ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOFİLM OLUŞTURAN İNVAZİV *CANDİDA ALBİCANS*'IN MOLEKÜLER TANISI

Sinan Abdullah Ali ALI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Sinan Abdullah Ali ALI tarafından hazırlanan **"Biyofilm Oluşturan İnvaziv *Candida Albicans*'ın Moleküler Tanısı"** adlı tez çalışması 27/07/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi. İlkay ÇORAK ÖCAL

Eş Danışman : Prof. Dr. Asal Aziz TAWFEEQ

Jüri Üyeleri :

Başkan : Dr. Öğr. Ütesi Aysel SARI
Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı
Fırat Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

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 "**Biyofilm Oluşturan İnvaziv *Candida Albicans*'ın Moleküler Tanısı**" 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 (27/07/2022).

Sinan Abdullah Ali ALI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİYOFİLM OLUŞTURAN İNVAZİV *CANDİDA ALBİCANS*'IN MOLEKÜLER TANISI

Sinan Abdullah Ali ALI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Eş Danışman: Prof. Dr. Asal Aziz TAWFEEQ

Candida albicans, insanlarda invazif hastalığa neden olan ve dünya çapında yüksek sağlık maliyetlerine neden olan, çoklu ilaç tedavisine direnç gösteren bir mantar patojenidir. İnvazif kandidiyazis (İS), hastenede tadavi gören çocuklarda önemli morbidite ve mortaliteye neden olan, ciddi bir hastane enfeksiyonudur. Bu çalışmanın amacı, invazif *Candida Albicans* mantarının popülasyondaki prevalansını belirlemek ve biyofilm oluşumunun patojenite üzerindeki etkisini incelemektir. Çalışmaya, yaşları 16-70 arasında iki cinsiyetten oral kandidiyazisi 101 hasta dahil edilmiştir. Numuneler, Kerkük halk sağlığı laboratuvarını ziyaret eden 63 hasta, Kerkük Onkoloji ve Hematoloji tanı ve tadavi Merkezi'ndeki 15-20 yaş arası 20 hasta ve Azadi Eğitim Hastanesinde yatmakta olan 15-20 yaş arası 18 hastadan alınmak suretiyle Ekim 2020-Mart 2021 tarihleri arasında alınmıştır. Mevcut çalışmanın sonuçları, CRA yöntemlerinin aksine Mikrotiter plaka yöntemi ile çalışanların sadece %22,2'sinin ve kanser hastalarının %60'ının *Candida albicans* pozitif olduğunu ve *Candida albicans* izolatlarının büyük çoğunluğunun biyofilm üreticisi olduğunu göstermiştir. İzole suş, 18SrRNA gen dizisinin (550 bp) ürün boyutunda iki amplikon göstermiştir. *Candida* izolatının ALS3 ve SAP8 genlerinin (%76,92) biyofilm oluşumunun iki kritik yönünü araştırdık. biyofilm formları vardır. Buna göre, iki suş, NCBI'de ALS3 izolatı için (Lc651376) ve SAP8 izolatı için (Lc651377) erişim numarası altında tescil edilmiştir. Klinik mikolojinin önemli yönlerini ve *C. albicans*'tan biyofilm üretimi ile olası hastalık ilişkilerini kontrol etmek için gelecekte çalışmalar yapılabilir.

2022, 50 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Candida albicans*, Biyofilm, CRA, ALS3, SAP8

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR DIAGNOSIS OF BIOFILM FORMING INVASIVE *CANDIDA ALBICANS*

Sinan Abdullah Ali ALI

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

Advisor: Asst. Prof. Dr. İlkay ÇORAK ÖCAL
Co-Advisor: Prof. Dr. Asal Aziz TAWFEEQ

Candida albicans is a multidrug-resistant fungal pathogen that is causing invasive disease in humans and causing high healthcare costs around the world. Invasive candidiasis (IC) is a serious nosocomial infection that causes significant morbidity and mortality in hospitalized children. The objective of this project was to estimate the prevalence of invasive *Candida albicans* fungus among the population and to study the effect of biofilm formation on its pathogenicity. Oral samples obtained by swabbing the oral mucosa (palatal mucosa and tongue dorsal) of all patients with sterile swabs. Samples were collected between October 2020 to March 2021, Oral samples was obtained 63 samples from Workers visiting a public health laboratory in Kirkuk, 20 samples from Cancer patients at the Specialized Center for Oncology and Hematology in Kirkuk, and 18 samples in patients ages 15-20 in Azadi Teaching Hospital. The results of current study showed only (22.2%) of workers, and (60%) of cancer patients found to be *Candida albicans* positive, and that the majority of *Candida albicans* isolates were producers for biofilm. The isolated strains showed two amplicons of product size of (550 bp) of 18 SrRNA gene sequence. We investigated two critical aspects of the biofilm formation ALS3 and SAP8 genes, (76.92%) of isolate of *Candida* have forms biofilm. The two strains were registered in the NCBI under the accession number of (Lc651376) for ALS3 gene isolate, and (Lc651377) for SAP8 gene isolate. Future study can be conducted to check the important aspects of clinical mycology and possible disease associations with biofilm production from *C. albicans*.

2022, 50 pages

Keywords: *Candida albicans*, Biofilm, CRA, ALS3, SAP8

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca gösterdikleri değerli emek ve tavsiyeleri için danışmanım Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL ve eş danışmanım Prof. Dr. Asal Aziz TAWFEEQ hocalarıma teşekkür ederim. Yüksek lisans derecemi alma fırsatı verdiği için Çankırı Karatekin Üniversitesi'ne sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Sinan Abdullah Ali ALI
Çankırı, Haziran 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1 GİRİŞ **1**
1.1 Çalışmanın Amacı **2**
2 LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 *Candida Albicans* **3**
2.2 Morfoloji **5**
2.2.1 Yaygınlık **6**
2.2.2 Vücut organ ve sisteminde meydana gelmesi **7**
2.2.3 Patojenite **10**
2.2.4 *Candida albicans*'ın invazifliği **12**
2.3 Biyofilm Oluşumu **13**
2.4 Patojenite ile İlişkili Genler **14**
3 MATERYAL VE METOT **15**
3.1 Hastalar **15**
3.2 Klinik İzolasyon **15**
3.3 Materyaller **15**
3.3.1 Kitler, reaktifler ve tamponlar **16**
3.4 Yöntemler **17**
3.4.1 Kültür ortamının hazırlanışı **17**
3.5 Mikrobiyolojik Testler **19**
3.5.1 Gram boyama **19**
3.5.2 Germ tüp testi **19**
3.5.3 *Candida* için analitik profil indeksi **19**

3.5.4 *Candida* AUX için analitik profil indeksi 19
3.6 Biyofilm Oluşumunun Algılanması 20
3.6.1 Tüp yöntemi 20
3.6.2 Mikrotiter plakalar yöntemi 21
3.6.3 Kongo kırmızı agar yöntemi 21
3.7 Moleküler Analiz 22
3.7.1 DNA ekstraksiyonu 22
3.7.2 DNA'nın kantitatif nicelenmesi 23
3.7.3 Primer hazırlığı 23
3.7.4 Reaksiyon ayarı ve termal çevrim protokolü 23
3.7.5 Agarose jel elektroforez 24
3.8 İstatistiksel Analiz 26
4 BULGULAR VE TARTIŞMA 27
4.1 Numunelerin Toplanması 27
4.2 Yaş ve Cinsiyet Dağılımı 27
4.3 Kandidyaz Değerlendirmesi 28
4.3.1 *Candida* kolonizasyonu 28
4.3.2 Biyokimyasal testler 30
4.4 İnvazif *Candida Albicans*'ın Değerlendirilmesi 31
4.5 Biyofilmlerin Karakterizasyonu 32
4.5.1 Biyofilm oluşumunun tanımlanması 32
4.6 ITS Geninin *Candida* için Moleküler Tespiti 34
4.7 ALS3 ve SAP8 Geninin Moleküler Tespiti 35
5 SONUÇ VE ÖNERİLER 40
5.1 Öneriler 40
KAYNAKLAR 41
ÖZGEÇMİŞ 50

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µL	Mikrolitre
dk.	Dakika
g	Gram
mL	Mililitre
s	Saniye

KISALTMALAR DİZİNİ

BHI	Beyin kalp infüzyonu
DNA	Deoksiribo nükleik asit
IC	İnvazif kandidiyazis
PCR	Plimer zincir reaksiyonu
SDA	Sabouraud dekstroz agar
TSB	Triptik soya suyu
YBÜ	Yoğun bakım ünitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Seçilmiş *C. albicans* patojenite mekanizmalarına genel bir bakış (Mayer *et al.* 2013) 4
Şekil 2.2 *Candida albicans*'ın enfeksiyon sürecindeki morfolojik değişimleri ve geçişleri (Talapko *et al.* 2021) 6
Şekil 2.3 İnvaziv kandidiyazis patogenezi (Kullberg and Arendrup 2015). 11
Şekil 4.1 Çalışma bireylerinin cinsiyet dağılımı yüzdesi 28
Şekil 4.2 *Candida'nın* CHROM agar üzerinde yetiştirilen koloni görünümü 28
Şekil 4.3 *Candida* enfeksiyonunun cinsiyete göre dağılımı 29
Şekil 4.4 API *Candida* ile *Candida albicans*'ın tanımlanması 31
Şekil 4.5 Kristal violet ile boyanan germ tüpü 32
Şekil 4.6 Mikrotiter plak yöntemi ile biyofilm oluşumu 33
Şekil 4.7 Kongo kırmızısı yöntemiyle biyofilm oluşumu 33
Şekil 4.8 Bilinmeyen mantar türlerinin ITS geninin amplifikasyonunun sonuçları. Eth. Br ile boyanmış %1,5 agaroz jel elektroforezi. M: 100bp merdiven Şeritler 4-5 görünüş olarak 550bp PCR ürünlerine benzer 35
Şekil 4.9 ALS3 geninin amplifikasyonunun sonuçları 36
Şekil 4.10 ALS3 geninin gerçek zamanlı PCR amplifikasyon eğrisindeki eşik seviyesi ve Cq değeri, micPCR sürüm 2.10.0 tarafından oluşturulan 40 döngüden sonra ölçülen *Candida albicansı* belirler 36
Şekil 4.11 SAP8 geninin amplifikasyonunun sonuçları 37
Şekil 4.12 SAP8 geninin gerçek zamanlı PCR amplifikasyon eğrisindeki eşik seviyesi ve Cq değeri, micPCR sürüm 2.10.0 tarafından oluşturulan 40 döngüden sonra ölçülen *Candida albicans* belirler 37
Şekil 4.13 ALS3 geni için örneğin (Lc651376) kısmi genomik dizilemesinin veri analizi 38
Şekil 4.14 SAP8 Geni için numunenin (Lc651377) kısmi genomik sekanslama veri analizi 38

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan genel aparatlar ve aletler 15
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan malzemeler ve laboratuvar eşyaları 16
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kültür ortamları. 17
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan *Candida albicans'ta* araştırılan aderans genleri için primer dizisi (Macrogen, Kore) 17
Çizelge 3.5 Primerlerin hazırlanması 23
Çizelge 3.6 *Candida*'nın rRNA'sı için PCR koşulları 24
Çizelge 3.7 Gerçek zamanlı PCR programı 24
Çizelge 4.1 Mevcut çalışmada yaş dağılımı 27
Çizelge 4.2 Farklı hasta kategorilerinde *Candida* oluşumu 29
Çizelge 4.3 Farklı hasta kategorilerinde germ tüpü ile *Candida* 31

1 GİRİŞ

İnvaziv mantar enfeksiyonlarının insidansı ve prevalansı, özellikle çocuklar ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda son on yıldan beri artmıştır (Aziz 2020). Şu anda, hastanelerdeki nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının ana nedeninin *Candida* enfeksiyonu olduğu bilinmektedir (Tawfeeq 2019, Tawfeeq and Taher 2018). 15 *Candida* türü insanlar için patojenik olabilir, ancak rapor edilen invazif kandidiyazın %90'ından fazlası en yaygın *Candida albicans* türleri ile ilişkilendirilmiştir (Höfling *et al.* 2010, Owotade and Patel 2014). *Candida albicans*'ın bir patojene dönüşmesi, genellikle *Candida* enfeksiyonlarının yaşamı tehdit etmeyen yüzeysel mukokutanöz bozukluklardan, birden fazla organı içeren yaygın invazif bir hastalığa kadar değişebilmesi bağışıklık sistemi tarafından belirlenir (Owotade and Patel 2014, Saghrouni *et al.* 2013). Son yıllarda, popülasyonda *Candida albicans* enfeksiyonlarının insidansının artmasından kaynaklı, *Candidiasis*'te dikkate değer bir artış gözlemlenmiştir (Dadar *et al.* 2018, Saghrouni *et al.* 2013). Muhtemelen 8 kromozom olarak düzenlenmiş 14,4 megabazlı diploid genom içeren bu mantarın önemli fenotipik ve genetik çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır (Braunsdorf and LeibundGut-Landmann 2018). Genomun heterozigot ve heterozigot olmasının *Candida albicans* virülansı ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (Brown *et al.* 2014). Ek olarak, *C. albicans*'ın genomik kararsızlığının patogenezinde önemli bir rol oynadığı artık iyi bir şekilde belgelenmiştir (Butler *et al.* 2009). Ayrıca mantar türlerinin suşa özgü değişiklikler, *Candida albicans* ile konakçının etkileşimine katkıda bulunabilir (Braunsdorf and LeibundGut-Landmann 2018). *C. albicans*'ın genetik kararsızlığı, konak ara yüzündeki *Candida* davranışını, büyüme oranını, morfolojiyi, antimikrobiyal peptitler veya antifungaller dahil stres faktörlerine karşı direnci ve mukozal ve sistemik enfeksiyon sırasında mantar patojenitesini modüle edebilir (Canela *et al.* 2018). Öte yandan, *Candida albicans* biyofilmlerindeki hücrelerin çoğunluğu antimikrobiyal ajanlara daha az duyarlı olduğundan, *C. albicans*'ın ilaca dirençli biyofilmler oluşturma yeteneği, insan hastalıklarına katkılarında önemli bir faktördür (McCall *et al.* 2019, Wall *et al.* 2019). Bu hücreler, planktonik hücrelerin tam tersi olan değişik gelişimsel özelliklere ve fenotipik özelliklere sahiptir (Uppuluri *et al.* 2009). Bu nedenle, *Candida albicans* biyofilm oluşumuyla ilişkili enfeksiyonlar, sağlık hizmetlerinde artan bir sorunu temsil eder

(McCall *et al.* 2019, Uppuluri *et al.* 2009). Bu nedenle moleküler tiplendirme, mantar patojenlerinin popülasyon yapısını ve epidemiyolojik özelliklerini incelemek için kullanılan ve insan popülasyonlarındaki *Candida albicans* enfeksiyonlarının dinamikleri hakkında değerli bilgiler sağlayan etkili bir teknik haline gelmiştir (Saghrouni *et al.* 2013).

