, Sexton *et al.* 2007). Sistemik Candida enfeksiyonları, HIV ile enfekte olmuş hastalar, organ nakli gerçekleştirilmiş hastalar, kemoterapi hastaları ve doğum ağırlığı normalin artında olan bebekler gibi bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda yaygın olarak görülmektedir (Pfaller and Diekema 2007, Schelenz 2008). Candida mantarının, *C. albicans* dışında türleri de vardır ve bu farklı türlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde hasta vücudu söz konusu farklı mantar türlerinden tamamen arındırılsa da, *C. albicans,* günümüzde halen mantara neden olan başlıca bulaşıcı mantar türü olmaya devam etmektedir (Gozalbo *et al.* 2004).

Günümüze sağlık sisteminin gelişmesi ile birlikte insanların yaş ortalaması da artış göstermektedir. Yaşlı nüfusun artması ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların sayısının önemli ölçüde artması ile birlikte bakteriyel enfeksiyonlar ve mantar hastalıklarından tedavisi sürdürülen hastaların sayısında da artış kaydedilmektedir. Öyle ki Candida türleri, kan dolaşımı ve kardiyovasküler enfeksiyon nedenleri arasında ilk dört etken arasında yer almaktadır (Gudlaugsson *et al.* 2003). Candida'nın neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarında mortalite oranı %50'ye kadar ulaşmaktadır (Gudlaugsson *et al.* 2003, Eggimann *et al.* 2003, Wey *et al.* 1988). Yeni doğan bakım ünitelerinde, Candida kaynaklı kan dolaşım enfeksiyonlarının daha sık olduğu bildirilmektedir (Patel and Saiman 2010).

C. albicans üzerine yapılan araştırmalar 1980'lerin başında hız kazanmış olmasına karşın, *C. albicans'*ın genetik ve moleküler biyolojik bağlamda ele alınmasının başlangıcı ise 1996 yılından sonrasına dayanmaktadır. Öyle ki, bu patojenin genom dizilimi ilk kez 1996 yılında incelenmiş ve 2004 yılında *C. albicans'*ın genom dizisi tamamlanmıştır (Jones *et al.* 2004). Dolayısıyla, göreceli olarak ele alındığında *C. albincans* henüz yeni bir araştırma alanıdır.

C. albicans izolatlarının genomik analizi ile ilgili olarak yapılan araştırmaların temelini bu patojenin bazı özellikleri oluşturmaktadır. Bu nedenle bu patojenin başta virülans faktörleri olmak üzere bu özelliklerinin çok iyi anlaşılması gerekmektedir.

2.2 Patojenite ve Virülans Faktörleri

C. albicans'ın enfeksiyon oluşturma kapasitesi ve yeteneğinin en büyük ve en etkili nedenleri, bu patojenin sahip olduğu virülans faktörleridir. Maya ve hif gibi mantar formları arasındaki morfolojik geçişler, hücre yüzünde adezin ve invazinlerin ekspresyonu, tigmotropizm, biyofilm oluşumu, fenotipik değişim ve hidrolitik enzimlerin salgılanması da dahil olmak üzere çeşitli özellikler, bu patojenin virülans faktörleri arasında sayılabilmektedir. Bununla birlikte, *C. albicans'*ın uygunluk özelikleri, çevresel pH'taki dalgalanmalara hızlı adaptasyonu, metabolik esnekliği, güçlü besin toplama sistemlerini ve sağlam stres tepkilerini içermektedir (Nicholls *et al.* 2011).

2.2.1 Polimorfizm

C. albicans, septada daralma ile uzatılan elipsoid hücreler şeklinde ya da paralel duvarlı gerçek hif şeklinde olmak üzere, yumurtaya benzer şekillerde tomurcuklanan ve maya olarak büyüyen polimorfik bir mantardır (Berman 2012). Diğer gelişmiş mofolojiler arasında ise geçiş esnasında oluşan beyaz ve opak hücreler ile kalın ve duvarlı spor benzeri yapılar olan klamidosporların sayılması mümkündür (Sudbery *et al.* 2004). Maya ve gerçek hif, enfeksiyon sırasında düzenli olarak gözlenmekte ve farklı işlevlere sahipken, yalancı hifin rol, ve in vivo geçiş etkinliği hâlâ belirsizliğini korumaktadır. Ayrıca belirtmek gerekir ki, hasta numunelerinde klamidosporlar gözlenmemektedir (Staib and Morschhäuser 2007, Soll 2009).

*C. albicans'*ın morflojisi çeşitli dışsal ve çevresel etkenlerden etkilenmektedir. Örneğin, düşük pH değerinde *C. albicans* hücreleri ağırlıklı olarak maya formundayken yüksek pH değerlerinde hif büyümesinin indüklendiği gözlenmektedir. Aynı şekilde, açlık halinde, serum veya N-asetilglukozamin varlığında, fizyolojik sıcaklığın artması ve CO_2 varlığı gibi bir dizi koşul da hif oluşumunu teşvik etmektedir (Sudbery 2011). *C. albicans'ta* temel Quorum Algılama (Çekirdek / Çoğunluk Algılama – QS) molekülleri arasında farnesol, tirosol ve dodecanol bulunmaktadır (Hornby *et al.* 2001, Chen *et al.* 2004, Hall *et al.* 2011). QS nedeniyle hücre yoğunluklarında görülen artış hali maya büyümesini desteklerken, düşük hücre yoğunlukları hif oluşumunu teşvik etmektedir (Hall *et al.* 2011).

Maya ve hif formları arasındaki geçiş, dimorfizm olarak adlandırılmakta ve her iki büyüme formunun da patojenite için önemli olduğu öne sürülmektedir (Jacobsen *et al.* 2012). Hif formunun maya formuna göre daha istilacı olduğu kanıtlanmıştır (Berman 2012). Öte yandan, daha küçük maya formlarının yayılma formunu temsil ettiğine inanılmaktadır (Saville *et al.* 2003). In vivo koşullar altında hif oluşturamayan mutantların, genellikle virülansı zayıflamaktadır. Bununla birlikte, hif oluşumu, hif oluşumunda yer almayan virülans faktörlerini kodlayan genlerin bir alt kümesinin ekspresyonu ile ilişkilidir (Lo *et al.* 1997). Bu tür hif ile ilişkili proteinler arasında hifal duvar proteini Hwp1, aglütinin benzeri sekans proteini Als3, salgılanan aspartik

proteazlar Sap4, Sap5 ve Sap6 ve hif bağlantılı proteinler Ece1 ve Hyrl yer almaktadır. Hif-spesifik G1 siklinle ilişkili bir proteini kodlayan HGC1'in silinmesi, normal olarak maya formunda büyüyen ancak hif üretemeyen hücrelerle sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte, hgc1Δ / Δ mutant hücreleri hala en az dört hif ile ilişkili geni (HWP1, ECE1, HYR1 ve ALS3) eksprese etmektedir (Zheng *et al.* 2004, Almeida *et al.* 2008). Yapılan bir çalışmada ulaşılan bir hgc1 Δ / Δ mutantının bir fare sistemik enfeksiyon modelinde zayıflatıldığı bulgusu, hif oluşumunun başlı başına önemli bir virülans faktörü olduğu görüşünü desteklemektedir (Zheng *et al.* 2004).

2.2.2 Adezyon ve hücre istilası

C. albicans, diğer *Candida* türlerine, diğer mikroorganizmalara, abiyotik yüzeylere ve konakçı hücrelere adhezyona aracılık eden özel bir proteine sahiptir. Bu proteinlere adezinler adı verilmektedir (Verstrepen and Klis 2006, Garcia *et al.* 2011). Yapılan çalışmalar genellikle belirli adezinleri öne çıkarmaktadır ve bu adezinlerin en etkin türler olduğu düşünülmektedir. Söz konusu *C. albicans* adezinleri, ALS 1 – 7 ve ALS 9'dan oluşan toplam sekiz üyeli bir aile olan aglütinin benzeri sekans (ALS) moleküllerdir. ALS genleri, glikosilfosfatidilinositol (GPI) bağlı hücre yüzeyi glikoproteinlerini kodlamaktadır. Sekiz Als proteinden, hif bağlantılı adhezin Als3 özellikle yapışma için önemlidir (Phan *et al.* 2007, Murciano *et al.* 2012). ALS3 gen ekspresyonu, in vitro oral epitel hücrelerinin enfeksiyonu sırasında ve in vivo vajinal enfeksiyon sırasında yukarı yönlü regüle edilmektedir (Cheng *et al.* 2005, Zakikhany *et al.* 2007, Naglik *et al.* 2011, Wächtler *et al.* 2011). *C. albicans'ın* diğer bir önemli adezini, hif ile ilişkili GPI bağlantılı bir protein olan Hwp1'dir (Staab *et al.* 1999, Sundstrom *et al.* 2002). Hwp1, memeli transglütaminazlar için bir substrat görevi görmektedir ve bu reaksiyon, *C. albicans* hiflerini konakçı hücrelere kovalent olarak bağlamaktadır. Bir hwp1Δ / Δ mutantının, bukkal epitel hücrelerine daha az yapıştığı ve sistemik kandidiyazın bir fare modelinde zayıflatılmış virülans sergilediği ortaya konulmuştur (Staab *et al.* 1999, Sundstrom *et al.* 2002, Sundstrom 2002). Bununla birlikte belirtmek gerekir ki, Hwp 1 ve ALS 3'ün tamamlayıcı adezinler olarak hareket ettiği ve böylece biyofilm oluşumuna katkıda bulunduğu da kanıtlanmıştır (Nobile *et al.* 2008).

Morfolojiden bağımsız olan proteinlerin de adhezyona katkıda bulunabileceği gösterilmiştir. Bu proteinler arasında GPI bağlantılı proteinler (Eap 1, Iff 4 ve Ecm 3), kovalent olmayan duvarla ilişkili proteinler (Mp65, varsayılan bir β-glukanaz ve Phr1, bir β-1,3 glukanosil transferaz), hücre yüzeyiyle ilişkili proteazlar (Sap9 ve Sap10) ve integrin benzeri yüzey proteini Int 1 sayılabilmektedir (Zhu and Filler 2010, Naglik *et al.* 2011).

C. albicans, konakçı hücrelere girmek için iki farklı mekanizma kullanabildiği için dikkate değer bir patojendir. Bu iki farklı mekanizma; endositoz ve aktif penetrasyondur (Zakikhany *et al.* 2007, Zhu and Filler 2010, Dalle *et al.* 2010, Naglik *et al.* 2011). Mantar, indüklenmiş endositoz için, hücre yüzeyinde konakçı ligandlara (epitel hücrelerindeki E-kaderin (Phan *et al.* 2007) ve endotelyal hücrelerdeki N-kaderin (Phan *et al.* 2005) gibi) bağlanmaya aracılık eden özel proteinleri (invasinler) eksprese etmektedir. Böylece, mantar hücresinin konakçının hücrelerine tutunup onları yutmasını sağlamaktadır. Öyle ki, bu halde ölü hifler bile sürece dâhil olmakta, böylece indüklenmiş endositozun canlı mantar hücrelerinin aktivitelerini gerektirmeyen pasif bir süreç olduğu gösterilmektedir (Park *et al.* 2005, Dalle *et al.* 2010).

Bugüne dek biri aynı zamanda adezin olarak işlev gören Als 3 ve diğeri Ssa 1 olmak üzere iki invazin (istilacı) protein tanımlanmıştır (Phan *et al.* 2007, Sun *et al.* 2010). Ssa 1 ısı şoku proteini – 70 (Hsp 70) ailesinin hücre yüzeyinde eksprese edilen bir üyesidir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki hem als3Δ / hem de ssa1Δ / Δ mutantları, bir murin orofaringeal kandidiyaz modelinde epitelyal yapışma ve invazyonda azalma ve virülansta azalma sergilemiştir (Sun *et al.* 2010, Naglik *et al.* 2011). Als3 ve Ssa 1, konakçı E-kaderinine bağlanmakta ve muhtemelen klatrine bağlı bir mekanizma ile endositozu indüklemektedir; bununla birlikte, makropinositoz, *C. albicans'ın* endositoza neden olduğu da belirtilmektedir (Phan *et al.* 2007, Dalle *et al.* 2010). Ancak bunun aksine, aktif penetrasyon, mantar kaynaklı bir süreçtir ve canlı *C. albicans* hiflerinin varlığını gerektirmektedir (Dalle *et al.* 2010, Wächtler *et al.* 2011). Konakçı hücrelerinin bu ikinci yol ile istila edilmesine hangi faktörlerin aracılık ettiği tam olarak belli değildir. Mantar adhezyonunun ve fiziksel kuvvetlerin çok önemli olduğuna inanılmaktadır (Wächtler *et al.* 2011). Salgılanan aspartik proteazların (Saps) da aktif penetrasyona katkıda

bulunduğu ifade edilmektedir. Öte yandan, lipazlar ve fosfolipazların bu işleme katkıda bulunduğunu söylemek henüz mümkün görünmemektedir (Dalle *et al.* 2010, Naglik *et al.* 2011).

Özetle, konakçı hücrelerinin *C. albicans* tarafından istila edilmesi, iki olası tamamlayıcı mekanizmaya dayanmaktadır. Bunlardan biri, Als 3 ve Ssa 1 medyatörlüğünde gerçekleşen indüklenmiş endositoz ve diğeri de henüz tanımlanmamış moleküler mekanizmalar medyatörlüğünde gerçekleşen aktif penetrasyondur.

2.2.3 Temas algılama ve tigmotropizm

*C. albicans'*ta hif ve biyofilm oluşumunu tetikleyen önemli bir çevresel etken de temas algılamadır. Bir yüzeyle temas ettiğinde maya hücreleri, hif büyümesine geçiş yapmaktadır (Kumamoto 2008). Agar veya mukozal yüzeyler gibi belirli substratlarda, bu hifler daha sonra substratı istila edebilmektedir. Katı yüzeylerle temas da biyofilm oluşumuna neden olmaktadır (Kumamoto 2008). Belirli topolojilere sahip yüzeylerde yönlü hif büyümesi meydana gelebilmektedir. Bu duruma tigmotropizm adı verilmektedir (Brand *et al.* 2007).

Yapılan bir çalışmada, *C. albicans* hiflerinin tigmotropizminin, kalsiyum kanalları Cch1 ve Mid1 yoluyla gerçekleşen hücre dışı kalsiyum alımı ile düzenlendiği ortaya konulmuştur (Brand *et al.* 2007). Ek mekanizmalar, Rsr1 / Bud1-GTPaz modülünü içermektedir (Brand and Gow 2009). Ayrıca başka bir çalışmada, *C. albicans* tigmotropizminin farelerde epitel hücrelerinin tam hasarı ve normal virülans için gerekli olduğu kanıtlanmıştır (Brand *et al.* 2008). Bu nedenle, tigmotropizm, hem abiyotik (biyofilm oluşumu) hem de biyotik (istila) yüzeylere doğru algılama ve yanıt patojenite için önemlidir (Brand *et al.* 2008, Brand and Gow 2009).

2.2.4 Hidrolaz salgılaması

C. albicans, konakçının hücrelerine adezyonu ve hif büyümesini gerçekleştirdikten sonra, bu hifler, konakçı hücrelerine aktif penetrasyonu kolaylaştıran hidrolazları salgılayabilmektedir (Wächtler *et al.* 2012). Salgılanan bu hidrolazlar, hücre dışı besin alımının daha verimli bir şekilde gerçekleştirilmesini sağlamaktadır (Naglik *et al.* 2003). *C. albicans* üç farklı hidrolaz eksprese etmektedir. Bunlar; proteazlar, fosfolipazlar ve lipazlardır (Naglik *et al.* 2003, Wächtler *et al.* 2012).

C. albicans tarafından salgılanan aspartik protez (Saps) ailesi, Sap 1'den Sap 10'a kadar olan toplam on üye içermektedir. Sap 1 – Sap 8 çevreleyen ortama salgılanırken Sap 9 ve Sap 10 hücre yüzeyine bağlı kalmaktadır (Naglik *et al.* 2003, Taylor *et al.* 2005, Albrecht *et al.* 2006). Sap 1 – Sap 3'ün in vitro olarak yeniden oluşturulmuş insan epitelindeki (RHE) hasar için sistemik enfeksiyonun fare modelinde virülans için gerekli olduğu kanıtlanmıştır (Hube *et al.* 1997, Schaller *et al.* 1999). Bununla birlikte, Saps ailesi üyelerinin *C. albicans* patojenitesine göreceli katkısının tartışmalı olduğunu belirtmek mümkündür. Yakın zamanlı çalışmalarda elde edilen sonuçlar, Saps üyelerinin RHE'yi istila için gerekli olmadığını ve yaygın kandidiyazın fare modellerinde Sap 1 – 6'nın virülans için vazgeçilebilir olduğunu ortaya koymaktadır (Lermann and Morschhäuser 2008, Correia *et al.* 2010). Bununla birlikte, daha az patojenik olan diğer Candida türlerine kıyasla *C. albicans*'ta Sap kodlayan genlerin gözlenen genişlemesi, bu proteazların virülansta etkin bir rol oynadığını göstermektedir.

Fosfolipaz ailesi A, B, C ve D olmak üzere dört farklı sınıftan oluşmaktadır (Niewerth and Korting 2001). Yalnızca B sınıfının beş üyesi (PLB 1 – 5) hücre dışında etkindir ve konakçı membranlarının bozulması yoluyla patojeniteye katkıda bulunabilmektedir (Mavor *et al.* 2005). Hem plb1Δ / Δ hem de plb5Δ/ Δ mutantlarının, sistemik enfeksiyonun bir fare modelinde virülansta zayıfladığı gösterilmiştir (Leidich *et al.* 1998, Theiss *et al.* 2006).

Lipaz ailesi ise 10 üyeden (LIP 1 – 10) oluşmaktadır (Fu *et al.* 1997, Hube *et al.* 2000). Bir lip8Δ/Δ mutantının bir fare modelinde sistemik enfeksiyonu azalttığı gösterilmiştir

ki, bu çalışma, *C. albicans* patojenitesinde hücre dışı hidrolazların rolünü desteklemektedir (Gácser *et al.* 2007).

2.2.5 pH algılama ve düzenleme

İnsanlarda *C. albicans*, hafif alkalinden asidik olana kadar değişen bir pH değerine maruz kalmaktadır (Davis 2009). Ek olarak, konakçı nişe bağlı olarak, çevresel pH çok değişken, dinamik bir yapıda olabilmektedir. Bu nedenle, *C. albicans* pH'daki değişikliklere uyum sağlama yeteneği geliştirmiştir (Davis 2009). İnsan kanının ve dokularının pH'ı hafif alkalindir (pH 7,4), sindirim sisteminin pH'ı çok asidikten (pH 2) daha alkaliye (pH 8) kadar değişir ve vajinanın pH'ı pH 4 civarındadır (Davis 2009). Nötrden alkali pH'a kadar, pH'a duyarlı proteinlerin işlevinin bozulması ve bozulmuş besin alımının (bozulmuş bir proton gradyanının bir sonucu olarak) dâhil olduğu değişiklikler *C. albicans* için ciddi strese neden olabilmektedir (Davis 2009). Değişen pH'a adaptasyon için önemli olduğu belirlenen ilk proteinler arasında iki hücre duvarı-glikosidaz PHR1 ve Phr2 vardır (Fonzi 1999). PHR1, nötr-alkali pH'ta eksprese edilmektedir. Bunun aksine, PHR2 esas olarak asidik pH'ta eksprese edilmektedir. (Mühlschlegel and Fonzi 1997). Buna bağlı olarak, Phr1 sistemik enfeksiyonlar için gereklidir ve Phr2 vajina enfeksiyonları için gereklidir (De Bernardis *et al.* 1998).

C. albicans, Rim101 sinyal iletim yolağı aracılığıyla pH'ı algılamaktadır. Bu yolakta, çevresel pH, plazma membran reseptörleri Dfg16 ve Rim21 tarafından ölçülmektedir. (Davis 2009). Bu reseptörlerin aktivasyonu, bir sinyal kaskadının indüksiyonuna yol açmakta ve sonunda, proteolitik bölünmesi yoluyla majör pH'a duyarlı transkripsiyon faktörü Rim101'in aktivasyonuna yol açmaktadır. Rim101 daha sonra çekirdeğe girmekte ve pH'a bağlı tepkilere aracılık etmektedir (Davis 2009). Bir dfg16 Δ/Δ mutantı, sistemik kandidiyazın bir fare enfeksiyon modelinde azaltılmış virülansa sahip olarak gösterilmiştir (Thewes *et al.* 2007) ve bir rim20Δ / mutantı, bir fare kornea enfeksiyon modelinde virülansı azalmıştır (Mitchell *et al.* 2007, Cartwright *et al.* 2011). Son olarak, bir rim101Δ/Δ mutantının hem hematojen olarak yayılmış kandidiyazın sistemik bir fare modelinde (Davis *et al.* 2000) hem de bir fare orofaringeal kandidiyaz modelinde virülansı azalttığı gösterilmiştir (Nobile *et al.* 2008). Bu veriler birlikte, Rim101 yolağının

ve genel olarak pH algılamasının *C. albicans* virülansı için kritik olduğunu göstermektedir.

C. albicans sadece çevresel pH'ı algılamak ve ona uyum sağlamakla kalmaz, aynı zamanda hücre dışı pH'ı da modüle edebilmekte, besin açlığı altında çevreleyen ortamı aktif olarak alkalileştirebilmekte ve böylece hif oluşumunu otomatik olarak indükleyebilmektedir (Vylkova *et al.* 2011, Mayer *et al.* 2012). Bunun altında yatan moleküler mekanizmalar üzerine çalışmalar devam etmektedir ve glikoz yokluğunda amino asitlerin ve muhtemelen poliaminler gibi diğer amin içeren moleküllerin alımını içerdiği düşünülmektedir (Mayer *et al.* 2012). *C. albicans* daha sonra bu substratları hücre içi olarak üre amidoliaz Dur1,2 ile parçalamakta ve elde edilen amonyağı ATO proteinleri yoluyla ihraç hücre dışına atmaktadır. Amonyak ekstrüzyonu, hücre dışı ortamın alkalileşmesine yol açmakta ve bu da hifal morfogenezi teşvik etmektedir (Vylkova *et al.* 2011). İpliksi olmayan mutantlar virülansta zayıflatıldığı için yukarıda da belirtildiği üzere, hif oluşumunun kendisi, *C. albicans*'ın anahtar virülans faktörü olarak kabul edilebilmektedir (Lo *et al.* 1997). Böylelikle, *C. albicans* hücre dışı pH'ı algılamakta, adaptasyon sağlamakta ve aktif olarak modüle edebilmektedir. Tüm bu özellikler, *C. albicans*'ın kommensal olarak bir arada bulunma ve insanlarda bir mantar patojeni olarak hakim konumda olma kapasitesine katkıda bulunmaktadır (Vylkova *et al.* 2011, Mayer *et al.* 2012).

2.2.6 Metabolik adaptasyon

Beslenme, tüm canlı organizmaların hayatta kalması ve gelişmesi için temel bir ön koşuldur. Metabolik adaptasyon, alternatif besinlerin dinamik ortamlarda etkili bir şekilde asimilasyonuna aracılık etmektedir (Brown *et al.* 2011). Bu metabolik esneklik, farklı konak nişlerinin enfeksiyonu sırasında patojenik mantarlar için özellikle önemlidir (Brock 2009, Fleck *et al.* 2011). Glikoliz, glukoneogenez ve açlık tepkilerinin tümünün konakçı kolonizasyonuna ve patogeneze katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Ancak bunların katkıları oldukça spesifik olabilmektedir. Sağlıklı bireylerde *C. albicans*, ağırlıklı olarak gastrointestinal mikrobiyomun bir parçası olarak bulunmaktadır. Bu ortamdaki besin konsantrasyonu doğal olarak yüksek olabilse de, mantarın büyümesinin

bağırsak mikrobiyal florasının diğer üyeleriyle rekabet yoluyla kontrol edildiğine inanılmaktadır (Brock 2009). Duyarlı kişilerde yaygın kandidiyaz sırasında, *C. albicans* kan dolaşımına geçebilmektedir. Kan, çoğu mantarın tercih edilen besin kaynağı olan glikoz (6-8 mM) açısından nispeten zengindir (Brock 2009). Bununla birlikte, fagositik hücreler (makrofajlar ve nötrofiller) *C. albicans*'ı verimli bir şekilde fagosite edebilmektedir (Brock 2009). Ayrıca, bir makrofaj veya nötrofil içine girdikten sonra, beslenme ortamı mantar için tamamen değişmektedir. Fagosit sadece ROS, reaktif nitrojen türleri (RNS) ve antimikrobiyal peptidler (AMP'ler) gibi oldukça reaktif ara maddeler üretmekle kalmaz, aynı zamanda besin maddelerinin mevcudiyetini de kısıtlamaktadır (Frohner *et al.* 2009). Bu nedenle, *C. albicans'*ın böylesine zor bir konakçı ortama adaptasyonu için hızlı ve verimli metabolik plastisite gerekli olmaktadır. Makrofajların içinde mantar başlangıçta glikolizden glukoneogeneze ve açlık tepkisine (glioksilat döngüsünün aktivasyonu) geçmektedir. Lipidler ve amino asitlerin makrofajlar içinde besin kaynağı oldukları bildirilmektedir (Lorenz *et al.* 2004).

Metabolik esnekliğe ek olarak, mantar ayrıca antimikrobiyal efektörlerin üretimini engelleyerek ve hif oluşumunu indükleyerek makrofajlardan kaçmanın yollarını da geliştirmiştir. Fagositik hücrelerin içinde oluşan hif, konakçı bağışıklık hücresini mekanik kuvvetlerle delip kaçabilmektedir (Lorenz *et al.* 2004, Ghosh *et al.* 2009). Sistemik kandidiyaz sırasında, mantar hücreleri, her biri potansiyel olarak farklı besin maddelerine sahip olan insanların içindeki hemen hemen her organa yayılabilmektedir. Örneğin karaciğerde, *C. albicans*, glikozun ana depolama molekülü olan büyük miktarlarda glikojene erişebilmektedir. Ya da bir başka örnek olarak, beyin, potansiyel besin kaynakları olarak yüksek konsantrasyonlarda glikoz ve vitaminlere sahiptir (Fleck *et al.* 2011). Diğer dokularda, *C. albicans* nispeten zayıf glikoz konsantrasyonlarıyla karşı karşıyadır ve konakçı proteinleri, amino asitleri, lipitleri ve fosfolipitleri kullanmak için alternatif metabolik yollar kullanmaktadır. Mantar, konakçı proteinleri hidrolize etmek için salgılanan proteazları kullanabilmektedir. Yakın tarihte yapılan bilimsel çalışmalarla, *C. albicans*'ın farklı besin kaynaklarına adaptasyonunun sadece hayatta kalma ve büyümeyi desteklemekle kalmayıp aynı zamanda virülansı da etkilediği gösterilmiştir (Ene *et al.* 2012). Laktat veya amino asitler gibi alternatif karbon kaynakları üzerindeki büyüme, mantarı çevresel streslere karşı daha dirençli hale getirmekte ve hem sistemik

kandidiyazın bir fare modelinde hem de bir fare vajinal enfeksiyon modelinde virülans potansiyelini artırdığı gösterilmektedir (Ene *et al.* 2012). Ayrıca, glioksilat döngüsünün *C. albicans*'ta tam virülans için gerekli olduğu gösterilmiştir (Lorenz and Fink 2001). Amino asitlerin ve muhtemelen poliaminlerin alımı, hücre dışı alkalileştirme yoluyla mantarın hif oluşumunu otomatik olarak indüklemesine izin vererek *C. albicans*'ın virülansını etkilemektedir (Vylkova *et al.* 2011, Mayer *et al.* 2012).

Özetle, enfeksiyon sırasında *C. albicans* için ana besin kaynakları, anatomik nişe bağlı olarak muhtemelen konakçıdan türetilen glikoz, lipidler, proteinler ve amino asitler olacaktır. Bu farklı besinleri ayrı ayrı kullanabilmenin yanı sıra, *C. albicans*'ın mikro-çevresel besin bulunabilirliğindeki konakçı ve patojen kaynaklı değişikliklere hızlı ve dinamik olarak yanıt verme yeteneği, *C. albicans*'ın bir patojen olarak başarısına katkıda bulunmaktadır.

2.2.7 Çevresel stres tepkisi

Güçlü bir stres tepkisi, mantarın değişen koşullara adaptasyonunu kolaylaştırarak ve onu konakçı kaynaklı streslere karşı koruyarak *C. albicans*'ın hayatta kalmasına ve virülansına katkıda bulunmaktadır. Bağışıklık sisteminin fagositik hücreleri oksidatif ve nitrozatif stresler üretmektedir. Örneğin gastrointestinal ve ürogenital sistemde pH stresi meydana gelmektedir (Brown *et al.* 2011). Strese duyarlı düzenleyici yolakların yanı sıra aşağı akış (downstream) hedeflerinin sadece etkili stres adaptasyonu için değil, aynı zamanda mantarın tam virülansı için de gerekli olduğu gösterilmiştir (Brown *et al.* 2011). Aslında, stres tepkisi düzenleyicileri veya detoksifiye edici enzimleri kodlayan genlerden yoksun birkaç mutant ile yapılan çalışmada bunların virülansta zayıflatıldığı ortaya konulmuştur. Streslere hücresel yanıtlar arasında ısı şoku, ozmotik, oksidatif ve nitrozatif stres yanıtları sayılabilmektedir (Brown *et al.* 2011).

Isı şoku tepkisine, zararlı proteinin açılmasını ve toplanmasını önlemek için moleküler şaperonlar olarak hareket eden ısı şoku proteinleri medyatörlük etmektedir. Buna ek olarak, termal stres, açılma eğilimli proteinleri stabilize ederek *C. albicans*'ta bir kimyasal şaperon olarak hareket ettiği düşünülen trehaloz birikmesine yol açmaktadır (Brown *et*

al. 2011). Bununla birlikte, belirtmek gerekir ki termal saldırıların ardından trehaloz birikiminin tam işlevi bilinmemektedir.

Ozmotik stres tepkisi, dışa yönelik kimyasal gradyan nedeniyle su kaybını önlemek için uyumlu çözünen gliserolün hücre içi birikimiyle sonuçlanmaktadır. Gliserol biyosentezine gliserol 3-fosfataz Gpp1 ve gliserol 3-fosfat dehidrojenaz Gpd2 medyatörlük etmektedir (Wächtler *et al.* 2011). Hem gpp1Δ/ hem de gpd2Δ/ Δ mutantlarının in vitro olarak oral epitel hücrelerine zarar verme kapasitelerinin azaldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu muhtemelen, bu enfeksiyon modelinde ozmotik strese karşı artan duyarlılıktan ziyade, hifal turgor basıncı ve mekanik kuvvetler üretememe nedeniyle olduğu değerlendirilmektedir (Wächtler *et al.* 2011). Peroksit, süperoksit anyonları ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri (ROS) bir oksidatif stres tepkisine neden olmaktadır (Brown *et al.* 2011).

Katalaz Cta1 ve süperoksit dismutazlar, Sod1 ve Sod5, *C. albicans*'ta ROS'un etkili detoksifikasyonu için çok önemlidir ve sistemik kandidiyazın fare modellerinde tam virülans için gereklidir (Wysong *et al.* 1998, Hwang *et al.* 2002, Martchenko *et al.* 2004). Nötrofiller ayrıca, fagositozlu *C. albicans* hücrelerinde nitrozatif bir stres tepkisine neden olan reaktif nitrojen türleri (RNS) üretmektedir. RNS'nin detoksifikasyonunda rol oynayan ana protein, flavohemoglobin ile ilişkili protein Yhb1'dir. Yhb1'in delesyonu, *C. albicans* hücrelerini RNS'ye duyarlı hale getirmekte ve sistemik kandidiyazın bir fare modelinde virülansı azaltmaktadır (Hromatka *et al.* 2005).

Mantarlarda, stres sinyalleri de dâhil olmak üzere çevresel sinyaller algılanmakta ve ardışık fosforilasyon olayları aracılığıyla mitojenle aktive olan protein (MAP) kinaz yolları tarafından iletilmektedir (Monge *et al.* 2006). *C. albicans*'taki üç ana MAP kinaz sinyal yolağı, Mkc1-, Hog1- ve Cek1-MAP kinaz yolaklarıdır (Monge *et al.* 2006). Mkc1 (*C. albicans*'tan MAP kinaz) yolu, öncelikle hücresel bütünlüğün, hücre duvarı biyogenezinin, gömülü koşullar altında invazif büyümenin ve biyofilm oluşumunun korunmasında rol oynamaktadır (Monge *et al.* 2006). Mkc1, oksidatif ve ozmotik stres koşullarında aktive olmaktadır. Hog1 (Yüksek ozmolariteli gliserol yanıtı) yolu, ozmotik, oksidatif ve termal stres, morfogenez ve hücre duvarı oluşumuna yönelik yanıtta

medyatörlük etmektedir (Monge *et al.* 2006). Ozmotik stres altında, aktive edilmiş Hog1 gliserol birikimine yol açmaktadır (Monge *et al.* 2006). Cek1 (Candida ERK benzeri kinaz) yolağı, filamentasyona, çiftleşmeye ve muhtemelen termal strese adaptasyona medyatörlük etmektedir (Monge *et al.* 2006, Mayer *et al.* 2012). Her üç yolaktaki (mkc1Δ, hog1Δ veya cek1Δ) mutantların tümü, fare enfeksiyon modellerinde virülansta zayıflatılarak enfeksiyon sırasında stres tepkisinin önemini göstemektedir (Diez-Orejas *et al.* 1997, Csank *et al.* 1998, Alonso-Monge *et al.* 1999). Üç MAP kinaz yolağındaki ardışık aktivasyon kademesine ek olarak, çevresel sinyaller de bu yolaklar arasında çapraz karışmayı tetiklemektedir. Örneğin, etkinleştirilen Hog1 hem Cek1 yolunu baskılamakta hem de Mkc1 yolunu etkinleştirmektedir (Monge *et al.* 2006). Ayrıca, oksidatif veya ozmotik stres gibi bazı sinyaller birden fazla yolakla algılanmaktadır. Bu iç içe geçmiş MAP kinaz algılama ağı, muhtemelen sağlam bir uyarlanabilir yanıtın ince ayarını sağlamaktadır (Diez-Orejas *et al.* 1997, Alonso-Monge *et al.* 1999, Monge *et al.* 2006, Mayer *et al.* 2012).

