

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***CANDIDA ALBICANS'* A AİT *ALS, HWP* VE *STAPHYLOCOCCUS
EPIDERMIDIS'* E AİT *ICA* GENLERİNİN FARKLI
BİYOMATERYALLERDEKİ EKSPRESYONLARININ REAL TIME PCR İLE
KANTİTATİF ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bio. Sezen BOLAT

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ayşe KALKANCI

ANKARA

Mart 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***CANDIDA ALBICANS'* A AİT ALS, HWP VE STAPHYLOCOCCUS
EPIDERMIDIS' E AİT ICA GENLERİNİN FARKLI
BİYOMATERYALLERDEKİ EKSPRESYONLARININ REAL TIME PCR İLE
KANTİTATİF ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bio. Sezen BOLAT

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ayşe KALKANCI

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 01/2006-02 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

Mart 2008

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

DOKTORA /YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA SINAV TUTANAĞI

ÖĞRENCİNİN ADI ve SOYADI : SEZEN BOLAT
ANABİLİM DALI : MİKROBİYOLOJİ
SINAV TARİHİ : 14.03.2008
TEZ KONUSU : Candida albicans'a ait ALS, HWP ve
Staphylococcus epidermidis'e ait ICA genlerinin farklı biyomateriallerdeki
ekspresyonlarının Real Time-PCR ile kantitatif analizi
KARAR : Kabulüne

Yukarıda belirtilen tarihte yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda yukarıda konusu
belirtilen tezin

Düzeltilmesine :
Kabulüne : X
Reddine :

OYBİRLİĞİ / ~~OYÇOKLUĞU~~ ile karar verilmiştir.

GEREKÇE :

Prof. Dr. Seyyal Rota
JÜRİ BAŞKANI

ÜYE

ÜYE

ÜYE

Doç. Dr. Kenan HİZEL

ÜYE

Doç. Dr. Ayşe Kalkancı

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller, Grafikler	iv
Tablolar	vi
Teşekkür	vii

I. GİRİŞ..... 1

II. GENEL BİLGİLER..... 2

II. a. Tarihçe.....2

II. b. Biyofilmin Yapısı..... 2

II. c. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Nedenleri:..... 4

II.c.1 Savunma:..... 4

II. c. 2 Adezyon ve Kolonizasyon:..... 4

II. c. 3 Yaşanılabilir Çevre Geliştirme:..... 5

II. d. Biyofilm Oluşumu..... 5

II. e. Fungal Biyofilmler.....6

II. e. 1. Candida Biyofilm Yapısı..... 7

II. f. Bakteriyal Biyofilmler..... 10

II. g. Biyofilmdeki Mikroorganizmalar Arası İletişim..... 13

II. h. Biyofilm Oluşumu İle Hastalıklar Arasındaki İlişki..... 14

II. h. 1. Canlı Dokularda Oluşan Biyofilmler:..... 15

II. i. Biyofilm ve Kateter Enfeksiyonları.....20

II. i. Antimikrobiyal Direnç.....22

II. i. 1 Antibiyotik Direnci..... 22

II. i. 2. Antifungal Direnci..... 22

II. i. 3. Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesinde Kullanılan Yöntemler65:..... 24

II. i. 3. 2. Ölçüm Yöntemleri :..... 24

II. i. 3. 3. Moleküler Yöntemler :..... 25

III.GEREÇ VE YÖNTEM..... 33

III. a. Gereçler..... 33

III. a. 1. Cihazlar.....33

III. a. 2. Kimyasallar..... 34

III. a. 3. Candida albicans' a özgül primerler..... 34

III. a. 4. Staphylococcus epidermidis' e özgül primerler.....	34
III. a. 5. Laboratuvar Malzemeleri.....	35
III. a. 7. Mikroorganizmalar.....	36
III. b. Yöntem.....	37
III. b. 1. Slaym faktör oluşumunu gösteren yöntemler:.....	37
III. b.1.1. Christensen Yöntemi (Tüp Adherans Testi):.....	37
III. b. 3. RNA Eldesi.....	38
IV. BULGULAR.....	42
IV. a. Adezyon / Slaym Faktör Sonuçları:.....	42
IV. b. Konvansiyonel PCR Sonuçları.....	42
IV. c. Real Time PCR Sonuçları.....	44
V. TARTIŞMA.....	50
VI. SONUÇ.....	58
VII. ÖZET.....	59
VIII. SUMMARY.....	60
IX. KAYNAKLAR.....	61
X. ÖZGEÇMİŞ.....	74