1.1 Çalışmanın Amacı

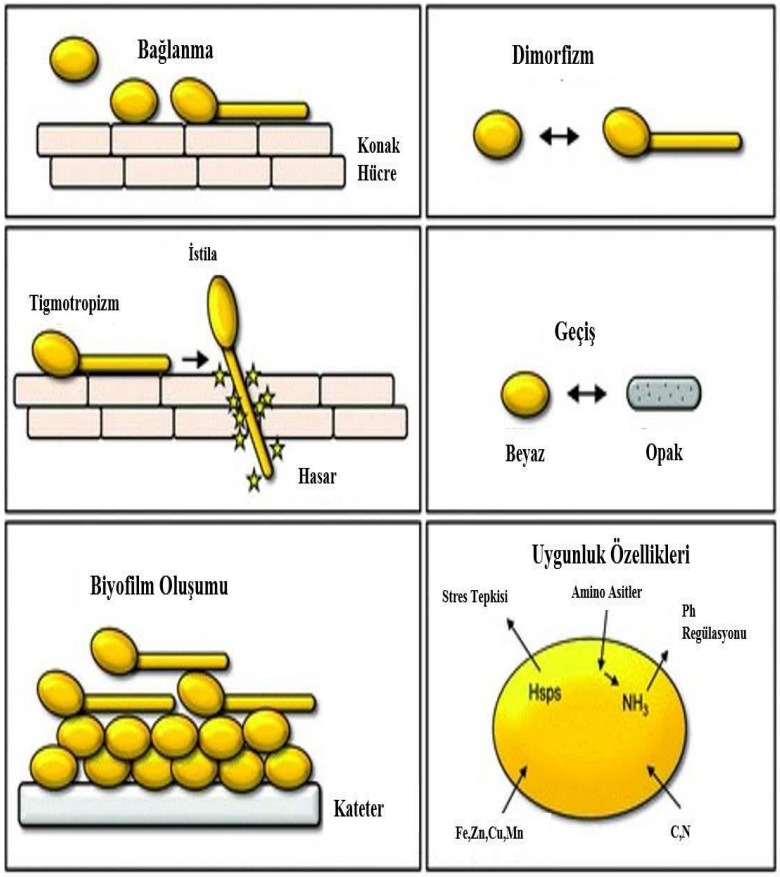
Bu çalışmanın amacı, popülasyondaki invazif *Candida Albicans* mantarının yaygınlığını belirlemek ve biyofilm oluşumunun patojenite üzerindeki etkisini incelemektir. Ayrıca Popülasyonlar arasında ınvazif *candida albicans* prevalansının değerlendirilecek ve izole edilen suşlar arasında biyofilm oluşumunun değerlendirilecektir. Mantar patojenitesi üzerine biyofilm oluşumunun tahmini yapılacak ve en yaygın biyofilm oluşturan patojenin moleküler teşhisi yapılacaktır

2 LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 *Candida Albicans*

Candida albicans mantar enfeksiyonlarına neden olan bir patojendir. Yaygın sistemik hastalığa ve mukozal enfeksiyona neden olmaktadır . *Candida* türleri 400,000 sistemik mantar enfeksiyonunda bulunabilirler (Mukaremera *et al.* 2017). Dünya çapında tüm mantar enfeksiyonlarının %70'inden fazlasını oluştururlar. Yıllarca hayati tehlikeye neden olan invazif enfeksiyonların birincil nedeni olmuştur. Tedaviye rağmen, ölüm oranı özellikle hastane ortamlarında %40 civarında yer almaktadır. (Hu *et al.* 2021). Bağışıklığı zayıflamış hastalarda, *Candida albicans* (Robin 1923) Berkhout mikozlar ciddi mukozal veya sistemik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Orofaengeal kandidiyazis AIDS hastalarında en sık görülen mantar enfeksiyonudur ve hastalığın ilerleyişi ile bağlantılıdır (Pujol *et al.* 1993). Antifungal tadaviler ilk başta sıklıkla etkilidir. HIV-pozitif (HIV+) bireylerde *Candida albicans* mikozlarının yaygın olarak görülmesi epidemiyolojik olarak daha iyi anlaşılması için daha kapsamlı araştırma yapılmasına yol açmıştır (Mohammed *et al.* 2020).

Candida Albicans sağlıklı kişilerin orofaringeal boşlukta, gastrointestinal sistemde, üreme sisteminde ve cildinde kolonize olan komensal bir mantardır. *Candida albicans,* populasyonun %50'sinde mikrobiyota tipik florasında bulunmaktadır. *Candida* türleri, lokalize, yüzeysel mukokutanöz problemlerden çok sayıda organ sistemini etkileyen ve ölümcül olabilen invazif enfeksiyonlara kadar çeşitli klinik semptomlara neden olabilmektedir (Talapko *et al.* 2021). Çeşitli sistemik, lokal, genetik, kalıtsal ve çevresel faktörler *Candida'nın* doğal dengesini bozarak patojenik ve fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır (Mohammed *et al.* 2020). Blastosporlar, yalancı hifler ve hifler, *Candida albicansların* morfolojik formlarıdır (Mohammed *et al.* 2020) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Seçilmiş *C. albicans* patojenite mekanizmalarına genel bir bakış (Mayer *et al.* 2013)

Candida albicans, insan gastrointestinal ve genitoüriner sistemlerinin mukozal dokusunda yaşayan ortak bir organizmadır. Ayrıca kan, doku ve diğer vücut sıvılarında en yaygın bulunan mantardır (Mishra and Koh 2021). Bunula birlikte, bir otopsi araştırmasına göre, ölümden sonra 109 pediatrik vakanın yaklaşık %90'ında en az bir majör organın mantarlar tarafından hasara uğratıldığı görülmüştür (Talapko *et al.* 2021). Karaciğer enzimlerinin aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz ve alkalin fosfataz düzeylerinin normal olmasına rağmen, ölüm sonrası hastaların % 50-%75'inde karaciğerde mantar tutulumu görülmüştür (Lipsett 2002).

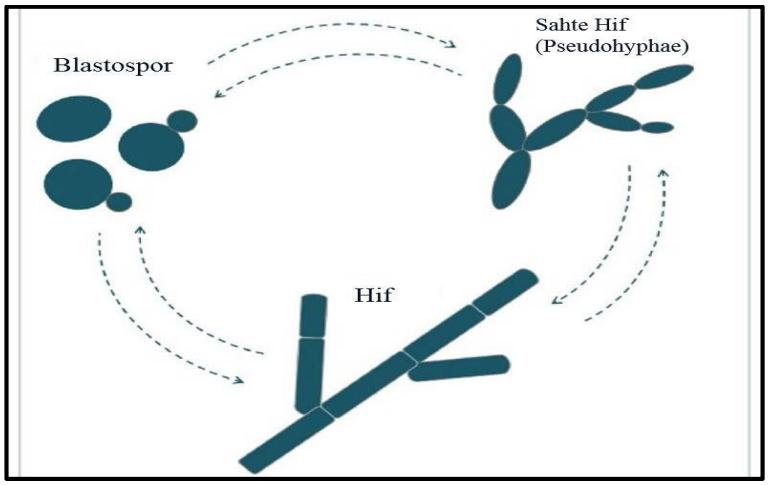
Geniş virülans ve uygunluk özellikleri, *Candida albicans*'ın çok değişik habitatlara bulaşma yeteneğini geliştirir (Balachandra *et al.* 2020). Maya ve hif formları arasındaki morfolojik geçiş, adezinlerin ve istilaların hücre yüzeyinde ekspresyonu, tigmotropizm,

biyofilmlerin gelişimi, fenotipik geçiş ve hidrolitik enzimlerin üretimi virülans faktörleri olarak kabul edilir. Ortam pH'ındaki değişikliklere hızlı uyum, metabolik esneklik, güçlü gıda toplama sistemleri ve sağlam stres tepki mekanizmaları de fitness özellikleri bulunmaktadır (Talapko *et al.* 2021) (Şekil 2.1). Adezin ekspresyonu, maya hücrelerinin ana konak hücre yüzeylerine bağlanmasına olanak tanır. Mayadan hif'e geçiş ve tigmotropizm yoluyla yönlendirilmiş büyüme, konakçı hücrelerle temas yoluyla tetiklenir. İnvazyon ekspresyonu artmış endositoz yoluyla konak hücresi tarafından mantar emilimini destekler.

İkinci invazyon modu, yani bariyerleri yıkarak konak hücrelerine aktif penetrasyon, yapışma, fiziksel basınçlar ve mantar hidrolasyonlarının salınmasıyla kolaylaştırmaktadır. Biyofilmler, maya hücrelerinin abiyotik veya biyotik yüzeylere, maya hücrelerinin biyolojik filmin üst kısmında alt yarı ve hifal hücrelere bağlı olduğu durumlarda meydana gelebilir. *Candida albicans*'ın antijenitesinde ve biyofilm üretimininde, demir (Fe), çinko (Zn), bakır (Cu) , manganez (MN) ve nitrojen (N) kaynakları gibi önemli metallerin emiliminin ve fenotipik etkisnin olduğu düşünülmektedir.

2.2 Morfoloji

Candida maya ve misel olmak üzere iki şekilde görülür. Maya formunun insanlarda gözlemlenen kolonizasyonla bağlantılı olduğu varsayılmaktadır. Tek hücreli bir maya türü olan bir blastospor, tomurcuklanma yoluyla aseksüel üreme gerçekleştirir. Yeni hücresel materyal üretilir, nükleer bölünme meydana gelir ve bir septum mayayı bu faz boyunca iki belirgin blastospora böler. Blastosporlar uzadığında ve birbirine yapıştığında yalancı hifler oluşur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 *Candida albicans*'ın enfeksiyon sürecindeki morfolojik değişimleri ve geçişleri (Talapko *et al.* 2021)

Candida, bir yalancı hif kümesi ve onların misel fazındaki dallarıdır. Antijenik ekspresyon, yapışma özellikleri, proteinaz salgılanması ve nötrofil tarafından oksidatif ölümlere karşı direnç bu iki tip arasındaki farklardır. Çoğu dimorfik mantarın maya formu invazif iken *Candida'nın* misel formu ters dimorfizm olarak bilinen bir durumdur. *Candida,* otopside her iki formda da tanımlanmıştır ve dokuda herhangi birinin varlığı invazyon için patognomoniktir (Mao *et al.* 2020).

2.2.1 Yaygınlık

Bu patojen, derinin doğal florasında, gastrointestinal sistemin mukozasında ve sağlıklı kadınların vajinal bölgelerinde bulunur. Bağışıklık sisteminin herhangi bir nedenle zayıflaması, bağışıklık dengesinde bozulmasına neden olan durumlardır. *Candida'nın* yayılmasına ve ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır (Vila *et al.* 2020). Tanı konulmadığı ve tedavi edilmediği takdirde, bağışıklığı zayıf kişilerde enfeksiyonlar ölümcül olabilmektedir (Sato *et al.* 2010).

Candida, Irak'ın Duhok kentindeki alınan klinik örnekler kan dolaşımı enfeksiyonlarında sorumlu en önemli patojen olarak kabul edilmiştir (Ali *et al*. 2020). 1997 ve 2002 yılları arasında *Candida* enfeksiyonları, Birleşik Krallık'ta en yaygın nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarından biriydi.

Candida albicans, insanların yaklaşık %50'sinin tipik mikrobiyotasında bulunur, enfeksiyonlar küçük mukokutanöz hastalıklardan birçok organı içeren sistemik bir enfeksiyona kadar çeşitli şekillerde ortaya çıkabilmekte (Henriet *et al.* 2013). *Candida albicans*'ın ağız boşluğu, bağırsak mukozası, deri ve invazif enfeksiyonlardaki klinik belirtileri görülmektedir (De Backer *et al.* 2000).

Turizm, sosyoekonomik koşullar ve yaygın göç hareketlerinin, bir sonucu olarak dermatofit enfeksiyonunun epidemiyolojisinin gelişmesine yol açmaktadır. Örneğin *Trichophyton soudanense, Trichophyton violaceum* ve *Microsporum audouinii* gibi Asya ve Afrika'ya özgü dermatofitler bu nedelerle Avrupa ve Kuzey Amerika'da daha yaygın hala gelmektedir (Zhan *et al.* 2021). Dermatofitozun değişen paternleri, nedensel ajanların epidemiyolojisindeki değişikliklere yansır. Örneğin, *Tinea capitis* bir asır önce Avrupa'da en yaygın dermatofitozdu, ancak yirminci yüzyılın sonlarında *Tinea pedis* daha sık hale geldiğinde, *Tinea capitis* daha az yaygın hale gelmiştir (Ameen 2010).

2.2.2 Vücut organ ve sisteminde meydana gelmesi

Kandidiyaz, *Candida* türlerinin ağızda neden olduğu ve en sık görülen mantar enfeksiyonudur (Aggarwal *et al.* 2018). Önceden, nüfusun yüzde 35 ila yüzde 80'inin oral *Candida* ile enfekte olduğu tahmin ediliyordu (Du *et al.* 2021). Yakın tarihli bir araştırmaya göre moleküler tanımlama teknikleri kullanılarak, normal ağız florasının bir parçası olarak tüm bireylerde görülmütür (Mosaddad *et al.* 2019). *Candida albicans,* hem enfekte hem de sağlıklı ağızlarda keşfedilen en sık türdür ve tüm oral mantar izolatlarının yaklaşık %80'ini oluşturur.

Candida glabrata, Candida dubliniensis, Candida parapsilosis, Candida krusei ve *Candida tropikalis* ağızda bulunan albicans olmayan *Candida* türlerinden bazılarıdır. (Aslani *et al*. 2018).

Kötü ağız hijyeni, hareketli protezler, ortodontik ekipmanlar, ağız kuruluğu (kserostomi), sigara ve steroid kullanımı, yüksek karbonhidratlı diyet ve oral mukoza bozuklukları

kandidiyazis için en yaygın lokal risk faktörleridir (Millsop and Fazel 2016). Yaş, gebelik, antibiyotik tedavisi, sistemik kortikosteroid tedavisi, tümör gibi hastalıklar ve tedavileri, sindirim sistemi hastalıkları, beslenme yetersizlikleri (demir, folik asit ve vitamin eksikliği), endokrinopati (diyabet, hipotiroidizm, hipoparatiroidizm vb.), otoimmün hastalıklar (Sjögren sendromu vb.), HIV ve primer immün yetmezlikler tanımlanan sistemik predispozan faktörler arasındadır (Suryana *et al.* 2020).