2.2.8 Isı şok proteinleri

Isı şoku tepkisi, canlı organizmaların yüksek sıcaklık, açlık ve oksidatif stres gibi stresli koşullara karşı korunmuş bir reaksiyonudur (Lindquist and Craig 1988, Lindquist 1992). Bu tür stresler, proteinin açılmasına ve spesifik olmayan protein toplanmasına neden olarak sonuçta hücre ölümüne yol açabilmektedir. Bu zararlı sonucu önlemek için hücreler ısı şoku proteinleri (Hsps) üretmektedirler (Lindquist 1992). Bu özelleşmiş proteinler şaperonlar olarak hareket eder ve alıcılarına bağlanarak ve onları stabilize ederek proteinin açılmasını ve toplanmasını önlemektedirler (Richter *et al.* 2010). *C. albicans*'ta altı ana Hsps tanımlanmıştır, bunlar şu şekilde sıralanmaktadır: Hsp104, Hsp90, Hsp78, iki adet Hsp70 proteini (Ssa1 ve Ssa2) ve Hsp60.

HSP104, *Caenorhabditis elegans* enfeksiyon modelinde uygun biyofilm oluşumu ve virülans için gerekli bir Hsp'yi kodlamaktadır (Fiori *et al.* 2012).

Hsp90, *C. albicans*'ta majör bir Hsp'dir ve ilaç direncini, morfogenezi, biyofilm oluşumunu ve virülansı düzenlemektedir (Cowen *et al.* 2009, Shapiro *et al.* 2009, Singh *et al.* 2009, LaFayette *et al.* 2010, Robbins *et al.* 2011).

HSP78, makrofajlar tarafından fagositoza yanıt olarak transkripsiyonel olarak yukarı yönlü regüle edilen karakterize edilmemiş bir Hsp'yi kodlamaktadır (Lorenz *et al.* 2004)

İki *C. albicans* Hsp70 ailesi üyesi, Ssa1 ve Ssa2 (stres-70 alt ailesi A), hücre yüzeyinde eksprese edilir ve antimikrobiyal peptitler için reseptörler olarak işlev görmektedir. Örneğin, Ssa2 histatin 5'i bağlamaktadır (Li *et al.* 2003, Li *et al.* 2006, Sun *et al.* 2008).

Bir ssa2Δ/ Δ mutantı, histatin 5'e karşı artan dirence sahip olduğu, ancak yaygın ve orofaringeal kandidiyazın fare modellerinde virülans için vazgeçilebilir olduğu tanımlanmıştır (Li *et al.* 2003, Sun *et al.* 2008, Sun *et al.* 2010). Ssa1 ayrıca bir invasin görevi görmektedir (Sun *et al.* 2010). Hem yaygın hem de orofaringeal kandidiyazın fare modellerinde ssa1Δ/ Δ mutantının zayıflatılmış virülansa sahip olduğu gösterilmiştir (Sun *et al.* 2010).

Son olarak, HSP60, işlevi bilinmeyen, varsayılan bir mitokondriyal Hsp'yi kodlamaktadır. Bir hsp60Δ/ HSP60 heterozigot mutantı, yüksek sıcaklıklara karşı artan duyarlılığa sahiptir. Bu da Hsp60'ın termal stres toleransı için gerekli olabileceğini göstermektedir (Leach *et al.* 2011).

Hsps'nin ekspresyonu esas olarak transkripsiyon faktörü ısı şoku faktörü 1 (Hsf1) tarafından kontrol edilmektedir (Sorger and Pelham 1987, Sorger and Pelham 1988). Hsf1, ısı stresine yanıt olarak fosforile edilmekte ve promotörlerinde ısı şok elemanlarına (HSE'ler) bağlanarak Hsp kodlayan genlerin transkripsiyonunu indüklemektedir (Sorger and Pelham 1988). *C. albicans* Hsf1, canlılık için gereklidir ve Hsf1'i aktive edemeyen bir mutant, sistemik kandidiyazın bir fare modelinde zayıflatılmış virülans göstermektedir (Nicholls *et al.* 2011).

Yukarıda belirtilen ısı şoku proteinlerine ek olarak, *C. albicans*'ta altı küçük Hsps (sHsps) de tanımlanmıştır (Inglis *et al.* 2012). sHsps, protein agregasyonunu önleyen düşük moleküler kütleli şaperonlardır (Haslbeck *et al.* 1999, Narberhaus 2002).

Isı veya diğer stres formları üzerine hücreler, bir oligomerik durumdan multimerik bir duruma geçiş yapan ve kümelenmiş proteinleri bağlayan sHSP'leri eksprese etmektedir (Eyles and Gierasch 2010). Bu şaperon-kümelenmiş komplekslerde, alıcı proteinleri Hsp104 gibi diğer büyük Hsps tarafından ayrıştırma ve yeniden katlanma için hazır tutulmaktadır (Cashikar *et al.* 2005).

*C. albicans'*ın altı sHsps kodladığı tahmin edilmektedir. Bunlar şu şekilde sıralanabilmektedir: Hsp31, Hsp30, Hsp21, iki Hsp12 proteini ve Hsp10 (Inglis *et al.* 2012).

Henüz sadece Hsp12 ve Hsp21'in incelendiği bilinmektedir (Fu *et al.* 2012). Hsp12, ısı şoku ve oksidatif stres gibi farklı streslere yanıt olarak eksprese edilmektedir. Her iki HSP12 geninin delesyonunun, bir Drosophila enfeksiyon modelinde *C. albicans*'ın virülansını etkilemediği gösterilmiştir (Fu *et al.* 2012).

2.3 Biyofilm Oluşumu ve Genetik Özellikleri

C. albicans'ın virülans faktörleri ve patojenitesi ile ilgili olarak en önemli unsur, biyofilm oluşumudur. Bu nedenle biyofilm oluşumunun incelenmesi en sona bırakılmıştır. Öyle ki, yukarıda sayılan bütün faktörlerin bir bakıma biyofilm oluşumuna katkı sağladığını ifade etmek mümkün görünmektedir.

Aslen bir virülans faktörü olmasına karşın, biyofilm oluşumunu bir üst düzey başlık halinde incelememizin nedeni bu faktörün *C. albicans*'ın inceleyeceğimiz genom dizilimi ile de yakından ilgisi olmasıdır.

Biyofilmler, çok sayıda mikroorganizmanın baskın bir büyüme durumunu ifade etmektedir. Son yıllarda oldukça popüler bir araştırma konusu haline gelen biyofilmin tanımı kısaca şu şekilde yapılabilmektedir: Biyofilm, en genel anlamıyla, serbest bir şekilde yüzen (planktonik), hücrelerden meydana gelen ve her bir hücrenin farklı özelliklere sahip olduğu yapışık hücreler topluluğudur (Kolter and Greenberg 2006, Kolter 2010, Lopez *et al.* 2010). Biyofilmler genellikle katı yüzeylere yapışsalar da sıvı, hava arayüzleri gibi farklı yüzeylerde ve ortamlarda da oluşabilmektedirler. Serbest emsallerine kıyasla biyofilmlerin en temel farkı, biyofilm hücrelerinin kimyasal ve fiziksel etkilere karşı daha yüksek direnç göstermesidir (Costerton *et al.* 1987, Costerton *et al.* 1999). Günümüzde, tüm mikrobiyal enfeksiyonların yaklaşık %75'inden daha fazlasında biyofilm oluşumunun gözlendiği ifade edilmektedir (Fox and Nobile 2012).

2.3.1 Biyofilm oluşumu

C. albicans'ın genel özelliklerinde belirttiğimiz üzere, *C. albicans*, hücre dışı bir matris içine yerleştirilmiş çeşitli morfolojilere sahiptir. Bunlar yuvarlak tomurcuklanan maya formundaki hücreler, oval yapılı yumurta benzeri yalancı hif hücreleri ve uzunlamasına silindirik gerçek hif hücreleridir. *C. albicans*, bu hücreler sayesinde yüksek yapılı biyofilmler üretme kabiliyetine sahip olmaktadır (Chandra *et al.* 2001, Ramage *et al.* 2005, Ramage *et al.* 2009, Fox and Nobile 2012). Yine yukarıda belirttiğimiz üzere hastane / klinik ortamında görülen kan dolaşımı enfeksiyonlarının nedenleri arasında en sık görülen ilk dört etken arasında yer almasının nedeni de bu biyofilm oluşturma kabiliyetidir. Öyle ki, *C. albicans*, hastaneden kullanılan tıbbi cihaz ve aparatların yüzeyinde biyofilm oluşturabilmektedir (Wenzel 1995, Wisplinghoff *et al.* 2004, Dominic *et al.* 2007, Pfaller and Diekama 2007). Bilhassa, üriner ve santral venöz kateterler, kalp pilleri, mekanik kalp kapakları, eklem protezleri, kontakt lensler ve protezlerin tümü *C. albicans* biyofilmlerine duyarlıdır (Donlan and Costerton 2002, Kojic and Darouiche 2004, Cauda 2009, Seddiki *et al.* 2013). Dünya üzerinde her yıl milyonlarca hastaya santral venöz katater yerleştirilmektedir, *C. albicans* biyofilmlerinin bu kataterler üzerinde oluşabildiği göz önünde bulundurulduğunda, *C. albicans* kaynaklı dolaşım sistemi enfeksiyonlarının ve buna bağlı doku ve organlardaki invazif sistemik enfeksiyon oluşma potansiyelinin ne denli yüksek olduğu görülmektedir (Kojic and

Darouiche 2004). Günümüzde tercih edilen gelişmiş ve ileri klinik yaklaşımlarda dahi, biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar, katater kullanılan vakaların %50'sinden fazlasında görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada, sadece bu ülkede, bu tür enfeksiyonların 100 binden fazla ölümden ve 6,5 milyar dolardan fazla ekonomik yükten sorumlu olduğu bildirilmektedir (Mermel *et al.* 2009, Lepak and Andes 2011, Lortholary *et al.* 2012, Andes *et al.* 2012, Cornely *et al.* 2012). Görüldüğü üzere, mantar enfeksiyonları ve bilhassa *C. albicans* biyofilm oluşumu kaynaklı enfeksiyonlar oldukça ciddi sonuçlara yol açmaktadır.

Katater dışında, bazı medikal cihazlara implantasyonunda çıkarılması da oldukça maliyetli ve tehlikelidir. Buna örnek olarak yapak eklemler ve yapay kalp kapakçıları sayılabilmektedir. Bu tür implantlarda oluşan biyofilmlerin yol açtığı enfeksiyonların temizlenmesinde, ilgili implantlar vücuttan çıkarılmalıdır. Ayrıca yüksek doz antifungal tedavisi hastanın böbrek ve karaciğeri başta olmak üzere vücuduna ciddi zarar vermektedir. Çoğu zaman bu hastalıkların tedavisi mümkün olmamaktadır (Mermel *et al.* 2009, Lortholary *et al.* 2012).

C. albicans biyofilmlerin oluşumu, laboratuvar ortamında katı bir yüzey üzerinde oldukça rahat bir şekilde gözlenebilmektedir (Baillie and Douglas 1999). Bu katı yüzeye örnek olarak, çoğu medikal üründe ve aparatta kullanımı tercih edilen silikon yüzeyler verilebilir. Tipik olarak, kare şeklindeki küçük bir silikon parçası, *C. albicans* kültür ortamına eklenir ve *C. albicans* hücrelerinin kare şeklindeki silikon parçasına adhezyon yolu ile yapışmasını sağlamak için ilk inkübasyonu gerçekleştirilir. Adhezyon ile yapışma sağlayamayan hücreler yıkama yoluyla ayrılır ve bu şekilde bir biyofilm oluşumuna izin verilerek gözlem yapılması mümkün kılınabilmektedir. Bu süreç boyunca, çökelmeyi önlemek için hücreler sürekli bir şekilde hafifçe çalkalanır. Buna alternatif olarak, implante edilmiş bir kataterin kan akışına maruz kalmasını taklit edecek şekilde, biyofilm boyunca sürekli bir sıvı akışının da tatbik edilmesi mümkündür. Maturasyonunu tamamlamış tipik bir biyofilmin oluşması ilk yirmi dört saat içerisinde tamamlanmaktadır. Çıplak gözle bakıldığında, kare şeklindeki silikon parçasının üzerinde bulanık bir yüzey yapısı olarak ve ayrıca farklı hücre türlerinin organize bir

koleksiyonu şeklinde mikroskop ile gözlenebilmektedir (Hawser and Douglas 1994, Baillie and Douglas 1998, Chandra *et al.* 2001, Douglas 2003).

C. albicans biyofilm oluşumu sırasıyla dört aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamaları şu şekilde sıralamak mümkündür (Nobile and Mitchell 2005, Uppuluri *et al.* 2010):

- Küre/tomurcuk şeklindeki maya hücrelerinin adhezyon yoluyla bir yüzeye yapışması,
- Sabitleyici hücrelerin bazal hücre katmanını oluşturmak için, proliferasyon,
- Hücre dışı matris materyalinin üretimi ile birlikte yalancı hiflerin ve gerçek hiflerin gelişimi,
- Yeni alanlarda tohumlanma ve çoğalmanın sağlanması için maya formundaki hücrelerin biyofilmden ayrılmasıdır.

Ayrıca belirtmek gerekir ki, laboratuvar ortamında *C. albicans* biyofilmlerin, farklı substratlar üzerinde ve farklı ortam türlerinde gelişebilmektedir. Bu durum, biyofilm gelişiminin dış koşullardaki değişikliklere yönelik olarak direncini, uyumunu ve sağlamlığını göstermektedir.

C. albicans biyofilm oluşumuna yönelik yapılan çalışmalar, in vivo biyofilm oluşumunun çoğunlukla in vivo ve ex vivo biyofilm modelleri ile iyi bir korelasyon gösterdiğini ortaya koymaktadır. Örneğin, protez stomatiti olan hastalardan ve enfekte intravasküler katateri olan hastalardan elde edilen Candida biyofilmlerinin maya, hif ve hücre dışı matriksin varlığını doğruladığı bildirilmektedir (Marrie and Costerton 1984, Ramage *et al.* 2004). Ayrıca, sıçan ve tavşanlar üzerinde yapılan çalışmalarda; venöz ve kalıcı üriner katater modellerinde ve sıçan protez stomatit modellerinde biyofilm yapılarının, bilhassa bazal bölgede çok sayıda maya hücresi içerdiği ve bununla birlikte biyofilm boyunca uzanan hif ve hücre dışı matrisin görüldüğü bildirilmektedir (Andes *et al.* 2004, Schinabeck *et al.* 2004, Wang and Fries 2011, Johnson *et al.* 2012, Birrenbach *et al.* 2012, Cruz *et al.* 2013, Nett *et al.* 2014). Yine *C. albicans* ile inoküle edilmiş canlı fareler üzerinde yapılan çalışmada, vajinal mukoza modelleri incelenmiş ve hem in vivo ve hem de ex vivo oluşan

biyofilmlerin benzer yapılara sahip olduğu gösterilmiştir. Her iki biyofilmde de maya, hif ve hücre dışı matriks yapıları mukozal katman üzerinde görülmüştür (Harriot *et al.* 2010).

2.3.2 Biyofilm oluşumunun genetiği

Paraseksüel döngüsünün laboratuvar ortamında kullanılmasının zahmetli ve maliyetli olması nedeniyle, *C. albicans* geleneksel anlamda, genetik olarak izlenebilir değildir. Ancak, *C. albicans* genomunun rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak değiştirilmesi ve şekillendirilmesi nispeten daha kolaydır. Diğer yaklaşımlar arasında ise biyofilmlerde spesifik olarak eksprese edilen genleri ve proteinleri tanımlamak için genom çapında transkripsiyonel profilleme ve proteomik teknikleri saymak mümkündür. Yapılan çalışmalar ile çok sayıda mRNA'nın ve proteinin biyofilmler ve planktonik hücreler arasında farklı şekilde eksprese edildiği keşfedilmiştir (Thomas *et al.* 2006, Martínez-Gomariz *et al.* 2009, Zarnowski *et al.* 2014).

2012 yılında, *C. albicans* biyofilmlerinin gelişimini kontrol eden büyük bir transkripsiyonel ağ tanımlanmıştır (Nobile *et al.* 2012). Bu ağ, her biri hem in vitro hem de in vivo sıçan kateteri ve sıçan protez modellerinde biyofilm gelişimi için gerekli olan altı ana transkripsiyonel regülatörden (Efg1, Tec1, Bcr1, Ndt80, Brg1 ve Rob1) oluşmaktadır (Nobile *et al.* 2012). Her bir ana düzenleyici, diğer ana düzenleyicilerin ekspresyonunu da kontrol ederek karmaşık, iç içe geçmiş bir düzenleyici ağ oluşturmaktadır. Birlikte, bu altı ana düzenleyici, bazıları ek transkripsiyon düzenleyiciler olan yaklaşık 1000 hedef genin promotörlerine doğrudan bağlanmakta ve ekspresyonunu düzenlemektedir. Hem planktonik hem de biyofilm koşullarında yürütülen bir çalışma (Fox and Nobile 2012), çeşitli hedef genlerin, hepsi de biyofilmlerin önemli özellikleri olan hif oluşumu, adezyon, ilaç direnci ve matris üretiminde rol oynadığını göstermektedir. Bununla birlikte, biyofilm ağında yeni tanımlanan hedef genlerin çoğu henüz çalışılmamıştır. Birçoğunun herhangi bir organizmadan önceden karakterize edilmiş herhangi bir genle açık sekans benzerliği yoktur (Nobile *et al.* 2012). Ortoloji haritalaması, hedef genlerin tamamının "genç" genler için önemli ölçüde zenginleştiğini göstermektedir ki bu da *C. albicans*'ın biyofilm oluşturma yeteneğinin evrimsel zaman ölçeklerine göre nispeten yakın zamanda evrimleştiğini ortaya koymaktadır. Bu çıkarım,

C. albicans ve yakından ilişkili türlerin, bir memeli konakçıda biyofilm oluşturabilen birçok mantar türünden neden sadece birkaçı olduğuna dair bir açıklama sunmaktadır. Biyofilm ağının ana hatlarıyla biyofilm gelişiminde düzenleyici olmayan hedef genlerin rolünü sistematik olarak incelemek mümkündür. Ancak yine de belirtmek gerekir ki bu biyofilm ağı henüz tam anlamıyla tamamlanmış değildir (Nobile *et al.* 2012).

Efg1, Tec1, Bcr1, Ndt80, Brg1 ve Rob1 ana transkripsiyonel regülatörlerine ek olarak, 44 adet daha transkripsiyonel regülatör tanımlanmıştır. Bunlardan herhangi birinin delesyonunun söz konusu olması halinde, *C. albicans* biyofilm oluşumunun farklı yönlerinin en az bir koşula bağlı olarak etkilendiği görülmektedir (Fox and Nobile 2012, Bonhomme and d'Enfert 2013).

C. albicans'ta biyofilm gelişimini kontrol eden transkripsiyonel ağa bakıldığında, bu ağın aşırı derecede karmaşık olduğu görünebilir. Ancak bu durum diğer birçok transkripsiyonel ağda, özellikle ökaryotik organizmalarda da tipik bir özelliktir. Örneğin, memeli kök hücre onarımı, drosophila göz gelişimi ve Arabidopsis sirkadiyen saat ritimlerinin tümü, birbirini ve birçok ek hedef geni düzenleyen çoklu transkripsiyon düzenleyiciler tarafından kontrol edilmektedir (Andes *et al.* 2004, Locke *et al.* 2005, Wilson *et al.* 2010, Young 2011). Karmaşık transkripsiyonel devreler aynı zamanda yalancı-hifal büyümeyi ve ekmek mayasında (Borneman *et al.* 2006, Ni *et al.* 2009) ozmotik strese yanıtı ve *C. albicans*'taki (Hernday *et al.* 2013) beyaz opak hücre tipi değişimi de kontrol etmektedir.

C. albicans biyofilm oluşumunda rolleri olan transkripsiyonel düzenleyiciler 6 tanesi ana regülatör ve 44 tanesi sadece düzenleyici olmak üzere toplam 50 tane iken, çok düzenleyici olmayan ancak biyofilm oluşumunda etkili olan genlerin sayısı da hayli fazladır. Burada yalnızca biyofilm oluşumunda etkili olan mekanizmaları düzenleyen ya da bu süreçte etkili olan genlere kısaca değinilmektedir.

2.3.2.1 Adezyon / yapışma

Bir biyofilmdeki hücrelerin birbirine ve sert (tıbbi bir cihaz) veya yumuşak (mukozal bir tabaka) yüzeylere yapışma yeteneği, *C. albicans* biyofilm gelişiminin tüm aşamaları için önemlidir. Örneğin, biyofilm oluşumu sırasında yapışma için biyofilm ana düzenleyici Bcr1 ve hücre duvarı proteinleri Als1, Als3 ve Hwp1 dâhil olmak üzere bazı hedef genleri gereklidir (Chandra *et al.* 2001, Nobile and Mitchell 2005, Nobile *et al.* 2006, Zhao *et al.* 2006, Nobile *et al.* 2014, Nobile *et al.* 2008). Birçok ek transkripsiyonel regülatör adezyonla ilişkilendirilmiştir (Nobile *et al.* 2006, Zhao *et al.* 2006, Dwivedi *et al.* 2011, Finkel *et al.* 2012, Monniot *et al.* 2013). Bunların çoğunluğu bir in vitro akış hücre analizi kullanarak bir transkripsiyonel regülatör mutantlar kütüphanesini tarayan bir çalışmada keşfedilmiştir (Finkel *et al.* 2012).

2.3.2.2 Hifler

C. albicans, birçok farklı çevresel koşul altında hem maya hücreleri hem de hifler oluşturma kabiliyeti ile diğer birçok mantar türünden ayrılmaktadır (Bu, *C. albicans*'ın dimorfik olarak erken sınıflandırılmasının temelidir). Planktonik kültürlerde kolaylıkla oluşsalar da, hifler *C. albicans* biyofilmlerinin önemli bir yapısal bileşenidir. Bu nedenle, süspansiyon kültürlerinde hif büyümesi için gerekli genlerin de uygun biyofilm oluşumu için gerekli olması şaşırtıcı değildir. Bu genler, transkripsiyon düzenleyicileri Efg1, Tec1, Ndt80 ve Rob1 olarak sıralanabilmektedir (Schweizer *et al.* 2000, Ramage *et al.* 2002, Nobile *et al.* 2012). Biyofilmlerdeki hifler, maya hücreleri ve diğer hifler için bir destek görevi görerek, biyofilmin genel stabilitesine katkıda bulunur. Bu nedenle, hif oluşturma yeteneği ve bu hiflerin birbirine ve maya hücrelerine yapışma kabiliyeti, normal biyofilm gelişimi ve bakımı için kritiktir. Aslında, ana regülatör Bcr1 hif oluşumu için tek başına gerekli değildi. Ancak biyofilmlerde hiflerin birbirine yapışması gerekmektedir (Nobile and Mitchell 2005).

2.3.2.3 Hücre dışı matriks

Maturasyonu tamamlanmış *C. albicans* biyofilmleri, hücre dışı matris olarak bilinen karmaşık bir materyalin içine yerleştirilmiştir. *C. albicans*'ta biyofilm matris üretiminin bilinen iki transkripsiyonel düzenleyicisi, RLM1 ve ZAP1 genleridir. RLM1'in silinmesi matriks seviyelerinde bir azalmaya neden olurken (Nett *et al.* 2011), ZAP1'in silinmesi, muhtemelen glukoamilazlar GCA1 ve GCA2'yi (Nobile *et al.* 2009) yukarı regüle ederek hücre dışı matriks materyalinin birikiminde bir artışa yol açmaktadır (Nobile *et al.* 2009, Nett *et al.* 2011).

2.3.2.4 Yayılım

Bir *C. albicans* biyofilmi içindeki hücrelerin çevreye yayılması, biyofilm yaşam döngüsündeki bir başka önemli aşamadır. Hücreler, biyofilm oluşumu boyunca sürekli olarak yayılır ve eğer tek başlarına değillerse, başlangıçta yuvarlak maya formunda oldukları gözlenmektedir (Uppuluri *et al.* 2010). Yayılmış hücreler morfolojik olarak planktonik büyüme modunda maya hücrelerine benzemelerine rağmen, farklı özelliklere sahiptirler. Bunlar, planktonik hücrelere kıyasla daha fazla olan yapışma özelliklerini, biyofilmleri daha verimli bir şekilde oluşturma yeteneğini ve fare enfeksiyon modellerinde gelişmiş virülansı içermektedir (Uppuluri *et al.* 2010). *C. albicans* biyofilm dağılımının iki transkripsiyonel düzenleyicisi tanımlanmıştır, bunlar Nrg1 ve Ume6 genleridir. Her iki regülatörün transkripsiyonel aşırı ekspresyonu, biyofilmden aktif olarak salınan dağılmış hücrelerin sayısını artırmaktadır (Uppuluri *et al.* 2010). Nrg1'in bir Set3 kromatin değiştirici kompleks aracılığıyla etki ettiği değerlendirilmektedir (Hnisz *et al.* 2012, Nobile *et al.* 2014). Gerçekten de, yapılan çalışmalarda görülmüştür ki, bireysel Set3 kompleks üyelerinin mutant suşları, normal biyofilm dağılımını gösteremeyen ve özellikle mekanik bozulmaya karşı dirençli ekstra güçlü biyofilmler oluşturmaktadır (Nobile *et al.* 2014). Nrg1 ve Set3 kompleks mutantları, maya formundaki hücreler üretememeleri ile tutarlı olarak hiperfilamentözdür (Uppuluri *et al.* 2010, Hnisz *et al.* 2012).

Hsp90'ın tükenmesi, bir biyofilmden yayılmış olan hücrelerin sayısını önemli ölçüde azalttığı için, moleküler şaperon Hsp90, *C. albicans* biyofilm yayılımında da rol oynamaktadır (Robbins *et al.* 2011). Hsp90'ın tükenmesi aynı zamanda cAMP-PKA sinyal yolağının Hsp90 medyatörlü baskılanmasını hafifleterek filamentasyonu indüklemektedir (Shapiro *et al.* 2009). Hücre duvarı proteini YWP1, biyofilm dağılımı için de önemlidir. Çünkü YWP1'in delesyonu, biyofilm dağılımının azalmasına ve biyofilm adezyonunun artmasına neden olmaktadır (Granger *et al.* 2005, Granger 2012). Maya şeklindeki hücrelere göre filamentli hücreleri tercih eden herhangi bir mutasyonun biyofilm yayılımını azaltması mümkündür. Bu nedenle, tam işlevli biyofilmler için her iki hücre türü de gereklidir (Granger *et al.* 2005).

2.3.3 Biyofilm oluşumu ve antibiyotik direnci

Biyofilm oluşumunun en önemli belirtilerinden biri, farklı antifungal ilaçlara karşı yüksek düzeyde direnç gelişimidir (Donlan and Costerton 2002, Kumamoto 2002, Douglas 2003). Biyofilmler nedeniyle bozulan ve biçim değiştiren hücrelerin, serbest ve bağımsız planktonik hücrelere göre mevcut ilaçlara daha dirençli olduğu gösterilmiştir (Bailie and Douglas 1998, Ramage *et al.* 2002). Bu durum, biyofilm oluşumunun, hücredeki diğer faktörleri etkilediğini ve biyofilm oluşumu sırasında yapılan bu değişikliklerin, tek tek hücrelerin biyofilmlerden ayrılmasından sonra bile aktif kaldığını göstermektedir. Bu antbiyotik direnci kesinlikle *C. albicans* ile ilişkili enfeksiyonlara yönelik tedavi yaklaşımlarını etkilemiştir. Öyle ki Biyofilm oluşumu ve bunun neticesinde oluşan direnç, Candida ile enfekte hastaların tedavisini zorlaştırmaktadır (Mukherjee *et al.* 2005, Nobile and Mitchell 2005, Blankenship and Mitchell 2006, Lewis 2008).

C. albicans biyofilmlerinden dolayı oluşan yüksek ilaç direncinin, ilaçların biyofilm yoluyla düşük penetrasyonundan kaynaklanabileceği varsayılmaktadır. Bununla birlikte, biyofilm kusurlu mutantlar da yüksek düzeyde ilaç direnci gösterebileceğinden, bu yaklaşımın hatalı olabileceğini savunan bilim adamları da vardır (Ramage *et al.* 2002, Al-Fattani and Douglas 2004). Bu konudaki çalışmalar günümüzde yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bu çalışmalar neticesinde, *C. albicans*'ın ilaç direnci için etkili olan çeşitli mekanizmalar önerilmektedir (Cannon *et al.* 2007, Morschhäuser 2010). Örneğin, *C.*

albicans, mantar enfeksiyonlarını tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan flusitozin, flukonazol, amfoterisin B ve kaspofungin gibi birçok antifungal ilaca direnç kazanmaktadır. Çeşitli çalışmalar, flusitozin alımını veya hücre içi dönüşümünü etkileyen mutasyonların, bu ilaçlara karşı direncin başlıca nedenleri olduğunu ortaya koymaktadır (Noël *et al.* 2003, Dodgson *et al.* 2004, Hope *et al.* 2004, Papon *et al.* 2007, Florent *et al.* 2009).

Lanosterol 14α-demetilazı kodlayan ERG11 genindeki mutasyonlar, azol ilaçlarının bu enzime bağlanmasını etkileyerek hücrelerin artan ilaç direncine yol açabilmektedir (Kelly *et al.* 1999). Ayrıca ERG11 geninin ve ergosterol biyosentetik yolağında yer alan diğer ERG genlerinin aşırı ekspresyonu, ilaçlara karşı direnci artırmaktadır. Bu genlerin aşırı ekspresyonu esas olarak regülatörleri Upc2'deki aktive edici bir mutasyondan kaynaklanmaktadır (Dunkel *et al.* 2008).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 Materyaller

3.1.1 Ekipman ve aletler

Bu çalışmada kullanılan aletler Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan ekipman ve alet

No.	Ekipman ve alet	Firma / Ülke
1-	İnkübatör	Ohmkar, Indiamart / Hindistan
2-	Denge	Lab Industry Equipment BUCH HOLM / Danimarka
3-	Mikropipetler 5 - 50, 0,5 - 10, 100 - 1000µL	Indiamart/ Hindistan
4-	Ameliyat eldivenleri	Sınoaoo Medıcal Corp. / Çin
5-	Fırın	KOMEG / Çin
6-	Buzdolabı	Labinco / Hollanda
7-	9 cm ve 6 cm boyutlarında plastik petri kapları	Wuhan Servicebio Technology/ Çin
8-	Test tüpleri	Wuhan Servicebio Technology/ Çin
9-	Mikroskobik slaytlar	Wuhan Servicebio Technology/ Çin
10-	Işık Mikroskobu	Olympus / Japonya
11-	Laminer	Lab Tech / Kore
12-	Raflar	Wuhan Servicebio Technology/ Çin
13-	Girdap	Clever Scientific Co., Ltd/ Birleşik Krallık
14-	VITEK2 kompakt sistem	BioMerieux / Fransa
15-	Tek Kullanımlık Döngü 0,01	Himedia / Hindistan
16-	Otoklav	DTS / Çin
17-	Raf	Çin

3.1.2 Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasalların ve reaktiflerin listesi Çizelge 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve reaktifler

No.	Kimyasallar	Firma / Ülke
1-	Mutlak etanol	Sigma-Aldrich / ABD
2-	Agaroz	Bioline/ ABD
3-	Etidyum bromür	Bioline/ ABD
4-	İzopropanol	FLUKA / ABD
5-	Proteinaz k	Thermo Fisher Scientific/ ABD
6-	TBE Tampon	Thermo Fisher Scientific/ ABD

3.1.3 Kitler

Bu çalışmada kullanılan mikrobiyolojik kitler, moleküler biyoloji kitleri ve primerler Çizelge 3.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3 Mikrobiyolojik kitler ve moleküler biyoloji kitleri

No.	Kitler	Firma / Ülke	
1-	VITEK YST ID	BioMérieux/ Fransa	
2-	VITEK AST-YS08	BioMérieux/ Fransa	
3-	My Taq PCR Master Mix	Bioline/ ABD	
4-	Fungi/ Yeast Genomic DNA Extraction Mini Kit		Favorgen/ Tayvan Kore
	Kit içeriği	Hacim	
1-	Boncuk Tüp	50 pcs	
2-	FA Tampon	60 mL	
3-	FB Tampon	32 mL	
4-	TG1 Tampon	22 mL	
5-	TG2 Tampon	15 mL	
6-	W1 Tampon (yoğunlaşmak)	22 mL	
7-	Yıkama Tamponu (yoğunlaşmak)	10 mL	
8-	Elüsyon Tamponu	7 mL	
9-	Litikaz çözeltisi	550 µL x 5	
10-	Proteinaz k	11 mg	
11-	TG Mini Sütun	10 pcs x 5	
12	Toplama tüpü	100 pcs	
13-	Elüsyon tüpü	50 pcs	
16-	GeneJET PCR saflaştırma kiti	50 pcs	Thermo Fisher Scientific/ ABD
17-	DNA jel yükleme boyası ve Stabilizatör	1 mL	Sigma-Aldrich/ABD
18-	DNA merdiveni	500 µL	Cleaver Scientific
19-	CAL5:5’TGTTGCTCTCTCGGGGGCGGCCG’3	25 nmol	Macrogene/ Kore
20-	NL4CAL:5’ AAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAA’3	25 nmol	Macrogene/ Kore
21-	Fw-TTAa1 5’ATTGAAATGGAATGATATTCCATTGGC’3 Rv-TTAa1 5’GAAACGATTCAAGAAATCAGCGA’3	25 nmol	Macrogene/ Kore
22-	Fw-ACC1 5’TTTTTGAGGTCATCTGTTGTTCAAAC’3 Rv-ACC1 TCTTGTGGAATGCTCGGTTTTAG’3	25 nmol	Macrogene/ Kore
23-	Fw-ADP1 5’CACGTTGCAATGTAAATCAGGTG’3 Rv-ADP1 5’TTGGATTTCCGTTCACATAAATTGA;3	25 nmol	Macrogene/ Kore
24-	Fw-MPIb 5’TTTAAACCTTTGGACCAATTGGCTAAG’3 RV-MPIb 5’TGCTTCCCCTTTGTTCAAACCAA’3	25 nmol	Macrogene/ Korea
25-	Fw-SYA1 5’TAAATCTAAAGAATTGGGAGTTGC’3 Rv-SYA1 5’TGATACAGCTTTAGCCAACTCATT’3	25 nmol	Macrogene/Korea
26-	Fw-VPS13 5’CCTTGATATGAAAATCAAACCTTTTG’3 RV-VPS13 5’CCATGATTTGATTCCAGTTTTGGT’3	25 nmol	Macrogene/ Korea
27-	Fw-ZWF1b 5’AAAACCAGGTTATTTAGATGATAA’3 Rv-ZWF1b 5’GTAATTCAATTTTTTTAGCTGGATC’3	25 nmol	Macrogene/ Korea

3.1.4 Kültür ortamı

Bu çalışmada kullanılan tüm kültür ortamları Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4 Bu çalışmada kullanılan kültür besiyeri

No.	Kültür ortamı	Firma / Ülke
1-	Mueller Hinton Agar (500 g)	Himedia / Hindistan
2-	Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) (500 g)	Himedia / Hindistan
3-	HiCrome™ Candida Diferansiyel Agar (100 g)	Himedia / Hindistan
4-	Swap Transport Medium	Himedia / Hindistan

3.1.5 Antibiyotik diskleri

Bu çalışmada kullanılan antibiyotikler Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 Bu çalışmada kullanılan antibiyotik disklerin listesi

No.	Antibiyotik Adı	Disk yükü (mg)	Sembol	Ülke
1-	Ketokonazol	10	KCA	Mast-group / Birleşik Krallık
2-	Amfoterisin B	20	AMB	
3-	Nistatin	100	NY	
4-	Kimyasal olarak modifiye edilmiş tetrasiklin	10	CMT	
5-	Mikonazol	10	MCL	
6-	İtrakonazol	50	ITR	

3.1.6 Konular

Çalışmaya Irak'ta İmam Hüseyin Eğitim Hastanesi ve dış kliniklerde, 7/12/2020-3/5/2021 tarihleri arasında vajinal enfeksiyondan muzdarip 50 kadın dâhil edildi.