RESİMLER, ŞEKİLLER ve GRAFİKLER

RESİMLER

Resim 1:	Dış Yüzeyinde Oluşmuş Plak Görüntüsü.....	3
Resim 2:	Tüp Adherans Testi Sonucunda Slaym Negatif (solda) ve Slaym Pozitif (sağda) Örnekler.....	38

ŞEKİLLER

Şekil 1:	Hem kemik hem de biyomateryal üzerinde oluşan biyofilm tabakasının şematik çizimi (mikroorganizmalar ve fibriler yapı).....	15
Şekil 2:	Kateter yüzeyinden kazınarak konvansiyonal PCR ile çoğaltılan <i>Candida albicans</i> ' a ait <i>ALS1</i> cDNA amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü (290 bç)	42
Şekil 3:	Kateter yüzeyinden kazınarak konvansiyonal PCR ile çoğaltılan <i>Candida albicans</i> ' a ait <i>HWP1</i> cDNA amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü (110 bç)	43
Şekil 4:	Kateter yüzeyinden kazınarak konvansiyonal PCR ile çoğaltılan <i>Staphylococcus epidermidis</i> ' e ait <i>ICA</i> cDNA amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü (350 bç)	43
Şekil 5:	Kantitatif analiz için 10^1 ile 10^6 kopya/ml arasındaki standart DNA'lardan elde edilen erime eğrilerini (melting curve) gösteren Real Time PCR ekran görüntüsü.....	44
Şekil 6:	Kantitatif analiz için 10^1 ile 10^6 kopya/ml arasındaki standart DNA'lardan elde edilen PCR döngüleri ile floresans düzeylerinin karşılaştırıldığı Real Time PCR ekran görüntüsü.....	44
Şekil 7:	<i>HWP</i> ; Kantitatif analiz için 10^1 ile 10^6 kopya/ml arasındaki standart DNA'lardan elde edilen standart eğrinin Real Time PCR ekran görüntüleri.....	45

Şekil 8:	<i>ALS</i> : Kantitatif analiz için 10^1 ile 10^6 kopya/ml arasındaki standart DNA'lardan elde edilen standart eğri görüntüleri	45
Şekil 9:	<i>ICA</i> : Kantitatif analiz için 10^1 ile 10^6 kopya/ml arasındaki standart DNA'lardan elde edilen standart eğrinin Real Time PCR ekran görüntüleri.....	46
Şekil 10:	<i>ALS</i> genine ait amplifikasyon eğrilerinin Real Time PCR' da ekran görüntüsü.....	46
Şekil 11:	<i>HWP</i> genine ait amplifikasyon eğrilerinin Real Time PCR' da ekran görüntüsü.....	47
Şekil 12:	<i>ICA</i> genine ait amplifikasyon eğrilerinin Real Time PCR' da ekran görüntüsü.....	47

GRAFİKLER

Grafik 1:	Kateter tiplerinin gen ekspresyonu açısından karşılaştırılması.....	48
------------------	---	----

TABLÖLAR

Tablo 1: Yabancı Cisim İnfeksiyonlarında Biyofilmlerden En Sık İzole Edilen Mikroorganizmalar.....	6
Tablo 2: <i>Candida albicans'</i> a Ait Adezyondan Sorumlu Bazı Genler..	8
Tablo 3: Bakterilerde Adezyondan Sorumlu Bazı Genler.....	12
Tablo 4: Bakterilerde Quorum Sensing' den Sorumlu Bazı Genler....	13
Tablo 5: Tıp Alanında Kullanılan Bazı Yabancı Cisimler, İnfeksiyon ve Katkıda Bulunduğu Mortalite Oranı.....	17
Tablo 6: Bazı Mikroorganizmalar ve Biyofilm Oluşturduğu Malzemeler.....	18
Tablo 7: RT-PCR Çalışmasında Kullanılan Primerler.....	39

TEŞEKKÜR

Hiçbir fedakarlıktan kaçınmayıp iyi bir eğitim almamı sağlayan ve beni bugünlere getiren canım annem Hatice BOLAT ve canım babam Cengiz BOLAT' a, yüksek lisans eğitimime başlamamda büyük katkıları olan Sayın Prof. Dr. Nedim SULTAN' a; eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR' a; tez çalışmam boyunca bana büyük destekleri olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ayşe KALKANCI' ya ve beni sabırla dinleyen, iyi ve kötü her anımda yanımda olan hayat arkadaşım Dr. Emrah SONGUR' a sonsuz teşekkürler...