Oral kandidiyazis kendini çeşitli şekillerde gösterir. Sonuç olarak, iki tür kandidiyaz vardır. Birincil olarak ağız boşluğunu ve perioral bölgeyi etkileyen birincil kandidiyaz, ikincisi ise sistemik bir hastalığın parçası olarak ortaya çıkan sistemik kandidiyazıstır. Mukozanın değişmesi, *Candida*'nın neden olduğu enfeksiyon ve lezyonlara karşı daha duyarlı hale getirir (Bajpai *et al*. 2019). Kandidiyazis, klinik semptomlara dayalı olarak renk değişkliği bakımından sıklıkla beyaz ve kırmızı kategorilere ayrılır (Warnakulasuriya *et al.* 2021). Psödomembranöz kandidiyazis, akut eritematöz kandidiyazis, kronik eritematöz kandidiyazis, kronik hiperplastik veya nodüler kandidiyazis majör tipi oluşturan dört bozukluktur (Baumgardner 2019).

İnsan gastrointestinal (GI) kanalındaki 10-100 trilyon sayısında kommensal bakteriler bulunmaktadır. Bakteriler GI mikrobiyotasının% 98'ini oluşturur. Mantarlar, virüsler ve protistler kalan % 2'yi oluşturur. Bakteriler bağırsak mikrobiyal popülasyonlarına hakim olmasından dolayı çoğu araştırmada, diğer mikroorganizmaların aktiviteleri göz ardı edilirken, mukozal bağışıklığı modüle etme ve bağırsak sağlığını desteklemedeki rollerine odaklanmıştır (Canela *et al.* 2018).

Birçok hayvanın midesi mantarlar tarafından kolonize edilir. Hemen hemen tüm GI bölgelerinde bulunurlar ve metagenomiklere göre GI kommensal bakterilerle yakından etkileşime girerler. Araştırmalarda insan dışkısında çok sayıda mantar bulunmuştur. *Aspergillus, Cryptococcus, Mucor, Rhodotorula* ve *Trichosporon* cinsleri de insanlarda yaygındır ve solunum sisteminden veya deride hareket ettikleri kabul edilir (Mao *et al.* 2020).

Luminal mikrobiyota (esasen dışkıda bulunur) ve mukozal mikrobiyota, GI yolundaki (mukozaya bağlı ve bağırsak epiteline yapışık) iki ayrı ekosistemdir. Önceki araştırmalar, mantar ve bağırsak iltihabı arasında bağlantı bulmuş olsa da, çoğu geleneksel kültür yöntemlerini kullanmıştır. Taksonomik tanımlamalar için yeterli bilgi toplamak amacıyla DNA tabanlı mantar araştırması gereklidir, bunun yanı sıra insan GI mikrobiyomu üzerine yapılan araştırmaların çoğunda dışkıya bakılmıştır (Qiu *et al.* 2015).

Ancak orada bulunan bakteriler hastalığın başlangıcında doğrudan rol oynamayabilir. Miktar olarak daha küçük olmasına rağmen, mukozal mikrobiyota, dışkı mikrobiyotasından daha fazla mikrobiyal sinyali yansıtır ve konakçının bağışıklık tepkisi üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Mukoza ile ilişkili mantar disbiyozunun spesifik yönleri henüz tam olarak tanımlanmamıştır ve birkaç araştırma mukoza ile ilişkili mantar disbiyozunu luminal kontrollerle karşılaştırmıştır (Baumgardner 2019).

İnflamatuar bağırsak hastalığı (IBD) olan bireylerde mantar bileşimindeki değişiklikler yaygındır ve bozulmuş konakçı ortamlarında bu, hastalık semptomlarını şiddetlendirebilir. Son araştırmalar, Crohn hastalığı olan hastaların bağırsaklarında *Candida albicans*'ta büyük bir artış bulmuştur. Bu da gecikmiş mukozal iyileşme ve anti-Saccharomyces cerevisiae antikorlarına neden olmaktadır. Fungal disbiyoz, dekstran sülfat sodyum (DSS) ile indüklenen sıçan IBD modellerinde fırsatçı patojenik *Candida* ve *Trichosporon*'un ve daha düşük patojenik olmayan Saccharomyces seviyelerinin desteklenmesi ile karakterize edildi (Mukaremera *et al.* 2017).

Bağırsak mantarının bağırsaktaki iltihaplanma üzerindeki etkisi tartışmalıdır. Çok sayıda bağırsak mantarının hücre duvarlarında -glukanı tanımlayan bir bağışıklık hücre reseptörü olan Dectin-1, bireylerde genellikle daha yüksek ülseratif kolit şiddeti ile bağlantılı olan bir genetik tek nükleotid polimorfizmine sahiptir. Ayrıca, bağırsaktaki mantar-bakteriyel etkileşimler hala bir gizemdir (Hu *et al.* 2021).

2.2.3 Patojenite

Candida albicans, insan mukoza florasının doğal bir unsuru olmasına rağmen, uygun koşullar sağlandığında hastalığa neden olabilen fırsatçı bir patojen olarak da kabul edilmektedir (Kong *et al.* 2015). *Candida* enfeksiyonları yüzeysel ve yaygın enfeksiyonlar olmak üzere iki tipe ayrılır. Vajinal, oral pamukçuk, endokard, merkezi sinir sistemi, kemik ve eklem mantar infiksiyonları örnek olarak sayılabilir (Mack *et al.* 2017).

Mekanik ventilasyon uygulanan hastalarda bronşiyal ve trakeal yollarda *Candida albicans* kolonizasyonu da kaydedilmiştir (Huang *et al.* 2020). *Candida* ayrıca depresyon, anksiyete, zayıf göğüs gelişimi, hazımsızlık, ishal, migren ve adet öncesi stres ile de bağlantılıdır (Builder 2021).

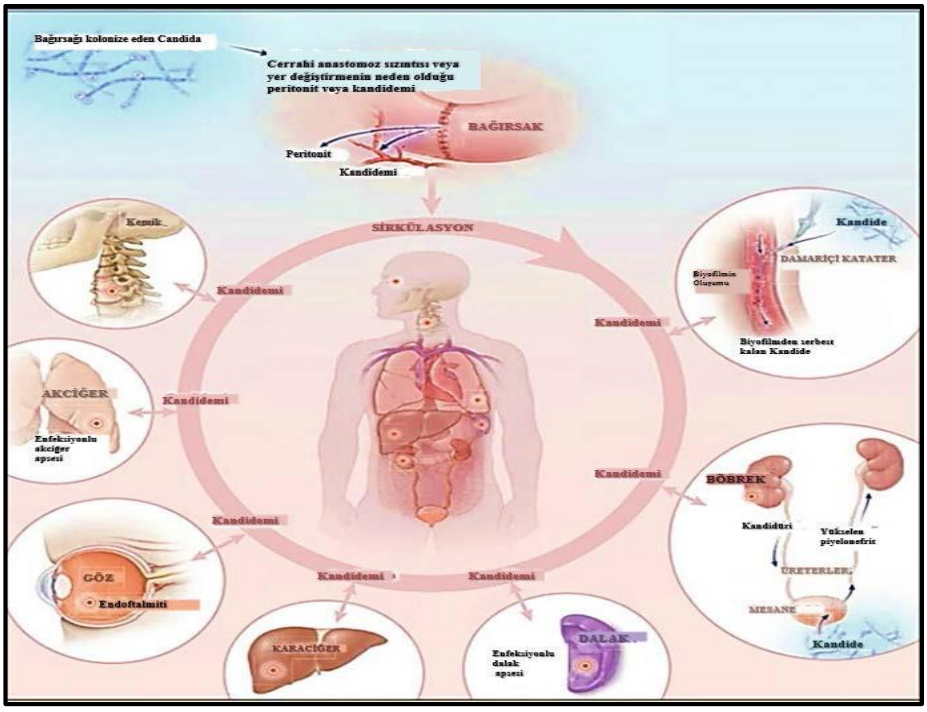
Candida albicans insan için önemli bir patojendir (Prasad *et al.* 2019). Bu organizmanın potansiyel virülans özelliklerinin her birine girmeden önce, onun bir patojen olarak ne kadar uyarlanabilir olduğunu not etmek çok önemlidir (Padder *et al.* 2022). Uyarlanabilirliğinin en önemli yönlerinden biri, her biri kendi çevresel streslerine sahip, anatomik olarak çeşitli ortamlarda ortaklaşa yaşama kapasitesidir (Mba and Nweze 2020). Bu nedenle *Candida albicans* ve diğer *Candida* spp. kommensal mikropların çoğundan daha geniş bir yelpazede rahatsızlığa sebep olabililmektedir (Vila *et al.* 2020). Bu yerlerin her birinde kommensal olarak yaşayan ve hastalığa neden olan *Candida albicans*'ın aksine, *Escherichia coli* insanların midesini kolonize eder, ancak ağız boşluğunda ve nadiren vajinal mukozada geçici olarak saptanır (Staniszewska *et al.* 2012).

Fırsat doğduğunda, mukozal yüzeyler söz konusu ise, kaynak kıtlığı ve bakteri rekabeti, mantar ve bakteriler seçici destek verir (Man *et al.* 2017). Daha az uygun mikroorganizmalar birçoğu gıda kıtlığı veya fazlalığı sırasında zorlamalar sonucunda elimine edilir. Bakteriyel mikrobiyota, katabolik ve anabolik yollarını düzenler. İnsan patojenik mantarında benzer mekanizmalar tanımlanmamıştır, ancak var olması muhtemeldir (Mixão and Gabaldón 2018). *Candida'ya* özgü genlerin çoğu katabolik

proteinleri kodlar ve bu genlerin bazılarının organizmanın hem ortak hem de patojen olarak hayatta kalmasından sorumlu olması mümkündür (De Backer *et al.* 2000).

Ayrıca, belirli immünolojik yetersizliklerden uygun olmayan takma dişlerin kullanımına kadar çeşitli altta yatan nedenler konakçıyı enfekte eder. *Candida albicans* 'fırsatçı' olmasına rağmen, konakçıyı birçok anatomik yerde enfekte eden bir patojendir.

Candida albicans bu konuda ancak *Pseudomonas aeruginosa* ile eşleştirilebilir. Kandidiyazisin bu kadar yaygın olması, bunların ciddi enfeksiyonlar olduğu iddiasını desteklemektedir (Staniszewska *et al*. 2012). Sonuç olarak, *Candida spp*. kandidemi hastalarında % 35 atfedilebilir ölüm oranı ile Amerika Birleşik Devletleri ve dünya genelinde hastane enfeksiyonlarının dördüncü önde gelen nedenidir (Pristov and Ghannoum 2019). Ek olarak, orofaringeal kandidiyazis (OPC) AIDS hastalarının yaklaşık %70'ini etkiler ve tüm kadınların (AIDS'li veya AIDS'siz) %70'inde *Candida spp*.'nin neden olduğu en az bir vajinit atağı geçilir ve %20'sinde tekrarlayan infiksiyona yol açmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 İnvaziv kandidiyazis patogenezi (Kullberg and Arendrup 2015).

2.2.4 *Candida albicans*'ın invazifliği

İnvaziv *Candida* enfeksiyonu yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) yaygındır ve ölüm oranı yüksektir. Bu özellikle bağışıklığı baskılanmış kişilerde veya ölüm oranları yüzde 35 ila 80 arasında değiştiğinde ciddi rahatsızlıkları olan kişilerde geçerlidir. İnvaziv *Candida* enfeksiyonu, tanı koymadaki zorluğuna rağmen, tüm YBÜ enfeksiyonlarının %17'sini oluşturan yoğun bakıma yatış enfeksiyonlarının üçüncü en yüksek nedenidir (Gong *et al.* 2016).

Yaş, altta yatan bozukluklar, çok bölgeli *Candida* kolonizasyonu, invazif prosedürler, ilaçlar, üst karın ameliyatı ve immünosupresif koşullar, invazif mantar enfeksiyonu olan kritik hastalarda % 40 ila % 82 sıklıkta önemli risk faktörleridir. *Candida albicans,* invazif mantar hastalıklarının en yaygın patojenlerinden biridir (León *et al*. 2006).

Amerika Birleşik Devletleri'nde *Candida albicans* enfeksiyonları, YBÜ enfeksiyonlarının %50 ila %70'ine denktir. Ancak Asya, Güney Amerika ve Kuzey Avrupa'da *albicans* dışı *Candida* (NAC) enfeksiyonunun sıklığı daha fazladır. *Candida albicans*, son 20 yıldır hastanede yatan hastalardan elde edilen en yaygın suş olmuştur. Ancak şimdi artan bir NAC enfeksiyonu eğilimi vardır.

Candida glabrata enfeksiyonları, çeşitli alanlarda *Candida* enfeksiyonlarının %15 ila %20'sini temsil eder. 1,25* Birkaç *Candida*'da mantar direnci değişmiş ve flukonazol duyarlılığı azalmıştır. (*Candida albicans* ile karşılaştırıldığında) (Gong *et al.* 2016).

İnvaziv kandidiyaz, acil müdahale gerektiren ciddi bir hastalıktır. Artan tıbbi müdahale standartları nedeniyle prevalansı son 50 yılda önemli ölçüde artmıştır. *Candida* spp'nın kan dolaşımı enfeksiyonunun dördüncü en yaygın nedeni olduğu sık sık iddia edilir ve invazif *Candida* enfeksiyonlarının artışta olduğu düşünülür. Önemli coğrafi faklılklar nedeniyle, invazif *Candida* enfeksiyonlarının dünya çapındaki hastalık yükünü tahmin etmek zordur (Hobson 2003).

2.3 Biyofilm Oluşumu

Biyofilm gelişimi *Candida* patogenezinin en kritik özelliklerinden biri olarak kabul edilir, mukozal hücrelere, kateter ve protez gibi tıbbi cihazların plastik yüzeylerine yapışarak cihazla ilişkili enfeksiyonlara ve hastane enfeksiyonlarının yayılmasına neden olabilmektedir (Finkel and Mitchell 2011).

Biyofilm üreten hücreler, üç nedene bağlı olarak (sağlıklı insanlarda çoğalabilmeleri, konağın bağışıklık sistemi içinde hayatta kalabilmeleri ve antifungel ilaçlara karşı daha yüksek bir dirence sahip olmaları) natant hücrelerden farklıdır (Gebreyohannes *et al.* 2019).

Biyofilm gelişimi, tıbbi cihazlar veya denatüre mukozal tabaka tarafından uyarılır. İlişkili semptomlar ağrısızdan şiddetli ağrıya kadar değişir (Finkel and Mitchell 2011, Nett *et al.* 2010, Sardi *et al.* 2013). Bunun gelişimi dört aşamayla oluşur: 1. maya tomurcuklanan hücrenin konakçı hücrelerin veya plastik yüzeylere yapışması, 2. hücre tomurcuklanması, bu da ek maya hücreleri ve ilk başta psödohifa ve gerçek hif üretimi ile sonuçlanır: 3. içinde hif ve yalancı hif hücrelerinin bulunduğu bir matrisin oluşturulması, bağışıklık korumalı ve antifungal ilaç hedeflerinin çoğunu maskeleyen üç boyutlu bir yapı oluşturulması: 4. Yeni maya hücrelerinin yayılması ve bunların yeni yerlere dağılmasıdır (Lipke *et al.* 2018, Uppuluri *et al.* 2010). Bunun sonucunda tedavisi son derece zor olan ilaca dirençli infiksiyonlarla sonuçlanır (Zhao *et al.* 2018).