3.2 Yöntemler

3.2.1 Bilgilendirilmiş onay

Bu çalışmadaki her katılımcıdan numune toplamadan önce imzalı bir bilgilendirilmiş onam alındı.

3.2.2 Numunelerin toplanması

Bu çalışmaya elli kadından elli vajinal sürüntü örneği alındı. Tüm hastalara, numunelerin alındığı süre boyunca herhangi bir antifungal uygulanmadı. Bu çalışmada toplanan tüm numuneler, Irak'taki İmam Hüseyin Eğitim Hastanesi ve dış kliniklerden 7/12/2020-3/5/2021 tarihleri arasında toplanmıştır. Hastalarla ilgili yaş, ikametgah, kronik hastalık, medeni durum, idrar yolu enfeksiyonu öyküsü gibi bazı kriterler dikkate alındı. Şüpheli patojenleri taşıyan toplanan pamuklu çubuklar, taşıma ortamında laboratuara transfer edildi (Crookes and Stuart 1959). Hastalardan toplanan tüm pamuklu çubukların işlenmesi, aşağıda belirtildiği gibi SDA plakaları üzerinde kültürlenerek aynı gün gerçekleştirildi.

3.2.3 Toplanan klinik örneklerden patojen candida türlerinin izolasyonu

Şüpheli patojeni taşıyan transfer edilen pamuklu çubuklar (klinik numuneler), sürme tekniği ile kommensal mikroorganizmalara karşı seçiciliği arttırmak için kloramfenikol ile takviye edilmiş SDA plakalarında kültürlendi. İnoküle edilen SDA plakaları, 37^{o}c'de 48 saat boyunca statik bir inkübatörde ters konumda inkübe edildi. Plakalar, 48 saatlik inkübasyon boyunca her gün düzenli olarak görünür büyüme açısından kontrol edildi. Yükseltilmiş maya kolonileri, saflaştırma amaçları için üç alt kültüre tabi tutuldu. Saflaştırılan kültürler, -80^{o}c'de uzun süreli bakım için %50 gliserol stokunda korunmuştur.

3.2.4 Klinik örneklerden candida albicans tanımlama şeması

Bu çalışmada klinik vajinal örneklerden izole edilen *C. albicans*'ın tanımlanması için dört aşamalı bir şema kullanılmıştır. Dört aşamalı şema: a) HiCrome™ Candida Differential Agar plakası üzerinde varsayımsal tanımlama, b) Gram boyama kullanılarak ışık mikroskobu altında mikroskobik inceleme, c) VITEK®2 sistemi kullanılarak biyokimyasal tanımlama ve d) *C. albicans*'a özgü primerler kullanılarak moleküler tanımlama'yı içeriyordu. Kısaca, her saf maya kültüründen tek bir koloni HiCrome™ candida differential agar plakasına ekildi. Tüm aşılanmış plakalar, 37^{o}c'de 48 saat süreyle inkübe edildi. Koloni morfolojisinin düzenli kontrolü, 28 saatlik inkübasyon boyunca günlük olarak gerçekleştirildi. Yeşil ışıkta pürüzsüz görünüme sahip koloniler, tahminen *C. albicans* olarak tanımlandı. Farklı bir renk görünümüne sahip diğer koloniler, tahminen albicans olmayan candida türleri olarak tanımlandı. Tüm candida izolatları ışık mikroskobu altında gram boyama tekniği kullanılarak incelendi. Tüm Candida izolatları VITEK®2 sistemi ile tanımlamaya tabi tutulmuştur. Son olarak tüm izolatlar için moleküler tanımlama yapılmıştır.

3.2.5 Tanılama ortamının hazırlanması

3.2.5.1 Kloramfenikol ile sabouraud dekstroz agar (SDA)

Sabouraud Dektroz Agar (SDA), Sabouraud (Price *et al.* 1982) tarafından geliştirilen Dektroz Agar'ın bir reformasyonudur. Sabouraud Dextrose Agar, genel olarak mantar ve mayaların ve özellikle patojen olanların kültürlenmesi için kullanılır. Ortam, yüksek bir dekstroz içeriğine sahiptir ve yüksek oranda asidiktir. Bu da mantar patojenlerinin yüksek seçiciliğine yardımcı olacaktır. Sabouraud Dektroz Agar W/kloramfenikol, Sabouraud Dektroz Agar'ın değiştirilmiş bir versiyonudur. SDA baz besiyerine kloramfenikol ilavesinin amacı, kommensal mikroorganizmalara karşı duyarlılığı arttırmaktır. SDA plakaları, üretici talimatlarına göre hazırlandı (Himedia/ Hindistan). Kısaca, 65g besiyeri, bir litre damıtılmış su içinde süspanse edildi. Karışım, sık sık çalkalanarak ısıtıldı ve ortamın tamamen çözünmesi sağlanana kadar iki dakika kaynatıldı.

3.2.5.2 HiCrome™ candida diferansiyel agar

HiCrome™ Candida Diferansiyel Agar hem klinik hem de klinik olmayan örneklerde bulunan Candida türlerinin hızlı izolasyonu ve tanımlanması için önerilmektedir. *C. albicans*, b-N-asetil-galaktosaminidaz salgılar. Kromojenik veya florojenik heksosaminidaz substratlarının büyüme ortamına dâhil edilmesi üzerine (Rousselle *et al.* 1991). *C. albicans* izolatları, birincil izolasyonda doğrudan tanımlanabildi. HiCrome™ Candida Diferensiyel Agar sadece seçici bir besiyeri değil, aynı zamanda *C. albicans, C. krusei, C. tropicalis* ve *C. glabrata* gibi Candida türlerini renk ve koloni'nin morfolojik özelliklerine göre klinik örneklerden ayırmaya yardımcı olan bir diferansiyel besiyeridir. En fazla, Klinik Mikoloji Laboratuvarında yaygın olarak kullanılan kurallara göre 48 saatlik büyümeden sonra hızlı ve olası sonuçlar alınabilir. Candida türleri için koloni morfolojisinin diferansiyel şeması: *C. albicans* için açık yeşil düz koloniler, *C. tropicalis* için mavi renkli kabarık koloniler, *C. glabrata* için oval düz koloniler ve *C. krusei* için mor bulanık koloniler şeklindedir. HiCrome™ Candida Diferansiyel Agar plakaları, üretim talimatlarına göre hazırlanmıştır. Kısaca, 42,72 g toz besiyeri, bir litre damıtılmış su içinde süspanse edildi. Karışımın ısınmasına izin verildi, ardından ortamın tamamen çözünmesi gerçekleşene kadar kaynatıldı. Daha sonra çözünmüş ortam 121^{o}c'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Daha sonra besiyeri 45^{o}c'ye soğutulduktan sonra sterilize edilmiş plastik petri kaplarına döküldü.

3.2.6 Gram boyama

SDA plakaları üzerinde şüpheli maya kolonisinin ışık mikroskobu altında kolonyal morfolojiyi incelemek için gram boyama kullanıldı. Genel bir kural olarak, Gram boyama prosedüründe dört temel aşama vardır: a) Şüpheli maya patojeninden mikroskobik slayt filmin alevle hazırlanması ve sabitlenmesi, b) dakika boyunca kristal viyole solüsyonu ile boyama ve ardından lamın tamamı renkten arınıncaya kadar musluk suyuyla kaldırma, c) iyot mordanı ile bir dakika fiksasyon ve ardından bir dakika musluk suyu ile kaldırma, d) 20 saniye boyunca %95 etanol ile renk giderme ve e) karşıt leke safranin solüsyonu ile bir dakika boyama, ardından lamın tamamı renkten arınıncaya kadar musluk suyuyla

durulama. Daha sonra boyanmış filmler, yağ daldırma lensi ve sedir yağı kullanılarak ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

3.2.7 VITEK®2 sistemi

3.2.7.1 Otomatikleştirilmiş bir yöntem olan VITEK®2 sistemini kullanarak tanımlama

VITEK®2 sistemi, hızlı, hassas mikrobiyal tanımlama ve antibiyogram testi gereksinimleriyle sağlık laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Gelişmiş VITEK®2 mikrobiyal tanımlama sistemi, tanımlama amaçları için genişletilmiş bir veri tabanını, en otomatik platform erişilebilirliğini, hızlı çıktıları, artırılmış güveni ve en az eğitim süresini kapsamaktadır. VITEK®2 yeni nesil platformu, güvenliği artırırken otomasyon sağlar. VITEK®2 sistemi, 30 kuyulu plakalarda birkaç biyokimyasal tanı test ortamını kaplamak için plastik reaktiflerle doldurulmuş plastik kartlardan oluşur (Zhai *et al.* 2018). Bu çalışmada elde edilen Candida izolatlarının tanımlanması, VITEK®2 sistemi üreticisinin talimatlarına göre yapılmıştır. Her şüpheli patojenin 24 saatlik taze aşısı otomatik olarak karta aktarıldı. Bir fotometre, şüpheli patojen tarafından gerçekleştirilen metabolik faaliyetlerden kaynaklanan kartta değişen rengi kesintili olarak ölçmektedir. Elde edilen veriler, bir veritabanına karşı yazılım tarafından saklandı ve analiz edildi.

3.2.7.2 VITEK®2 sistemi prosedürü

1- Temiz bir plastik tüpe aseptik olarak üç mililitre steril salin eklendi.
2- Quest mantar kolonisi steril çubuğu ile saline aktarıldı. Daha sonra, mantar kolonisinin eşit dağılımını garanti etmek için karışım iyice karıştırıldı.
3- Süspansiyonun yoğunluğu, bir VITEK®2 Densi CHEKTM kullanılarak 1,8 – 2,2 McFarland standardından değiştirildi.
4- Test edilen numunelerin benzersiz sayıları yazılım üzerinden girildi.
5- VITEK®2 kimlik kartları yüklendi ve test başlatıldı.

6- 37°c'de 24 saat sonra renk reaksiyon çıktıları otomatik olarak kaydedilmiştir. Renk, belirli bir cins veya türe çevrilecek sayısal bir koda dönüştürülür. Çıktının yüzdesi tahmin edilir.

3.2.8 Antifungal biyogram testleri

3.2.8.1 Disk difüzyon yöntemi

Bu çalışmadaki Candida izolatları, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'ne göre disk difüzyon yöntemiyle antibiyotiklere duyarlılıkları açısından test edilmiştir. Antibiyogram testi, daha önce belirtilen dört antibiyotik tarafından gerçekleştirilmiştir. Her Candida izolatından 24 saatlik bir kültür hazırlandı. Her kültürden bir öze dolusu, Muller-Hinton agar plakalarının yüzeyinin tamamına birkaç kez ekildi. Daha sonra antibiyotik diskleri steril forseps kullanılarak plakların yüzeyine kaplandı. Üst üste binen antibiyotik diskleri, plakanın kenarından yaklaşık 15 cm uzağa yerleştirildi. Agar yüzeyi ile tam teması garantilemek için diskler bastırıldı. Tüm plaklar dik konumda statik inkübatörde 37ºC'de 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün, varsa inhibisyon bölgesinin çapını tahmin etmek için tüm plakalar görselleştirildi. Elde edilen sonuçlar ayrıca CLSI yönergelerine göre yorumlandı.

3.2.8.2 VITEK®2 yöntemleri

VITEK®2 kartı AST-YS08, antibiyotik duyarlılık testlerini üreticinin talimatlarına göre yapmak için uygulandı. Bir maya süspansiyonunu 2 McFarland'a dönüştürmek için DensiCheck (bioMérieux) kullanıldı. Kart maya süspansiyonuna yerleştirildi ve ardından 10-26 saat inkübasyon yapıldı. Okumalar otomatik olarak kaydedildi. Elde edilen veriler, minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) cinsinden ifade edildi.

3.2.9 Moleküler teknikler

3.2.9.1 Candida spp. şüpheli patojenlerden genomik DNA izolasyonu

Tüm Candida türlerinden mantar genomik DNA'sı şüpheli patojenlerden üreticinin talimatlarına göre FAVORGEN Fungi/ Maya Genomik DNA Ekstraksiyon Mini Kiti ile izole edilmiştir. Aşağıdaki adımlar izlendi:

1- Candida sp. şüpheli patojenin 1-5 x 106'lık kültürü 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
2- Bir ml FA hücre tamponu ilave edildikten sonra iyice karıştırıldı.
3- Karışım 5,000xg'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı.
4- Hasat edilen hücreler 550 µL tamponda süspanse edildi ve 50 µL litikaz solüsyonu uygulandı. Karışım 37°C'de 30 dakika iyice karıştırıldı.
5- Sekiz µL 50 mg/mL RNase A (sağlanmadı) ilave edildikten sonra oda sıcaklığında iki dakika inkübasyona bırakıldı.
6- 5000 x g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı.
7- TG1 (350 µL) eklendi ve karışım iniş çıkışlı pipetleme ile iyice karıştırıldı. Daha sonra tüm karışım bir boncuk tüpüne aktarıldı.
8- Plus 5 dakika vorteks yapıldı.
9- Yirmi µL Proteinaz K (10 mg/mL) eklendi. Karışım iyi vortekslendi. Karışım 55 °C'de 15 dakika inkübe edildi.
10- Karışımı 5.000 x g'de 1 dakika santrifüjleyerek taze 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
11- TG2 tamponu (200 µL) ilave edildi, karışım tekrarlanan pipetleme ile iyice karıştırıldı.
12- İki yüz 200 µL Etanol (%96-100) eklendi ve karışım 10 saniye puls vortekslendi.
13- TG mini kolonu bir toplama tüpüne yerleştirildi. Numune karışımı, TG mini kolonuna aktarıldı. Karışım 11.000 x g'de 30 saniye santrifüjlendi.
14- TG Mini Kolonuna dört yüz (400 µL) W1 Tamponu eklendi. 11.000 x g'de 30 saniye boyunca santrifüjleme yapıldı. Tüm akış atıldı ve TG mini kolonu toplama tüpünün arkasına yerleştirildi.

15- TG Mini kolonuna yıkama tamponu (750 µL) eklendi. Santrifüjleme 11.000 x g'de 30 saniye boyunca gerçekleştirildi. Tüm akış atıldı ve TG mini kolonu tekrar toplama tüpüne geri alındı.
16- Kolonun kurumasını garantilemek için 3 dakika daha tam hızda (~ 18.000 xg) santrifüjleme yapıldı.
17- TG mini kolonu bir elüsyon tüpüne yerleştirildi.
18- Elüsyon tamponu (50 ~100 µL) veya ddH_2O, zarın ortasındaki TG Mini kolonuna ilave edildi. Elüsyon tamponunun membranda tam adsorpsiyonunu garanti etmek için TG mini kolonu oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildi.
19- Toplam DNA'nın elute edilmesi için tam hızda (~ 18.000 xg) 1 dakika santrifüj yapıldı.
20- İzole edilen genomik DNA, uzun süreli koruma için -20 °C'de saklandı.

3.2.9.2 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jelleri (Baez 1987)'da bildirildiği gibi hazırlandı. Bir gram agaroz, 100 mL 1X TBE tamponu ile karıştırıldı. Karışım 100^{o}C'de erimeye bırakıldı. Bundan sonra, 0,5 ug etidyum bromür/ml agaroz çözeltisinin nihai konsantrasyonunda erimiş karışıma etidyum bromür ilave edildi. Otuz mililitre erimiş agaroz, submarine unitin (Clever Scientific Ltd, Birleşik Krallık) döküm tepsisine döküldü. Jel katılaşmasından sonra, DNA örnekleri 1X jel yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra jele yüklendi. Elektroforez işlemi, anot ve katot arasında 5-8V/cm'de gerçekleştirilmiştir. Elektroforezin sona ermesinden sonra, agaroz jeli UV-transillüminatör (Clever Scientific, UK) altında görüntülendi.

3.2.9.4 *C. albicans* şüpheli patojenlerin moleküler tespiti

Vajinal klinik örneklerde şüpheli patojen *C. albicans* varlığı, *C. albicans* türüne özel primer seti kullanılarak PCR gerçekleştirilerek doğrulandı. Bu çalışmada aşağıdaki *C. albicans* türleri primer seti kullanılmıştır:

CAL5:5'TGTTGCTCTCTCGGGGGCGGCCG'3 ve NL4CAL:5' AAGATCATTATGCCAACATCCTAGGTAAA'3 (Abacı 2008). Polimeraz zincir

reaksiyon karışımı (50 µL), 30 ng genomik DNA, 25 µL MyTaq PCR Master Mix, her bir ileri ve ters primerden 0,5 uM, 1,5 mM $MgCl_2$'den oluşmakta ve nihai hacim nükleaz içermeyen su ile 50 µL'ye tamamlanmaktadır. Termocycler (Biometra, Almanya) şu şekilde programlanmıştır: 95^oC, ilk denatürasyon için 5 dakika, 35 döngü: her biri 94^oc, 1 dk denatürasyon, 67^oc, 20 saniye tavlama, 72^oc, 20 saniye ve son uzama 72^oc'de 5 dakika. PCR'nin sonlandırılmasından sonra, 100 bp DNA merdiveni ile birlikte %1 agaroz jel elektroforezi üzerinde kontrol edilmek üzere bir kısım kullanıldı.

3.2.9.5 *C. albicans* şüpheli patojenlerin multilokus dizi tiplemesi (MLST)

3.2.9.5.1MLST prensibi

Bu çalışmada iki *C. albicans* izolatının suş düzeyinde genotiplenmesi için bu çalışmada çok bölgeli dizi tipleme (MLST) yaklaşımı kullanılmıştır. MLST, çok sayıda bakteri ve maya türüne ait çeşitli bakteri suşları için ST(ler)in depolandığı sunucuda bulunan açık erişimli bir veritabanıdır. MLST'nin prensibi, yedi ev tutma genini kodlayan yedi lokus dizisindeki varyasyonları izlemektir. Dizideki varyasyonlar nükleotid seviyesidir. Bu nedenle, her lokus, nükleotid seviyesinde nükleotid dizilerinde farklılık gösteren birkaç alele sahip olacaktır. Genotiplendirilecek olan quest türünün genomik DNA'sı, yedi temizlik geninin 7 lokusunu kısmen büyütmek için yedi ayrı PCR reaksiyonunda DNA şablonu olarak kullanılır. Bu yaklaşımın esası, *C. albicans*'ta housekeeping genlerinin 7 lokusunu kodlayan 7 fragmanın amplifikasyonudur. Normalde, her lokus için PCR ile amplifiye edilmiş DNA fragmanları 450-500 bp arasında değişir. Amplifiye edilmiş DNA fragmanları sıralanır. Her bir lokus için her DNA parçasının nükleotid dizisi, MLST veri tabanında depolanan lokus alellerinin DNA dizileri ile hizalanır. Daha sonra quest *C. albicans* suşundaki her lokusun alleli tanımlanır. 7 lokus allelinin tümünün kombinasyonu daha sonra quest *C. albicans* suşunun ST'sini tanımlamak için MLST veri tabanında depolanan ST ile karşılaştırılır.

3.2.9.5.2 *C. albicans* MLST'nin 7 lokus houskeeping geni için primer tasarımı

C. albicans'ta yedi lokus houskeeping geni için yedi gene özel primer seti tasarlandı. Her bir houskeeping gen lokusunun referans dizisi, MLST veri tabanından alındı. *C. albicans* için MLST veri tabanına göre 7 houskeeping geni TTAa1, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13 ve ZWF1b idi. Tasarlanan primerler, sunucuda lokalize edilmiş çevrimiçi Primer-Blast programı aracılığıyla erime sıcaklığı, 3'kendini tamamlayıcılık, primer uzunluğu, 3'tamamlayıcılık ve özgünlük açısından kontrol edildi.

3.2.9.5.3 *C. albicans* genotipleme suşları için MLST için şema protokolü

C. albicans için MLST veri tabanına göz atmak, 7 temizlik genini kodlayan 7 lokusun nükleotid dizilerinin alınmasıyla sonuçlandı. Her lokusun 450-500 bp'lik bir DNA fragmanını kısmen PCR ile büyütmek için her lokus için gene spesifik bir primer tasarlanmıştır. Sonuç olarak, 7 houskeeping geninin 7 lokusunu kapsayacak şekilde yedi gene özel primer tasarlandı. *C. albicans* için MLST veri tabanına göre 7 houskeeping geni şunlardır: TTAa1, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13 ve ZWF1b, Çizelge 3.6'te gösterildi. Ek olarak, yedi lokus houskeeping geninin primer dizisi, PCR tarifi ve her PCR'nin belirli bir lokustan DNA fragmanını kısmen büyütmesi için PCR koşulları Çizelge 3.6'te gösterildi.

Çizelge 3.6 *C. albicans* MLST için gene özel primer dizisi, PCR tarifi, PCR koşulları ve 7 lokus (temizlik genleri) için PCR uzunluğu

Primer Dizisi	**PCR Tarifi**	**PCR Koşulları ve PCR uzunluğu**
Fw-TTAa1 5'ATTGAAATGGAATGATATTCCATTGGC'3 Rv-TTAa1 5'GAAACGATTCAAGAAATCAGCGA'3	50 µL Reaksiyon karışımı: 30 ng genomik DNA, 0,5 µM her primerin, 25 µL of MyTaq Ana Karışım, ve 50 µL nihai hacme kadar nükleaz içermeyen su	İlk denatürasyon: 95ºC - 10 dk 35 döngüler, her biri: denatürasyon: 94ºC - 30 saniye, Tavlama: 58ºC - 30 saniye, Uzatma: 72ºC - 25 saniye Son uzatma: 72ºC - 25 saniye PCR ürünü: 373 bp
Fw-ACC1 5'TTTTTGAGGTCATCTGTTGTTCAAAC'3 Rv-ACC1 TCTTGTGGAATGCTCGGTTTTAG'3		İlk denatürasyon: 95ºC - 10 dk 35 döngüler, her biri: denatürasyon: 94ºC - 30 saniye, Tavlama: 59ºC - 30 saniye, Uzatma: 72ºC - 25 saniye Son uzatma: 72ºC - 25 saniye PCR ürünü: 407 bp
Fw-ADP1 5'CACGTTGCAATGTAAATCAGGTG'3 Rv-ADP1 5'TTGGATTTCCGTTCACATAAATTGA'3		İlk denatürasyon: 95 ºC - 10 dk 35 döngüler, her biri: denatürasyon: 94ºC - 30 saniye, Tavlama: 59ºC - 30 saniye, Uzatma: 72 ºC - 25 saniye Son uzatma: 72ºC - 25 saniye PCR ürünü: 443 bp
Fw-MPIb 5'TTTAAACCTTTGGACCAATTGGCTAAG'3 RV-MPIb 5'TGCTTCCCCTTTGTTCAAACCAA'3		İlk denatürasyon: 95ºC - 10 dk 35 döngüler, her biri: denatürasyon: 94ºC - 30 saniye, Tavlama: 61ºC - 30 saniye, uzatma: 72ºC - 25 saniye Son uzatma: 72ºC - 25 saniye PCR ürünü: 375 bp
Fw-SYA1 5'TAAATCTAAAGAATTGGGAGTTGC'3 Rv-SYA1 5'TGATACAGCTTTAGCCAACTCATT'3		İlk denatürasyon: 95ºC - 10 min 35 döngüler, her biri: denatürasyon: 94ºC - 30 saniye, Tavlama: 58ºC - 30 saniye, uzatma: 72ºC - 25 saniye Son uzatma: 72ºC - 25 saniye PCR ürünü: 391 bp
Fw-VPS13 5'CCTTGATATGAAAATCAAACCTTTTG'3 RV-VPS13 5'CCATGATTTGATTCCAGTTTTGGT'3		İlk denatürasyon: 95ºC - 10 min 35 döngüler, her biri: denatürasyon: 94ºC - 30 saniye, Tavlama: 58ºC - 30 saniye, uzatma: 72ºC - 25 saniye Son uzatma: 72ºC - 25 saniye PCR ürünü: 403 bp
Fw-ZWF1b 5'AAAACCAGGTTATTTAGATGATAA'3 Rv-ZWF1b 5'GTAATTCAATTTTTTTAGCTGGATC'3		İlk denatürasyon: 95ºC - 10 dk 35 döngüler, her biri: denatürasyon: 94ºC - 30 saniye, Tavlama: 53ºC - 30 saniye, uzatma: 72ºC - 25 saniye Son uzatma: 72ºC - 25 saniye PCR ürünü: 403 bp

3.2.9.5.4 PCR ürünün pürifikasyonu

Amplifiye edilmiş tüm PCR ürünleri, DNA dizilimine tabi tutulmadan önce GeneJET® PCR pürifikasyon kiti kullanılarak pürifiye edildi. PCR ürünlerinin pürifikasyonu, üreticinin talimatlarına göre yapıldı. GeneJET®PCR pürifikasyon kiti kullanılarak PCR ürünleri pürifikasyon protokolü aşağıdaki adımlarda oluşturulmuştur:

1- Bir PCR ürün karışımına 1:1 oranında bağlama tamponu ilave edildi (100 µL PCR ürün karışımı: 100µL bağlama tamponu). Geliştirilen sarı renk, DNA bağlanmasını destekleyen optimal pH'ı gösterir.

(Not: turuncu veya mor renk gelişimi, karışımın renginin sarıya dönüşmesine yardımcı olmak için 10 µL 3 M sodyum asetat, pH 5,2 solüsyonunun eklenmesini gerektirir).

2- Adım 1'deki karışım (800 µL) GeneJET pürifikasyon kolonuna aktarıldı. Daha sonra karışım, 10.000 rpm'de bir dakika boyunca santrifüjlendi. Tüm akış atıldı.

3- Solüsyonun tamamı kolon membranına eklenene kadar 2. adımı tekrarlayın.

4- GeneJET pürifikasyon kolonuna yıkama tamponu (700 µL) eklendi. Daha sonra karışım, 30-60 saniye boyunca 10.000 rpm Santrifüjde santrifüjlemeye tabi tutuldu. Tüm akış atıldı ve pürifikasyon kolonu tekrar toplama tüpüne geri alındı.

5- Boş GeneJET pürifikasyon kolonu, yıkama tamponunda bulunan herhangi bir etanol kalıntısının tamamen çıkarılmasını garanti etmek için ek bir dakika boyunca santrifüjlemeye tabi tutuldu (Not. Bu adım, sonraki adımlarda DNA örneğindeki etanolün olası engelleyici etkilerini en aza indirmeye yardımcı olmak için zorunludur).

6- GeneJET pürifikasyon kolonu temiz 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Daha sonra elüsyon tamponu (50 uL), GeneJET pürifikasyon kolonu membranının merkezine ilave edildi. DNA, oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edilerek ayrıştırıldı.

3.2.9.5.5 DNA dizilimi

Tüm pürife edilmiş PCR ürünleri, ABI Prism 377 üzerinde Otomatik Floresan DNA Dizilimi kullanılarak DNA dizilimine tabi tutuldu. Her bir DNA numunesi, ileri primer ve ters primer kullanılarak iki yönde dizilendi.

3.2.9.5.6 Yedi lokus temizlik geni için DNA dizilerinin analizi

Elde edilen DNA dizileri Bioedit yazılım versiyonu 7,5 kullanılarak analiz edildi. Diziler, tüm diziden örtüşen, belirsiz nükleotidleri kesmek için temizlendi. Kesilmiş, temiz DNA dizileri, belirli bir lokus temizlik genini kodlayan her DNA dizisinin, bu lokusun PubMLST depolanmış DNA dizilerine karşı hizalandığı PubMLST veri tabanı çevrimiçi sunucusu kullanılarak analiz edildi. PubMLST veri tabanının çevrimiçi sunucusunda çoklu dizi hizalaması gerçekleştirildikten sonra, her lokus temizlik geni bir alel numarası olarak gösterilecektir.

3.2.9.5.7 *C. albicans* suşları için ST profilinin belirlenmesi

Her lokus için alel belirlendikten sonra, yedi lokus alel kombinasyonu, PubMLST veri tabanının çevrimiçi sunucusu tarafından analize tabi tutuldu. Belirli bir suş için birleşik alelik profilin normal olarak PubMLST biriktirilmiş ST profilleri ile eşleştiği durumlarda. Son olarak, her *C. albicans* suşu için ST profili, PubMLST veri tabanına gönderildi.

4. BULGULAR

4.1 Vajinal Klinik Örneklerin Şüpheli Patojenleri

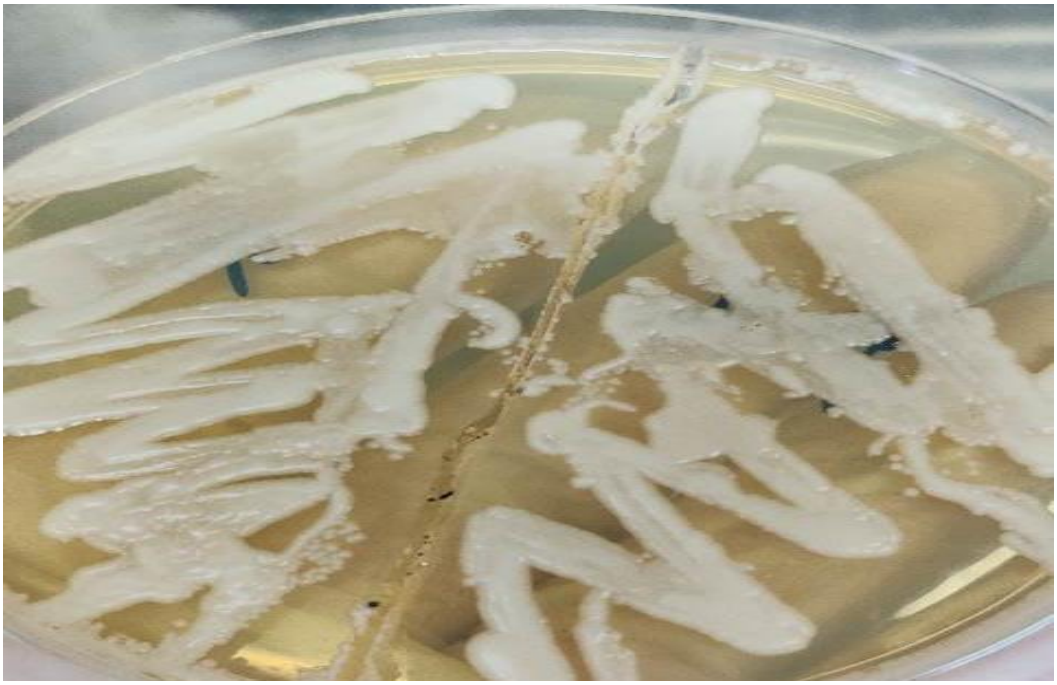
Bu çalışmada vajinal klinik örneklerden elli maya izolatı elde edildi. SDA plakalarındaki elli maya izolatı mayaya atanmıştır, Şekil 4.1'de gösterilmektedir, temsili bir örnek olarak vajinal klinik örneklerden Candida izolatlarını göstermektedir.