I. GİRİŞ

Biyofilm, mikroorganizmalar tarafından üretilen, herhangi bir yüzeye, arayüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan, büyüme oranları ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen, mikroorganizmanın içinde gömülü olarak bulunduğu ekstrasellüler polimerik maddeden oluşmuş bir matrikstir¹.

Kateterlerde ortaya çıkan biyofilmde hem mikrobiyal hem de konak faktörleri önemlidir. Mikrobiyal faktör olarak slaym faktörü, konak faktörü olarak fibrin ve fibronektin bu faktörlere örnektir².

Slaym faktör, mikroorganizmaların katetere adezyonu ve kolonizasyonu ile ilgili bir virülans faktörüdür².

Biyofilm oluşumunu düzenleyen genler bütün mikroorganizmalarda tanımlanmıştır².

Biyofilm oluşturan en önemli mikroorganizmalar gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus epidermidis* ve maya mantarlarından *Candida albicans*' dir².

Her iki mikroorganizmanın biyofilm oluşturma adezyondan sorumlu genler tarafından kontrol edilmektedir. Bu genlerin gösterilmesi için moleküler yöntemlerden faydalanılmaktadır.

Bu çalışmanın amacı; *Candida albicans* adezyonundan ve biyofilm oluşumundan sorumlu genlerden *ALS1* ve *HWP1* ile *Staphylococcus epidermidis* için aynı mekanizmalardan sorumlu *ICA1* ifadesinin, kantitatif Revers Transkriptaz – Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile gerçek zamanlı olarak incelenmesidir.

II. GENEL BİLGİLER

II. a. Tarihçe

Günümüze kadar biyofilm birçok araştırmacı tarafından farklı şekillerde tanımlanmıştır. İlk olarak 17. yy' da Leewenhoek' un dışından almış olduğu örnekte plaklar içerisinde yaşayan mikroorganizmalardan bahsetmesinden sonra, 1978 yılına kadar biyofilmin varlığından bahsedilmemiştir. Burada mikroorganizmanın büyük bir kısmının biyofilm adı verilen besleyici bir oluşum içerisinde olduğunu ve mikroorganizmanın yapışmış yüzeyi ile yüzen taraf arasında farklılık olduğunu göstermiştir. Daha sonra yapılan mikroskobik gözlemlerde, mikroorganizmaların doğadaki ekosistemlerde farklı yüzeylere yapışarak çoğalmasının, % 99.9 biyofilm aracılığı ile olduğu gösterilmiştir¹.

II. b. Biyofilmin Yapısı

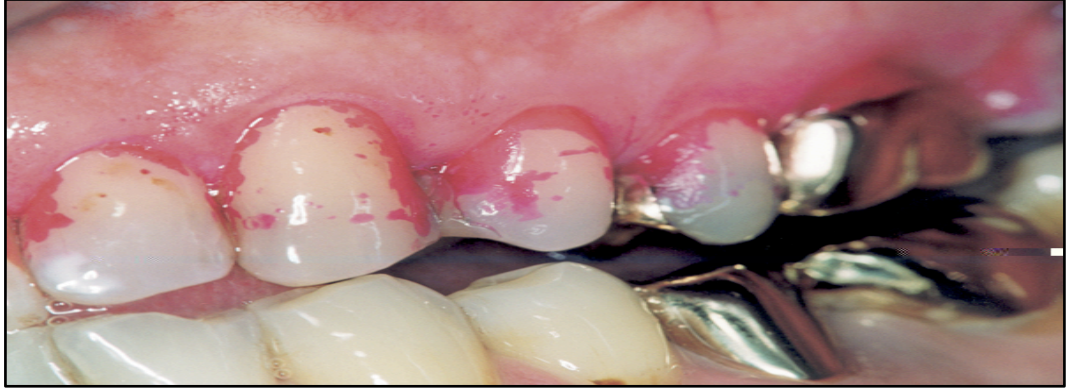
Film kelimesi, yüzeyi kaplayan ince bir tabakayı ifade eder. Biyofilm ise bu tabakayı oluşturan maddenin biyolojik bir materyal olduğunu tanımlar.