(Zhou *et al.* 2012) tarafından yürütülen yeni bir araştırmaya göre kullanılan en eski anti-inflamatuar ilaçlardan biri olan aspirin, üç boyutlu yapının oluşumunu kısıtlayarak ve maya hücresi dağılımını önemli ölçüde azaltarak biyofilm gelişimini inhibe eder, bu da bizi antifungal tedavilerin etkinliğini arttırmak için aspirin ve antifungal ilacların kombinasyonunun kullanılabileceği sonucuna götürür. (Zhou *et al.* 2012).

2.4 Patojenite ile İlişkili Genler

Son yıllarda klinik örneklerden izole edilen patojenik mantarların çeşitliliğindeki artışa rağmen, *Candida albicans* mantar enfeksiyonlarının en yaygın nedeni olmaya devam etmektedir (Navarro-García *et al*. 2001).

Diğer yandan *Candida albicans'ın* ALS gen ailesi, konakçı yüzeylerine yapışma sürecinde yer alan büyük hücre-yüzey glikoproteinleri kodlar. Diğer *Candida* türlerinde klinik hastalık vakalarından izole edilmiş ve ALS genleri, fizyolojik olarak ilgili mekanizmalarla farklı şekilde düzenlenir. ALS genleri, aynı gen için gerinim ve özel boyut farklıkları dahil, gen düzenlemesinde gerilime özel farklılıklar, bazı izotlarda belirli ALS genlerinin olmaması ve diğerlerinde ek ALS kodlama bölgelerinin bulunması gibi çeşitli şekillerde farklılık gösterse de, ALS genlerinin diferansiyel regülasyonu ve genetik değişkenliği, büyüme koşullarından da etkilenen çeşitli hücre yüzeyi ALS protein profiline neden olur (Hoyer *et al.* 2001).

Örneğin, her iki ailenin de benzer sayıda gene sahip olduğu ve ailede benzer mekanizmalarla farklı şekilde düzenlendiği görülen *Candida albicans* SAP ailesi gizlenmiş aspartil proteinlerini kodlar, ALS ve SAP genleri büyük oranda aynı *Candida albicans* kromozomlarında yer alır. Bu eş lokalizasyon trendi *C. dubliniensis ve C. tropikal* gibi türlerde de devam eder. Ayrıca, bu türdeki ALS genlerinin sayısı SAP genlerinin sayısına yaklaşık olarak eşittir (Hube *et al.* 1994).

ALS ve SAP kodlama genlerine sahip bu *Candida* türleri, klinik hastalıktan en sık izole edilen türlerdir. Aslında, her bir ALS ve SAP genlerinin sayısı aynıdır. Türler, pozitif bir şekilde frekansa bağlıdır (Calderone and Fonzi 2001, Hoyer *et al.* 2001).

3 MATERYAL VE METOT

3.1 Hastalar

Her iki cinsiyetten 16-70 yaş aralığında oral candidiasisi olan toplam 101 hasta belirlenmiştir. Belirtilen kriterlere göre hastanın genel ve ayrıntılı bilgilerini içeren detaylı çalışma yapılmıştır.

3.2 Klinik İzolasyon

Örnekler tüm hastaların oral mukoza (palatal mukosa ve dil üstü)'sından sürüntü ile elde edildi. Numuneler Ekim 2020 - Mart 2021 tarihleri arasında toplandı. Kerkük 'teki kamu sağlık laboratuvarını ziyaret eden sağlıklı çalışan işçilerden 63 numune, Kerkük Onkoloji ve Hematoloji tanı ve tadavi Merkezi'nde kanser hastalarından 20 numune ve Azadi eğitim ve araştırma Hastanesine müracaat eden 15-20 olan yaşlarında hastalardan 18 numune alındı.

3.3 Materyaller

İncelemede kullanılan araç gereçler, bunları üreten şirketler ve menşeleri Çizelge 3.1 'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan genel aparatlar ve aletler

No.	Aparat	Şirket	Ülke
1	Otoklav	Sakura	Japonya
2	Santrifüj	Fisher Scientific	ABD
3	Tek kullanımlık Petri kapları	Himedia	Hindistan
4	Mic qPCR Döngüleyici	Bio Molecular System	Avustralya
5	Mic Tüpü	Bio Molecular System	Avustralya
6	Mikropipet	Human	Almanya
7	Burgaç	Quality Lab System	İngiltere
8	Kuluçka makinesi	Memmert	Almanya
9	Işık mikroskobu	Optika	İtalya
10	Buzdolabı	Beko	Türkiye
11	Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)	Bio-Rad	ABD
12	Su banyosu		Çin
13	Güvenlik dolabı	Biotec	Kore

Çizelge 3.1 Bu çalışmada kullanılan genel aparatlar ve aletler (Devam)

14	Hassas terazi	Daihan Labtech	Almanya
15	UV transillüminatör	Sartorius	ABD
16	Düztabanlı 96 oyuklu hücre kültürü plakası		
17	Kamera	iphone 8 plus	Çin
18	Quantus Florometre	Promega	ABD
19	Jel Görüntüleme Sistemi	Major Science	Tayvan
20	Mikro spin Santrifüj	My Fugene	Çin
21	Mikrodalga fırın	GOSONIC	Çin
22	OWL Elektroforez Sistemi	Thermo	ABD
23	Termal ısı döngüleyici	Thermo Fisher Scientific	ABD
24	Su banyosu		Çin

3.3.1 Kitler, reaktifler ve tamponlar

Çalışmada kullanılan kitler, reaktifler, primerler ve kültür ortamı Çizelge 3.2, Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan malzemeler ve laboratuvar eşyaları

No.	**Malzemeler**	**Şirket**	**Ülke**
1	Gram boya	Himedia	Hindistan
2	Api Candidası	Bio meriux	Fransa
3	Api 20 C AUX	Bio meriux	Fransa
4	ABIOpureTM Total DNA	ABIOpure	ABD
5	Salt Etanol	ROMIL pure chemistry	BK
6	GoTag qPCR Master Mix	Promega	ABD
7	Nükleazsız Su	Promega	ABD
8	Quantifluor dsDNA System	Promega	ABD
9	Etidyum Bromür Solüsyonu (10 mg/mL)	Promega	ABD
10	TAE 40X	Promega	ABD
11	Salt Etanol	ROMIL pure chemistry	BK

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kültür ortamları.

No.	Ortam	Üretici Adı	Menşe
1	Beyin kalp et suyu	Mast group	BK
2	Tripton soya suyu (TSB)	Mast group	BK
3	Kongo kırmızı ağarı	Himedia	Hindistan
4	Sabouraud dekstroz ağarı	Himedia	Hindistan
5	Kromagar Candidası	Chromagar	Fransa

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan *Candida albicans'ta* araştırılan aderans genleri için primer dizisi (Macrogen, Kore)

Primer Adı	Seq.	Uzatma Sıcaklığı (°C)
ALS3-F	5`-ACCTGACTAAAACTGCACCAA-3`	60
ALS3-R	5`-GCAGTGGAACTTGCACAACG-3`	
SAP8-F	5`-TCTCAAGAAATTATCCCCAAAATA-3`	55
SAP8-R	5`-TCGGTTCCATTATCAGAATTTGTTC-3`	
ITS1	5`-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3`	55
ITS4	5`-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3`	

3.4 Yöntemler

3.4.1 Kültür ortamının hazırlanışı

3.4.1.1 Beyin kalp enfüzyon suyu

- 1000 mL saf veya deiyonize su içine (34,5 g) toz eklenir.
- İyi karıştırılır ve dağıtılmış solüsyonu uygun konteynerlere boşaltılır.
- 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edilir.
- Oda sıcaklığında soğutulur.
- Hazırlanan besiyeri hemen kullanılabilir veya 1 haftaya kadar 2 ila 8oC'de saklanabilir.

3.4.1.2 Tripton soya suyu (TSB) hazırlanması

- 1000 mL cinsinden çözünmüş (30 g) toz çözünür.

- Uygun kaplara dağıtılır.
- 121°C'de 15 dakika boyunca otoklavda sterile edilir.

3.4.1.3 Kongo kırmızı agarın hazırlanması

- (32,54 g) (1000 mL) distile suda hazırlanır.
- Tam çözülmesi için uygun ısıya getirilir.
- 15 dakika boyunca (121°C) otoklavda sterilize edilir.

3.4.1.4 Sabouraud agarı hazırlanması

- (65,0 g) toz besiyeri (1000 mL) distile suda eritilir.
- Tozun tamamen çözünmesi için kaynatılır.
- 15 dakika boyunca (121°C) otoklavda sterilize edilir.
- (45-50°C) ye kadar soğutulur ve iyice karıştırılarak steril petri kaplarına dökülür.

3.4.1.5 Chrom agar *candida* hazırlanması

- Tozdan yavaşça 1000 mL distile suya eklenlir.
- Agar yoğun hale gelene kadar karıştırılır.
- Kaynamaya kadar (100°C) düzenli olarak karıştırlır.
- 45-50°C'ye kadar su banyosunda soğutulur, hafifçe sallanır ve karıştırılır.
- Ortamı steril petri kaplarına dökerek katılaşıp kurumaya bırakılır.

3.5 Mikrobiyolojik Testler

3.5.1 Gram boyama

Seçilen tek koloniler, üretim şirketi Kit protokolüne (Himedia/Hindistan) göre boyanmıştır. Lamlar, bir ışık mikroskobunun (100 X) hedefinin büyütme oranı incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.5.2 Germ tüp testi

Bu prosedür, invazif *Candida albicansların* tanımlaması için yapılır. İzole edilmiş ve saflaştırılmış suşlar insan serumunda 2 saat boyunca 37°C'de inkübe edilir ve kısa, ince, germ tüplere üretme yeteneği patojenik bir gerilme olarak kaydedilir.

3.5.3 *Candida* için analitik profil indeksi

- API NaCl'nin %0,85 Orta (2 mL) bir ampülü açılır.
- Bir pipet veya bez kullanarak, iyi izole edilmiş bir veya aynı koloniden alıp 3 McFarland'a eşdeğer bulanıklık değerine sahip bir süspansiyon hazırlanır.
- Maya süspansiyonunu homojen hale getirilir. Bu süspansiyon, hazırlıktan hemen sonra kullanılır.

3.5.4 *Candida* AUX için analitik profil indeksi

(A) Şeridin hazırlanması

1. Nemli ortam oluşturmak için İnkübasyon kutusun hazırlanır ve yaklaşık 5 mL distile su veya demineralize su veya katkı maddesi veya kimyasal içeren ve gaz oluşturan örneğin (CL_2, CO_2, vb.) herhangi bir su tepsinin peteklerine yayılır.

2. Tepsinin uzatılmış kapağındaki gerinim referansı kaydedilir.

3. Şerit paketinden çıkarılır, inkübasyon tepsisine yerleştirilir.

(B) İnokulumun hazırlanması

1. API Süspansiyon Ortamı (2 mL) bir ampülü açılır veya API NaCl'nin %0,85 Orta (2 mL) ampülü açılır.

2. Maya kolonisinin bir kısmı pipet yardımıyla emme veya art arda dokunma yoluyla alınır.

3. McFarland'a eşit bulanıklığa sahip bir süspansiyon hazırlanır.

4. API C Medium'dan oluşan bir ampul açılır ve önceki süspansiyonun yaklaşık 100 µL'sini bu ampule aktarılır. Pipet ile yumuşak bir şekilde homojen hale getirilmiş baloncuk oluşmamasına özen gösterilir.

5. Strip inokülasyonu

6. Küpürleri API C Medium'un amfiyle elde edilen süspansiyonla doldurulur. Pipet ucu kap kenarına yerleştirerek baloncuk oluşumunu önlenir.

7. Kapak tepsiye yerleştirilir ve 48-72 saat boyunca 29°C±2°C'de inkübe edilir (±6 saat).

3.6 Biyofilm Oluşumunun Algılanması

3.6.1 Tüp yöntemi

Biyofilm oluşumunun kalitatif değerlendirmesi ise şöyle açıklanabilir: Trypticase soya broth'u (10 mL) gece kültürleri vasatlarından alınan ve 37°C'de 24 saat inkübe edilen bir çok mikroorganizmayla aşılanmış ve bu tüpler Fosfat Tampon Tuzlu Su (pH 7,2) ile

karıştırılmış ve kurutulmuşlardır. Kurutulmuş tüpler %0,1 Kristal Mor ile boyanmıştır. Fazla boya deiyonize suyla yıkanmıştır. Daha sonra tüpler, biyofilm oluşumu için ters çevrilmiş konumda kurutulmuşlardı. Biyofilm oluşumu, görünür bir film tüpün duvarına ve tabanına hizalandığında pozitif kabul edilmiştir.

3.6.2 Mikrotiter plakalar yöntemi

Sterilize ve özel olmayan ortamı test etmek için, 96 adet altı düz mikrotiter plaka, hücre süspansiyonunun 100 µ alotları ile doldurulmuştur ve sadece kontrol olarak kullanılmıştır. Mikrotiter plakalar 48 saat boyunca $37c^0$ inkübe edilmiştir. Her bir kuyu içeriği, inkübasyon sonrasında plakalara vurularak yavaşça çıkarılmıştır. Serbest yüzen 'planktonik' organizmaları gidermek için kuyular 200 µ PBS (pH 7,2) ile dört kez yıkanmıştır. Kristal viole (%0,1 W/v), bir plakada bulunan organizmaların oluşturduğu biyofilmleri boyama için kullanılmıştır. Fazla boya, plakalar deiyonize suyla iyice yıkanarak giderildi ve plakalar kurumaya bırakılmıştır. Bağlı *Candida* hücreleri genellikle kuyuların dibinde bir biyofilm oluşturmuş ve kristal mor ile eşit şekilde boyanmıştır.

630 nm'de bir mikro-ELISA otomatik okuyucu (Model 680, Bio Rad) kullanılarak, boyanmış yapışan *Candida* biyofilminin optik yoğunluğu (OD) belirlenmiştir. Bu OD değerleri, yüzeye yapışan ve biyofilmler oluşturan *Candida*'nın bir ölçüsü olarak yorumlanmıştır.

3.6.3 Kongo kırmızı agar yöntemi

Biyofilm gösteriminin bir diğer yöntemi olan Brain Heart infüzyon broth, %5 sakroz ve kongo kırmızısı ile desteklenmiş. Plakalar 2-3 gün boyunca 37°C'de inkübe edilmiş şekilde havalandırılmıştır. Kuru kristal kıvamlı siyah koloniler pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir.