Şekil 4.1 Vajinal klinik örneklerden elde edilen maya kolonilerini gösteren SDA plakası

4.2 Şüpheli Patojenin Candida Olarak Olası Tanımlaması

HiCrome™ Candida differential agar üzerinde kültürlenen elli maya izolatı, tüm maya izolatlarının Candida cinsine atandığını ortaya çıkardı. Ek olarak, elli maya izolatından ikisi (n=2/50=4%) *C. albicans*'ın düzgün, açık yeşil kolonilere sahip tipik kolonyal morfolojisini vermiştir. Şekil 4.2, elli klinik vajinal örnekte *C. albicans*'ın dağılım sıklığını ortaya koydu. Şekil 4.3, HiCrome™ Candida differential agar plakası üzerinde bu çalışmada elde edilen *C. albicans* suşlarının tipik kolonyal morfolojisini tasvir etmiştir. Tahmini olarak tanımlanmış bu iki *C. albicans* suşu, tanımlama şemasındaki bir sonraki adıma tabi tutuldu.



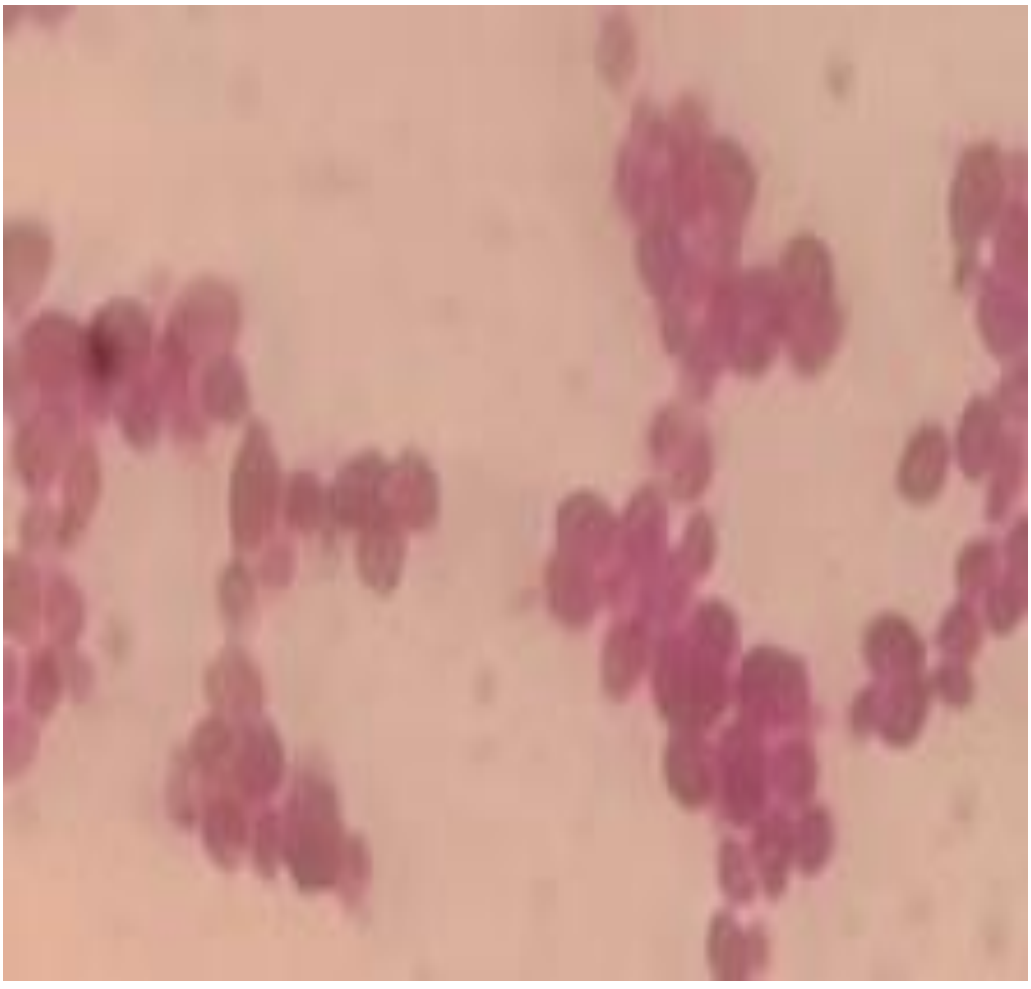
Şekil 4.2 Elli klinik vajinal örnekte *C. albicans*'ın dağılım sıklığı. Doldurulan alan: albicans olmayan Candida suşları (%96). Boş alan: *C. albicans* suşları (%4)



Şekil 4.3 Bu çalışmada vajinal klinik örnekten elde edilen *C. albicans*'ın farklı morfolojik özelliklerini gösteren HiCrome™ candida differential agar plakası

4.3 Işık Mikroskobunda *C. albicans*'ın Morfolojik Özellikleri

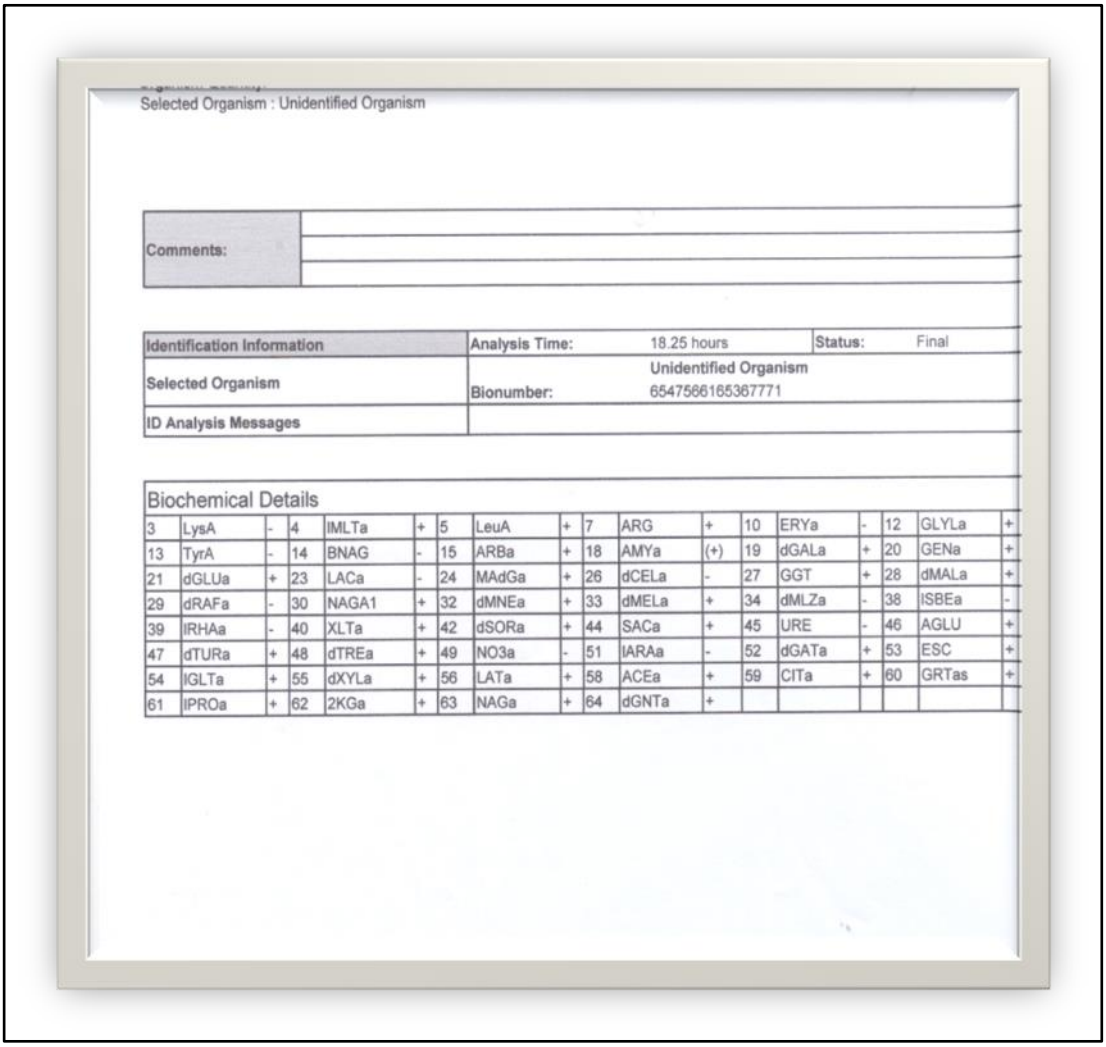
Varsayımsal olarak tanımlanmış iki *C. albicans* suşu, materyal ve yöntemler bölümünde belirtildiği gibi gram boyama kullanılarak ışık mikroskobu altında analize tabi tutuldu. Şekil 4.4, ışık mikroskobu altında gram boyama ile boyanmış *C. albicans* suşunun tipik morfolojik özelliklerini göstermektedir. Veriler, varsayılan olarak tanımlanmış iki *C. albicans* suşunun, ışık mikroskobu altında tipik *C. albicans* morfolojik özellikleri verdiğini ortaya koydu. Işık mikroskobu altında tipik albicans morfolojik özelliği gösteren iki *C. albicans* suşu, ayrıca tanımlama şemasındaki bir sonraki adıma tabi tutuldu: VITK®2 sistemini kullanan bir doğrulayıcı tanımlama adımıdır.



Şekil 4.4 Işık mikroskobu altında gram boyama ile boyanmış tipik *C. albicans* suşu. Fotoğraf, yağa daldırmalı merceğin altında çekilmiştir

4.4 *C. albicans*'ın VITE K ®2 Sistemi İle Doğrulayıcı Tanımlaması

VITEK®2 sistemi, varsayılan olarak tanımlanmış iki *C. albicans* suşunun kimliğini doğrulamak için çalışıldı. İki quest *C. albicans* suşu için elde edilen biyokimyasal profiller, VITEK ®2 veri tabanında bulunan tipik *C. albicans*'ınkiyle yakından eşleştirildi. Şekil 4.5, varsayılan olarak tanımlanmış iki *C. albicans* suşu için VITEK®2'ye dâhil edilen biyokimyasal reaksiyonların sonuçlarını göstermektedir. İki *C. albicans* suşuna, *C. albicans* Vag-1 suşu ve *C. albicans* Vag-2 suşu olarak suş ataması verildi.



Selected Organism : Unidentified Organism

Comments:	

Identification Information	Analysis Time:	18.25 hours	Status:	Final
Selected Organism	Bionumber:	Unidentified Organism 6547566165367771		
ID Analysis Messages				

Biochemical Details

3	LysA	-	4	IMLTa	+	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	+		
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	+	18	AMYa	(+)	19	dGALa	+	20	GENa	+		
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	+	28	dMALa	+		
29	dRAFa	-	30	NAGA1	+	32	dMNEa	+	33	dMELa	+	34	dMLZa	-	38	ISBEa	-		
39	IRHAa	-	40	XLTa	+	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+		
47	dTURa	+	48	dTREa	+	49	NO3a	-	51	IARAa	-	52	dGATa	+	53	ESC	+		
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	+	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	+		
61	IPROa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	+	64	dGNTa	+								

Şekil 4.5 Tahmini olarak tanımlanmış iki *C. albicans* suşu için VITE K ®2 sistemi tarafından yürütülen biyokimyasal testlerin bir profili

4.5 Vajinal Numunenin Patojenik *C. albicans* Suşlarının Antibiyogramı

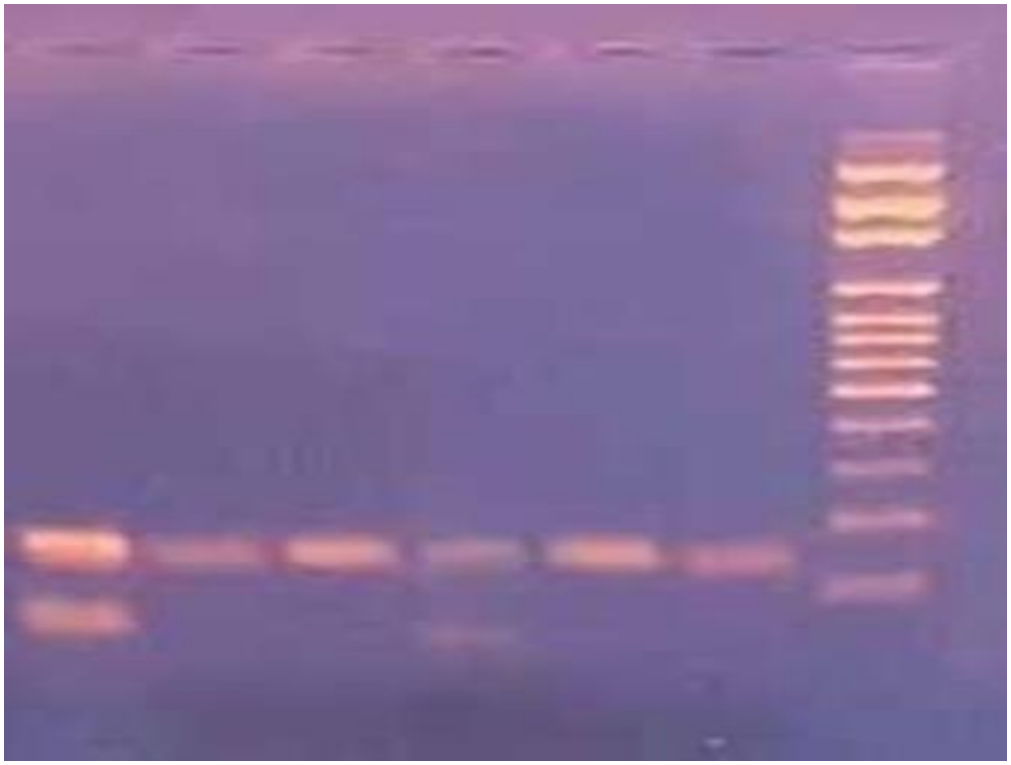
İki *C. albicans* patojenik suşu için antibiyogram profili; *C. albicans* Vag-1 suşu *ve C. albicans* Vag-2 suşu Çizelge 4.1'de gösterildi.

Çizelge 4.1 Vajinal sürüntülerden izole edilen *C. albicans* suşu Vag-1 ve *C. albicans* suşu Vag-2 için antibiyotik duyarlılık profili

Antifungal	***C. albicans* Vag-1 suşu**		***C. albicans* Vag-2 suşu**	
AST	S	R	S	R
Ketokonazol	S			R
Amfoterisin B	S			R
Nistatin	S		S	
CMT	S		S	
Mikonazol	S		S	
İtrakonazol	S		S	
Flukonazol	S		S	
Flusitozin	S		S	
Vorikonazol	S		S	
Kaspofungin		R		
Mikafungin		R		

4.6 *C. albicans* Patojenik Suşlarının Moleküler Tanımlanması

İki *C. albicans* patojenik suşunun moleküler tanımlaması: Vag-1 suşu ve Vag-2 suşu, VITEK®2 sistemi ile biyokimyasal tanımlamayı doğruladı. Gerçekleştirilen laboratuvar PCR'si, *C. albicans* genine özgü primer seti CAL5 ve NL4CAL'nin kullanılması üzerine 175 bp PCR ürünlerinin varlığını ortaya koydu. Şekil 4.6, *C. albicans*'a özgü primer tarafından yürütülen PCR'de DNA şablonu olarak iki patojenik *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşunun genomik DNA'sı kullanılarak elde edilen PCR ürünlerini göstermektedir.



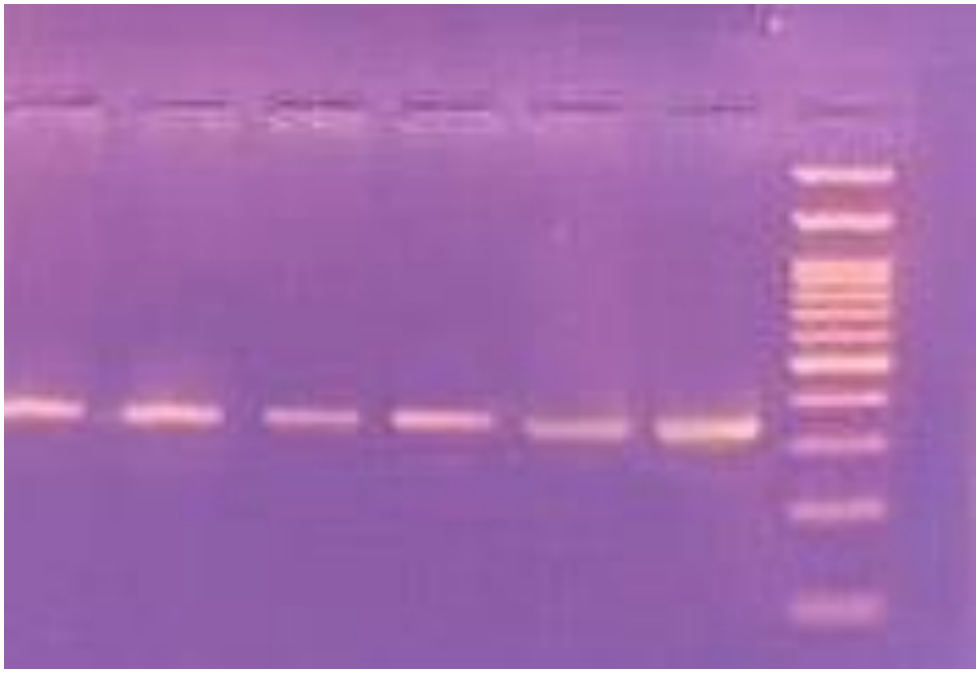
Şekil 4.6 İki vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşunun genomik DNA'sından amplifiye edilen 175 bp'lik PCR ürünlerini gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA toplayıcı

4.7 *C. albican* Suşu Vag-1 ve *C. albicans* Suşu Vag-2 için MLST

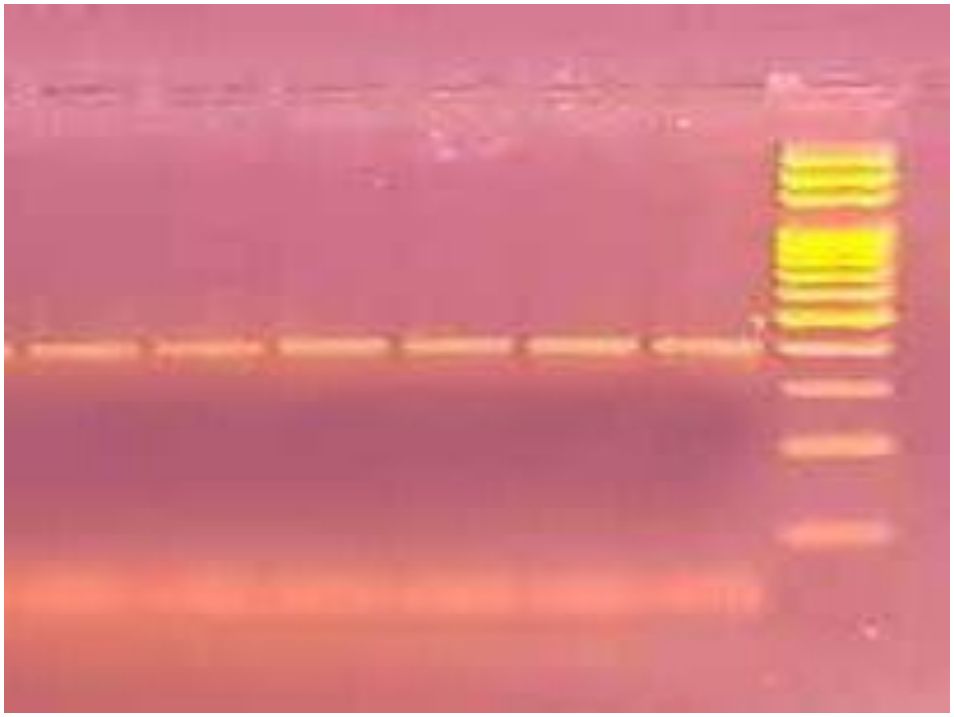
4.7.1 *C. albicans* vajinal suşlarının 7 lokus housekeeping genlerinin PCR amplifikasyonu

Her aday suş için, yedi housekeeping genini (TTA1, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13 ve ZWF1b) kodlayan yedi lokus kısmen PCR ile amplifiye edildi. Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13 iki *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan elde edilen kısmen PCR amplifiye edilmiş genleri tutan bu yedi lokus için PCR ürünlerini göstermektedir.

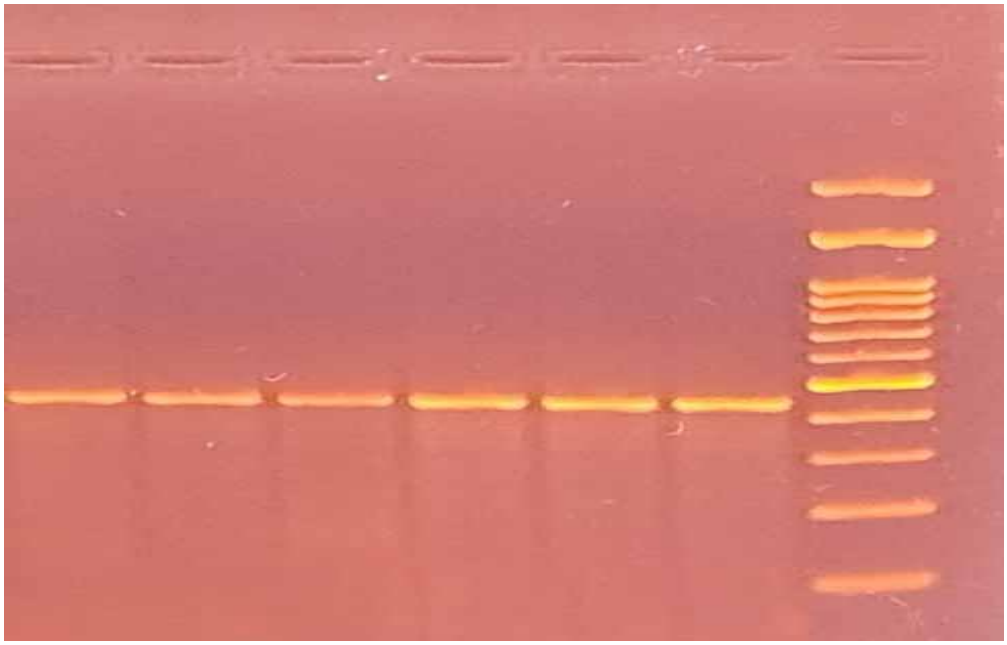
İki *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan elde edilen kısmen PCR amplifiye edilmiş genleri tutan bu yedi lokus için PCR ürünlerini göstermektedir.



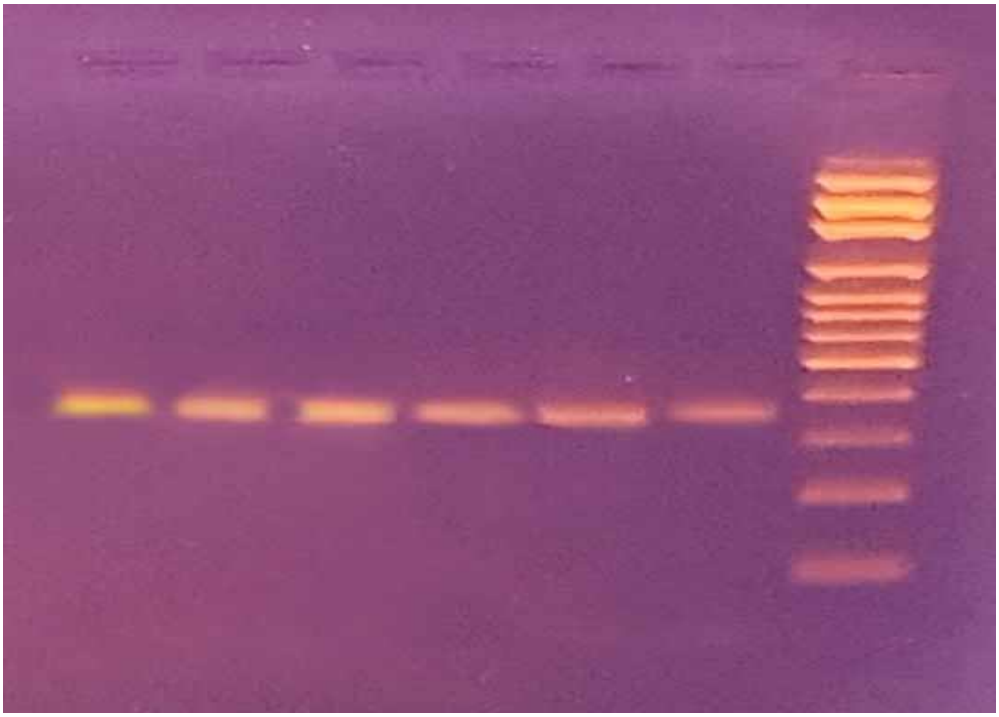
Şekil 4.7 Quest iki patojenik vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan TTAa1 lokusunun PCR amplifikasyonunu gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA merdiveni



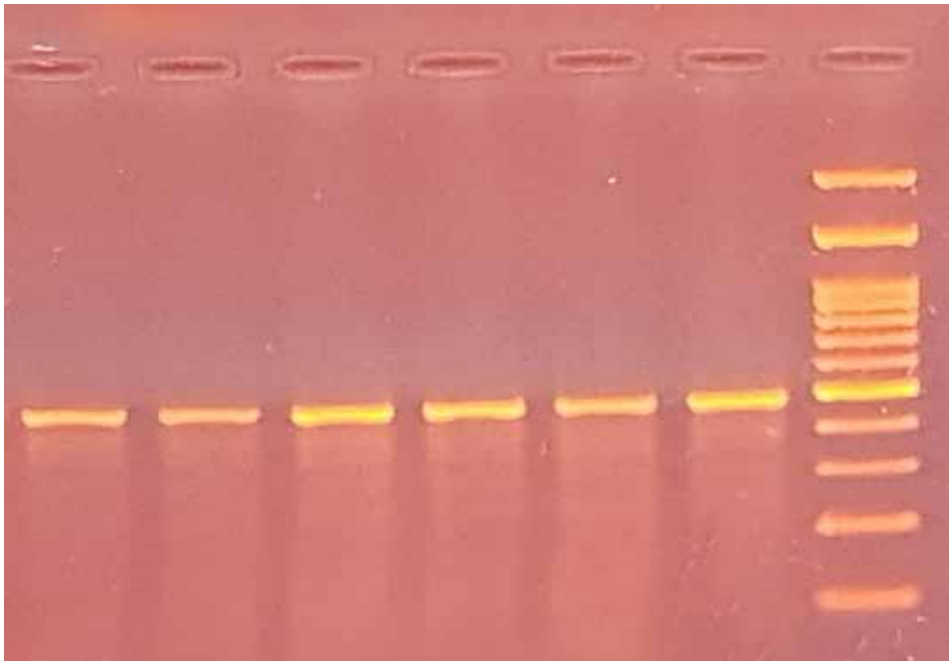
Şekil 4.8 Quest iki patojenik vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan ACC1 lokusunun PCR amplifikasyonunu gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA merdiveni



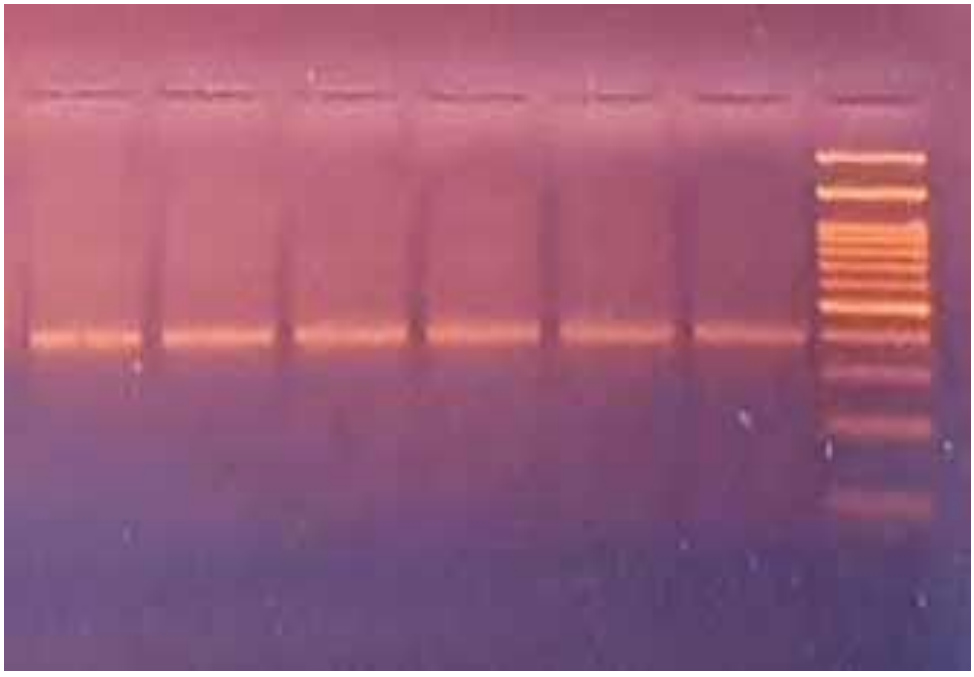
Şekil 4.9 Quest iki patojenik vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan ADP1 lokusunun PCR amplifikasyonunu gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA merdiveni



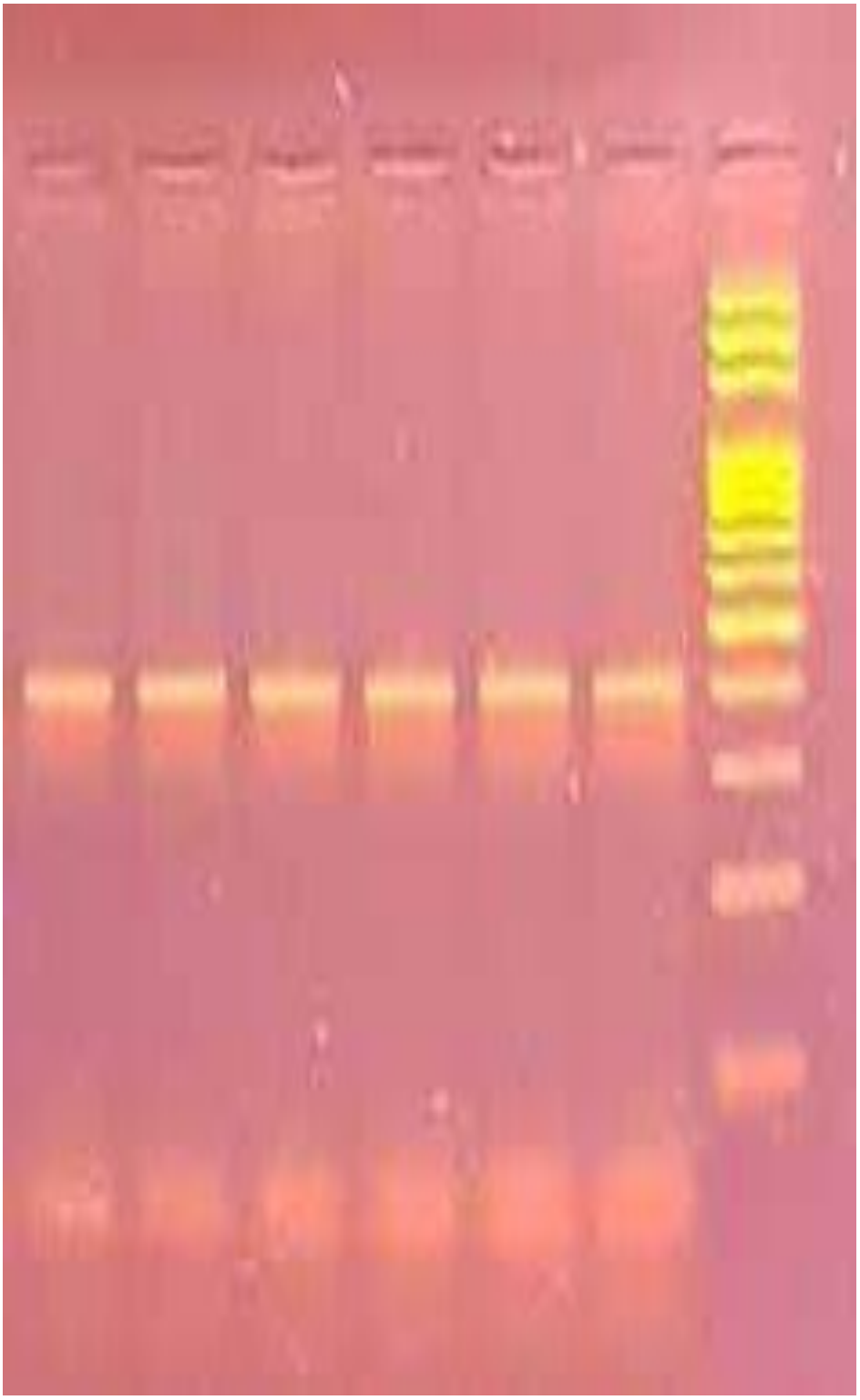
Şekil 4.10 Quest iki patojenik vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan lokus MPIb'nin PCR amplifikasyonunu gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA merdiveni



Şekil 4.11 Quest iki patojenik vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan SYA1 lokusunun PCR amplifikasyonunu gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA merdiveni