Bir başka deyişle biyofilm, bir yüzey üzerinde mikroorganizma kolonileri ve ürettikleri hücre dışı polisakkaritler, proteinler, çevreden absorblanan organik ve inorganik maddelerin oluşturduğu bir tabakadır³.

Biyofilmin temel birimi mikrokolonilerdir. Mikrokolonilerin %10-25' i hücrelerden, %75-90' ı ise ekzopolisakkarit (EPS) matriksinden oluşmaktadır. Mikrokoloniler, bir veya birkaç türde bakteri hücrelerinden oluşabilir. Örneğin; dış yüzeyindeki biyofimler, 500 kadar farklı bakteri içerirken, kistik fibrozis hastalığının ilerleyen evrelerinde yalnızca *Pseudomonas aeruginosa*' nın oluşturduğu biyofilmlerden söz edilir. Biyofilmin kalınlığı ise teorik olarak 5-500 mikron arasında olabilir³.

Biyofilm oluşumu tüm doğal ortamlar için genel bir davranıştır⁴. Günümüzde derin yeraltı suları ve okyanusların derinlikleri hariç, biyofilm tüm doğal ekosistemlerde oluşabilmektedir⁵.

Yıllardır endüstriyel su ve petrol boru sistemlerinde önemli bir sorun olarak bilinirken, artık tıptaki önemi sadece dişteki plaklardan ibaret olmayıp, özellikle yabancı cisim enfeksiyonları başta olmak üzere birçok kronik enfeksiyonda rol oynadığı gösterilmiştir⁶.



Resim 1: Diş Yüzeyinde Oluşmuş Plak Görüntüsü

Biyofilm oluşumunda mikroorganizmaların birbirlerine ve yüzeylere tutunmaları (adezyonu), aderans temeldir. Aderansın antibiyotik direnci ve fagositoza karşı dirençte önemli olduğunun bilinmesi, son yıllarda tıbbi önemini arttırmıştır⁷. Bakterilerin birbirleriyle konuşarak bir topluluk oluşturmaları ve gen modülasyonu aracılığı ile ortama adapte olmalarında yer almaları tıbbi önemini daha da arttırmaktadır⁸.

Üç boyutlu incelendiğinde biyofilm, mikroorganizma topluluğunun dışında, düzensiz bir şekilde dağılmış polisakkarit yapısında bir matrikstir⁹. Yapılan çalışmalarda, matriksin yoğunluğu ve genişliği sadece hücresel ve hücresel olmayan yapılar arasında değil, aynı zamanda mikroorganizma türleri arasında da farklılık göstermektedir⁹⁻¹⁰.

Doğada biyofilm, arasından kanalların geçtiği mercan kayalıklar üzerindeki piramit veya mantar şekilli uzantılardan oluşan bir görünüme sahiptir. Bu mercan kayalık görünümlü yoğun ve kompleks yapısı, ortamdaki organik ve inorganik moleküllerin ekstrasellüler yapısında toplanmasıyla oluşur⁹. Biyofilmin gelişme potansiyeli yakın çevredeki besinlerin kullanımı ve hücre içine alınımı, atıkların uzaklaştırılması ile yakın ilişkilidir. Besin kısıtlanması sonucu eksprese olan hücreler arası iletişim (Quorum-sensing) moleküllerinin salınımı, ortam pH' sı, oksijen perfüzyonu, karbon kaynağı ve ozmolarite, biyofilm gelişimde çok etkilidir⁹⁻¹⁰.

Son yıllarda bazı ökaryot ve prokaryot hücreler tarafından salınan ve hücreler arası sinyal iletimini sağlayarak bakterinin gen ekspresyonunu düzenleyen moleküller aracılığı ile biyofilm yapımının düzenlenebileceğinin gösterilmesi, biyofilmin patojenite ve çevreye adaptasyonda önemini çok arttırmıştır¹¹⁻¹².

II. c. Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Nedenleri:

II.c.1 Savunma:

Biyofilm yapan mikroorganizmalar, besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençlidir. Bu nedenle biyofilm kronik seyirli enfeksiyonlarda önemli bir faktör olarak bilinmektedir⁹.

Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan hücre dışı polisakkaritler (EPS) savunmada önemli rol oynayan moleküllerdir. EPS, bulunduğu bakteriyi güç alanlardan (elektrik çekimi) uzaklaştırarak inflamatuvar hücrelerin fagositozundan, antibiyotik etkisinden korumaktadır⁹⁻⁷. Çevreden almış olduğu sinyaller sonucunda tehlikede olduğunu algılayan bakteriler, bazı genlerin kontrolünde biyofilm oluşturarak, kendini koruma altına almaktadır¹¹.

II. c. 2 Adezyon ve Kolonizasyon:

İnsan vücudu mikroorganizmaların yaşaması için uygun bir ortam olup, biyofilm oluşturmalarını da kolaylaştırmaktadır. Bakterilerin, vücudun herhangi bir bölgesinde sabit kalabilmek için birtakım stratejileri vardır¹². Bakteri yüzey proteinleri, konakçının fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine yapışırlar¹³. Tutunma yani adezyon sonrası bu bölgeye yerleşen bakteriler bir yandan çoğalırken, diğer yandan da biyofilm yapımına başlarlar. İlginçtir ki; biyofilm bakterinin adheransını arttırırken, biyofilm oluşumunun başlaması ile birlikte bakteri adhezyonu ve motilite faktörlerinin ekspresyonunda bir baskılama olmaktadır¹⁴⁻¹⁵.

II. c. 3 Yaşanılabilir Çevre Geliştirme:

Ortamdaki glikoz *Pseudomonas*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus*' ların EPS üretmelerini ve biyofilm oluşturmalarını belirgin bir şekilde arttırmaktadır. Glikozun kullanılmasıyla oluşan karbon katabolitleri yapışmış bakterinin gen ekspresyonunu düzenleyerek biyofilm oluşumunda kritik rol oynar. Bakterinin konakçıda uygun bir ortam oluşturarak kalabilmesi için biyofilm oluşumu gerekmektedir¹⁶⁻¹⁷.

II. c. 4 Topluluk Oluşturmak:

Bakterinin ortama adaptasyonundaki beraberlik biyofilm oluşturmada sıklıkla görülmektedir. Bakteriler biyofilm oluşturdıkları gibi ortamdan aldıkları uyarılar (besin, pH, ısı vs.) sonucu hızla da planktonik hale geçebilmektedir. Bu da ortama uygun olarak eksprese ettikleri genler aracılığı ile olmaktadır. Tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıt vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri toplu yaşamlarının en önemli göstergesidir¹⁶⁻¹⁷.

II. d. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm oluşumu bir dizi basamaktan sonra meydana gelir. İlk basamak, yüzeyde hazırlayıcı film oluşumudur. Ortamdaki organik ve inorganik moleküller yüzeye difüzyonla taşınarak yüzeyde birikirler. Özellikle organik olanlar malzeme yüzeyine mikroorganizmanın yapışmasını kolaylaştırır. İnsanda bulunan fibronektin, kollagen, albumin gibi proteinler bakteri yapışmasında çok etkindir. İkinci basamak ise, sıvı ya da hava içerisinde pasif veya aktif yolla taşınan mikroorganizmanın hazırlayıcı film tabakasına yapışmasıdır. Aktif taşınma flagella, pili gibi hücre uzantıları ile veya bazı mikroorganizmaların amipsi hareketleriyle gerçekleşir. Üçüncü basamak olan tutunma ise sıvının ara yüzeyine, yüzeyin ve mikroorganizmanın özelliklerine bağlıdır¹⁶.

Katı yüzeylere mikroorganizmanın yapışması ise van der Waals kuvvetleri, elektrostatik kuvvetler ve hidrojen bağları olmak üzere üç temel mekanizma ile gerçekleşir. Mikroorganizma yüzeye tutunduktan sonra hazırlayıcı film tabakası ile mikroorganizma arasında protein-reseptör etkileşimleri ile özgül tersinmez yapışma gerçekleşir. Ayrıca mikroorganizmaların ürettikleri polisakkaritler yüzeye bağlanarak hücre kümeleşmesine mikrokolonilerin oluşumuna yardımcı olmaktadır.

Sıcaklık, katyon dengesi gibi çevresel koşullar uygunsa mikroorganizmanın üremesiyle birlikte EPS üretimi gerçekleşir. Organik maddeler, ölü hücreler (nötrofil, epitelyum hücreleri) ve minerallerin katılımıyla da biyofilm yapısı oluşmaktadır¹⁶.