3.7 Moleküler Analiz

3.7.1 DNA ekstraksiyonu

Genomik DNA, aşağıdaki sırasıyla aşağıdaki adımlar kullanılarak ABIOpure Extraction protokolüne göre *Candida* büyümesinden izole edilmiştir:

- Pelet hücreler için 13000 dev/dak'da 2 dakika boyunca 1 mL gece bekletilmiş kültür mevcuttur.
- Hücre pelesi 200 µL tampon CL'de tamamen bekletildi.
- Protein sindirimi ve hücre lizinde 200 µL tampon CL ve hücre topekine 20 µL Proteinase K çözeltisi (20 mg/mL) eklenmiştir, ardından tüp vorteks kullanılarak vigore olarak karıştırılarak 30 dakika boyunca 56°C'de inkübe edilmişti, daha fazla liz için 70°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında numuneye 200 µL tampon BL eklendi, ardından tüp vorteks kullanılarak güçlü bir şekilde karıştırıldı ve 30 dakika boyunca 70°C'de inkübe edilmiştir.
- Numuneye mutlak etanol 200 µL eklendikten sonra numuneyi iyice karıştırmak için puls- vorteks eklenmiştir.
- Tüm karışımlar dikkatlice mini sütuna aktarıldı, ardından 6,000 x g'de (>8,000 dev/dak) 1 dakika boyunca santrifüjlendi ve toplama tüpü yenisiyle değiştirilmiştir.
- Tampon BW 600 µL'den mini sütuna eklendi, ardından 6,000 x g'de (>8,000 dev/dak) 1 dakika boyunca santrifüjlendi ve toplama tüpü yenisiyle değiştirilmiştir.
- Tampon TW 700 µL'den itibaren uygulanmıştır. 1 dakika boyunca 6,000 x g'den daha yüksek bir hızda (>8,000 dev/dak) santrifüjlenmiş. Mini sütun toplama tüpüne geri takılmıştır.
- Mini kolon, kalan yıkama tamponunu temizlemek için 1 dakika boyunca tam hızda (>13,000 xg) santrifüjlendikten sonra mini sütun yeni bir 1,5 mL tüpe konmuştur.
- Tampon AE 70 µL'den oda sıcaklığında 1 dakika boyunca eklenip inkübe edildi, ardından 5 dakika boyunca 5,000 dev/dak'da santrifüjlenmiştir.

3.7.2 DNA'nın kantitatif nicelenmesi

Quantus Florometre, sonraki uygulamalar için numunelerin kalitesini tespit etmek amacıyla çıkarılan DNA konsantrasyonunu tespit etmek için kullanılmıştır. 1 µL DNA için, 199 µL seyreltilmiş Quanti fluor boya karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakikalık inkübasyon sonrasında DNA konsantrasyon değerleri tespit edilmiştir.

3.7.3 Primer hazırlığı

Primerler, Macrogen Company tarafından liyofilize bir biçimde tedarik edilmiştir. Liyofilize primerler, stokta son olarak 100 pmol/µL konsantrasyonuna sahip olmak için nükleaz içermeyen suda çözünmüştür. 10 pmol/µL çalışma primer çözeltisi elde etmek için 10 µL primer stok çözeltisi (dondurucuda -20°C'de depolanır) ile 90 µL nuclease içermeyen su eklenerek bu primerlerin çalışma çözeltisi hazırlanmıştır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Primerlerin hazırlanması

Primer Adı	Nükleaz içermeyen suyun hacmi (µL)	Konsantrasyon(pmol/µL)
ALS3-F	300	100
ALS3-R	300	100
SAP8-F	300	100
SAP8-R	300	100
ITS1	300	100
ITS4	300	100

3.7.4 Reaksiyon ayarı ve termal çevrim protokolü

Mantar için, analiz (güncellemeden önce 18S); uzunluğu 500 bp'den fazladır. Burada, kullanılan PCR koşulları Çizelge 3.6'da yer alıyor.

Çizelge 3.6 *Candida*'nın rRNA'sı için PCR koşulları

Adımlar	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95°C	5 dakika	1
Denatürasyon	95°C	30 saniye	30
Bağlama	55°C	30 saniye	
Uzatma	72°C	30 saniye	
Son Uzatma	72°C	7 dakika	
Bekleme	10°C	10 dakika	

GoTag qPCR Master Mix kiti (Promega, ABD), qPCR tayinine ana karışımı hazırlamak için kullanılmıştır ve şirket protokolü izlenmelidir. Daha sonra ana karışım Miniopticon Gerçek Zamanlı PCR sistemine (BioRad, ABD) konmuştur. Burada, kullanılan termosislerin koşulları Çizelge 3.7'de gösterildi.

Çizelge 3.7 Gerçek zamanlı PCR programı

Adımlar	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	95°C	5 dakika	1
Denatürasyon	95°C	20 saniye	40
Bağlama	56°C	20 saniye	
Yayılma	72°C	20 saniye	

3.7.5 Agarose jel elektroforez

PCR amflikasyonundan sonra, amflikasyonun varlığını kanıtlamak için agarose jel elektroforez benimsenmiştir. PCR çıkarılan DNA kriterlerini tamamen doğrular nitelikteydi.

3.7.5.1 Çözümler

1 X TAE tamponu, yükleme boyası, DNA merdiven işaretçisi, Ethidium bromide (10 mg/mL) kullanıldı.

3.7.5.2 Agarozun hazırlanışı

- 100 mL 1X TAE şişeye döküldü.
- Arabelleğe 1 gm (%1,5 için) agaroz eklendi.
- Tüm jel parçacıkları çözülene kadar solüsyon kaynayıncaya kadar (su banyosu kullanılarak) ısıtıldı.
- Karışıma 1 µL Ethidium bromide (10 mg/mL) eklendi.
- Agaroz karıştırılarak karışım hazırlandı ve böylece baloncuklar önlendi.
- 50-60°C'de soğuması için solüsyon bırakıldı.

3.7.5.3 Yatay agaroz jeli

Her iki kenarda klophane bantları kapatıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika boyunca katılaşmasına izin verildikten sonra, agaroz solüsyonu jel tepsisine döküldü. Tarak dikkatlice çıkarıldı ve jel tepsinin içine yerleştirildi. Tepsi, tampon jelin yüzeyi üzerinde 3-5 mm'ye ulaşana kadar 1X TBE-elektroforezs tamponu ile dolduruldu.

3.7.5.4 DNA yükleme

PCR ürünü için 5µL doğrudan kuyuya yüklenmiştir. Elektrik gücü 60 dakika boyunca 100 v/mAmp'de açılmıştı. DNA Katot'tan artı düğüm kutuplarına geçer. Jel içindeki Ethidium bromide lekeli şeritler, Jel görüntüleme sistemi kullanılarak görselleştirildi.

3.7.5.5 Sıralama

Güney Kore'de Macrogen Company tarafından yapmış, PCR DNA ürünü özel kapsüllerde dondurucu çanta ile gönderilmiştir. Sıralama çalışması, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nde (NCBI) çevrimiçi olarak (http://www.ncbi.nih.gov) ve BioEdit programı kullanılarak mevcut olan standart gen programı dizisi arasında gerçekleştirilmiştir.

3.8 İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucunda elde edilen, Windows için SPSS programı Ver.10 T testi kullanılarak analiz edilmiştir. Burada, istatistiksel açıdan önemli bir farklık göstergesi olarak <0,05 P değeri kabul edilmiştir.

4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Numunelerin Toplanması

Candida enfeksiyonlarının tür düzeyinde saptanması, ölümle sonuçlanabilecek, yaygın enfeksiyona neden olması hastalar için uygun antifungal tedavinin sağlanması hayati bir adımdır (Hankovszky *et al*. 2015). Çalışmamızda tüm hastalardan numuneler oral mukozadan (palatal mukoza ve dil üstü) sürüntü yöntemi ile toplandı. Çalışma için gerekli örnekler, Ekim 2020 ile Mart 2021 arasında, Kerkük halk sağlığı laboratuvarını ziyaret eden 63 sağlıklı işçiden, Kerkük Onkoloji ve Hematoloji tanı ve tadavi Merkezi'nde tedavi gören 20 kanser hastası ve Azadi Eğitim ve araştırma Hastanesi'nde yaşları 15 ila 20 arasında değişen 18 hastadan olmak üzere toplam 101 kişiden alınmıştır.

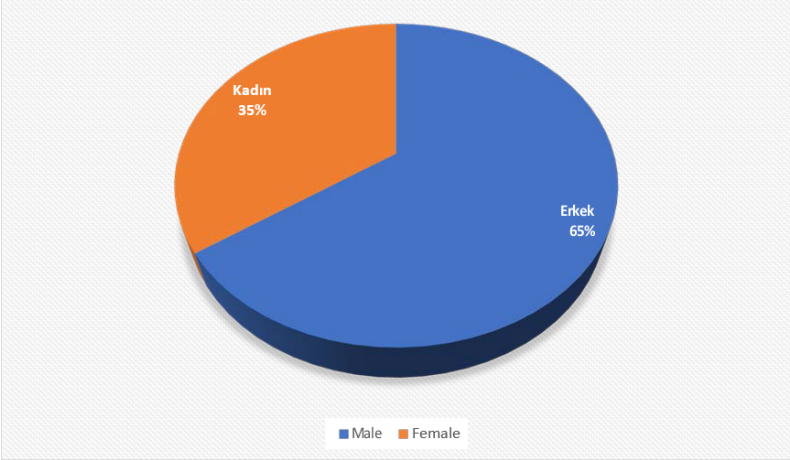
4.2 Yaş ve Cinsiyet Dağılımı

Enfeksiyon insidansı ilk muayeneler sonrası çalışmaya alınan bireylerin yaşlarına göre değerlendirilmiş olup, bulgular Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1 Mevcut çalışmada yaş dağılımı

Yaş	**Sayı**
15-25	24
25-35	23
35-45	26
45-55	16
55-56	12
Toplam	**101**

Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, çalışma bireylerinin cinsiyeti 66 erkek (%65,34) 35 kadın (%34,66) idi.

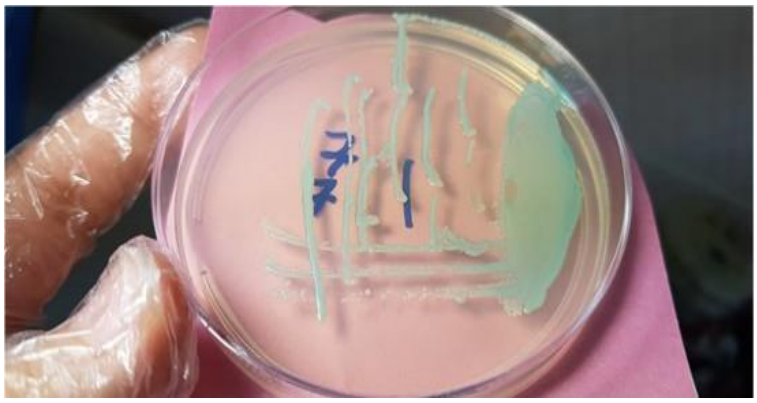


Şekil 4.1 Çalışma bireylerinin cinsiyet dağılımı yüzdesi

4.3 Kandidyaz Değerlendirmesi

4.3.1 *Candida* kolonizasyonu

Son yıllarda, invazif kandidiyazdan ölüm risk faktörleri araştırılmıştır ve başlıca nedenler arasında, ileri yaş, hematolojik malignite, kronik organ yetmezliği ve yoğun bakım ünitesinde yatış olarak tespit edilmiştir (Ortega-Loubon *et al.* 2019) (Şekil 4.2).



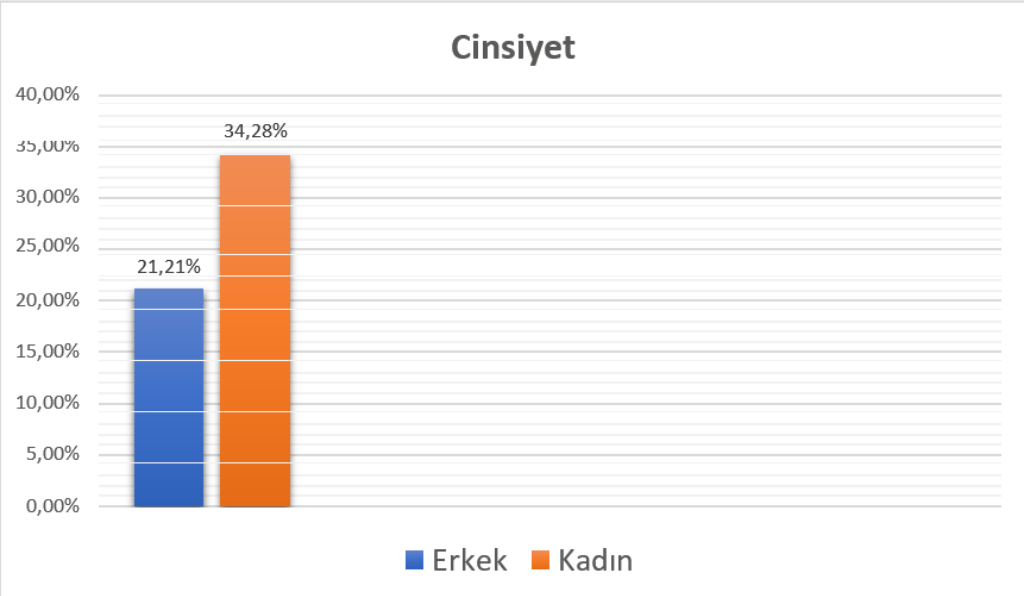
Şekil 4.2 *Candida'nın* CHROM agar üzerinde yetiştirilen koloni görünümü

Candida'yı belirlemek için daha ileri testler yapılmıştır. İşçilerden alınan 63 oral sürüntü örneğinin 14'ü (%22,2), kanser hastalarından alınan 20 oral sürüntü örneğinin 9'u (%60) *Candida albicans* pozitif bulundu. 15 izolattan 3'ü (%16,66) Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi 15-20 yaş grubundan elde edilmiştir.