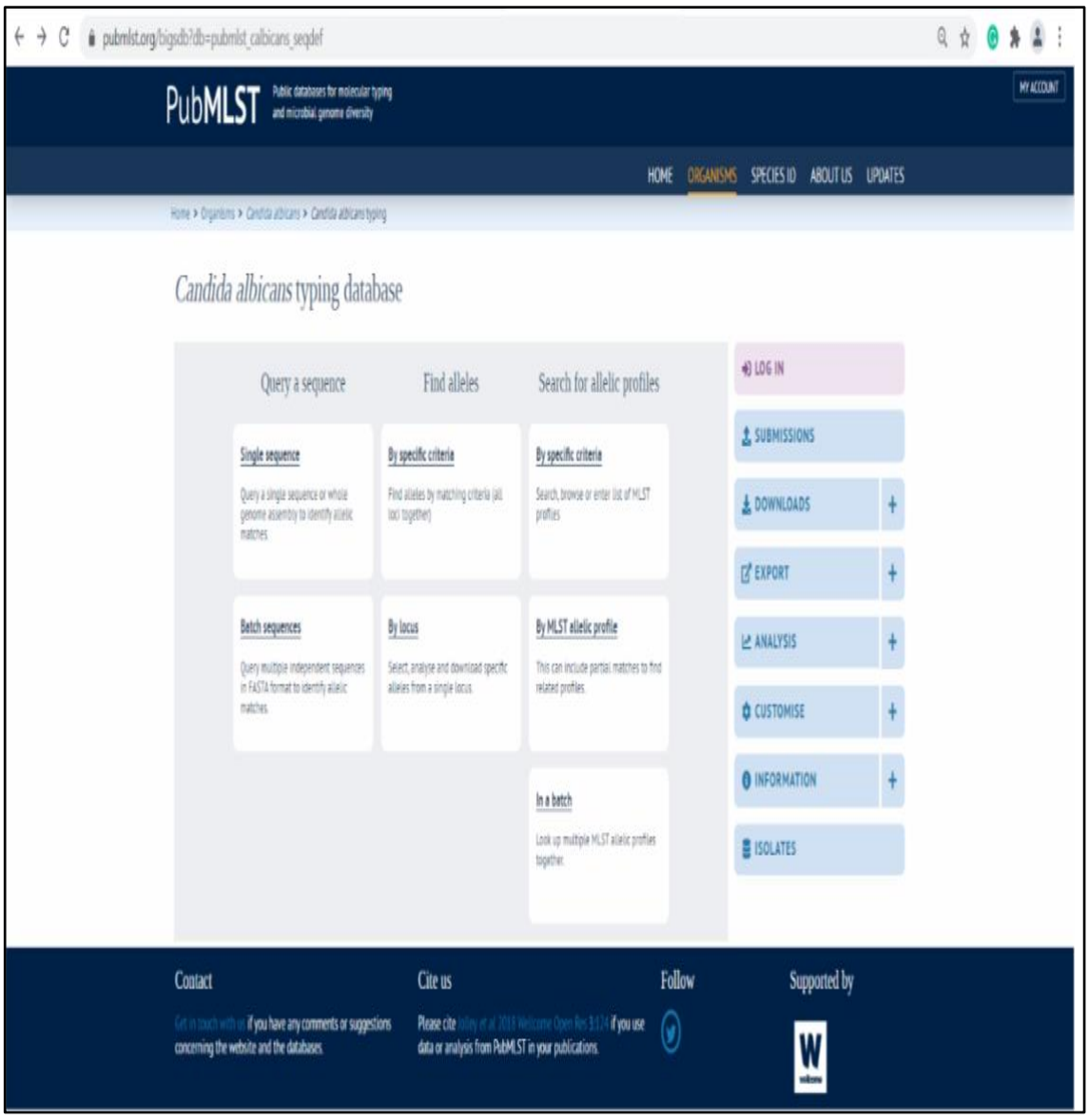
Şekil 4.12 Quest iki patojenik vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan VPS13 lokusunun PCR amplifikasyonunu gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA merdiveni



Şekil 4.13 Quest iki patojenik vajinal *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan ZWF1b lokusunun PCR amplifikasyonunu gösteren %1 agaroz jel elektroforezi. M: 100 bp DNA merdiveni

4.7.2 *C. albicans* vajinal suşlarının 7 lokus housekeeping genlerinin nükleotid dizileri ve alel tayini

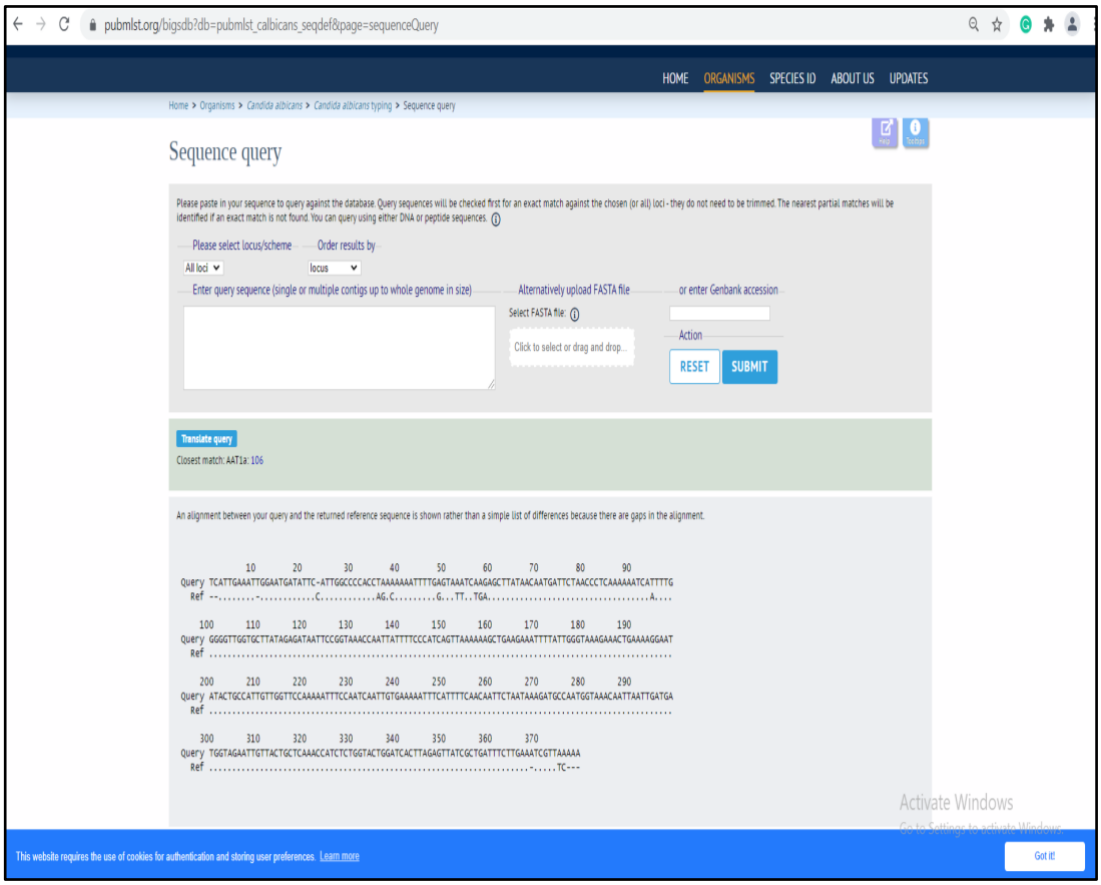
İki *C. albicans* Vag-1 ve Vag-2 suşundan gelen 7 lokus housekeeping genlerin nükleotid dizisi, her bir diziden örtüşen kısımlar düzenlendikten ve kırpıldıktan sonra aşağıda gösterilmiştir, Şekil 4.14'de gösterilmektedir.



Şekil 4.14 *C. albicans* suşlarının yazılması için PubMLST çevrimiçi sayfasının ekran görüntüsü 7 lokus housekeeping genleri için nükleotid dizileri ve *C. albicans* Vag-1 suşu için lokus alel

4.7.2.1 Lokus nükleotid dizisi: AAT1a ve lokus alel: 106

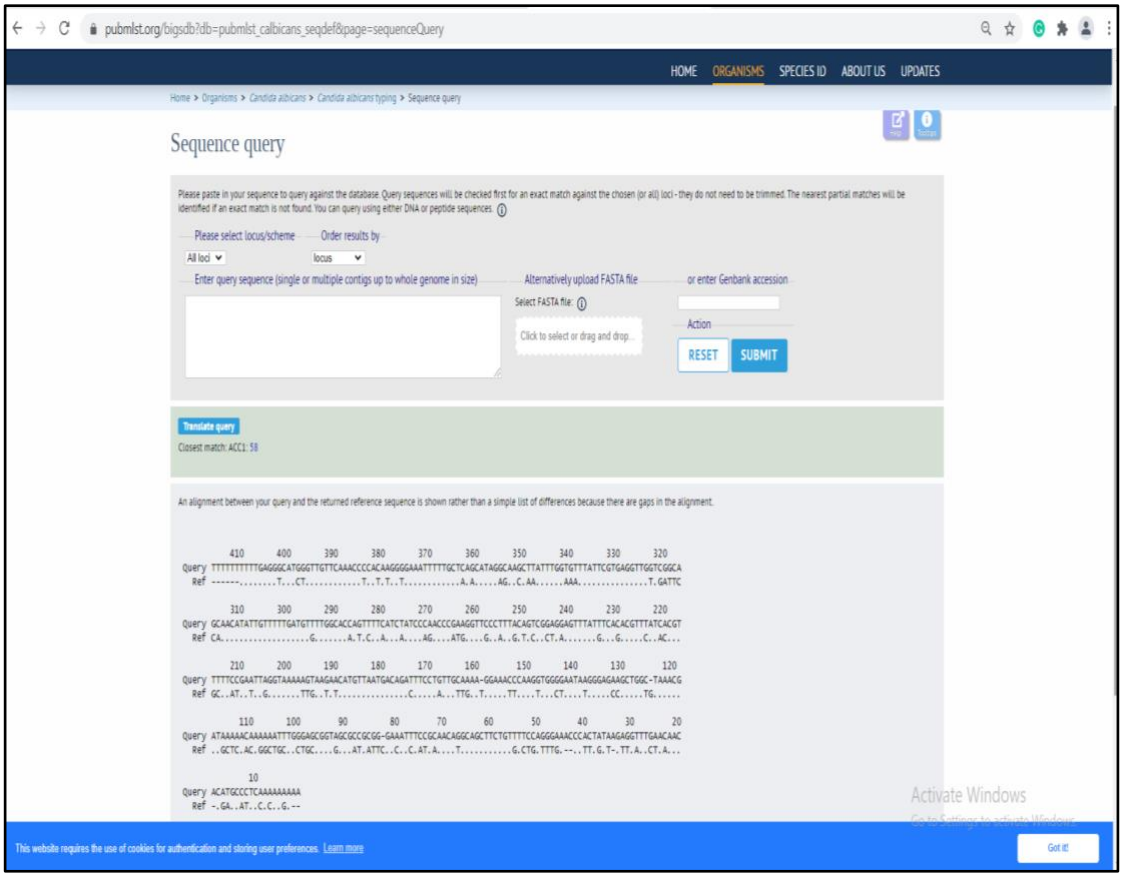
TCATTGAAATTGGAATGATATTCATTGGCCCCACCTAAAAAAATTTTGAGTA
AATCAAGAGCTTATAACAATGATTCTAACCCTCAAAAAATCATTTTGGGGGT
TGGTGCTTATAGAGATAATTCCGGTAAACCAATTATTTTCCCATCAGTTAAA
AAAGCTGAAGAAATTTTATTGGGTAAAGAAACTGAAAAGGAATATACTGCC
ATTGTTGGTTCCAAAAATTTCCAATCAATTGTGAAAAATTTCATTTTCAACA
ATTCTAATAAAGATGCCAATGGTAAACAATTAATTGATGATGGTAGAATTG
TTACTGCTCAAACCATCTCTGGTACTGGATCACTTAGAGTTATCGCTGATTT
CTTGAAATCGTTAAAAA, Şekil 4.15'e bakın.



Şekil 4.15 *C. albicans* suşu Vag-1'in AAT1a sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğu için basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir

4.7.2.2 Lokus nükleotid dizisi: ACC1 ve lokus alel: 58

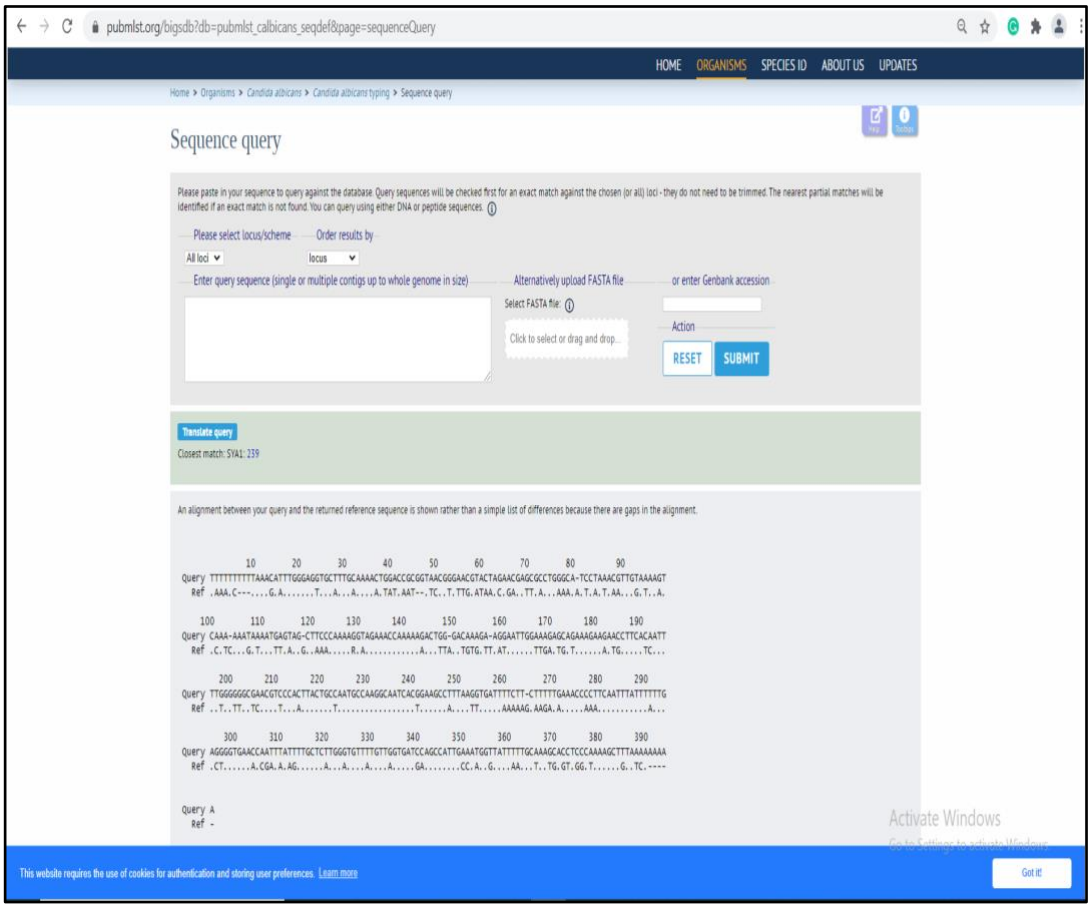
TTTTTTTTTGAGGGCATGTGTTGTTCAAACCTCTTATAGTGGGTTTCCCTGGA
AAACAGAAGCTGCCTGTTGCGGAAATTTCCCGCGGCGCTACCGCTCCCAAA
TTTTTTGTTTTTATCGTTTAGCCAGCTTCTCCCTTATTCCCCACCTTGGGTTTC
CTTTTGCAACAGGAAATCTGTCATTAACATGTTCTTACTTTTTACCTAATTCG
GAAAAACGTGATAAACGTGTGAAATAAACTCCTCCGACTGTAAAGGGAACC
TTCGGGTTGGGATAGATGAAAACTGGTGCCAAAACATCAAAAACAATATGT
TGCTGCCGACCAACCTCACGAATAAACACCAAATAAGCTTGCCTATGCTGA
GCAAAAATTTCCCCTTGTGGGGTTTGAACAACCCATGCCCTCAAAAAAAAA
A, Şekil 4.16'e bakın.



Şekil 4.16 *C. albicans* suşu Vag-1'in ACC1 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veri tabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğu için basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir

4.7.2.3 Lokus nükleotid dizisi: SYA1 ve lokus alel: 239

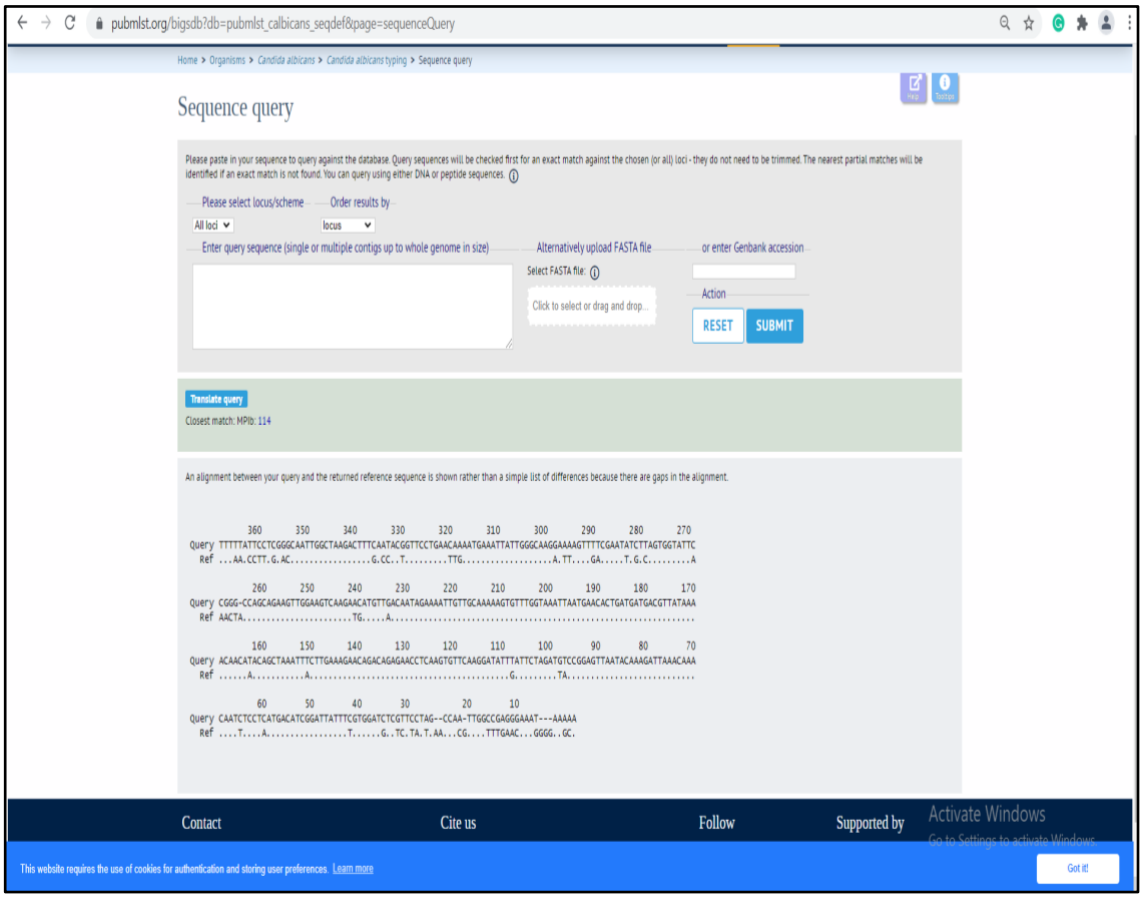
TTTTTTTTTTAAACATTTGGGAGGTGCTTTGCAAAACTGGACCGCGGTAACG
GGAACGTACTAGAACGAGCGCCTGGGCATCCTAAACGTTGTAAAAGTCAAA
AAATAAAATGAGTAGCTTCCCAAAAGGTAGAAACCAAAAAGACTGGGACA
AAGAAGGAATTGGAAAGAGCAGAAAGAAGAACCTTCACAATTTTGGGGGG
CGAACGTCCCACTTACTGCCAATGCCAAGGCAATCACGGAAGCCTTTAAGG
TGATTTTCTTCTTTTTGAAACCCCTTCAATTTATTTTTTGAGGGGTGAACCAA
TTTATTTTGCTCTTGGGTGTTTTGTTGGTGATCCAGCCATTGAAATGGTTATT
TTTGCAAAGCACCTCCCAAAAGCTTTAAAAAAAAAA, Şekil 4.17'e bakın.



Şekil 4.17 *C. albicans* suşu Vag-1'in SYA1 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğu için basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir

4.7.2.4 Lokus nükleotid dizisi: MPb1 ve lokus alel: 114

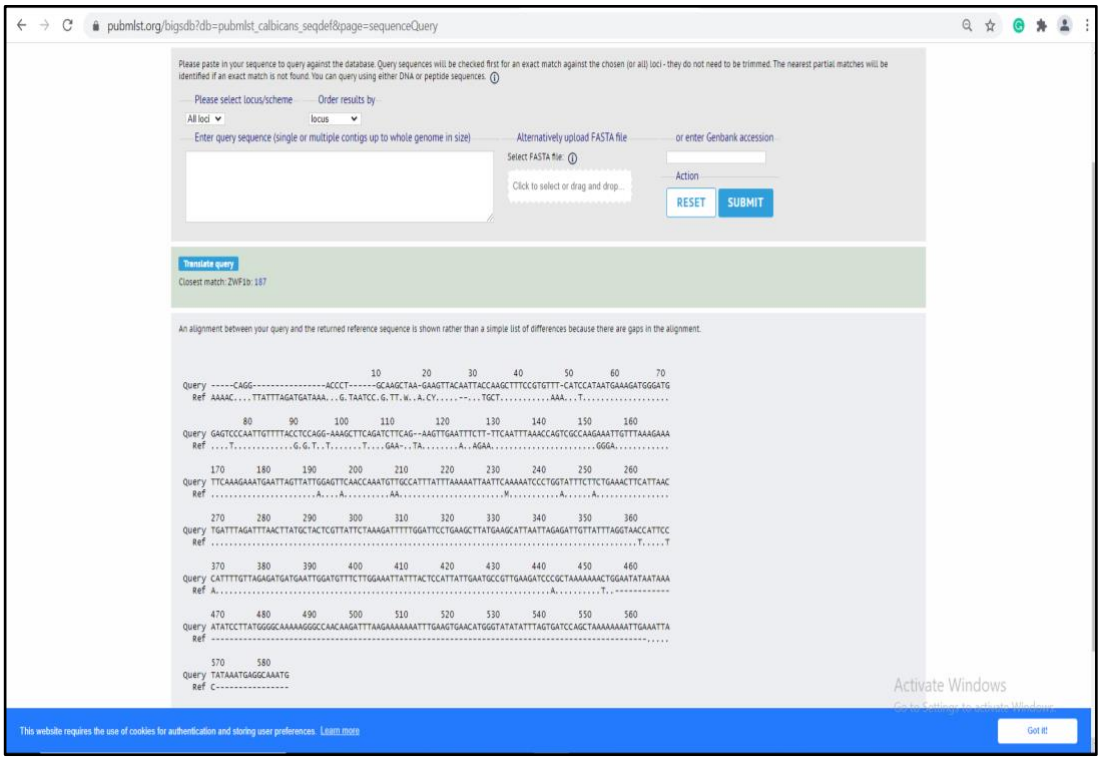
TTTTTATTTCCCTCGGCCAATTGGCTAGGAACGAGATCCACGAAATAATCCG
ATGTCATGAGGAGATTGTTTGTTTAATCTTTGTATTAACTCCGGACATCTAG
AATAAATATCCTTGAACACTTGAGGTTCTCTGTCTGTTCTTTCAAGAAATTT
AGCTGTATGTTGTTTTATAACGTCATCATCAGTGTTCATTAATTTACCAAAC
ACTTTTTGCAACAATTTTCTATTGTCAACATGTTCTTGACTTCCAACTTCTGC
TGGCCCGGAATACCACTAAGATATTCGAAAACTTTTCCTTGCCCAATAATTT
CATTTTGTTCAGGAACCGTATTGAAAGTCTTAGCCAATTGCCCGAGGAATAA
AAA, Şekil 4.18'e bakın.



Şekil 4.18 PubMLST veritabanı sunucusunda, *C. albicans* suşu Vag-1'in MPb1 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğu için basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir

4.7.2.5 Lokus nükleotid dizisi: ZWF1b ve lokus alel: 187

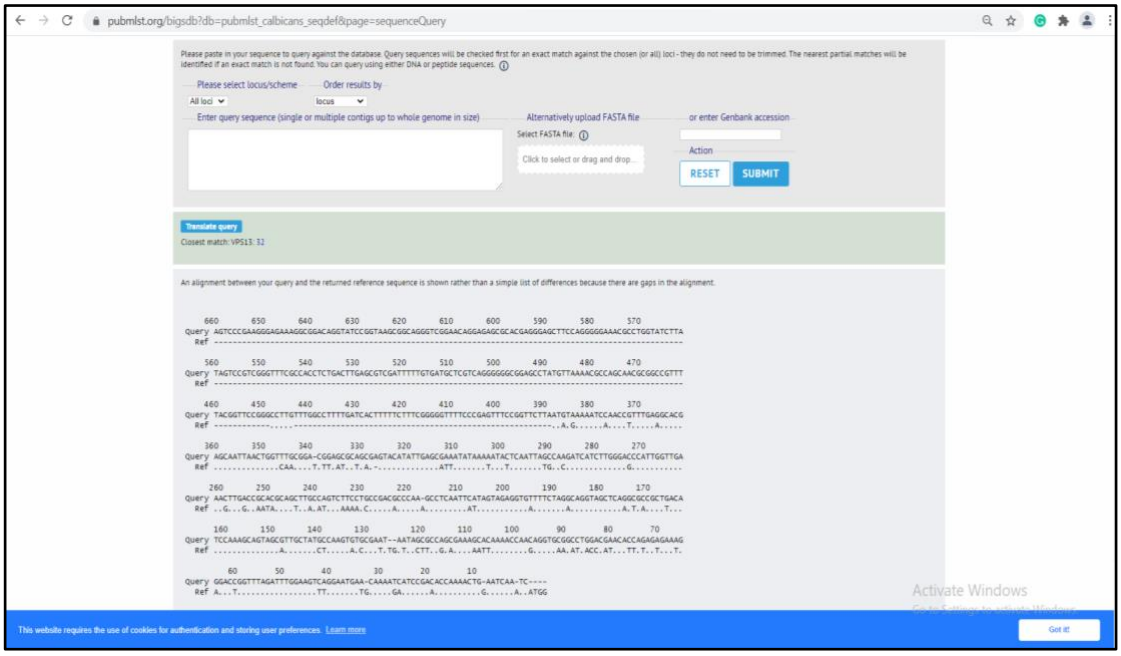
CAGGACCCTGCAAGCTAAGAAGTTACAATTACCAAGCTTTCCGTGTTTCATC
CATAATGAAAGATGGGATGGAGTCCCAATTGTTTTACCTCCAGGAAAGCTT
CAGATCTTCAGAAGTTGAATTTCTTTTCAATTTAAACCAGTCGCCAAGAAAT
TGTTTAAAGAAATTCAAAGAAATGAATTAGTTATTGGAGTTCAACCAAATG
TTGCCATTTATTTAAAAATTAATTCAAAAATCCCTGGTATTTCTTCTGAAACT
TCATTAACTGATTTAGATTTAACTTATGCTACTCGTTATTCTAAAGATTTTTG
GATTCCTGAAGCTTATGAAGCATTAATTAGAGATTGTTATTTAGGTAACCAT
TCCCATTTTGTTAGAGATGATGAATTGGATGTTTCTTGGAAATTATTTACTCC
ATTATTGAATGCCGTTGAAGATCCCGCTAAAAAAACTGGAATATAATAAAA
TATCCTTATGGGGCAAAAAGGGCCAACAAGATTTAAGAAAAAAATTTGAAG
TGAACATGGGTATATATTTAGTGATCCAGCTAAAAAAAATTGAAATTATAT
AAATGAGGCAAATG, Şekil 4.19'e bakın.



Şekil 4.19 *C. albicans* suşu Vag-1'in ZWF1b sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğundan, basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir

4.7.2.6 Lokus nükleotid dizisi: VPS13 ve lokus alel: 32

GATTGATTCAGTTTTGGTGTCGGATGATTTTGTTCATTCCTGACTTCCAAATC
TAAACCGGTCCCTTTCTCTCTGGTGTTCGTCCAGGCCGCACCTGTTGGTTTTG
TGCTTTCGCTGGCGCTATTATTCGCACACTTGGCATAGCAACGCTACTGCTT
TGGATGTCAGCGGCGCCTGAGCTACCTGCCTAGAAAACACCTCTACTATGA
ATTGAGGCTTGGGCGTCGGCAGGAAGACTGGCAAGCTGCGTGCGGTCAAGT
TTCAACCAATGGGTCCCAAGATGATCTTGGCTAATTGAGTATTTTTATATTT
CGCTCAATATGTACTCGCTGCGCTCCGTCCGCAAACCAGTTAATTGCTCGTG
CCTCAAACGGTTGGATTTTTACATTAAGAACCGGAAACTCGGGAAAACCCC
CGAAAGAAAAAGTGATCAAAAGGCCAAACAAGGCCCGGAACCGTAAAACG
GCCGCGTTGCTGGCGTTTTAACATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACA
AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACGGACTATAAGATAC
CAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGC
CGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGACT, Şekil 4.20'e bakın.



Şekil 4.20 *C. albicans* suşu Vag-1'in VPS13 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğu için basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir

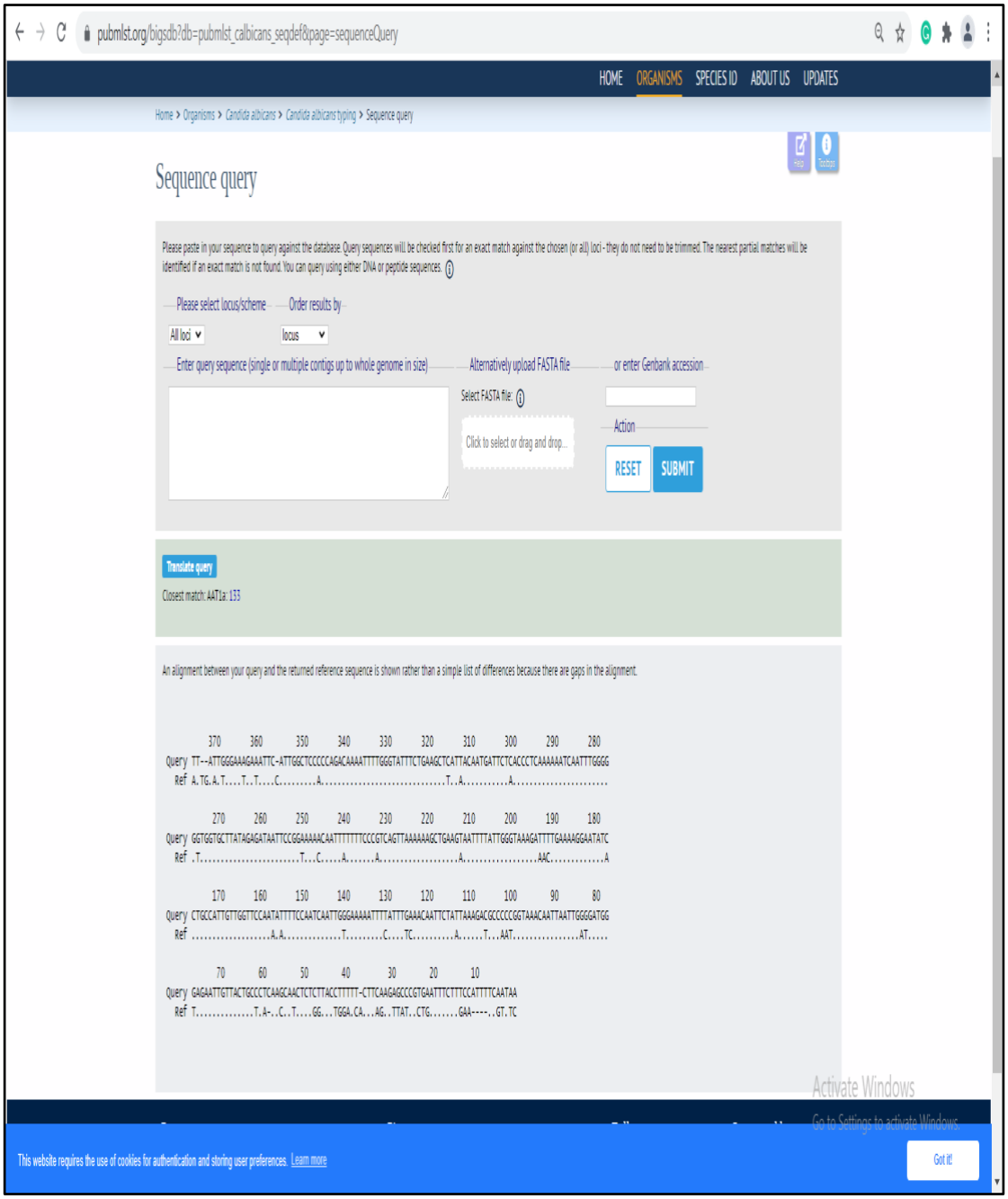
4.7.2.7 Lokus nükleotid dizisi: ADP1 ve lokus alel: 1 (1 tam eşleşme)

CACGTTGCAATGTAAATCAGGTGAGTGTATTCATAAAAGYGAAATYCCAGG
ATACACTCTCCCCGATAATCCAAAGTTCACCCTTGGTAATTTGTTTGTAATA
ATTGGRGTCTTGTTGGTTTGTRTTTTAGCTGTTGTCT
CTCTTTTGAGAAATATTAGTGAGTCRGCCTTGTTCAAGAAGAATGGGTATGA
ACCGTTGGATTCRGATCC
TAGTGTCATGAACCTAAACTTTGAGCCTACAACATTGTCCTTTGAAGATATT
AAATATGAGGTTACTGGT
GGTCGACAAATTTTAAATGGAGTCTTTGGGTTTGTAAAACCAAGAGAATGTT
TGGCTATAATGGGAGGTT
CAGGTGCTGGTAAAACTACATTGTTGGATATTTTGGCTGGTAAGAACAAAG
ATGGTAAAATCGATGGATC AATTTATGTGAACGGAAATCCAA

7 lokus housekeeping genleri için nükleotid dizileri ve *C. albicans* Vag-2 suşu için lokus alel:

4.7.2.8 Lokus adı: AAT1a ve lokus aleli: 133

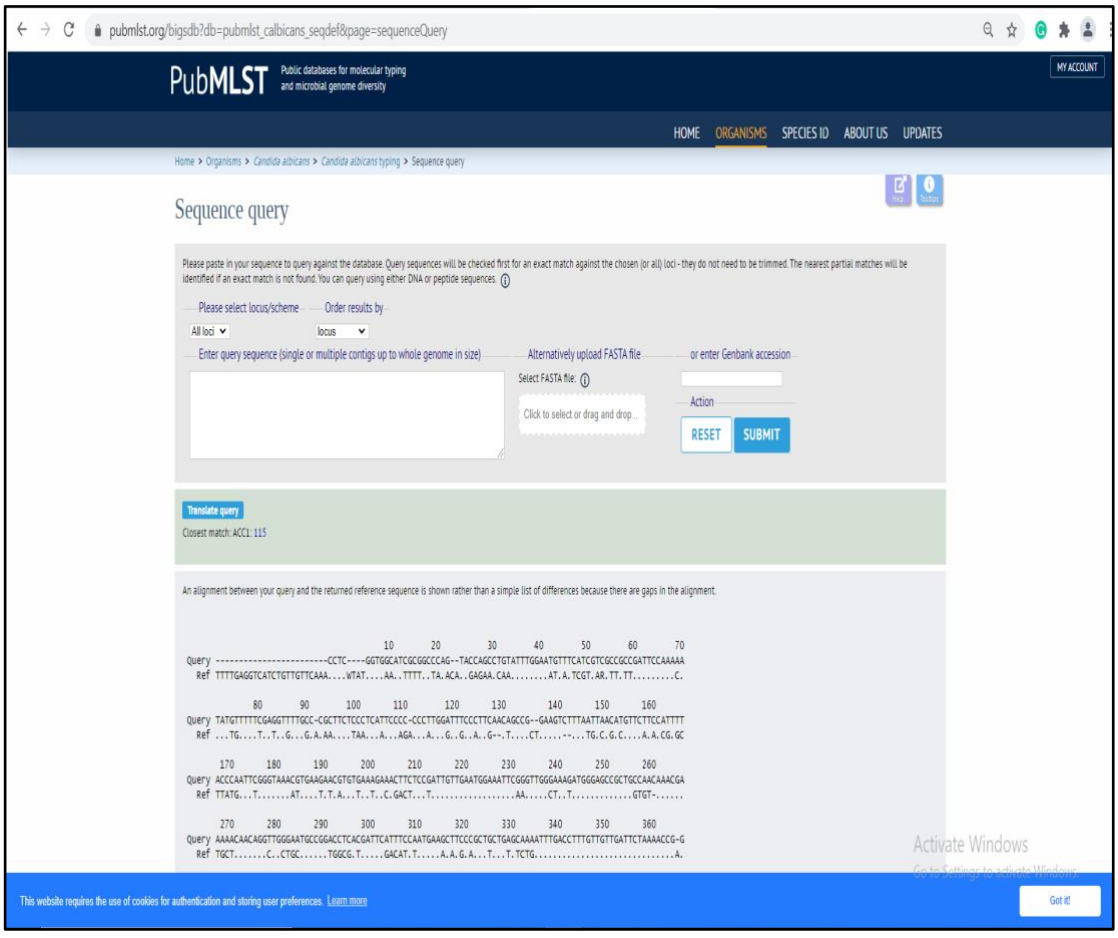
TTATTGAAAATGGAAAGAAATTCACGGGCTCTTGAAGAAAAAGGTAAGAGA
GTTGCTTGAGGGCAGTAACAATTCTCCCATCCCCAATTAATTGTTTACCGGG
GGCGTCTTTAATAGAATTGTTTCAAATAAAATTTTTCCCAATTGATTGGAAA
ATATTGGAACCAACAATGGCAGGATATTCCTTTTCAAAATCTTTACCCAATA
AAATTACTTCAGCTTTTTTAACTGACGGGAAAAAAATTGTTTTTCCGGAATT
ATCTCTATAAGCACCACCCCCCAAATTGATTTTTTGAGGGTGAGAATCATTG
TAATGAGCTTCAGAAATACCCAAAATTTTGTCTGGGGGAGCCAATGAATTTC
TTTCCCAATAA, Şekil 4.21'e bakın.