Tablo 1: Yabancı Cisim Enfeksiyonlarında Biyofilmlerden En Sık İzole Edilen Mikroorganizmalar

Gram Pozitif	Gram Negatif	Mantarlar
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida</i> türleri
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Streptococcus viridans</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

II. e. Fungal Biyofilmler

Başta *Candida parapsilosis* ve *Candida albicans* olmak üzere diğer *Candida* türleri, insan vücudunda epitel, endotel hücrelerine ve kullanılan sentetik (örn: polisistren) materyale yapışma eğilimindedirler. Her ne kadar *C. albicans*' in slaym faktör pozitifliği non-albicans türlere göre düşük olsa da, biyofilm oluşturmada *C. albicans* başta gelmektedir. *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* ve birkaç bakteri türü karışımının da silikon kaplı ses protezlerinde biyofilm oluşturduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür. Biyofilm antimikrobiyal maddelerden korunarak ve immün sistemden kaçarak enfeksiyon kaynağı olabilir¹⁸.

II. e. 1. Candida Biyofilm Yapısı

C. albicans biyofilm oluşumunu incelemek için bazı model sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemlerde organizmaların önce kateter veya protez materyali gibi yüzeylere adezyonu sağlanmış sonra besiyerinde inkübe edilmişlerdir. Bu şekilde oluşturulan *C. albicans* biyofilmleri tipik olarak yüzeye adhere maya formundaki hücrelerin katmanından ve bunun üzerinde geniş bir ekzopolimerik matriks ile çevrili hifal formdaki filamentöz hücre katmanından oluşmaktadır¹⁸⁻¹⁹.

C. albicans biyofilm matriksi izole edilip, içeriği serbest (planktonik) hücreler tarafından oluşturulan ekstrasellüler matriks (ESM) ile karşılaştırılmıştır.²⁰ Her ikisinin de karbonhidrat, protein, fosfor ve hekzosamin içermekte olduğu fakat matriksin daha az karbonhidrat (%41) ve protein (%5) içerdiği saptanmıştır. Ayrıca mannozdan daha fazla glukoz (%16) ve galaktoz içerdiği de saptanmıştır²⁰.

C. albicans biyofilmlerinin ayırıcı özelliği farklı morfolojik formların bir arada bulunmasıdır. *C. albicans* biyofilm oluşumu 3 basamakta gerçekleşmektedir: Erken faz (0-11 saat), ara faz (12-30 saat) ve olgun faz (38-72 saat)²¹⁻²². Biyofilmdeki karbonhidrat miktarının erken fazdan olgun faza doğru arttığı ve olgun fazda karbonhidrattan zengin bir ESM olduğu saptanmıştır²³. Daha detaylı incelemede, kateter materyalinden hazırlanan intravasküler disklerin yüzeyinde deneysel biyofilm oluşturulmuş ve scanning elektron mikroskopunda maya hücrelerinin adezyonunun 3-6 saat sonrasında germ tüp oluşumu ve 48 saatlik inkübasyon sonrası ise yoğun maya, hif ve yalancı hif açısından oluşan tam olgun biyofilm oluşumu gözlenmiştir²⁴. Organizmanın aynı besiyerinin sıvı veya agar formunda (glukozlu yeast nitrojen base) üretildiğinde hifal formları oluşturmaması, morfogenezin plastik polivinilklorid (PVC) yüzeylere temas ile indüklendiğini ve bazal hücre katmanının biyofilm yapışmasında önemli rol oynadığını göstermektedir²²⁻²³⁻²⁵.

Yüzeyin kimyasal yapısı biyofilm oluşum hızını etkilemektedir; PVC'ye kıyasla lateks yüzeylerde daha fazla, poliüretan ve %100 silikonda ise azalmış olarak saptanmıştır. Selüloz filtrelerde oluşan *Candida* biyofilm yapısı kateter disklerinden farklıdır. Bu da yüzey temasıyla indüklenen gen ekspresyonunu akla getirmektedir²⁴.

Yüzeyin hidrofobisitesi de biyofilm oluşumunu pozitif etkilemektedir. Silikon elastomer veya PVC disklerinin hidrofobik yüzeylerinde bifazik yapıda; bazal tabakada maya hücreleri ve bu tabaka üzerinde ESM içerisinde hifal elementlerin sıralandığı, buna rağmen düzensiz veya pürüzlü ‘polymethylmethacrylate’ yüzeylerde olgun biyofilmin sadece maya hücreleri ve ESM’den oluştuğu gözlenmiştir ²⁴.