Çizelge 4.2 Farklı hasta kategorilerinde *Candida* oluşumu

Kategori	***Candida* ve+**	***Candida* ve-**	**Toplam**
Çalışanlar	14 (22,2%)	49	63
Kanser	9 (60%)	11	20
15-20 yaş aralığı	3 (16,66%)	15	18
Toplam	**26 (25,74%)**	**75**	**101**

Cinsiyet dağılımına göre toplam 63 kişiden 14'ünün (%21,21) erkek, 35 kişiden 12'sinin (%34,28) kadın olduğunu göstermektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 *Candida* enfeksiyonunun cinsiyete göre dağılımı

İran Mazandaran Üniversitesi Hastanesinde yapılan araştırmanın sonuçlarına göre, yoğun kemoterapi veya radyoterapi gören kanser hastalarının %52,3'ünde *C. albicans* saptanmıştır. Irak'ın Necef kentinde kanser hastalarından alınan oral sürüntülerin %84,0'ında *Candida albicans* pozitif saptanmış ve sağlıklı kişilerin %52.0'nde tesbit edilmiştir (Samaka *et al.* 2018). Irak Basra kentinde, yapılan bir başka çalışmada, kanser hastalarının ağız boşluğunda *Candida*'nın toplam prevalans yüzdesi %77,8olarak saptanmıştır. Meme kanseri hastalarında %85,5 iken bu rakamı %80,7 ile lösemi hastaları izlemiştir. Ancak kontrol bireylerinde *Candida*'nın toplam yüzdesi %37,5 çıkmıştır (Aldossary *et al.* 2016). Kerkük şehrinde yapılan bir araştırmada, her yaştan ve her iki cinsiyetten ilkokullardan gelen öğrencilerin %58,37de, Kandidiyazis hastası adayı olduklarını göstermiştir (Aziz 2020). Sonuç olarak, kanser hastalarının hastane kaynaklı *Candida albicans* enfeksiyonlarına karşı oldukça duyarlı oldukları görülmektedir. Bu mikroorganizmalar, bağışıklığı baskılanmış hastalarda ciddi enfeksiyonlarda giderek daha fazla rol almaktadır (Samaka *et al.* 2018).

4.3.2 Biyokimyasal testler

İzole edilmiş çeşitli *Candida* türlerinin birincil tanımlaması için kültürlerde kullandıkları 1% karbohidratların örnğin (glukoz, maltoz, sakroz, trehaloz ve raffinoz) sonucunda indikatör renginde değişikliklere yol açan biyokimyasal testler kullanılmıştır (Elfeky *et al*. 2016).

Bu biyokimyasal testler, Şekil 4.4'te gösterildiği gibi API C ticari kitler olarak mevcuttur.



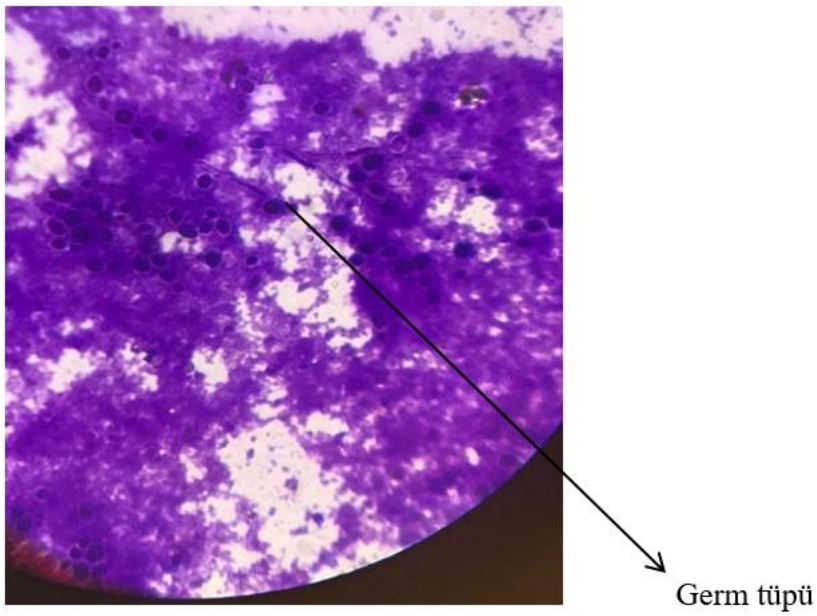
Şekil 4.4 API *Candida* ile *Candida albicans*'ın tanımlanması

4.4 İnvazif *Candida Albicans*'ın Değerlendirilmesi

Fungal kolonizasyonla invazif hastalık arasındaki ayrım, invazif fungal hastalığın teşhisini zorlaştırır. Normal koşullar altında *Candida albicans,* ortak olarak dimorfik bir maya ve önemli bir fırsatçı patojendir (Çizelge 4.3). *C. albicans*'ın patojenik olmayan durumu, blastospor maya ve diğer mikroorganizmaların dengesi ile belirlenir. *Candida albicans* patojenik olmadığında, kan yaymalarında spor antijenlerinin veya metabolitlerin varlığı, invazif *Candida albicans* enfeksiyonunun varlığını göstermez. Blastospor fazından (maya) hiphal faza geçiş sırasında mikrop tüpü oluştuğunda mantar patojenik hale gelir (Şekil 4.5).

Çizelge 4.3 Farklı hasta kategorilerinde germ tüpü ile *Candida*

Kategori	**Germ tüpü ve+**	**Germ tübü ve-**	**Toplam**
Çalışanlar	13 (92,85%)	1	14
Kanser	4 (44,44%)	5	9
15-20 yaş aralığı	3 (100%)	0	3
Toplam	**20 (76,92%)**	**6**	**26**



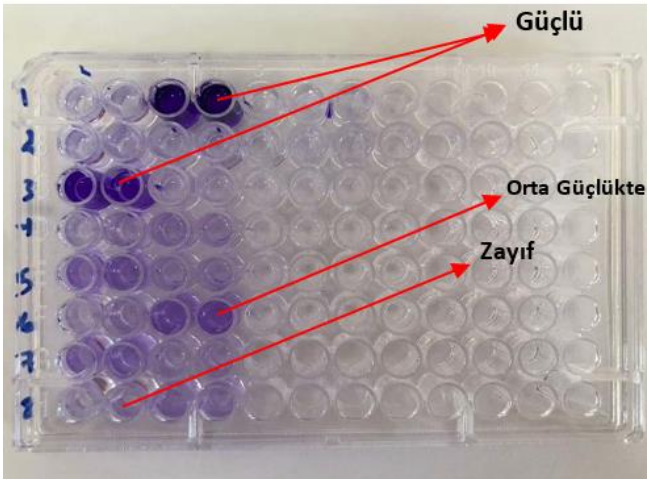
Şekil 4.5 Kristal violet ile boyanan germ tüpü

4.5 Biyofilmlerin Karakterizasyonu

4.5.1 Biyofilm oluşumunun tanımlanması

4.5.1.1 Biyofilm oluşumunun mikrotiter plaka yöntemi ile değerlendirilmesi

Biyofilm, bir yüzey veya arayüzde birbirine bağlı bir polisakkarit matrisine gömülü, yüksek düzeyde yapılandırılmış bir mikroorganizma topluluğudur (Sardi *et al*. 2014). İnsanlarda biyofilm ile ilişkili enfeksiyon, sağlık hizmetlerinde daha yaygın hale gelir ve tüm enfeksiyonların %65-80'ini oluşturur. Modern mikroskopi ve moleküler teknikleri kullanan birçok çalışmada kronik insan enfeksiyonlarının temel kaynağı olarak tanımlanmıştır (Cavalheiro and Teixeira 2018). İncelenen suşların süspansiyonları, iki gün boyunca 35°C'de Brain Heart Infusion Broth (BHI-broth) içeren cam tüplerde aerobik olarak kültürü yapıldı. Süpernatant sonradan eklendi ve cam tüp (%0,1) safranin solüsyonu ile boyandı, daha sonra üç kez damıtılmış su ile yıkandı ve kurutuldu. Tüplerin iç çeperine yapışık lekeli bir tabakanın varlığı olumlu bir sonuç olarak kabul edildi. Yalnızca sıvı-hava temasında mor rengli bir halkanın varlığı, Şekil 4.6'da gösterildiği gibi pozitif Mikrotiter plakası olarak kabul edilmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.6 Mikrotiter plak yöntemi ile biyofilm oluşumu



Şekil 4.7 Kongo kırmızısı yöntemiyle biyofilm oluşumu

Çalışmalar, tamamı *Candida* pozitif olan 26 hastanın 20'sinde (%76,92) oluşan biyofilmin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Distribütörler aşağıdaki gibidir: sağlıklı çalışan işçilerden alınan 14 oral sürüntü örneğinin 13'ü (%92,85) ve 9 kanser hastasının 4'ü (%44,44) *Candida albicans* pozitif bulunurken, 15-20 yaş grubundan 3 (%100) izolatta tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın sonucu (Shin *et al.* 2002)'nin bulgularıyla uyumlu bulunmuştur. Hindistan'dan yapılan bir başka çalışmada biyofilm oluşumu *candida albicansların*

%36,6 pozitif bulunmuştur (Arora *et al*. 2017). Bununla birlikte, bazı araştırmacılar daha yüksek (%64-73) oranda biyofilm üreten *Candida* izolatları bildirmiştir (Mohandas and Ballal 2011, Muni *et al.* 2012, Sida *et al.* 2016).

Biyofilm oluşumu üzerine yapılan çalışmaların çoğu *Candida albicans*'a odaklanmış olsa da, bazı araştırmacılar diğer *Candida* türlerinin, maya cinslerinin ve filamentli mantarların da biyofilm gelişiminde rol oynadığını keşfetmiştir (Sardi *et al.* 2014).

Mevcut çalışma bulguları, izolatların çoğunun güçlü ve orta düzeyde biyofilm oluşturma aktivitesi sergilediğini ortaya koydu bizim buluglarımız ile izolatların dokuya yapışma potansiyeline sahip olduğu açıklanabilir. Yüksek ekzoenzim aktivitesine sahip izolatların patojenitesi bir hayvan modelinde test edilmiştir (Jung *et al.* 2015).

4.6 ITS Geninin *Candida* için Moleküler Tespiti

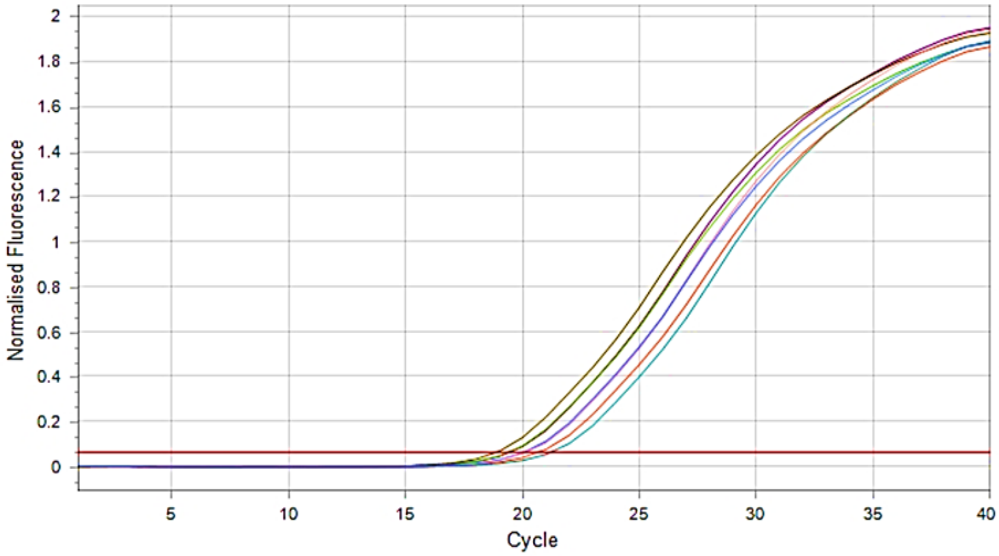
İzole edilmiş *candida* suşlarının ITS geninin moleküler tanımlaması, (Neville *et al.* 2015) tarafından belirtilen protokolleri takip etmiştir. Mantar rRNA'sının amplifikasyonundan sonra, dizi analizi ve mikroorganizma homojen verilerinin doğrulanması rRNA veri tabanını (NCBI) kullanmıştır. Mantar DNA ekstraksiyonu, PCR amplifikasyonu, sıralama ve montaj sağlanmıştır. Mantarlar için, ITS bölgesinde analiz (güncellemeden önce 18SrRNA); kesin uzunluk 550 bp'den fazla olarak gösterilmiş (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Bilinmeyen mantar türlerinin ITS geninin amplifikasyonunun sonuçları. Eth. Br ile boyanmış %1,5 agaroz jel elektroforezi. M: 100bp merdiven Şeritler 4-5 görünüş olarak 550bp PCR ürünlerine benzer

4.7 ALS3 ve SAP8 Geninin Moleküler Tespiti

Candida biyofilm oluşumunda birkaç gen yer alır (Yu *et al.* 2012). En sık karşılaşılan yapışma genleri ALS3 ve SAP8 olup, bunların *Candida albicans* suşlarının genel virülansına önemli ölçüde katkıda bulunduklarını düşündürmektedir. Tüm ALS proteinlerinden, hifa ile ilişkili adezin ALS3, adezyonda önemli bir rol oynar (Staniszewska *et al.* 2017). SAP (salgılanan aspartil proteaz) genleri, *Candida albicans* suşlarının oluşumu, yapışma ve fenotipik geçiş dahil olmak üzere bir dizi varsayılan virülans özelliği ile ilişkilidir ve SAP'nin *Candida albicans* patojenitesine katılımının karmaşıklığını vurgulamaktadır (Naglik *et al.* 2003). Mevcut çalışma, *Candida albicans* ALS3 geni ve SAP8 gen dizilerini belirleyebilen bir dizi RT-PCR primerinin oluşturulmasını anlatmaktadır (Şekil 4.9). Farklı numunelerden yedi izolat seçildi, bir DNA ekstraksiyonu, ALS3 geninin ve SAP8 gane'nin 60°C tavlama sıcaklığına sahip spesifik primer ile amplifikasyon protokolü ile analiz edildi (Green *et al.* 2004).



Şekil 4.9 ALS3 geninin amplifikasyonunun sonuçları

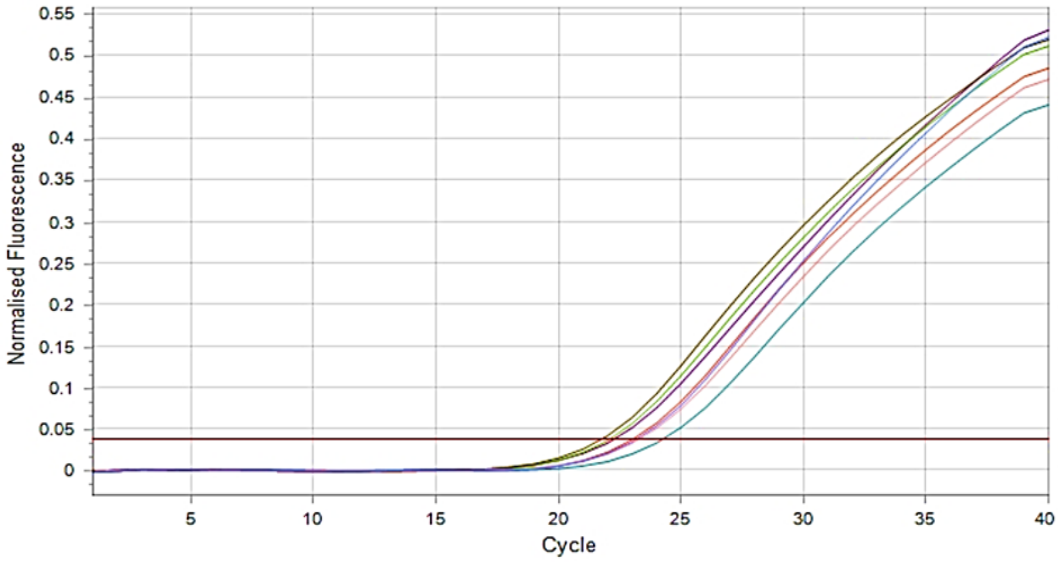
Bu çalışmada *Candida albicans* biyofilm hücrelerinde ALS3 geninin ekspresyon seviyeleri, çeşitli yaklaşımlar qPCR ve RT-PCR kullanılarak araştırıldı (García-Sánchez *et al*. 2004, O'Connor *et al.* 2005) (Şekil 4.10).