Şekil 4.21 *C. albicans* suşu Vag-2'nin AAT1a sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğu için basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir

4.7.2.9 Lokus adı: ACC1 ve lokus alel: 115

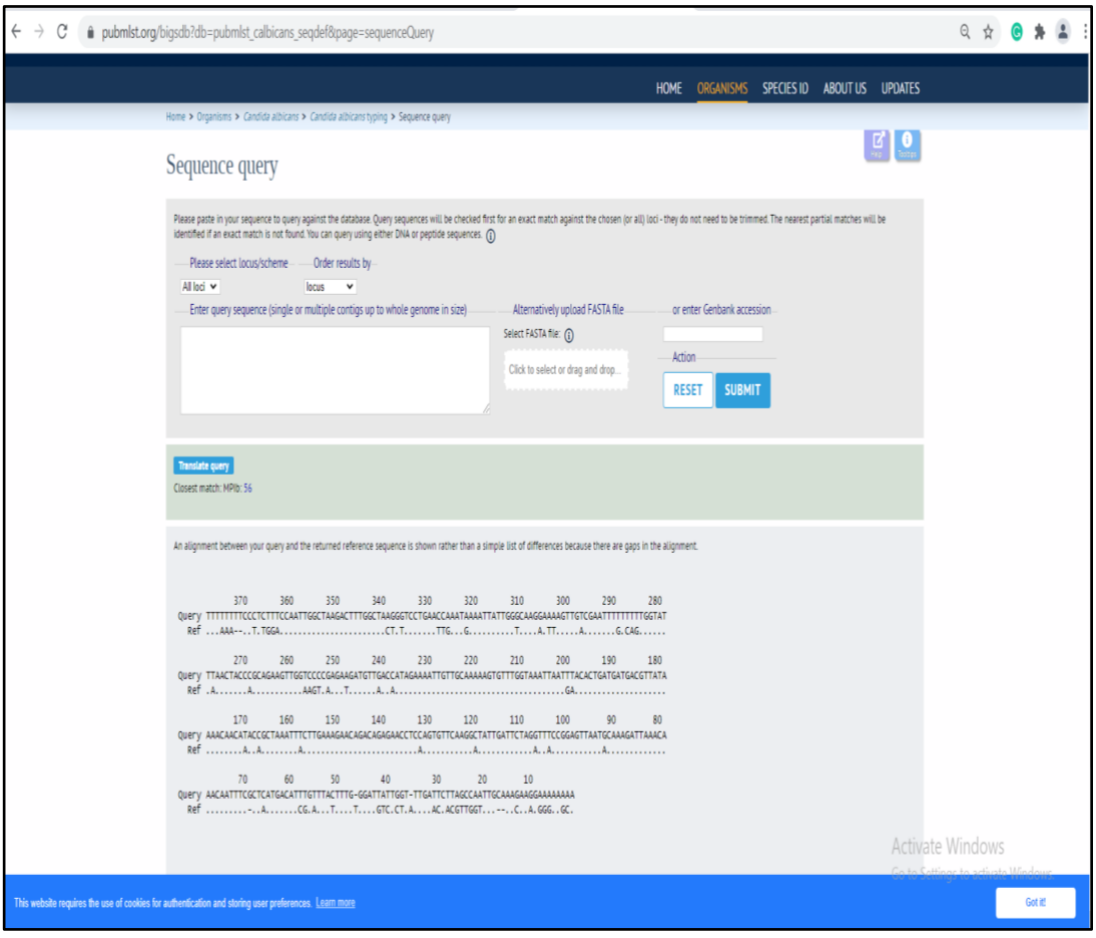
CCTCGGTGGCATCGCGGCCCAGTACCAGCCTGTATTTGGAATGTTTCATCGT
CGCCGCCGATTCCAAAAATATGTTTTTCGAGGTTTTGCCCGCTTCTCCCTCAT
TCCCCCCCTTGGATTTCCCTTCAACAGCCGGAAGTCTTTAATTAACATGTTCT
TCCATTTTACCCAATTCGGGTAAACGTGAAGAACGTGTGAAAGAAACTTCTC
CGATTGTTGAATGGAAATTCGGGTTGGGAAAGATGGGAGCCGCTGCCAACA
AACGAAAAACAACAGGTTGGGAATGCCGGACCTCACGATTCATTTCCAATG
AAGCTTCCCGCTGCTGAGCAAAATTTGACCTTTGTTGTTGATTCTAAAACCG
GCCCCCCAAAAAAGAA, Şekil 4.22'e bakın.



Şekil 4.22 *C. albicans* suşu Vag-2'nin ACC1 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğu için basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir

4.7.2.10 Lokus adı: MPb1 ve lokus alel: 56

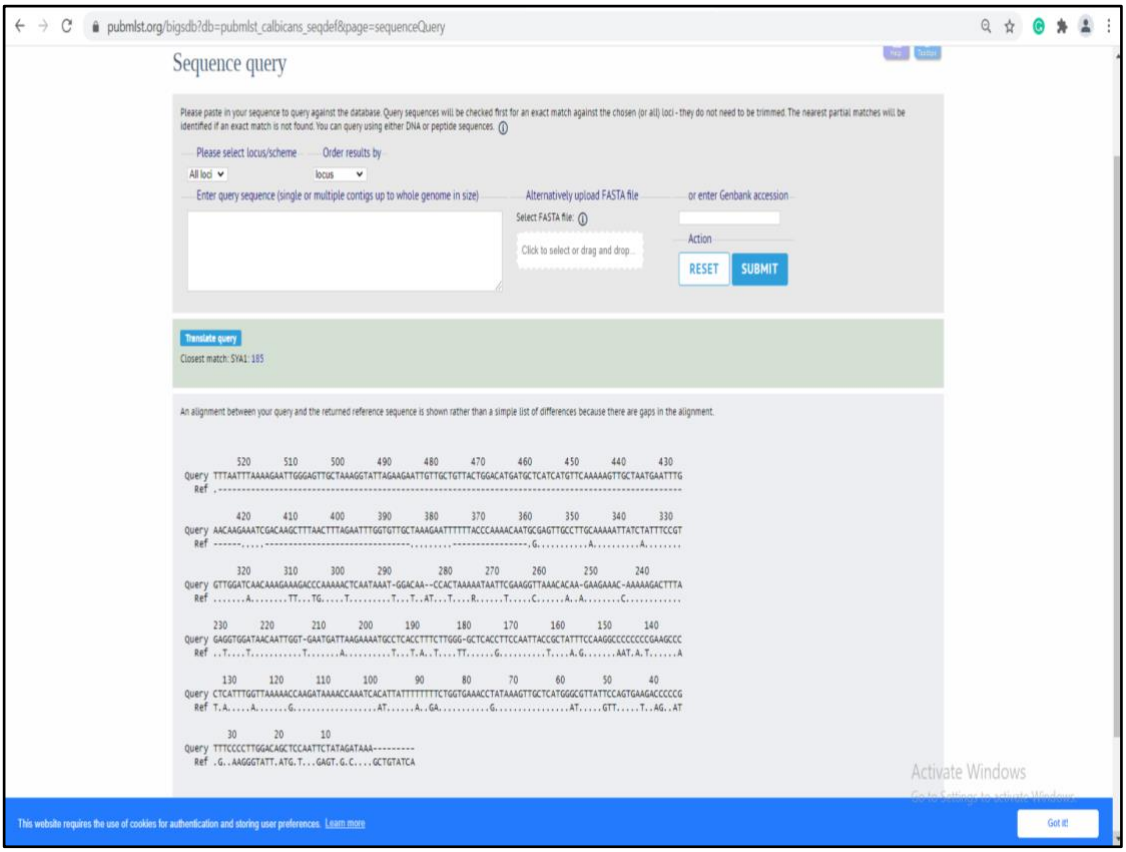
TTTTTTTTCCTTCTTTGCAATTGGCTAAGAATCAAACCAATAATCCCAAAGT
AAACAAATGTCATGAGCGAAATTGTTTGTTTAATCTTTGCATTAACTCCGGA
AACCTAGAATCAATAGCCTTGAACACTGGAGGTTCTCTGTCTGTTCTTTCAA
GAAATTTAGCGGTATGTTGTTTTATAACGTCATCATCAGTGTAAATTAATTT
ACCAAACACTTTTTGCAACAATTTTCTATGGTCAACATCTTCTCGGGGACCA
ACTTCTGCGGGTAGTTAAATACCAAAAAAAAATTCGACAACTTTTCCTTGCC
CAATAATTTTATTTGGTTCAGGACCCTTAGCCAAAGTCTTAGCCAATTGGAA
AGAGGGAAAAAAAA, Şekil 4.23'e bakın.



Şekil 4.23 PubMLST veritabanı sunucusunda, *C. albicans* suşu Vag-2'nin MPb1 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğundan, basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir

4.7.2.11 Lokus adı: SYA1 ve lokus alel: 185

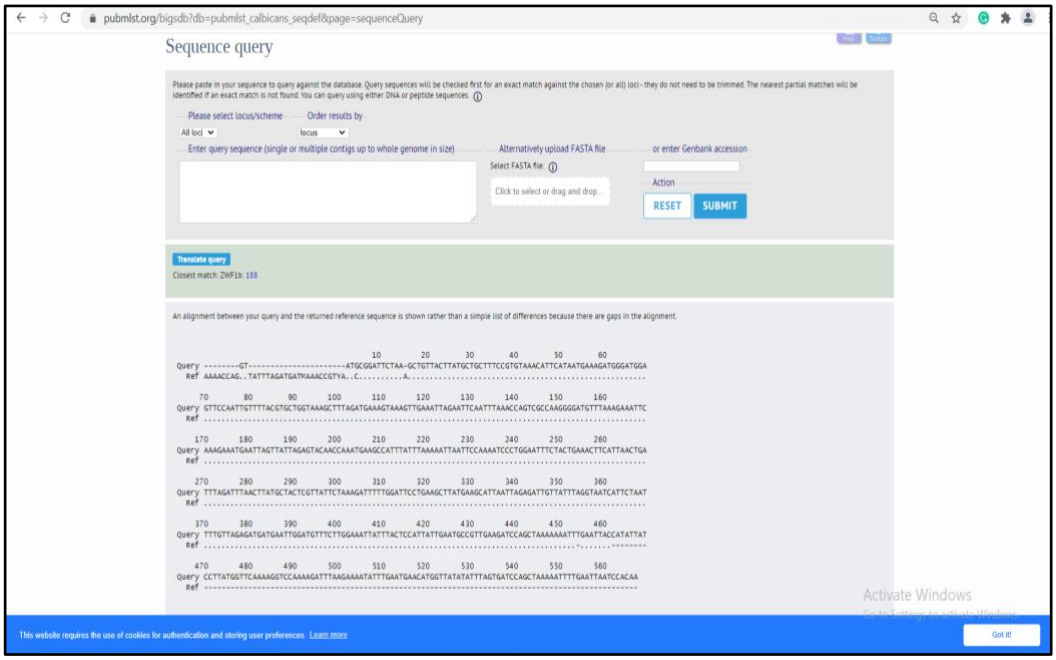
TTTATCTATAGAATTGGAGCTGTCCAAGGGGAAACGGGGGTCTTCACTGGA
ATAACGCCCATGAGCAACTTTATAGGTTTCACCAGAAAAAAAATAATGTGA
TTTGGTTTTATCTTGGTTTTTAACCAAATGAGGGGCTTCGGGGGGGGCCTTG
GAAATAGCGGTAATTGGAAGGTGAGCCCCAAGAAAGGTGAGGCATTTTCTT
AATCATTCACCAATTGTTATCCACCTCTAAAGTCTTTTTGTTTCTTCTTGTGT
TTAACCTTCGAATTATTTTTAGTGGTTGTCCATTTATTGAGTTTTTGGGTCTT
TCTTTGTTGATCCAACACGGAAATAGATAATTTTTGCAAGGCAACTCGCATT
GTTTTGGGTAAAAAATTCTTTAGCAACACCAAATTCTAAAGTTAAAGCTTGT
CGATTTCTTGTTCAAATTCATTAGCAACTTTTTGAACATGATGAGCATCATG
TCCAGTAACAGCAACAATTCTTCTAATACCTTTAGCAACTCCCAATTCTTTT
AAATTAAA, Şekil 4.24'e bakın.



Şekil 4.24 *C. albicans* suşu Vag-2'nin SYA1sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğundan, basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir

Lokus adı: ZWF1b ve lokus aleli: 188

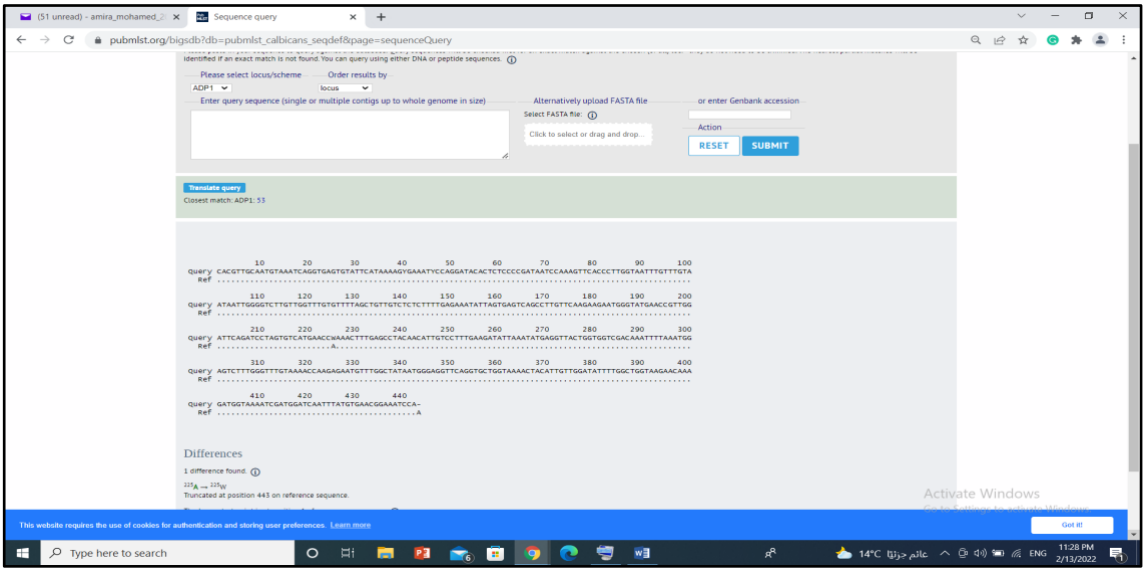
GTATGCGGATTCTAAGCTGTTACTTATGCTGCTTTCCGTGTAAACATTCATA
ATGAAAGATGGGATGGAGTTCCAATTGTTTTACGTGCTGGTAAAGCTTTAGA
TGAAAGTAAAGTTGAAATTAGAATTCAATTTAAACCAGTCGCCAAGGGGAT
GTTTAAAGAAATTCAAAGAAATGAATTAGTTATTAGAGTACAACCAAATGA
AGCCATTTATTTAAAAATTAATTCCAAAATCCCTGGAATTTCTACTGAAACT
TCATTAACTGATTTAGATTTAACTTATGCTACTCGTTATTCTAAAGATTTTTG
GATTCCTGAAGCTTATGAAGCATTAATTAGAGATTGTTATTTAGGTAATCAT
TCTAATTTTGTTAGAGATGATGAATTGGATGTTTCTTGGAAATTATTTACTCC
ATTATTGAATGCCGTTGAAGATCCAGCTAAAAAAATTTGAATTACCATATTA
TCCTTATGGTTCAAAAGGTCCAAAAGATTTAAGAAAATATTTGAATGAACA
TGGTTATATATTTAGTGATCCAGCTAAAAATTTTGAATTAATCCACAA, Şekil 4.25'e bakın.



Şekil 4.25 *C. albicans* suşu Vag-2'nin ZWF1b sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğundan, basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir

4.7.2.12 Lokus adı: ADP1 ve lokus alel: 53 (1 tam eşleşme)

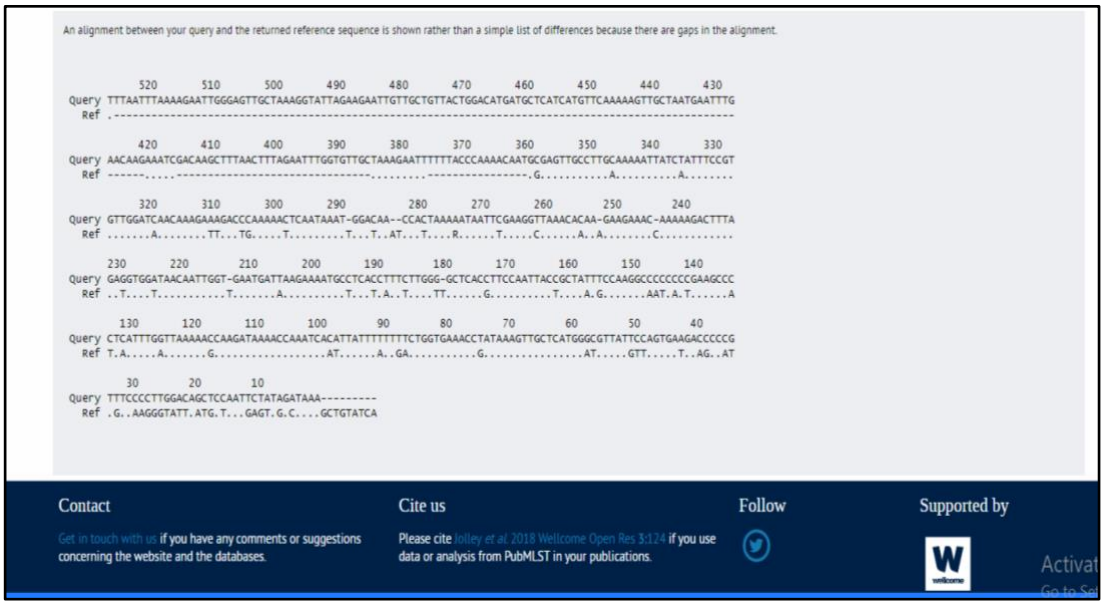
CACGTTGCAATGTAAATCAGGTGAGTGTATTCATAAAAGYGAAATYCCAGG
ATACACTCTCCCCGATAAT
CCAAAGTTCACCCTTGGTAATTTGTTTGTAATAATTGGGGTCTTGTTGGTTTG
TGTTTTAGCTGTTGTCT
CTCTTTTGAGAAATATTAGTGAGTCAGCCTTGTTCAAGAAGAATGGGTATGA
ACCGTTGGATTCAGATCC
TAGTGTCATGAACCWAAACTTTGAGCCTACAACATTGTCCTTTGAAGATATT
AAATATGAGGTTACTGGT
GGTCGACAAATTTTAAATGGAGTCTTTGGGTTTGTAAAACCAAGAGAATGTT
TGGCTATAATGGGAGGTT
CAGGTGCTGGTAAAACTACATTGTTGGATATTTTGGCTGGTAAGAACAAAG
ATGGTAAAATCGATGGATC AATTTATGTGAACGGAAATCCA, Şekil 4.26'e bakın.



Şekil 4. 26 *C. albicans* suşu Vag-2'nin ADP1 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğundan, basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir

4.7.2.13 Lokus adı: VPS13 ve lokus alel: 7 (1 tam eşleşme)

CCTTGATATGAAAATCAAACCTTTTGAAGCACGAGCAATTAACTGGTCCAC
GGATCTTAATGCTGAGGTA
CATATTGAGCATTATATAAATATATTCAATTATGCACGATCATCTTGGGAGC
CATTGGTTGAAAGTTGGC
CAATAGCAGTTTACATGTCAAAATCCCGACACCCAAAGCCTCAATTATTAGT
AGAGGTGATTTCTAGACA
GGTAGCYCAAGTGACGCTTACATCCAAAGCAGTAGCATTGCTATCTCAAGT
ATCCGATTTGATTACTTCC
RGAGAAAAATTAAAACCAAGAGGTGAAGATTACCCATACGTTATAGTGAAT
GAGACTGGTTTAGATTTGG
AAGTTTGGAATGATGCAAAAGAATCCGAAACCAAAACTGGAATCAAATCAT
GG, Şekil 4.27'e bakın.



Şekil 4. 27 *C. albicans* suşu Vag-2'nin VPS13 sorgusu ile döndürülen referans dizisi arasındaki PubMLST veritabanı sunucusundaki bir hizalama, hizalamada boşluklar olduğundan, basit bir farklılıklar listesi yerine gösterilmektedir

4.7.3 *C. albicans* vajinal patojenik suşları için kombinasyon alelik profili: Vag-1 ve Vag-2

4.7.3.1 *C. albicans* vajinal patojenik suş Vag-1 için kombinasyon alelik profile

AAT1a: 106
ACC1: 58
SYA1: 239
MP1b: 114
ZWF1b: 183
VPS13: 32
ADP1: 1

4.7.3.2 *C. albicans* vajinal patojenik suş Vag-2 için kombinasyon alelik profile

AAT1a: 133
ACC1: 115
SYA1: 185
MP1b: 56
ZWF1b: 183
VPS13: 7
ADP1: 53

4.7.4 *C. albicans* vajinal patojenik suşları için ST profilinin belirlenmesi: Vag-1 & Vag-2

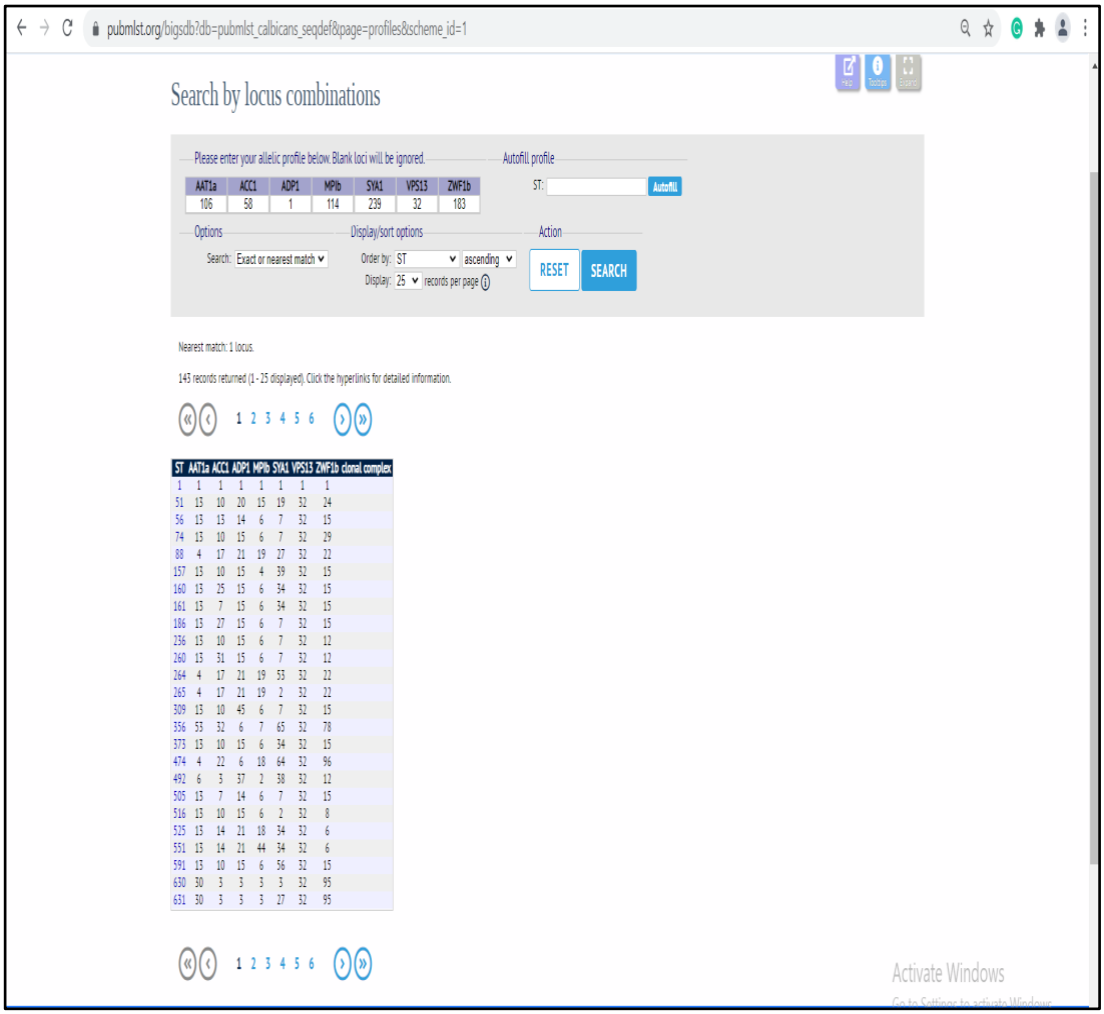
C. albicans için PubMLST veri tabanı, iki *C. albicans* patojenik suşu Vag-1 ve Vag-2 için kombinasyon alelik profili için ST'yi (dizi tipi) belirlemek için araştırıldı. Şekil 4.28, belirli bir *C. albicans* suşu için ST'nin belirlenebildiği PubMLST *C. albicans* veri tabanındaki web sayfasını göstermektedir.



Şekil 4.28 Verilen *C. albicans* suşları için ST aramak için PubMLST çevrimiçi sayfasının ekran görüntüsü

4.7.4.1 *C. albicans* vajinal patojenik Vag-1 suşu için ST profilinin belirlenmesi

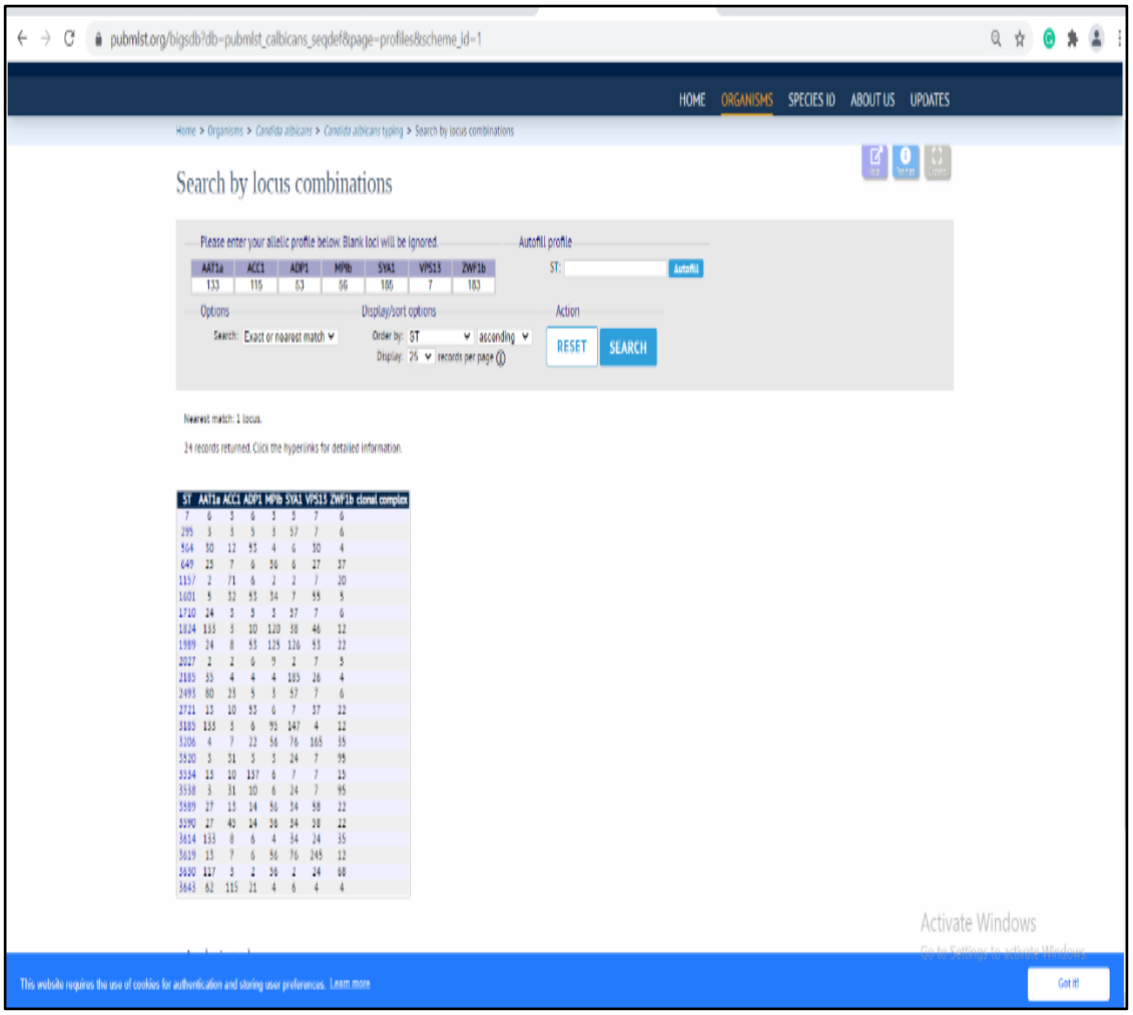
PubMLST veritabanında *C. albicans* arandığında, *C. albicans* vajinal patojenik Vag-1 suşu için alelik kombinasyon profilinin, yalnızca 1 lokus tam eşleşme ile 143 ST kaydı gösterdiğini, arama çıktısı tarafından en yakın veya en yakın eşleşme olarak önerildiğini ortaya çıkardı. Vag-1 suşu için sorgu alelik kombinasyon profili. Şekile 4.29 PubMLST veri tabanındaki *C. albicans*'ın ST kayıtlarını, Vag-1 suşu için sorgu alelik kombinasyon profiliyle tam veya en yakın eşleşmeyle gösterir.



Şekil 4.29 Vag-1 suşunun sorgu allelik kombinasyon profili için PubMLST veritabanını aramak için ST kayıtlarının bir çıktısı: 143 ST kaydından ilk 25 ST kaydı

4.7.4.2 *C. albicans* vajinal patojenik Vag-2 suşu için ST profilinin belirlenmesi

PubMLST veritabanında *C. albicans* arandığında, *C. albicans* vajinal patojenik Vag-1 suşu için alelik kombinasyon profilinin, yalnızca 1 lokus tam eşleşme ile 24 ST kaydı gösterdiğini, arama çıktısı tarafından en yakın veya en yakın eşleşme olarak önerildiğini ortaya çıkardı. Vag-2 suşu için sorgu alelik kombinasyon profili. Şekile 4.30, PubMLST veri tabanındaki *C. albicans*'ın ST kayıtlarını, Vag-1 suşu için sorgu alelik kombinasyon profiliyle tam veya en yakın eşleşmeyle gösterir.



Şekil 4.30 Vag-2 soyunun sorgu alelik kombinasyon profili için PubMLST veritabanını aramak için 24 ST kaydının çıktısı

5. TARTIŞMA

Candida türleri, insandaki mantar enfeksiyonlarının en yaygın etiyolojik ajanıdır. Candida türlerinin, yaşamı tehdit eden istilacı besinlerden yaşamı tehdit etmeyen hastalıklara, başta genitoüriner kandidiazis ve vulvovajinal kandidiazis olmak üzere dünya çapında çok çeşitli insan hastalıklarında rol oynadığı bildirilmiştir (Zaoutis *et al.* 2005). *C. albicans*, kandidiyazis adı verilen sağlık rahatsızlıklarına neden olan en yaygın candida türü olarak bildirilmiştir. Çoğu enfeksiyonda kandidiyazda *C. albicans* baskın olmasına rağmen, diğer albicans olmayan Candida (NAC) türleri çoğunlukla *C.tropicalis, C. glabrata* ve *C. krusei* (Latha and Daisy 2011). Çoğunlukla bağışıklığı baskılanmış hastalarda meydana gelen fırsatçı mantar enfeksiyonlarına sıklıkla NAC türleri aracılık eder (Knoke *et al.* 1998). Candida spp. Vajinal flora ile simbiyotik ilişki içinde hayatta kalırlar, sonuç olarak asemptomatik kolonizasyon sıktır ve yıllarca sürebilir. Candida'nın kadın genital sisteminde kolonizasyonu genç kadınlarda %20 iken, asemptomatik olarak hamile kadınlarda %30'dur (Beigi *et al.* 2004, Aguin and Sobel 2015). Candida üyelerinin tür düzeyinde hızlı ve kesin türlenmesi, etkili bir tedaviyi gerçekleştirmek için sağlam bir stratejiyi uyarlamak için uygun antifungal ilaçların seçiminde büyük önem taşır. Irak'ta yürütülen bu çalışmada, elli Candida türünden iki *C. albicans* suşu (n=2/50= %4) izole edilmiş ve vajinal örnekte doğrulanmıştır, %96 (n=48/50=%96) NAC türü mevcuttu. 2018'de Etiyopya'da daha önce yapılan bir çalışma, vajinal sürüntülerden izole edilen en baskın patojenin *C. albicans* olduğunu (n=51/81= %62,96) ve NAC türleri vajinal sürüntü örneklerinden elde edilen toplam Candida türlerinin %37'sini (n=30/81) temsil ettiğini ortaya koydu (Bitew and Abebaw 2018). 2016'da Mısır'da yapılan diğer bir çalışma, *C. albicans* ve NAC türlerinin sırasıyla %60 (n=38/63) ve %39,7'sini (n=25/63) temsil ettiğini çıkarmıştır (ElFeky and Masadeh 2016). Amerika'da Richter ve ark. vajinal sürüntü örneklerinde sırasıyla %72,4 (n=420/580) ve %27,7 (n=160/580) *C. albicans* ve NAC türlerinin görülme sıklığı olduğunu bildirmiştir (Richter *et al.* 2010). Lübnan'da hamile kadınlar üzerinde yapılan bir araştırma, vajinal sürüntülerden izole edilen Candida türlerinin %42'sinin *C. albicans*'a ait olduğunu göstermiştir (Ghahfarokhi *et al.* 2020).

Açıkçası, NAC türleri ile karşılaştırıldığında *C. albicans*'ın çokluğu ülkeler arasında farklılık göstermektedir. 2020 yılında son 10 yılda yapılan bir meta-analiz çalışması

vajinal sürüntülerde *C. albicans* dağılımının şu sırada olduğunu göstermiştir: Malysia'da (2011) %80, Arjantin ve Çin'de %80 (2016), %78 Tunus'ta (2015), Yunanistan'da %78 (2017), Kuveyt'te %75 (2011), Hindistan'da %75 (2010), Nepal'de %65 (2015), İran ve Brezilya'da %65 (2016), %65 Türkiye'de (2012), Mısır'da %45 (2012), Lübnan ve Pakistan'da %43 (2016) ve Burkina Faso'da %43 (2015) (Kalkancı and Erhun 2012, Brandolt *et al.* 2017, Zhai *et al.* 2018, Maraki *et al.* 2019).

2003-2007 arasındaki 4 yıllık bir süre boyunca Candida türlerine özgü PCR kullanılarak Candida türlerinin prevalansını araştıran servikovajinal sürüntülerden alınan 93,775 örneği kapsayan retrospektif bir çalışma, Amerika Birleşik Devletleri'nde en yüksek görülme sıklığını (%89) *C. albicans*'ın gösterdiğini ortaya koydu. Çeşitli yaş kümeleri arasında türlerin görülme sıklığı, yaş arttıkça NAC türlerinin yüzdesinde bir yükselme göstermiştir (Vermitsky *et al.* 2008). Irak'ta daha önce yapılan bir çalışma, kadın hastaların %38'inin vajinal sürüntülerden izole edildiği gibi *C. albicans* ile enfekte olduğunu göstermiştir. Shekhany, 2016-2018 yılları arasında Irak'ta gerçekleştirdiği çalışmasına katılan kadınların %56,14'ünün vajinal sürüntülerden *C. albicans* gösterdiğini belirtti (%56,14 2021). Yadav ve Prakash, kadın hastalardan alınan vajinal sürüntülerde *C. albicans*'ın görülme yüzdesi (%64,04) olduğunu bildirmiştir (Yadav and Prakash 2016). Nordenmalm ve ark. kadın hastalardan alınan vajinal sürüntülerde %35,55 oranında *C. albicans* bulunduğu sonucuna varılmıştır (Nordenmalm *et al.* 2019). Nabi ve diğerleri, Bangaladesh'teki kadın hastalardan toplanan vajinal sürüntüler üzerinde yaptıkları çalışmadan, örneklerin yaklaşık %77'sinin *C. albicans* içerdiğini çıkarmıştır (Nabi *et al.* 2017). Guragain ve Bichchha, *C. albicans*'ın kadın hastalardan toplanan toplam vajinal sürüntü numunesi sayısının %57,8'ini temsil ettiğini bildirmiştir. Bu çalışmada vajinal enfeksiyonlarda az sayıda *C. albicans* olması, vajinal enfeksiyonlarda Candida dışı enfeksiyonların değişme eğiliminin büyük ölçüde altını çizmektedir. Vajinal enfeksiyonlar için Candida dışı patojenlerin değişen eğilimine ilişkin mevcut bulgu, daha önceki diğer çalışmalar tarafından rapor edilmiştir (Bitew and Abebaw 2018). Candida üyelerinin vajinal enfeksiyonlardaki bu kayma eğilimi, antibiyotiklerin aşırı ve yanlış kullanımı sonucu ortaya çıkması muhtemel vajinal floradaki değişikliğe bağlanabilir. Vajinal enfeksiyonlarda Candida dışı patojenlerdeki bu kayma eğiliminin bir diğer olası

nedeni, dezenfektan içeren temizleyicilerin rutin kullanımını gerektiren kadınların hijyen uygulamalarıdır.

Vajinal patojenin kimliği, hasta için doğru tedaviyi uyarlama ve ayarlamada kilit bir belirleyicidir. Bu çalışmadaki bir sınırlama, Candida türlerinin *C. albicans*'a benzediği için *C. africana*'yı dışlamadan *C. albicans* olarak tanımlanmasıdır ve mevcut hiçbir ticari araç, dişi genital sisteminde hayatta kalan yakından ilişkili iki patojen arasında ayrım yapamamıştır. Sonuç olarak, HWP1 (hyphal wall protein 1) genini amplifiye etmek için bir PCR aracı aracılığıyla vajinal enfeksiyonlarla ilişkili etiyolojik ajanın ortaya çıkarılmasıyla ilgili ileriye dönük çalışmalarda şiddetle tavsiye edilir. HWP1 genine özgü primer kullanılarak HWP1'in PCR yoluyla amplifikasyonunun, *C. albicans* ve *C. africana* arasında ayrım yapmak için sağlam bir moleküler yaklaşım olduğu bildirildi (Ghahfarokhi *et al.* 2020). Klinik örnekte patojenin hızlı ve doğru tanımlanması, patojenin kesin tespiti ışığında çok önemli bir konu ve zorunlu bir görevdir ve bu nedenle hastaya ve sağlıklı bireylere profilaktik amaçlı doğru bir antibiyotik önerilecektir. Klinik laboratuvarlarda klinik numunelerde *C. albicans* teşhisi için kullanılan metodolojiler çoğunlukla CHROMagar Candida besiyeri ve VITEK®2 sisteminin kullanımı ile sınırlıdır. CHROMagar Candida ortamının prensibi, Candida'ya özgü enzimlerin CHROMagar ortamına dâhil edilen belirli substratlar üzerindeki etkisinin bir sonucu olarak kültürlenmiş kolonilerin renklendirilmesidir. CHROMagar besiyerindeki zorluk, tür düzeyinde Candida izolatını türlendirmedeki etkinliğidir. Bu besiyeri çeşitli çalışmalarda Candida spp'nin tanımlanması sırasında kullanılıyordu. Bu besiyeri ile ilgili çoğu çalışma, hem izolatlardan elde edilen stok kültür hem de doğrudan klinik örneklerle yürütülmüştür (Jabra-Rizk *et al.* 2001, Lee *et al.* 2003). Bu çalışmalarda, CHROMagar Candida besiyeri kullanılarak izole edilen patojenin doğru tanımlanma yüzdeleri %99,4-95 arasında değişmektedir (Jabra-Rizk *et al.* 2001, Dewing *et al.* 2003, Ann Chai *et al.* 2010). Sarıgüze *et al.* CHROMagar Candida besiyerinin kan kültürlerinden *C. albicans* patojenlerini tanımlamada %100 doğruluk gösterdiğini kanıtlamıştır. Daef ve diğerleri tarafından yürütülen bir çalışmada, CHROMagar Candida besiyerinin duyarlılığı ve özgüllüğü tahmin edilmiştir ve *C. albicans* için sırasıyla %100 ve %98,9'dur (Sahoo *et al.* 2014). Willinger ve ark. CHROMagar Candida besiyerinin *C. albicans* için %98,8 duyarlılık ve %100 özgüllük verdiğini bildirmiştir (Sahoo *et al.* 2014). Bununla birlikte,

Baradkar ve ark. laboratuvarda *C. albicans* teşhisi ışığında CHROMagar Candida besiyeri için %96,55 duyarlılık ve %96,42 özgüllük olduğu sonucuna varılmıştır (Baradkar *et al.* 2010). Ann Chai ve ark., ise CHROMagar Candida besiyerinin duyarlılığını ve özgüllüğünü *C. albicans*'ın laboratuvar teşhisi için sırasıyla %99.4 ve %100 olarak bildirmiştir (Ann Chai *et al.* 2003). Özcan ve diğerleri, *C. albicans*'ın laboratuvar teşhisi için CHROMagar Candida besiyerinin daha düşük duyarlılık ve özgüllük düzeylerini sırasıyla %87,5 ve %100 gösterdi. Scharmann ve diğerleri, CHROMagar Candida besiyerinde *C. albicans*'ın laboratuvar tespiti ve teşhisi için yalnızca %68 duyarlılık ve %82 özgüllük bildirmiştir (Scharmann *et al.* 2019). Nazir ve Kanth, *C. albicans* tanı amaçlı CHROMagar Candida besiyerinin duyarlılık ve özgüllüğü için sırasıyla %100 ve %96 rapor etmiştir. Mehta ve Wyawahare 115 Candida izolatı üzerinde yaptıkları çalışmada, CROMagar Candida besiyerinin klinik örneklerden Candida türlerinin tanımlanması için hızlı, doğru ve uygun bir yöntem olduğu sonucuna varmıştır Devi ve ark., Selvam ve ark., Redpath ve diğerleri ve Sajjan ve diğerleri, Candida türlerinin tanımlanması için CHROMagar çıktısının geleneksel yöntemlerin çıktısına uygun olduğunu doğruladı (Selvam *et al.* 2011, Redpath *et al.* 2013).

VITEK®2 sistemi (bioMérieux, Fransa), mikrobiyal tanımlama duyarlılık testleri adına tam otomatik bir cihaz olarak adlandırılır. Örneğin, yalnızca değil, VITEK®2 sistemi, klinik numunelerdeki tıbbi açıdan önemli mayaların teşhisi için hızlı ve doğru bir yaklaşımdır. VITEK® 2 sistemi, tanımlama için değiştirilen süreyi kısaltır ve sonuçların laboratuvarlar içinde ve arasında standardizasyonuna izin verir. VITEK®2 sistemi, hızlı epidemiyolojik raporların yayınlanmasına yardımcı olur. Etkili tedavi ve profilaktik önlemlerin doğru reçete edilmesi bağlamında büyük önem taşıyan bir konuda klinik laboratuvarlarda tıbbi açıdan önemli patojenlerin tanımlanmasında kullanılan bir mikrobiyal yaklaşımın tekrarlanabilirliği. Martin ve diğerleri, %100 doğru tanımlama ile 32 Candida izolatının tanımlanmasında VITEK®2 sisteminin tekrarlanabilirliğini ele almıştır (Klinik olarak ilgili maya türlerinin antifungal duyarlılığını belirlemek ve test etmek için VITEK®2 sisteminin kullanılması (Martin *et al.* 2013). Alfouzan ve diğerleri, *C. albicans*'ın tanımlanması için VITEK®2 sistemi ile Etest arasındaki kategorik anlaşmayı doğrulamıştır (Alfouzan *et al.* 2017). Hirsch ve diğerleri, klinik örneklerden Candida izolatlarının tanımlanması ve türlenmesi için VITEK®2 sisteminin

duyarlılığının ve özgüllüğünün her ikisinin de %100 olduğunu bildirmiştir (Hirsch *et al.* 2020).

Belirli bir türe ait mikrobiyal suş türleri arasında ayrım yapma potansiyeli, özellikle epidemiyologlar için son derece önemli bir konu haline gelmektedir. Bir suş düzeyinde bir patojenin yazılması, salgınlardan sorumlu etiyolojik ajanların izlenmesini ve ayrımını kolaylaştırmaya yardımcı olur. En fazla, epidemiyologlar, aynı türe atanan iki mikrobiyal izolatın aynı türe mi yoksa farklı türe mi ait olduğu konusunda bir tartışma içindedir. Bu tartışmaya sağlam bir cevap arama bağlamında, tartışmalı suşların kimliği hakkında net bir fikir vermek için sağlam bir metodoloji kullanılmalıdır. Açıkçası, bir yaklaşımın inceliği, maliyet etkinliği, yüksek ayrım gücü, hızlılık, tekrarlanabilirlik, doğruluk ve özgüllük gibi birkaç konu tarafından vurgulanmaktadır. Tür kimliğini ortaya çıkarma bulmacasına olası bir cevap, iki suş için tam genom dizilerini karşılaştırmak olabilir. Bununla birlikte, genomun oldukça değişken lokuslarında dizi varyasyonları hızlı bir şekilde meydana gelebilir ve bu da suş kimliğini ortaya çıkarmada bir zorlukla sonuçlanabilir. Öte yandan, MLST, altı ila sekiz kromozomal lokustan oluşan bir dizi düzeyinde bir ata türünden kaynaklanan suşlar arasındaki benzerlik ve farklılıkların izini sürer. Tavanti ve meslektaşları MLST yaklaşımını uyarladılar (Tavanti *et al.* 2003). MLST yaklaşımı, mevcut fenotipik ve genotipik tipleme yöntemlerine göre bir takım faydalar gösterir. MLST yöntemlerinde kullanılan lokusların dizilenmesinden elde edilen veriler, alternatif teknolojilere kıyasla analizde biraz daha yüksek düzeyde tekrarlanabilirlik ve minimum önyargı sağlar. Ayrıca, bu veriler, ilgili tüm araştırmacıların erişimine açık çevrimiçi veri tabanında saklanabilir. Şu anda, MLST veritabanı yani PubMLST, https://pubmlst.org/ sunucusunda bulunmaktadır. Şu anda, Candida epidemiyolojisi bir teknoloji paneli tarafından zaten araştırılmıştır. Bununla birlikte, Candida MLST yaklaşımından elde edilen veriler, halk sağlığı komplikasyonlarında rol oynayan salgın ve pandemik suşların insidansını ve prevalansını daha fazla ortaya çıkarmak için Candida epidemiyolojisi ile ilgili önceki bulguları doğrulayacaktır.

Klinik kullanım için bakteriyel MLST'ye benzer tarzda PubMLST veri tabanında depolanan daha önceki Candida MLST şeması, 1994'de Bougnoux ve arkadaşları

tarafından *C. albicans* için uyarlanmıştır (Bougnoux *et al.* 1994). Mevcut *C. albicans* MLST şeması, *C. albicans'*ın ayrımına izin verir ve 7 housekeeping (consensus) geninde, yani AAT1a, ACC1, SYA1, MP1b, ZWF1b, VPS13 ve ADP1'de bir nükleotid seviyesindeki (SNP) dizi varyasyonlarının izlenmesine dayanır (Tavanti *et al.* 2003).

Temel bir kural olarak, bakteriyel MLST için sıralanacak seçilen genler, geleneksel olarak kodlanmış "housekeeping" işlevleri (metabolik aktiviteler) ile çeşitlendirme seçimi olarak stabilize seçim ile yakından ilişkili suşlar arasındaki ilişkileri gizleyebilir (Tavanti *et al.* 2003).

Candida türleri ile MLST için kullanılan genlerin çoğu için kullanılan SNP'ler, kodlanmış peptitlerinde, seçimin stabilize edilmesi için karakter olan 1.0'dan az olan eşanlamlı olmayan ila eşanlamlı amino asit değişikliklerinin ayrıntılı oranlarını (dN/dS) detaylandırır. Bununla birlikte, Taylor ve Fisher, akla gelebilecek kadar çok dizi çeşitliliği ile MLST lokuslarını seçtiler (Taylor and Fisher 2003). C. krusei için PubMLST şeması (Jacobsen *et al.* 2007), tam olarak bu mantık için dN/dS oranları >1 olan lokusları içerir.

MLST için vaat değeri olan genlerin seçimi, sağlam SNP'lerin (tek nükleotid polimorfizmleri) belirlenmesine yardımcı olmak için tüm genomik dizi verilerine erişilebilir olduğunda basitçe uyarlanabilir. Bununla birlikte, genomik bilgide kıtlık olması durumunda, yaklaşım, olası housekeeping genlerinin konsensüs lokuslarına karşı tasarlanmış dejenere primerlerin kullanılmasıyla bilgiye erişilebilen genlerin sıralanmasıyla, varsayılan olarak çeşitli suşlardan oluşan bir panelin bazı isabet ve ıska testlerini içerir. Bu, *C. krusei* için PubMLST şemasının oluşturulması için geçerlidir (Jacobsen *et al.* 2007).

Pratik olarak, MLST yaklaşımıyla bir suş yazmak için genomik DNA izole edilir; altı (C. glabrata, *C. krusei* ve *C.tropicalis* için), yedi (*C. albicans* için) veya sekiz (*C. dubliniensis* için) PCR uygun primer setleri ile yürütülür. PCR ürünleri daha sonra çift yönlü dizilemeden önce saflaştırmaya tabi tutulur. Dizilemeden türetilen kromatogramlar görsel olarak test edilir ve heterozigot SNP'ler (*C. albicans, C. dubliniensis, C. krusei* ve *C. tropicis*) için analiz edilir. Her dizi, türler için PubMLST veri tabanında depolanan

referans diziyle eşleştirilir. Mevcut bir diziyle karşılaştırılabilir ise, o dizinin alel numarası (*C. glabrata*) veya (diploid) genotip numarası (*C. albicans, C. dubliniensis, C. krusei ve C.tropicalis*) atanacaktır. Yeni bir dizi ise, bilgi yeni alel/ genotip numaralarını atamaktan sorumlu personel olan Web veritabanı küratörüne gönderilir. Genel olarak konuşursak, altı ila sekiz alel/genotip numarası seti, PubMLST veri tabanına atıfta bulunarak veya buna eklenerek bir kez daha numaralandırılacak olan bir suş tipini tanır.

6. SONUÇ

1. Elli kadın hastadan alınan elli vajinal sürüntüden ikisinde vulvovajinit etiyolojik ajanı olarak iki *C. albicans* ortaya çıktı. Patojen *C. albicans*'ın iki suşunun morfolojik, VITEK2 sistemi ve moleküler tanımlaması iyi uyum sağlamıştır. *C. albicans'*ın iki vajinal patojenik suşu, MLST yaklaşımıyla gerçekleştirilen ST profillerine dayalı olarak yeni suşlar gibi görünüyordu.

2. Iraklı kadınlar arasında vulvovajinitin baskın etiyolojik ajanı hakkında daha doğrulanmış sonuçların elde edilmesi ve bu kadınların vajinal sürüntülerinden izole edilen *C. albicans* suşlarının moleküler epidemiyolojisinin ortaya çıkarılması için daha büyük örneklem boyutlarını kapsayacak ileriye dönük çalışmalar şiddetle tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

Abacı, O. 2008. Eğitimde müzelerden yararlanma. Muradiye Eğitim Kültür Sanat Dergisi, 4: 58-65.

Aguin, T. J., & Sobel, J. D. 2015. Vulvovaginal candidiasis in pregnancy. Current Infectious Disease Reports, 17: 30.

Albrecht, A., Felk, A., Pichova, I., Naglik, J. R., Schaller, M., de Groot, P., Monod, M. 2006. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of candida albicans target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions. Journal of Biological Chemistry, 281: 688-694.

Al-Fattani, M. A., & Douglas, L. J. 2004. Penetration of candida biofilms by antifungal agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48: 3291-3297.

Alfouzan, W. A., & Dhar, R. 2017. Candiduria for evidence-based approach to management, are we there yet. Journal de Mycologie Medicale, 27: 293-302.

Almeida, R. S., Brunke, S., Albrecht, A., Thewes, S., Laue, M., Edwards Jr, J. E., Hube, B. 2008. The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of Candida albicans mediates iron acquisition from host ferritin. PLoS Pathog., 4: e1000217.

Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Molero, G., Diez-Orejas, R., Gustin, M., Pla, J., Nombela, C. 1999. Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of Candida albicans. Journal of Bacteriology, 181: 3058-3068.

Andes, D. R., Safdar, N., Baddley, J. W., Playford, G., Reboli, A. C., Rex, J. H., Kullberg, B. J. 2012. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis. Clinical Infectious Diseases, 54: 1110-1122.

Andes, D., Nett, J., Oschel, P., Albrecht, R., Marchillo, K., & Pitula, A. 2004. Development and characterization of an in vivo central venous catheter Candida albicans biofilm model. Infection and Immunity, 72: 6023-6031.

Ann Chai, L. Y., Denning, D. W., & Warn, P. 2010. Candida tropicalis in human disease. Critical Reviews in Microbiology, 36: 282-298.

Baez, M. 1987. Les reptiles des îles Canaries. Bulletin de la Société zoologique de France, 112: 153-164.

Baillie, G. S., & Douglas, L. J. 1998. Effect of growth rate on resistance ofcandida albicans biofilms to antifungal agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42: 1900-1905.

Baillie, G. S., & Douglas, L. J. 1999. Role of dimorphism in the development of candida albicans biofilms. Journal of Medical Microbiology, 48: 671-679.

Baradkar, V. P., Mathur, M., & Kumar, S. 2010. Hichrom candida agar for identification of Candida species. Indian Journal of Pathology and Microbiology, 53: 93.

Beigi, R. H., Meyn, L. A., Moore, D. M., Krohn, M. A., & Hillier, S. L. 2004. Vaginal yeast colonization in nonpregnant women. Obstetrics and Gynecology, 104: 926-930.

Berman, J. 2012. Candida albicans. Current Biology, 22: R620-R622.

Birrenbach, T., Bertschy, S., Aebersold, F., Mueller, N. J., Achermann, Y., Muehlethaler, K., & Zimmerli, S. 2012. Emergence of blastoschizomyces capitatus yeast infections, central Europe. Emerging Infectious Diseases, 18: 98.

Bitew, A., & Abebaw, Y. 2018. Vulvovaginal candidiasis: species distribution of Candida and their antifungal susceptibility pattern. BMC Women's Health, 18: 1-10.

Blankenship, J. R., & Mitchell, A. P. 2006. How to build a biofilm. Current Opinion in Microbiology, 9: 588-594.

Bonhomme, J., & d'Enfert, C. 2013. Candida albicans biofilms. Current Opinion in Microbiology, 16: 398-403.

Borneman, A. R., Leigh-Bell, J. A., Yu, H., Bertone, P., Gerstein, M., & Snyder, M. 2006. Target hub proteins serve as master regulators of development in yeast. Genes and Development, 20: 435-448.

Bougnoux, P., Koscielny, S., Chajes, V., Descamps, P., Couet, C., & Calais, G. 1994. α-Linolenic acid content of adipose breast tissue: a host determinant of the risk of early metastasis in breast cancer. British Journal of Cancer, 70: 330-334.

Brand, A., & Gow, N. A. 2009. Mechanisms of hypha orientation of fungi. Current Opinion in Microbiology, 12: 350-357.

Brand, A., Shanks, S., Duncan, V. M., Yang, M., Mackenzie, K., & Gow, N. A. 2007. Hyphal orientation of Candida albicans is regulated by a calcium-dependent mechanism. Current Biology, 17: 347-352.

Brand, A., Vacharaksa, A., Bendel, C., Norton, J., Haynes, P., Henry-Stanley, M., Gale, C. A. 2008. An internal polarity landmark is important for externally induced hyphal behaviors in Candida albicans. Eukaryotic Cell, 7: 712-720.

Brandolt, T. M., Klafke, G. B., Gonçalves, C. V., Bitencourt, L. R., Martinez, A. M. B. D., Mendes, J. F., & Xavier, M. O. 2017. Prevalence of Candida spp. in cervical-vaginal samples and the in vitro susceptibility of isolates. Brazilian Journal of Microbiology, 48: 145-150.

Brock, M. 2009. Fungal metabolism in host niches. Current Opinion in Microbiology, 12: 371-376.

Brown, A. J., Haynes, K., Gow, N. A., & Quinn, J. 2011. Stress responses in candida. Candida and Candidiasis, 23: 225-242.

Cannon, R. D., Lamping, E., Holmes, A. R., Niimi, K., Tanabe, K., Niimi, M., & Monk, B. C. 2007. Candida albicans drug resistance–another way to cope with stress. Microbiology, 153: 3211-3217.

Cartwright, N. E. K., Tyrer, J. R., & Marshall, J. 2011. Age-related differences in the elasticity of the human cornea. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 52: 4324-4329.

Cashikar, A. G., Duennwald, M., & Lindquist, S. L. 2005. A chaperone pathway in protein disaggregation Hsp26 alters the nature of protein aggregates to facilitate reactivation by Hsp104. Journal of Biological Chemistry, 280: 23869-23875.

Cauda, R. 2009. Candidaemia in patients with an inserted medical device. Drugs, 69: 33-38.

Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., & Ghannoum, M. A. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogenCandida albicans. Journal of Bacteriology, 183: 5385-5394.

Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., & Fink, G. R. 2004. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in Candida albicans. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101: 5048-5052.

Cheng, G., Wozniak, K., Wallig, M. A., Fidel, P. L., Trupin, S. R., & Hoyer, L. L. 2005. Comparison between Candida albicans agglutinin-like sequence gene expression patterns in human clinical specimens and models of vaginal candidiasis. Infection and Immunity, 73: 1656-1663.

Cornely, O. A., Bassetti, M., Calandra, T., Garbino, J., Kullberg, B. J., Lortholary, O. 2012. ESCMID guideline for the diagnosis and management of candida diseases. Clinical Microbiology and Infection, 18: 19-37.

Correia, A., Lermann, U., Teixeira, L., Cerca, F., Botelho, S., da Costa, R. M. G., Pais, C. 2010. Limited role of secreted aspartyl proteinases Sap1 to Sap6 in candida albicans virulence and host immune response in murine hematogenously disseminated candidiasis. Infection and Immunity, 78: 4839-4849.

Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., & Marrie, T. J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Annual Reviews in Microbiology, 41: 435-464.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms. Science, 284: 1318-1322.

Cowen, L. E., Singh, S. D., Köhler, J. R., Collins, C., Zaas, A. K., Schell, W. A.,Lindquist, S. 2009. Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106: 2818-2823.

Crookes, E. M., & Stuart, R. D. 1959. The Value of Aerosporm in the Isolation of Neisseria from Swabs forwarded to the Laboratory in Transport Medium. Journal of Pathology and Bacteriology, 78: 283-8.

Cruz, M. R., Graham, C. E., Gagliano, B. C., Lorenz, M. C., & Garsin, D. A. 2013. Enterococcus faecalis inhibits hyphal morphogenesis and virulence of candida albicans. Infection and Immunity, 81: 189-200.

Csank, C., Schröppel, K., Leberer, E., Harcus, D., Mohamed, O., Meloche, S., Whiteway, M. 1998. Roles of the candida albicansmitogen-activated protein kinase homolog, cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. Infection and Immunity, 66: 2713-2721.

Dalle, F., Wächtler, B., L'Ollivier, C., Holland, G., Bannert, N., Wilson, D., & Hube, B. 2010. Cellular interactions of Candida albicans with human oral epithelial cells and enterocytes. Cellular Microbiology, 12: 248-271.

Davis, D. A. 2009. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. Current Opinion in Microbiology, 12: 365-370.

Davis, D., Edwards, J. E., Mitchell, A. P., & Ibrahim, A. S. 2000. Candida albicans RIM101 pH response pathway is required for host-pathogen interactions. Infection and Immunity, 68: 5953-5959.

De Bernardis, F., Mühlschlegel, F. A., Cassone, A., & Fonzi, W. A. 1998. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of candida albicans. Infection and Immunity, 66: 3317-3325.

Dewing, P., Shi, T., Horvath, S., & Vilain, E. 2003. Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. Molecular Brain Research, 118: 82-90.

Diez-Orejas, R., Molero, G., Navarro-García, F., Pla, J., Nombela, C., & Sanchez-Perez, M. 1997. Reduced virulence of candida albicans MKC1 mutants: a role for mitogen-activated protein kinase in pathogenesis. Infection and Immunity, 65: 833-837.

Dodgson, A. R., Dodgson, K. J., Pujol, C., Pfaller, M. A., & Soll, D. R. 2004. Clade-specific flucytosine resistance is due to a single nucleotide change in the FUR1 gene of Candida albicans. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48: 2223-2227.

Dominic, R. S., Shenoy, S., & Baliga, S. 2007. Candida biofilms in medical devices: evolving trends. Kathmandu University Medical Journal, 5: 431-436.

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews, 15: 167-193.

Douglas, L. J. 2003. Candida biofilms and their role in infection. Trends in Microbiology, 11: 30-36.

Dunkel, N., Liu, T. T., Barker, K. S., Homayouni, R., Morschhäuser, J., & Rogers, P. D. 2008. A gain-of-function mutation in the transcription factor Upc2p causes upregulation of ergosterol biosynthesis genes and increased fluconazole resistance in a clinical candida albicans isolate. Eukaryotic Cell, 7: 1180-1190.

Dwivedi, P., Thompson, A., Xie, Z., Kashleva, H., Ganguly, S., Mitchell, A. P., & Dongari-Bagtzoglou, A. 2011. Role of Bcr1-activated genes Hwp1 and Hyr1 in Candida albicans oral mucosal biofilms and neutrophil evasion. PloS One, 6: e16218.

Eggimann, P., Garbino, J., & Pittet, D. 2003. Epidemiology of candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. The Lancet Infectious Diseases, 3: 685-702.

Elfeky, A. I., & Masadeh, T. S. 2016. The effect of mobile learning on students achievement and conversational skills. International Journal of Higher Education, 5: 20-31.

Ene, I. V., Adya, A. K., Wehmeier, S., Brand, A. C., MacCallum, D. M., Gow, N. A., & Brown, A. J. 2012. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. Cellular Microbiology, 14: 1319-1335.

Eyles, S. J., & Gierasch, L. M. 2010. Nature's molecular sponges. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107: 2727-2728.

Finkel, J. S., Xu, W., Huang, D., Hill, E. M., Desai, J. V., Woolford, C. A., Lanni, F. 2012. Portrait of Candida albicans adherence regulators. PLoS Pathog, 8: e1002525.

Fiori, A., Kucharíková, S., Govaert, G., Cammue, B. P., Thevissen, K., & Van Dijck, P. 2012. The heat-induced molecular disaggregase Hsp104 of Candida albicans plays a role in biofilm formation and pathogenicity in a worm infection model. Eukaryotic Cell, 11: 1012-1020.

Fleck, C. B., Schöbel, F., & Brock, M. 2011. Nutrient acquisition by pathogenic fungi: nutrient availability, pathway regulation, and differences in substrate utilization. International Journal of Medical Microbiology, 301: 400-407.

Florent, M., Noël, T., Ruprich-Robert, G., Da Silva, B., Fitton-Ouhabi, V., Chastin, C., Chapeland-Leclerc, F. 2009. Nonsense and missense mutations in FCY2 and FCY1 genes are responsible for flucytosine resistance and flucytosine-fluconazole cross-resistance in clinical isolates of Candida lusitaniae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53: 2982-2990.