Kuyu	Renk	Numune Adı	Cq	Verimlilik	R^2 Verimliliği	Sonuç
1		1	22.27	0.61	0.99903	
2		2	22.09	0.66	0.99705	
3		3	23.03	0.68	0.99496	
4		4	24.26	0.66	0.99657	
5		5	21.76	0.65	0.99852	
6		6	23.29	0.61	0.99830	
7		7	23.18	0.66	0.99574	
8		NC	-	-	-	Hariç

Şekil 4.10ALS3 geninin gerçek zamanlı PCR amplifikasyon eğrisindeki eşik seviyesi ve Cq değeri, micPCR sürüm 2.10.0 tarafından oluşturulan 40 döngüden sonra ölçülen *Candida albicansı* belirler

Göreceli RT-qPCR'de normalizasyon için uygun bir referans genin seçimi, doğru ve güvenilir gen ifadesi veri yorumlaması için çok önemlidir. Bununla birlikte, *C. albicans*'ta, qPCR verilerinin normalleştirilmesi için kontrol genlerinin seçimi sıklıkla keyfidir veya geçmiş araştırma bulgularına dayanır.

Bu çalışma insan mukozal infeksiyonlarda SAP8 gene seviyesini ölçmek için yapılmıştır. SAP8 geni, sırasıyla sonuçlar Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de belirtilmiştir.



Şekil 4.11 SAP8 geninin amplifikasyonunun sonuçları

Bu çalışma, SAP8 genlerinin rolüne ve *Candida albicans* ile konakçısı arasındaki birçok etkileşimde onlar tarafından ifade edilen proteinlere daha fazla ışık sağlayacaktır.

Kuyu	Renk	Numune Adı	Cq	Verimlilik	R^2 Verimliliği	Sonuç
1		1	22.27	0.61	0.99903	
2		2	22.09	0.66	0.99705	
3		3	23.03	0.68	0.99496	
4		4	24.26	0.66	0.99657	
5		5	21.76	0.65	0.99852	
6		6	23.29	0.61	0.99830	
7		7	23.18	0.66	0.99574	
8		NC	-	-	-	Hariç

Şekil 4.12SAP8 geninin gerçek zamanlı PCR amplifikasyon eğrisindeki eşik seviyesi ve Cq değeri, micPCR sürüm 2.10.0 tarafından oluşturulan 40 döngüden sonra ölçülen *Candida albicans* belirler

Otomatik DNA dizileyici kullanılarak Sanger dizileme için PCR ürünleri Macrogen Corporation /Kore tarafından AB13730XL ye gönderilmiş ve sonuçlar e analiz edilmiştir. ALS3 geni için NCBI veri tabanına (Lc651376) ve SAP8 geni için (Lc651377)

kaydedilmiştir. İki izolatın standart dizilimi için özgün bir yazılım kullanılarak BLAST sonuçları Şekil 4.13. ve Şekil 4.14'de verilmiştir.

Buna göre, ALS3 geni için Lc651376) ve SAP8 gen dizilimi için (Lc651377) BLAST'ı, 10 kayıtlı *Candida* ile önemli bir hizalanma gösterdi. *Candida albicans* suşları, Şekil 4.13'te gösterilmiştir.



select all 0 sequences selected — GenBank — Graphics — Distance tree of results — New MSA Viewer

Açıklama	Bilimsel Adı	Azami Skor	Toplam Skor	Sorgu Kapağı	E Değeri	Kimlik Başına	Hizalanma	Katılım
Candida albicans strain TIMM 1768 chromosome 6, complete sequence	Candida albicans	305	1077	100%	7e-79	100.00%	1031625	CP032016.1
Candida albicans strain SC5314-P0 chromosome 6B	Candida albicans	305	1082	100%	7e-79	100.00%	1032709	CP025163.1
Candida albicans strain SC5314-P0 chromosome 6A	Candida albicans	305	1106	100%	7e-79	100.00%	1032578	CP025155.1
Candida albicans strain SC5314-GTH12 chromosome 6B	Candida albicans	305	1086	100%	7e-79	100.00%	1032226	CP025180.1
Candida albicans strain SC5314-GTH12 chromosome 6A	Candida albicans	305	1092	100%	7e-79	100.00%	1032182	CP025172.1
Candida albicans strain 1161 agglutinin-like protein (ALS2) gene, ALS2-1 allele, partial cds	Candida albicans	305	305	100%	7e-79	100.00%	2728	AH006927.2
Candida albicans saiL ALS2 gene for agglutinin-like protein, partial sequence	Candida albicans	305	305	100%	7e-79	100.00%	165	LC651376.1
Candida albicans SC5314 Als2p (ALS2), partial mRNA	Candida albicans SC5314	302	302	100%	9e-78	99.39%	7089	XM_707553.2
Candida albicans SC5314 chromosome 6	Candida albicans SC5314	302	1101	100%	9e-78	99.39%	1033292	CP017628.1
Candida albicans SC5314 Als4p (ALS4), partial mRNA	Candida albicans SC5314	300	300	100%	3e-77	99.39%	6303	XM_705333.2

Şekil 4.13ALS3 geni için örneğin (Lc651376) kısmi genomik dizilemesinin veri analizi

Ardından PCR ürünleri, Macrogen Corporation /Kore tarafından otomatik DNA dizileyici AB13730XL kullanılarak Sanger dizilimi için gönderilmiştir. Sonuçlar ALS3 geni için NCBI veri tabanına (Lc651376) ve SAP8 geni için (Lc651377) BLAST sonuçları Şekil Şekil 4.14 'te verilmiştir.



select all 0 sequences selected — GenBank — Graphics — Distance tree of results — New MSA Viewer

Açıklama	Bilimsel Adı	Azami Skor	Toplam Skor	Sorgu Kapağı	E Değeri	Kimlik Başına	Hizalanma	Katılım
Candida albicans strain TIMM 1768 chromosome 3, complete sequence	Candida albicans	185	185	100%	5e-43	100.00%	1788788	CP032018.1
Candida albicans strain SC5314-P0 chromosome 3B	Candida albicans	185	185	100%	5e-43	100.00%	1799405	CP025160.1
Candida albicans strain SC5314-P0 chromosome 3A	Candida albicans	185	185	100%	5e-43	100.00%	1799323	CP025152.1
Candida albicans strain SC5314-GTH12 chromosome 3B	Candida albicans	185	185	100%	5e-43	100.00%	1798977	CP025177.1
Candida albicans strain SC5314-GTH12 chromosome 3A	Candida albicans	185	185	100%	5e-43	100.00%	1799051	CP025169.1
Candida albicans SC5314 Sap8p (SAP8), partial mRNA	Candida albicans SC5314	185	185	100%	5e-43	100.00%	1218	XM_714848.2
Candida albicans SC5314 chromosome 3	Candida albicans SC5314	185	185	100%	5e-43	100.00%	1799298	CP017625.1
Candida albicans saiL SAP8 gene for candidapepsin-8, partial sequence	Candida albicans	185	185	100%	5e-43	100.00%	100	LC651377.1
Candida albicans secreted aspartyl proteinase (SAP8) gene, complete cds	Candida albicans	185	185	100%	5e-43	100.00%	1641	AF043330.1
Candida dubliniensis CD36 candidapepsin-8 precursor, putative (SAP8), partial mRNA	Candida dubliniensis CD36	147	147	100%	2e-31	93.00%	1191	XM_002419140.1
Candida dubliniensis CD36 chromosome 3, complete sequence	Candida dubliniensis CD36	147	147	97%	2e-31	93.81%	1863824	FM992690.1

Şekil 4.14SAP8 Geni için numunenin (Lc651377) kısmi genomik sekanslama veri analizi

Buna göre, ALS3 geni için (Lc651376) ve SAP8 gen dizilimi için (Lc651377) BLAST'ı, 10 kayıtlı *Candida* ile önemli bir hizalanma gösterdi. *Candida albicans* suşları, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14 gösterildiği gibi %100,00 ve %97-100 özdeşliğe sahiptir.

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Candida albicans, bağışıklığı baskılanmış hastalarda yüzeysel deri ve vajinal enfeksiyonlardan, yaygın hastalığa kadar çok çeşitli enfeksiyonlara neden olur. Konakçı çevrelerinde karşılaşılan değişik ortamlar, pH koşullarının yanı sıra oksijen veya besin mevcudiyeti açısından önemli ölçüde farklılık gösterir. Patojen ve konakçı arasındaki ilk temas noktası ve ayrıca çevresel ipuçlarının tespiti, bir enfeksiyonun oluşması için kritik öneme sahiptir. Mevcut çalışmanın sonuçları, çalışan sağlıklı işçilerin sadece %22,2'si ve kanser hastalarının %60'ı *Candida albicans* pozitif olduğunu ve *Candida albicans* izolatlarının çoğunluğunun Mikrotiter plaka yöntemiyle biyofilm üreticisi olduğunu göstermiştir. Ayrıca, *Candida* izolatının biyofilm oluşturan ALS3 ve SAP8 genlerinin (%76,92) biyofilm oluşumunun iki kritik yönü araştırılmıştır.

5.1 Öneriler

Bu çalışmanın bulgularına göre öneriler:

- Mikrotiter plak yöntemiyle biyofilm üretiminin taranması, rutin laboratuvar çalışmalarında CRA yöntemlerinden daha uygundur ve doğrudur.
- *Candida*'nın bakteri gibi diğer mikroorganizmalarla biyofilm oluşturması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.
- Biyofilmle ilgili hücreleri tanımlamak için daha fazla çalışmaya ve süreci kısaltmak için yeni anti-biyofilm ilaçlarının tanımlanmasına ihtiyaç vardır.
- Klinik mikolojinin önemli yönlerini ve *Candida albicans*'tan biyofilm üretimi ile olası hastalık ilişkilerini kontrol etmek için gelecekte çalışmalar yapılabilir.
- Dünyada farklı illerinde *C. albicans*'ın enfeksiyon oranlarını ve genotipik özelliklerini değerlendirmek ve anlamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

Aggarwal, N., Bhateja, S., Arora, G., & Yasmin, T. 2018. Candidiasis-The most common fungal infection of oral cavity. Biomedical Journal of Scientific and Technical Research, 8(3): 6487-6491.

Aldossary, M. A., Almansour, N. A., & Abdulraheem, B. S. 2016. Isolation and identification of Candida species from the oral cavity of cancer patients undergoing chemotherapy in Basrah, Iraq. J Of Biol Agricul And Healthca, 6(18): 22-30.

Ali, F. F., Allu, M. A., Assafi, M. S., & Al-Berfkani, M. I. 2020. The frequency of the pathogenic bacteria isolated from different clinical samples in Duhok, Iraq. In IMDC-SDSP 2020: Proceedings of the 1st International Multi-Disciplinary Conference Theme: Sustainable Development and Smart Planning, IMDC-SDSP 2020, Cyperspace, 28-30 June 202 (p. 363). European Alliance for Innovation.

Ameen, M. 2010. Epidemiology of superficial fungal infections. Clinics in dermatology, 28(2), 197-201.

Arora, S., Dhuria, N., Jindal, N., & Galhotra, S. 2017. Speciation, biofilm formation and antifungal susceptibility of Candida isolates. International Journal of Research and Development in Pharmacy & Life Sciences, 6(2): 2517-2521.

Aslani, N., Janbabaei, G., Abastabar, M., Meis, J. F., Babaeian, M., Khodavaisy, S., & Badali, H. 2018. Identification of uncommon oral yeasts from cancer patients by MALDI-TOF mass spectrometry. BMC Infectious Diseases, 18(1): 1-11.

Aziz, T. A. 2020. RT-PCR diagnosis of invasive *Candida albicans* strain predominant among a private school in Kirkuk City. GSC Biological and Pharmaceutical Sciences, 11(2): 124-129.

Bajpai, V. K., Khan, I., Shukla, S., Kumar, P., Rather, I. A., Park, Y. H., & Han, Y. K. 2019. Invasive fungal infections and their epidemiology: Measures in the clinical scenario. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 24(3): 436-444.

Balachandra, V. K., Verma, J., Shankar, M., Tucey, T. M., Traven, A., Schittenhelm, R. B., & Ghosh, S. K. 2020. The RSC (Remodels the Structure of Chromatin) complex of *Candida albicans* shows compositional divergence with distinct roles in regulating pathogenic traits. PLoS Genetics, 16(11): e1009071.

Baumgardner, D. J. 2019. Oral fungal microbiota: to thrush and beyond. Journal of Patient-Centered Research and Reviews, 6(4): 252.

Braunsdorf, C., & LeibundGut-Landmann, S. 2018. Modulation of the fungal-host interaction by the intra-species diversity of *C. albicans*. Pathogens, 7(1): 11.

Brown, A. J. P., Brown, G. D., Netea, M. G., & Gow, N. A. R. 2014. Metabolism impacts upon Candida immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. Trends in Microbiology, 22(11): 614–622.

Builder, V. 2021. Reproductive Pathologies, Conditions, and Disorders. Mosby's Pathology for Massage Professionals-E-Book, 356.

Butler, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A. S., Sakthikumar, S., Munro, C. A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., & Reedy, J. L. 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight Candida genomes. Nature, 459(7247): 657–662.

Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. Trends in microbiology, 9(7): 327-335.

Canela, H. M. S., Cardoso, B., Vitali, L. H., Coelho, H. C., Martinez, R., & Ferreira, M. E. da S. 2018. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of Candida spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. Mycoses, 61(1): 11–21.

Cavalheiro, M., & Teixeira, M. C. 2018. Candida biofilms: threats, challenges, and promising strategies. Frontiers in medicine, 5, 28.

Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. 2018. *Candida albicans*-Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control–An update. Microbial pathogenesis, 117: 128-138.

De Backer, M. D., Magee, P. T., & Pla, J. 2000. Recent developments in molecular genetics of *Candida albicans*. Annual Reviews in Microbiology, 54(1): 463-498.