Fonzi, W. A. 1999. PHR1 and PHR2 of candida albicans encode putative glycosidases required for proper cross-linking of β-1, 3-and β-1, 6-glucans. Journal of Bacteriology, 181: 7070-7079.

Fox, E. P., & Nobile, C. J. 2012. A sticky situation: untangling the transcriptional network controlling biofilm development in candida albicans. Transcription, 3: 315-322.

Frohner, I. E., Bourgeois, C., Yatsyk, K., Majer, O., & Kuchler, K. 2009. Candida albicans cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. Molecular Microbiology, 71: 240-252.

Fu, M. S., De Sordi, L., & Mühlschlegel, F. A. 2012. Functional characterization of the small heat shock protein Hsp12p from Candida albicans. PLoS One, 7: e42894.

Fu, Y., Ibrahim, A. S., Fonzi, W., Zhou, X., Ramos, C. F., & Ghannoum, M. A. 1997. Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast Candida albicans. Microbiology, 143: 331-340.

Gácser, A., Stehr, F., Kröger, C., Kredics, L., Schäfer, W., & Nosanchuk, J. D. 2007. Lipase 8 affects the pathogenesis of candida albicans. Infection and Immunity, 75: 4710-4718.

Garcia, M. C., Lee, J. T., Ramsook, C. B., Alsteens, D., Dufrêne, Y. F., & Lipke, P. N. 2011. A role for amyloid in cell aggregation and biofilm formation. PloS One, 6: e17632.

Ghahfarokhi, S. H., Mosadegh, M., Ahmadi, A., Pourmand, M. R., Azarsa, M., Rahbar, M., & Nikmanesh, B. 2020. Serotype Distribution and antibiotic susceptibility of Streptococcus pneumoniae isolates in Tehran, Iran: A surveillance study. Infection and Drug Resistance, 13: 333.

Ghosh, S., Navarathna, D. H., Roberts, D. D., Cooper, J. T., Atkin, A. L., Petro, T. M., & Nickerson, K. W. 2009. Arginine-induced germ tube formation in candida albicans is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. Infection and Immunity, 77: 1596-1605.

Gozalbo, D., Roig, P., Villamon, E., & Gil, M. L. 2004. Candida and candidiasis. Current Drug Targets-Infectious Disorders, 4: 117-135.

Granger, B. L. 2012. Insight into the antiadhesive effect of yeast wall protein 1 of candida albicans. Eukaryotic Cell, 11: 795-805.

Granger, B. L., Flenniken, M. L., Davis, D. A., Mitchell, A. P., & Cutler, J. E. 2005. Yeast wall protein 1 of candida albicans. Microbiology, 151: 1631-1644.

Gudlaugsson, O., Gillespie, S., Lee, K., Berg, J. V., Hu, J., Messer, S., Diekema, D. 2003. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. Clinical Infectious Diseases, 37: 1172-1177.

Hall, R. A., Turner, K. J., Chaloupka, J., Cottier, F., De Sordi, L., Sanglard, D., Mühlschlegel, F. A. 2011. The quorum-sensing molecules farnesol/ homoserine lactone and dodecanol operate via distinct modes of action in candida albicans. Eukaryotic Cell, 10: 1034-1042.

Harriott, M. M., Lilly, E. A., Rodriguez, T. E., Fidel Jr, P. L., & Noverr, M. C. 2010. Candida albicans forms biofilms on the vaginal mucosa. Microbiology, 156: 3635.

Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, S., Buchner, J. 1999. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. The EMBO Journal, 18: 6744-6751.

Hawser, S. P., & Douglas, L. J. 1994. Biofilm formation by candida species on the surface of catheter materials in vitro. Infection and Immunity, 62: 915-921.

Hernday, A. D., Lohse, M. B., Fordyce, P. M., Nobile, C. J., DeRisi, J. L., & Johnson, A. D. 2013. Structure of the transcriptional network controlling white-opaque switching in C andida albicans. Molecular Microbiology, 90: 22-35.

Hirakawa, M. P., Martinez, D. A., Sakthikumar, S., Anderson, M. Z., Berlin, A., Gujja, S., & Cuomo, C. A. 2015. Genetic and phenotypic intra-species variation in Candida albicans. Genome Research, 25: 413-425.

Hirsch, J. S., Ng, J. H., Ross, D. W., Sharma, P., Shah, H. H., Barnett, R. L. 2020. Acute kidney injury in patients hospitalized with COVID-19. Kidney International, 98: 209-218.

Hnisz, D., Bardet, A. F., Nobile, C. J., Petryshyn, A., Glaser, W., Schöck, U., Kuchler, K. 2012. A histone deacetylase adjusts transcription kinetics at coding sequences during candida albicans morphogenesis. PLoS Genet, 8: e1003118.

Hope, W. W., Tabernero, L., Denning, D. W., & Anderson, M. J. 2004. Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in candida albicans. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48: 4377-4386.

Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisec, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Nickerson, K. W. 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus candida albicans is mediated by farnesol. Applied and Environmental Microbiology, 67: 2982-2992.

Hromatka, B. S., Noble, S. M., & Johnson, A. D. 2005. Transcriptional response of Candida albicans to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. Molecular Biology of the Cell, 16: 4814-4826.

Hube, B., Sanglard, D., Odds, F. C., Hess, D., Monod, M., Schäfer, W., Gow, N. A. 1997. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of candida albicans attenuates virulence. Infection and Immunity, 65: 3529-3538.

Hube, B., Stehr, F., Bossenz, M., Mazur, A., Kretschmar, M., & Schäfer, W. 2000. Secreted lipases of candida albicans. Archives of Microbiology, 174: 362-374.

Hwang, C. S., Rhie, G. E., Oh, J. H., Huh, W. K., Yim, H. S., & Kang, S. O. 2002. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ ZnSOD) is required for the protection of candida albicans against oxidative stresses and the expression of its full virulence. Microbiology, 148: 3705-3713.

Inglis, D. O., Arnaud, M. B., Binkley, J., Shah, P., Skrzypek, M. S., Wymore, F., Sherlock, G. 2012. The Candida genome database incorporates multiple Candida species: multispecies search and analysis tools with curated gene and protein information for candida albicans and candida glabrata. Nucleic Acids Research, 40: D667-D674.

Jabra-Rizk, M. A., Brenner, T. M., Romagnoli, M., Baqui, A. A., Merz, W. G., Falkler Jr, W. A., & Meiller, T. F. 2001. Evaluation of a reformulated CHROMagar Candida. Journal of Clinical Microbiology, 39: 2015-2016.

Jacobsen, I. D., Wilson, D., Wächtler, B., Brunke, S., Naglik, J. R., & Hube, B. 2012. Candida albicans dimorphism as a therapeutic target. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 10: 85-93.

Jacobsen, P. B., Donovan, K. A., Vadaparampil, S. T., & Small, B. J. 2007. Systematic review and meta-analysis of psychological and activity-based interventions for cancer-related fatigue. Health Psychology, 26: 660.

Johnson, C. C., Yu, A., Lee, H., Fidel, P. L., & Noverr, M. C. 2012. Development of a contemporary animal model of candida albicans-associated denture stomatitis using a novel intraoral denture system. Infection and Immunity, 80: 1736-1743.

Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B. B., Davis, R. W. 2004. The diploid genome sequence of candida albicans. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101: 7329-7334.

Kalkancı, B., & Erhun, F. 2012. Pricing games and impact of private demand information in decentralized assembly systems. Operations Research, 60: 1142-1156.

Kelly, S. L., Lamb, D. C., & Kelly, D. E. 1999. Y132H substitution in candida albicans sterol 14α-demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem. FEMS Microbiology Letters, 180: 171-175.

Knoke, D., Taylor, A. E., & Saint-Cyr, J. A. 1998. The differential effects of cueing on recall in Parkinson's disease and normal subjects. Brain and Cognition, 38: 261-274.

Kojic, E. M., & Darouiche, R. O. 2004. Candida infections of medical devices. Clinical Microbiology Reviews, 17: 255-267.

Kolter, R. 2010. Biofilms in lab and nature. Int. Microbiol, 13: 1-7.

Kolter, R., & Greenberg, E. P. 2006. The superficial life of microbes. Nature, 441: 300-302.

Kumamoto, C. A. 2002. Candida biofilms. Current Opinion in Microbiology, 5: 608-611.

Kumamoto, C. A. 2008. Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. Nature Reviews Microbiology, 6: 667-673.

LaFayette, S. L., Collins, C., Zaas, A. K., Schell, W. A., Betancourt-Quiroz, M., Gunatilaka, A. L., Cowen, L. E. 2010. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen Candida albicans via circuitry comprised of Mkc1, calcineurin, and Hsp90. PLoS Pathog, 6: e1001069.

Latha, R. C. R., & Daisy, P. 2011. Insulin-secretagogue, antihyperlipidemic and other protective effects of gallic acid isolated from Terminalia bellerica Roxb. Chemico-Biological Interactions, 189: 112-118.

Leach, M. D., Stead, D. A., Argo, E., & Brown, A. J. 2011. Identification of sumoylation targets, combined with inactivation of SMT3, reveals the impact of sumoylation upon growth, morphology, and stress resistance in the pathogen Candida albicans. Molecular Biology of the Cell, 22: 687-702.

Lee, C. Y., Cetinkaya, S., & Jaruphongsa, W. 2003. A dynamic model for inventory lot sizing and outbound shipment scheduling at a third-party warehouse. Operations Research, 51: 735-747.

Leidich, S. D., Ibrahim, A. S., Fu, Y., Koul, A., Jessup, C., Vitullo, J., Ghannoum, M. A. 1998. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of Candida albicans. Journal of Biological Chemistry, 273: 26078-26086.

Lepak, A., & Andes, D. 2011. Fungal sepsis. Critical Care Clinics, 27: 123-147.

Lermann, U., & Morschhäuser, J. 2008. Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by Candida albicans. Microbiology, 154: 3281-3295.

Lewis, K. 2008. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. In Bacterial biofilms, pp. 107-131, Berlin.

Li, X. S., Reddy, M. S., Baev, D., & Edgerton, M. 2003. Candida albicans Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5. Journal of Biological Chemistry, 278: 28553-28561.

Li, X. S., Sun, J. N., Okamoto-Shibayama, K., & Edgerton, M. 2006. Candida albicans cell wall ssa proteins bind and facilitate import of salivary histatin 5 required for toxicity. Journal of Biological Chemistry, 281: 22453-22463.

Lian, C. H., & Liu, W. D. 2007. Differential expression of Candida albicans secreted aspartyl proteinase in human vulvovaginal candidiasis. Mycoses, 50: 383-390.

Lindquist, S. 1992. Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. Current Opinion in Genetics & development, 2: 748-755.

Lindquist, S., & Craig, E. A. 1988. The heat-shock proteins. Annual Review of Genetics, 22: 631-677

Lo, H. J., Köhler, J. R., DiDomenico, B., Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., & Fink, G. R. 1997. Nonfilamentous C. albicans mutants are avirulent. Cell, 90: 939-949.

Locke, J. C., Southern, M. M., Kozma-Bognár, L., Hibberd, V., Brown, P. E., Turner, M. S., & Millar, A. J. 2005. Extension of a genetic network model by iterative experimentation and mathematical analysis. Molecular Systems Biology, 1: 2005-0013.

López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. 2010. Biofilms. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2: a000398.

Lorenz, M. C., & Fink, G. R. 2001. The glyoxylate cycle is required for fungal virulence. Nature, 412: 83-86.

Lorenz, M. C., Bender, J. A., & Fink, G. R. 2004. Transcriptional response of candida albicans upon internalization by macrophages. Eukaryotic Cell, 3: 1076-1087.

Lortholary, O., Petrikkos, G., Akova, M., Arendrup, M. C., Arikan-Akdagli, S. E. V. T. A. P., Bassetti, M., & Escmid. 2012. Fungal ınfection study group (EFISG). Clinical Microbiology and Infection, 18: 68-77.

Maraki, M. I., Yannakoulia, M., Stamelou, M., Stefanis, L., Xiromerisiou, G., Kosmidis, M. H., & Scarmeas, N. 2019. Mediterranean diet adherence is related to reduce probability of prodromal Parkinson's disease. Movement Disorders, 34: 48-57.

Marrie, T., & Costerton, J. W. 1984. Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. Journal of Clinical Microbiology, 19: 687-693.

Martchenko, M., Alarco, A. M., Harcus, D., & Whiteway, M. 2004. Superoxide dismutases in candida albicans. Molecular Biology of the Cell, 15: 456-467.

Martin, J., Melhem, A., Shchedrina, I., Duchanoy, T., Nomine, A., Henrion, G., & Belmonte, T. 2013. Effects of electrical parameters on plasma electrolytic oxidation of aluminium. Surface and Coatings Technology, 221: 70-76.

Martínez-Gomariz, M., Perumal, P., Mekala, S., Nombela, C., Chaffin, W. L., & Gil, C. 2009. Proteomic analysis of cytoplasmic and surface proteins from yeast cells, hyphae, and biofilms of Candida albicans. Proteomics, 9: 2230-2252.

Mavor, A. L., Thewes, S., & Hube, B. 2005. Systemic fungal infections caused by Candida species. Current Drug Targets, 6: 863-874.

Mayer, F. L., Wilson, D., Jacobsen, I. D., Miramón, P., Große, K., & Hube, B. 2012. The novel candida albicans transporter dur31 Is a multi-stage pathogenicity factor. PLoS Pathog, 8: e1002592.

Meiller, T. F., Hube, B., Schild, L., Shirtliff, M. E., Scheper, M. A., Winkler, R., & Jabra-Rizk, M. A. 2009. A novel immune evasion strategy of candida albicans. PloS One, 4: e5039.

Mermel, L. A., Allon, M., Bouza, E., Craven, D. E., Flynn, P., O'Grady, N. P., Warren, D. K. 2009. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection. Clinical Infectious Diseases, 49: 1-45.

Mitchell, B. M., Wu, T. G., Jackson, B. E., & Wilhelmus, K. R. 2007. Candida albicans strain-dependent virulence and Rim13p-mediated filamentation in experimental keratomycosis. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 48: 774-780.

Monge, R. A., Roman, E., Nombela, C. P. L. A., & Pla, J. 2006. The MAP kinase signal transduction network in Candida albicans. Microbiology, 152: 905-912.

Monniot, C., Boisramé, A., Da Costa, G., Chauvel, M., Sautour, M., Bougnoux, M. E., Richard, M. L. 2013. Rbt1 protein domains analysis in Candida albicans brings insights into hyphal surface modifications and Rbt1 potential role during adhesion and biofilm formation. PloS One, 8: e82395.

Morschhäuser, J. 2010. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. Fungal Genetics and Biology, 47: 94-106.

Mukherjee, P. K., Zhou, G., Munyon, R., & Ghannoum, M. A. 2005. Candida biofilm. Medical Mycology, 43: 191-208.

Murciano, C., Moyes, D. L., Runglall, M., Tobouti, P., Islam, A., Hoyer, L. L., & Naglik, J. R. 2012. Evaluation of the role of candida albicans agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. PLoS One, 7: e33362.

Mühlschlegel, F. A., & Fonzi, W. A. 1997. PHR2 of Candida albicans encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. Molecular and Cellular Biology, 17: 5960-5967.

Nabi, G., Liñán, F., Fayolle, A., Krueger, N., & Walmsley, A. 2017. The impact of entrepreneurship education in higher education. Academy of Management Learning & Education, 16: 277-299.

Naglik, J. R., Challacombe, S. J., & Hube, B. 2003. Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67: 400-428.

Naglik, J. R., Moyes, D. L., Wächtler, B., & Hube, B. 2011. Candida albicans interactions with epithelial cells and mucosal immunity. Microbes and Infection, 13: 963-976.

Narberhaus, F. 2002. α-Crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 66: 64-93.

Nett, J. E., Brooks, E. G., Cabezas-Olcoz, J., Sanchez, H., Zarnowski, R., Marchillo, K., & Andes, D. R. 2014. Rat indwelling urinary catheter model of candida albicans biofilm infection. Infection and Immunity, 82: 4931-4940.

Nett, J. E., Sanchez, H., Cain, M. T., Ross, K. M., & Andes, D. R. 2011. Interface of Candida albicans biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. Eukaryotic Cell, 10: 1660-1669.

Ni, L., Bruce, C., Hart, C., Leigh-Bell, J., Gelperin, D., Umansky, L., Snyder, M. 2009. Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. Genes and Development, 23: 1351-1363.

Nicholls, S., MacCallum, D. M., Kaffarnik, F. A., Selway, L., Peck, S. C., & Brown, A. J. 2011. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen Candida albicans. Fungal Genetics and Biology, 48: 297-305.

Niewerth, M., & Korting, H. C. 2001. Phospholipases of Candida albicans. Mycoses, 44: 361-367.

Nobile, C. J., & Mitchell, A. P. 2005. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the C. albicans transcription factor Bcr1p. Current Biology, 15: 1150-1155.

Nobile, C. J., Andes, D. R., Nett, J. E., Smith Jr, F. J., Yue, F., Phan, Q. T., & Mitchell, A. P. 2006. Critical role of Bcr1-dependent adhesins in C. albicans biofilm formation in vitro and in vivo. PLoS Pathogens, 2: e63.

Nobile, C. J., Fox, E. P., Hartooni, N., Mitchell, K. F., Hnisz, D., Andes, D. R., Johnson, A. D. 2014. A histone deacetylase complex mediates biofilm dispersal and drug resistance in Candida albicans. MBio., 5: e01201-14

Nobile, C. J., Fox, E. P., Nett, J. E., Sorrells, T. R., Mitrovich, Q. M., Hernday, A. D., Johnson, A. D. 2012. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in Candida albicans. Cell, 148: 126-138.

Nobile, C. J., Nett, J. E., Hernday, A. D., Homann, O. R., Deneault, J. S., Nantel, A., Mitchell, A. P. 2009. Biofilm matrix regulation by Candida albicans Zap1. PLoS Biol, 7: e1000133.

Nobile, C. J., Solis, N., Myers, C. L., Fay, A. J., Deneault, J. S., Nantel, A.,Filler, S. G. 2008. Candida albicans transcription factor Rim101 mediates pathogenic interactions through cell wall functions. Cellular Microbiology, 10: 2180-2196.

Noël, T., François, F., Paumard, P., Chastin, C., Brèthes, D., & Villard, J. 2003. Flucytosine-fluconazole cross-resistance in purine-cytosine permease-deficient

Candida lusitaniae clinical isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47: 1275-1284.

Nordenmalm, S., Tomasi, P., & Pallidis, C. 2018. More medicines for children: impact of the EU paediatric regulation. Archives of Disease in Childhood, 103: 557-564.

Papon, N., Noël, T., Florent, M., Gibot-Leclerc, S., Jean, D., Chastin, C., Chapeland-Leclerc, F. 2007. Molecular mechanism of flucytosine resistance in candida lusitaniae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51: 369-371.

Park, H., Myers, C. L., Sheppard, D. C., Phan, Q. T., Sanchez, A. A., E. Edwards, J., & Filler, S. G. 2005. Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis. Cellular Microbiology, 7: 499-510.

Patel, S. J., & Saiman, L. 2010. Antibiotic resistance in neonatal intensive care unit pathogens. Clinics in Perinatology, 37: 547-563.

Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis. Clinical Microbiology Reviews, 20: 133-163.

Phan, Q. T., Fratti, R. A., Prasadarao, N. V., Edwards, J. E., & Filler, S. G. 2005. N-cadherin mediates endocytosis of candida albicans by endothelial cells. Journal of Biological Chemistry, 280: 10455-10461.

Phan, Q. T., Myers, C. L., Fu, Y., Sheppard, D. C., Yeaman, M. R., Welch, W. H., Filler, S. G. 2007. Als3 is a candida albicans invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. PLoS Biol,. 5: e64.

Price, M. F., Wilkinson, I. D., & Gentry, L. O. 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in Candida albicans. Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology, 20: 7-14.

Ramage, G., Mowat, E., Jones, B., Williams, C., & Lopez-Ribot, J. 2009. Our current understanding of fungal biofilms. Critical Reviews in Microbiology, 35: 340-355.

Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P., & Lopez-Ribot, J. L. 2005. Candida biofilms. Eukaryotic Cell, 4: 633-638.

Ramage, G., Tomsett, K., Wickes, B. L., López-Ribot, J. L., & Redding, S. W. 2004. Denture stomatitis: a role for candida biofilms. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 98: 53-59.

Ramage, G., VandeWalle, K., López-Ribot, J. L., & Wickes, B. L. 2002. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in Candida albicans. FEMS Microbiology Letters, 214: 95-100.

Redpath, S. M., Young, J., Evely, A., Adams, W. M., Sutherland, W. J., Whitehouse, A., & Gutierrez, R. J. 2013. Understanding and managing conservation conflicts. Trends in Ecology and Evolution, 28: 100-109.

Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. 2010. The heat shock response. Molecular Cell, 40: 253-266.

Robbins, N., Uppuluri, P., Nett, J., Rajendran, R., Ramage, G., Lopez-Ribot, J. L., Cowen, L. E. 2011. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. PLoS Pathog, 7: e1002257.

Rousselle, P., Lunstrum, G. P., Keene, D. R., & Burgeson, R. E. 1991. Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. Journal of Cell Biology, 114: 567-576.

Ruhnke, M., & Maschmeyer, G. 2002. Management of mycoses in patients with hematologic disease and cancer--review of the literature. European Journal of Medical Research, 7: 227-235

Sahoo, D., Deck, C., & Willinger, R. 2014. Development and validation of an advanced anisotropic visco-hyperelastic human brain FE model. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 33: 24-42.

Saville, S. P., Lazzell, A. L., Monteagudo, C., & Lopez-Ribot, J. L. 2003. Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of candida albicans during infection. Eukaryotic Cell, 2: 1053-1060.

Schaller, M., Bein, M., Korting, H. C., Baur, S., Hamm, G., Monod, M., & Hube, B. 2003. The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. Infection and Immunity, 71: 3227-3234.

Schaller, M., Korting, H. C., Schäfer, W., Bastert, J., Chen, W., & Hube, B. 1999. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. Molecular Microbiology, 34: 169-180.

Scharmann, M., Grafe, T. U., Metali, F., & Widmer, A. 2019. Sex is determined by XY chromosomes across the radiation of dioecious nepenthes pitcher plants. Evolution Letters, 3: 586-597.

Schelenz, S. 2008. Management of candidiasis in the intensive care unit. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 61: i31-i34.

Schinabeck, M. K., Long, L. A., Hossain, M. A., Chandra, J., Mukherjee, P. K., Mohamed, S., & Ghannoum, M. A. 2004. Rabbit model of candida albicans biofilm infection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48: 1727-1732.

Schulze, J., & Sonnenborn, U. 2009. Yeasts in the gut. Deutsches Ärzteblatt International, 23: 106, 837.

Schweizer, A., Rupp, S., Taylor, B. N., Röllinghoff, M., & Schröppel, K. 2000. The TEA/ATTS transcription factor CaTec1p regulates hyphal development and virulence in Candida albicans. Molecular Microbiology, 38: 435-445.

Seddiki, S. M., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Badsi-Amir, S., Taleb, M., & Kunkel, D. 2013. Assessment of the types of catheter infectivity caused by Candida species and their biofilm formation. International Journal of General Medicine, 6: 1.

Selvam, N. C. S., Kumar, R. T., Kennedy, L. J., & Vijaya, J. J. 2011. Comparative study of microwave and conventional methods for the preparation and optical properties of novel MgO-micro and nano-structures. Journal of Alloys and Compounds, 509: 9809-9815.

Sexton, J. A., Brown, V., & Johnston, M. 2007. Regulation of sugar transport and metabolism by the candida albicans Rgt1 transcriptional repressor. Yeast, 24: 847-860.

Shapiro, R. S., Uppuluri, P., Zaas, A. K., Collins, C., Senn, H., Perfect, J. R., Cowen, L. E. 2009. Hsp90 orchestrates temperature-dependent candida albicans morphogenesis via Ras1-PKA signaling. Current Biology, 19: 621-629.

Singh, S. D., Robbins, N., Zaas, A. K., Schell, W. A., Perfect, J. R., & Cowen, L. E. 2009. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast Candida albicans via calcineurin. PLoS Pathog, 5: e1000532.

Sobel, J. D. 1985. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 152: 924-935.

Sobel, J. D. 1988. Pathogenesis and epidemiology of vulvovaginal candidiasis. Annals of the New York Academy of Sciences, 544: 547-557.

Sobel, J. D. 1997. Vaginitis. New England Journal of Medicine, 337: 1896-1903.

Soll, D. R. 2009. Why does Candida albicans switch. FEMS yeast research, 9, 973-989.

Soll, D. R., Staebell, M., Langtimm, C., Pfaller, M.,, Hicks, J., Rao, T. V. 1988. Multiple candida strains in the course of a single systemic infection. Journal of Clinical Microbiology, 26: 1448-1459.

Sorger, P. K., & Pelham, H. R. 1987. Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. The EMBO journal, 6: 3035-3041.

Sorger, P. K., & Pelham, H. R. 1988. Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. Cell, 54: 855-864.

Staab, J. F., Bradway, S. D., Fidel, P. L., & Sundstrom, P. 1999. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of Candida albicans Hwp1. Science, 283: 1535-1538.

Staib, P., & Morschhäuser, J. 2007. Chlamydospore formation in candida albicans and Candida dubliniensis–an enigmatic developmental programme. Mycoses, 50: 1-12.

Sudbery, P. E. 2011. Growth of candida albicans hyphae. Nature Reviews Microbiology, 9: 737-748.

Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. 2004. The distinct morphogenic states of Candida albicans. Trends in Microbiology, 12: 317-324.

Sun, J. N., Li, W., Jang, W. S., Nayyar, N., Sutton, M. D., & Edgerton, M. 2008. Uptake of the antifungal cationic peptide Histatin 5 by Candida albicans Ssa2p requires binding to non-conventional sites within the ATPase domain. Molecular Microbiology, 70: 1246-1260

Sun, J. N., Solis, N. V., Phan, Q. T., Bajwa, J. S., Kashleva, H., Thompson, A., Filler, S. G. 2010. Host cell invasion and virulence mediated by candida albicans Ssa1. PLoS Pathog, 6: e1001181.

Sundstrom, P. 2002. Adhesion in Candida spp. Cellular Microbiology, 4: 461-469.

Sundstrom, P., Balish, E., & Allen, C. M. 2002. Essential role of the candida albicans transglutaminase substrate, hyphal wall protein 1, in lethal oroesophageal candidiasis in immunodeficient mice. The Journal of İnfectious Diseases, 185: 521-530

Tavanti, A., Gow, N. A., Senesi, S., Maiden, M. C., & Odds, F. C. 2003. Optimization and validation of multilocus sequence typing for Candida albicans. Journal of Clinical Microbiology, 41: 3765-3776.

Taylor, B. N., Hannemann, H., Sehnal, M., Biesemeier, A., Schweizer, A., Röllinghoff, M., & Schröppel, K. 2005. Induction of SAP7 correlates with virulence in an intravenous infection model of candidiasis but not in a vaginal infection model in mice. Infection and Immunity, 73: 7061-7063.

Taylor, R. N., Grimwood, J., Taylor, R. S., McMaster, M. T., Fisher, S. J., & North, R. A. 2003. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 188: 177-182.

Theiss, S., Ishdorj, G., Brenot, A., Kretschmar, M., Lan, C. Y., Nichterlein, T., Köhler, G. A. 2006. Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type Candida albicans reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence. International Journal of Medical Microbiology, 296: 405-420.

Thewes, B., Butow, P., Bell, M. L., Beith, J., Stuart-Harris, R., Grossi, M., & Dalley, D. 2012. Fear of cancer recurrence in young women with a history of early-stage breast cancer. Supportive Care in Cancer, 20: 2651-2659.

Thewes, S., Kretschmar, M., Park, H., Schaller, M., Filler, S. G., & Hube, B. 2007. In vivo and ex vivo comparative transcriptional profiling of invasive and non-invasive Candida albicans isolates identifies genes associated with tissue invasion. Molecular Microbiology, 63: 1606-1628.

Thomas, D. P., Bachmann, S. P., & Lopez-Ribot, J. L. 2006. Proteomics for the analysis of the Candida albicans biofilm lifestyle. Proteomics, 6: 5795-5804.

Uppuluri, P., Pierce, C. G., Thomas, D. P., Bubeck, S. S., Saville, S. P., & Lopez-Ribot, J. L. 2010. The transcriptional regulator Nrg1p controls Candida albicans biofilm formation and dispersion. Eukaryotic Cell, 9: 1531-1537.

Vazquez, J. A., Sobel, J. D., Demitriou, R., Vaishampayan, J., Lynch, M., & Zervos, M. J. 1994. Karyotyping of Candida albicans isolates obtained longitudinally in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. Journal of Infectious Diseases, 170: 1566-1569.

Vermitsky, J. P., Self, M. J., Chadwick, S. G., Trama, J. P., Adelson, M. E., Mordechai, E., & Gygax, S. E. 2008. Survey of vaginal-flora Candida species isolates from

women of different age groups by use of species-specific PCR detection. Journal of Clinical Microbiology, 46: 1501-1503.

Verstrepen, K. J., & Klis, F. M. 2006. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. Molecular Microbiology, 60: 5-15.

Vylkova, S., Carman, A. J., Danhof, H. A., Collette, J. R., Zhou, H., & Lorenz, M. C. 2011. The fungal pathogen candida albicans autoinduces hyphal morphogenesis by raising extracellular pH. MBio., 2: e00055-11.

Wächtler, B., Citiulo, F., Jablonowski, N., Förster, S., Dalle, F., Schaller, M., Hube, B. 2012. Candida albicans-epithelial interactions. PloS One, 7: e36952.

Wächtler, B., Wilson, D., Haedicke, K., Dalle, F., & Hube, B. 2011. From attachment to damage: defined genes of candida albicans mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. PloS One, 6: e17046.

Wang, X., & Fries, B. C. 2011. A murine model for catheter-associated candiduria. Journal of Medical Microbiology, 60: 1523.

Wenzel, R. P. 1995. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. Clinical Infectious Diseases, 20: 1531-1534.

Wey, S. B., Mori, M., Pfaller, M. A., Woolson, R. F., & Wenzel, R. P. 1988. Hospital-acquired candidemia. Archives of Internal Medicine, 148: 2642-2645.

Wilson, N. K., Foster, S. D., Wang, X., Knezevic, K., Schütte, J., Kaimakis, P., Pimanda, J. E. 2010. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells. Cell Stem Cell, 7: 532-544.

Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., & Edmond, M. B. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clinical Infectious Diseases, 39: 309-317.

Wysong, D. R., Christin, L., Sugar, A. M., Robbins, P. W., & Diamond, R. D. 1998. Cloning and sequencing of a candida albicans catalase gene and effects of disruption of this gene. Infection and Immunity, 66: 1953-1961.

Yadav, M., Sharma, P., Chaudhary, V., & Srivastava, B. 2016. Gastroretentive drug delivery systems. Am. J. Pharm. Res., 6Ş 5225-5235.

Young, R. A. 2011. Control of the embryonic stem cell state. Cell, 144: 940-954.

Zakikhany, K., Naglik, J. R., Schmidt-Westhausen, A., Holland, G., Schaller, M., & Hube, B. 2007. In vivo transcript profiling of Candida albicans identifies a gene essential for interepithelial dissemination. Cellular Microbiology, 9: 2938-2954.

Zaoutis, T. E., Goyal, M., Chu, J. H., Coffin, S. E., Bell, L. M., Nachamkin, I., & Lautenbach, E. 2005. Risk factors for and outcomes of bloodstream infection caused by extended-spectrum β-lactamase–producing Escherichia coli and Klebsiella species in children. Pediatrics, 115: 942-949.

Zarnowski, R., Westler, W. M., Lacmbouh, G. A., Marita, J. M., Bothe, J. R., Bernhardt, J., Ntambi, J. M. 2014. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. MBio., 5: e01333-14.

Zhai, Z., Boquete, J. P., & Lemaitre, B. 2018. Cell-specific Imd-NF-κB responses enable simultaneous antibacterial immunity and intestinal epithelial cell shedding upon bacterial infection. Immunity, 48: 897-910.

Zhao, X., Daniels, K. J., Oh, S. H., Green, C. B., Yeater, K. M., Soll, D. R., & Hoyer, L. L. 2006. Candida albicans Als3p is required for wild-type biofilm formation on silicone elastomer surfaces. Microbiology (Reading, England), 152: 2287.

Zheng, X., Wang, Y., & Wang, Y. 2004. Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates candida albicans hyphal morphogenesis. The EMBO Journal, 23: 1845-1856.

Zhu, W., & Filler, S. G. 2010. Interactions of Candida albicans with epithelial cells. Cellular Microbiology, 12: 273-282.

EKLER

EK 1. Irak'ta Bağdat'tan vajinal mantar enfeksiyonu olan 50 kadının demografik özellikleri

EK 2. Bağdat, Irak'tan 50 hastadan Candida türlerinin izolasyonu

EK 1. Irak'ta Bağdat'tan vajinal mantar enfeksiyonu olan 50 kadının demografik özellikleri

Variables		Frequency	%
Age (years)	10-19	4	8%
	20-29	10	20%
	30-39	20	40%
	40-49	6	12%
	50-59	5	10%
	60-69	2	4%
	70-79	1	2%
	80-89	2	4%
	90-99	0	0%

EK 2. Bağdat, Irak'tan 50 hastadan Candida türlerinin izolasyonu

No.	***Candida* species**	**No.**	**%**
1	*Candida albicans*	2	4%
2	*Candida* non-*albicans*	48	96%
A	*Candida glabrata*	31	62%
B	*Candida krusei (Pichia kudriavzevii)*	16	32%
C	*Candida tropicalis*	1	2%

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Rafal Abdulhadi Kadhim AL-NASSER

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bioloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Bağdat Üniversitesi Bilim Koleji Bioloji Bölümü	2014-2018