Du, Q., Ren, B., He, J., Peng, X., Guo, Q., Zheng, L., & Xu, X. 2021. *Candida albicans* promotes tooth decay by inducing oral microbial dysbiosis. The ISME Journal, 15(3): 894-908.

Elfeky, D. S., Gohar, N. M., El-Seidi, E. A., Ezzat, M. M., & AboElew, S. H. 2016. Species identification and antifungal susceptibility pattern of Candida isolates in cases of vulvovaginal candidiasis. Alexandria Journal of Medicine, 52(3): 269-277.

Finkel, J. S., & Mitchell, A. P. 2011. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. Nature Reviews Microbiology, 9(2): 109-118.

García-Sánchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J. M., & d'Enfert, C. 2004. Candida albicans biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. Eukaryotic cell, 3(2), 536-545.

Gebreyohannes, G., Nyerere, A., Bii, C., & Sbhatu, D. B. 2019. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. Heliyon, 5(8): e02192.

Gong, X., Luan, T., Wu, X., Li, G., Qiu, H., Kang, Y., & Zang, B. 2016. Invasive candidiasis in intensive care units in China: Risk factors and prognoses of *Candida albicans* and non–albicans Candida infections. American journal of infection control, 44(5): e59-e63.

Green, C. B., Cheng, G., Chandra, J., Mukherjee, P., Ghannoum, M. A., & Hoyer, L. L. 2004. RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. Microbiology, 150(2): 267-275.

Hankovszky, P., Társy, D., Öveges, N., & Molnár, Z. 2015. Invasive Candida infections in the ICU: diagnosis and therapy. The Journal of Critical Care Medicine, 1(4): 129.

Henriet, S., Verweij, P. E., Holland, S. M., & Warris, A. 2013. Invasive fungal infections in patients with chronic granulomatous disease. Hot Topics in Infection and Immunity in Children IX, 27-55.

Hobson, R. P. 2003. The global epidemiology of invasive Candida infections—is the tide turning? Journal of Hospital infection, 55(3): 159-168.

Hoyer, L. L., Fundyga, R., Hecht, J. E., Kapteyn, J. C., Klis, F. M., & Arnold, J. 2001. Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-albicans Candida and phylogenetic analysis of the ALS family. Genetics, 157(4): 1555-1567.

Höfling, J. F., Anibal, P. C., Obando-Pereda, G. A., Peixoto, I. A. T., Furletti, V. F., Foglio, M. A., & Gonçalves, R. B. 2010. Antimicrobial potential of some plant extracts against Candida species. Brazilian Journal of Biology, 70(4): 1065–1068.

Hu, Y., Niu, Y., Ye, X., Zhu, C., Tong, T., Zhou, Y., & Ren, B. 2021. Staphylococcus aureus synergized with *Candida albicans* to increase the pathogenesis and drug resistance in cutaneous abscess and peritonitis murine models. Pathogens, 10(8): 1036.

Huang, D., Qi, M., Hu, Y., Yu, M., & Liang, Z. 2020. The impact of Candida spp airway colonization on clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia: A systematic review and meta-analysis. American journal of infection control, 48(6): 695-701.

Hube, B., Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J. P., & Gow, N. A. R. 1994. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. Molecular microbiology, 14(1): 87-99.

Jung, D. S., Farmakiotis, D., Jiang, Y., Tarrand, J. J., & Kontoyiannis, D. P. 2015. Uncommon Candida species fungemia among cancer patients, Houston, Texas, USA. Emerging Infectious Diseases, 21(11): 1942.

Kong, E. F., Kucharíková, S., Van Dijck, P., Peters, B. M., Shirtliff, M. E., & Jabra-Rizk, M. A. 2015. Clinical implications of oral candidiasis: host tissue damage and disseminated bacterial disease. Infection and immunity, 83(2): 604-613.

Kullberg, B. J., & Arendrup, M. C. 2015. Invasive candidiasis. New England Journal of Medicine, 373(15): 1445-1456.

León, C., Ruiz-Santana, S., Saavedra, P., Almirante, B., Nolla-Salas, J., Álvarez-Lerma, F., & EPCAN Study Group. 2006. A bedside scoring system ("Candida score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with Candida colonization. Critical care medicine, 34(3): 730-737.

Lipke, P. N., Klotz, S. A., Dufrene, Y. F., Jackson, D. N., & Garcia-Sherman, M. C. 2018. Amyloid-like β-aggregates as force-sensitive switches in fungal biofilms and infections. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 82(1): e00035-17.

Lipsett, P. A. 2002. Fungal infections in surgical patients. Problems in General Surgery, 19(1): 92-102.

Mack, D., Warren, S., Palanivel, S., & Conlon, C. P. 2017. Fungal bone and joint infections. Oxford Textbook of Medical Mycology.

Man, W. H., de Steenhuijsen Piters, W. A., & Bogaert, D. 2017. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. Nature Reviews Microbiology, 15(5): 259-270.

Mao, X., Qiu, X., Jiao, C., Lu, M., Zhao, X., Li, X., & Zhang, H. 2020. *Candida albicans* SC5314 inhibits NLRP3/NLRP6 inflammasome expression and dampens human intestinal barrier activity in Caco-2 cell monolayer model. Cytokine, 126: 154882.

Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence, 4(2): 119-128.

Mba, I. E., & Nweze, E. I. 2020. Mechanism of Candida pathogenesis: revisiting the vital drivers. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 39(10): 1797-1819.

McCall, A. D., Pathirana, R. U., Prabhakar, A., Cullen, P. J., & Edgerton, M. 2019. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. NPJ Biofilms and Microbiomes, 5(1): 1–12.

Millsop, J. W., & Fazel, N. 2016. Oral candidiasis. Clinics in dermatology, 34(4): 487-494.

Mishra, A. A., & Koh, A. Y. 2021. The microbial and host factors that govern Candida gastrointestinal colonization and dissemination. Current Opinion in Microbiology, 63: 29-35.

Mixão, V., & Gabaldón, T. 2018. Hybridization and emergence of virulence in opportunistic human yeast pathogens. Yeast, 35(1): 5-20.

Mohammed, N. A., Muhsen, T. A., & Risan, M. H. 2020. Isolation and diagnosıs of some Candida species from some Baghdad city hospitals with pcr technique and evaluation of the effectiveness of some antifungals.

Mohandas, V., & Ballal, M. 2011. Distribution of Candida species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. Journal of global infectious diseases, 3(1): 4.

Mosaddad, S. A., Tahmasebi, E., Yazdanian, A., Rezvani, M. B., Seifalian, A., Yazdanian, M., & Tebyanian, H. 2019. Oral microbial biofilms: an update. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 38(11): 2005-2019.

Mukaremera, L., Lee, K. K., Mora-Montes, H. M., & Gow, N. A. 2017. *Candida albicans* yeast, pseudohyphal, and hyphal morphogenesis differentially affects immune recognition. Frontiers in immunology, 8: 629.

Muni, S., Menon, S., Chande, C., Gohil, A., Chowdhary, A., & Joshi, A. 2012. Candida biofilm. Bombay Hosp J, 54(1): 19-23.

Naglik, J. R., Challacombe, S. J., & Hube, B. 2003. Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiology and molecular biology reviews, 67(3), 400-428.

Navarro-García, F., Sánchez, M., Nombela, C., & Pla, J. 2001. Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. FEMS microbiology reviews, 25(2): 245-268.

Nett, J. E., Marchillo, K., Spiegel, C. A., & Andes, D. R. 2010. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. Infection and immunity, 78(9): 3650-3659.

Neville, B. A., d'Enfert, C., & Bougnoux, M. E. 2015. *Candida albicans* commensalism in the gastrointestinal tract. FEMS yeast research, 15(7): fov081.

O'Connor, L., Lahiff, S., Casey, F., Glennon, M., Cormican, M., & Maher, M. 2005. Quantification of ALS1 gene expression in Candida albicans biofilms by RT-PCR using hybridisation probes on the LightCycler™. Molecular and cellular probes, 19(3), 153-162.

Ortega-Loubon, C., Cano-Hernández, B., Poves-Alvarez, R., Muñoz-Moreno, M. F., Román-García, P., Balbás-Alvarez, S., & Heredia-Rodríguez, M. 2019. The overlooked immune state in Candidemia: a risk factor for mortality. Journal of Clinical Medicine, 8(10): 1512.

Owotade, F. J., & Patel, M. 2014. Virulence of oral Candida isolated from HIV-positive women with oral candidiasis and asymptomatic carriers. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, 118(4): 455–460.

Padder, S. A., Ramzan, A., Tahir, I., Rehman, R. U., & Shah, A. H. 2022. Metabolic flexibility and extensive adaptability governing multiple drug resistance and enhanced virulence in *Candida albicans*. Critical reviews in microbiology, 48(1): 1-20.

Prasad, R., Nair, R., & Banerjee, A. 2019. Emerging mechanisms of drug resistance in *Candida albicans*. Yeasts in Biotechnology and Human Health, 135-153.

Pristov, K. E., & Ghannoum, M. A. 2019. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. Clinical Microbiology and Infection, 25(7): 792-798.

Pujol, C., Reynes, J., Renaud, F., Raymond, M., Tibayrenc, M., Ayala, F. J., & Bastide, J. M. 1993. The yeast Candida albicans has a clonal mode of reproduction in a population of infected human immunodeficiency virus-positive patients. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90(20): 9456-9459.

Qiu, X., Zhang, F., Yang, X., Wu, N., Jiang, W., Li, X., & Liu, Y. 2015. Changes in the composition of intestinal fungi and their role in mice with dextran sulfate sodium-induced colitis. Scientific reports, 5(1): 1-12.

Saghrouni, F., Ben Abdeljelil, J., Boukadida, J., & Ben Said, M. 2013. Molecular methods for strain typing of C andida albicans: a review. Journal of Applied Microbiology, 114(6): 1559–1574.

Samaka, H. M., Al-Mohana, A. M., Al-Hamadani, A. H., & Al-Charrakh, A. H. 2018. Genotyping and antifungal susceptibility profile of *Candida albicans* isolated from cancer patients. J Chem Pharm Sci, 11: 236-41.

Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Giannini, M. M. 2013. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. Journal of medical microbiology, 62(1): 10-24.

Sardi, J. D. C. O., Pitangui, N. D. S., Rodríguez-Arellanes, G., Taylor, M. L., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. 2014. Highlights in pathogenic fungal biofilms. Revista iberoamericana de micologia, 31(1): 22-29.

Sato, T., Takayanagi, A., Nagao, K., Tomatsu, N., Fukui, T., Kawaguchi, M., & Shimizu, N. 2010. Simple PCR-based DNA microarray system to identify human pathogenic fungi in skin. Journal of clinical microbiology, 48(7): 2357-2364.

Shin, J. H., Kee, S. J., Shin, M. G., Kim, S. H., Shin, D. H., Lee, S. K., & Ryang, D. W. 2002. Biofilm production by isolates of Candida species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. Journal of clinical microbiology, 40(4): 1244-1248.

Sida, H., Shah, P., Pethani, J., Patel, L., & Shah, H. 2016. Study of biofilm formation as a virulence marker in Candida species isolated from various clinical specimens. Int J Med Sci Public Health, 5(5): 842-6.

Staniszewska, M., Bondaryk, M., & Ochal, Z. 2017. Role of Virulence Determinants in Candida albicans' Resistance to Novel 2-bromo-2-chloro-2-(4-chlorophenylsulfonyl)-1-phenylethanone. Journal of Fungi, 3(3), 32.

Staniszewska, M., Bondaryk, M., Piłat, J., Siennicka, K., Magda, U., & Kurzatkowski, W. 2012. Virulence factors of *Candida albicans*. Przegląd epidemiologiczny, 66(4): 629-633.

Suryana, K., Suharsono, H., & Antara, I. G. P. J. 2020. Factors associated with oral candidiasis in people living with HIV/AIDS: a case control study. HIV/AIDS (Auckland, NZ), 12: 33.

Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., & Škrlec, I. 2021. *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection. Journal of Fungi, 7(2): 79.

Tawfeeq, A A. 2019. Prospective Cohort Study Defining *Candida albicans* Infections In Some Primary Schools In South of Kirkuk/Iraq. Proceeding of The 6th International Scientific Conference of Genetic and Environment Baghdad, Iraq, 150–158.

Tawfeeq, A. A., & Taher, S. A. D. M. 2018. Epidemiological study evaluating the impact of front door duct slot of a combined domestic sewer–rainwater drainage system on children health in Kirkuk, 2017. Karbala International Journal of Modern Science, 4(4): 369-376.

Uppuluri, P., Chaturvedi, A. K., Srinivasan, A., Banerjee, M., Ramasubramaniam, A. K., Köhler, J. R., & Lopez-Ribot, J. L. 2010. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. PLoS pathogens, 6(3): e1000828.

Uppuluri, P., Pierce, C. G., & López-Ribot, J. L. 2009. *Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences. Future Microbiology, 4(10): 1235–1237.

Vila, T., Sultan, A. S., Montelongo-Jauregui, D., & Jabra-Rizk, M. A. 2020. Oral candidiasis: a disease of opportunity. Journal of Fungi, 6(1): 15.

Wall, G., Montelongo-Jauregui, D., Bonifacio, B. V., Lopez-Ribot, J. L., & Uppuluri, P. 2019. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. Current Opinion in Microbiology, 52: 1–6.

Warnakulasuriya, S., Kujan, O., Aguirre-Urizar, J. M., Bagan, J. V., González-Moles, M. Á., Kerr, A. R., & Johnson, N. W. 2021. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification,

convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. Oral diseases, 27(8): 1862-1880.

Yu, L. H., Wei, X., Ma, M., Chen, X. J., & Xu, S. B. 2012. Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in Candida albicans biofilm. Antimicrobial agents and chemotherapy, 56(2), 770-775.

Zhan, P., Liang, G., & Liu, W. 2021. Dermatophytes and dermatophytic infections worldwide. In Dermatophytes and Dermatophytoses (pp. 15-40). Springer, Cham.

Zhao, J. L., Liu, W., Xie, W. Y., Cao, X. D., & Yuan, L. 2018. Viability, biofilm formation, and MazEF expression in drug-sensitive and drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains circulating in Xinjiang, China. Infection and Drug Resistance, 11: 345..

Zhou, Y., Wang, G., Li, Y., Liu, Y., Song, Y., Zheng, W., & Jia, J. 2012. In vitro interactions between aspirin and amphotericin B against planktonic cells and biofilm cells of *Candida albicans* and C. parapsilosis. Antimicrobial agents and chemotherapy, 56(6): 3250-3260.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı	: Sinan Abdullah Ali ALI

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2019-Halen
Lisans	Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü	2000-2004

İş Deneyimi

Yıl	**Kurum**	**Görev**
2005-Halen	Kerkük Sağlık Dairesi	Arş. Görevlisi