Candida albicans ' ın adezyon ve biyofilm oluşturmāsından sorumlu genler tablo 1’de listelenmiştir.

Tablo 2: *Candida albicans*’ a Ait Adezyondan Sorumlu Bazı Genler

Gen	Protein/fonksiyon	Tür
Biyofilm Oluşumu		
ALS	Aglütinin like sequence ailesi proteinleri / Adezyon- Biyofilm oluşumu	<i>C. albicans</i>
CWP_s	Fungal cell-wall proteins / Adezyon- Biyofilm oluşumu	<i>C. albicans</i>
HWP₁	Hypal wall protein / Adezyon- Biyofilm oluşumu	<i>C. albicans</i>
CSA₁	Mycelial surface antijen / Adezyon- Biyofilm oluşumu	<i>C. albicans</i>
PRA₁	Fibrinojen-binding protein / Adezyon- Biyofilm oluşumu	<i>C. albicans</i>
SAP family	Secreted aspartyl proteinase/ Adezyon-Biyofilm oluşumu	<i>C. albicans</i>

Adezyondan sorumlu bu genlerden en önemlileri *ALS* ve *HWP* genleridir.

ALS: *C. albicans* gen ailesi içinde enzimatik aktivitesi olmayan tek gen ailesi *ALS* ailesidir. İmmunohistokimyasal boyamalar *ALS* proteinlerinin *Candida albicans*' ın hücre duvarında lokalize olduğunu göstermiştir²⁶.

ALS genleri ilk olarak *Candida albicans*' da tanımlanmıştır ve bu gen ailesinde 9 gen olduğu gösterilmiştir; fakat *ALS3* ve *ALS8*' in aynı gen olduğu daha sonra yapılan çalışmalarda gösterildiğinden *ALS8* bu gen ailesinden çıkarılmıştır. *ALS1*, *ALS2*, *ALS4*, *ALS5* ve *ALS9* kromozom 6' da bulunurken; *ALS6* ve *ALS7* kromozom 3' de, *ALS3*' kromozom R' de bulunur²⁶.

Candida albicans' da hem *ALS1p* hem de *ALS5p* (*ALA1p*) proteinlerinin adezin işlevinin olduğu gösterilmiştir. Bu genler tarafından kodlanan proteinlerin ikisi, *ALS5p* ve *ALS1p*, *Saccharomyces cerevisiae*' nın insan hücrelerine ve ekstrasellüler matriks komponentlerine adezyonuna aracı olabilmektedir. *ALS5p*, ekstrasellüler matriks proteinleriyle kaplanmış substratlara ve insanda bukkal epitel hücrelerine ve hücrelerin biraraya toplanmasında adezyonun başlangıcına yardımcı olur²⁷.

ALS1, adezyon için önemli olduğu kadar hif gelişimi için de önemlidir. In-vitro *ALS1* ekspresyonu kültür ortamının içeriği tarafından düzenlenir ve *ALS3* hif spesifiktir. Ancak Zaho ve ark. *ALS1/ALS1* ve *ALS3/ALS3* mutant suşların doğrudan karşılaştırdıkları çalışmalarında *ALS3p*' nin daha güçlü bir adezin olduğu sonucuna varmışlardır²⁷.

ALS genleri içerisinde *ALS6* ve *ALS7* aile içindeki diğer genlerle benzerliği en az olanlardır, bunlardan da *ALS7* en az benzeyenidir. *ALS1* benzeri tekrarlayan dizileri kodlayan genler *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* ve *ALS4*' dür²⁸.

HWP: Hyphal duvar proteini 1 (*HWP1*) sistemik kandidozun virulansı için gerekli bir gendir. Bu gen *C. albicans* ve epitel hücrelerini karşılıklı bağlayan memeli transglutaminazı için, substrat olarak görev yapan, bir yüzey proteinini eksprese eder²⁹.

Hife özgöl, hücre duvar proteini (*HWP1P*) epitel hücrelerine tutunmada görev alır. Endotel hücrelerine ise tutunamamaktadır³⁰.

Candida albicans' in hifli formları AIDS hastaları gibi immün yetmezliğı olanlarda mukozal yüzeye hücum ederler. *HPW1* moleküler boyutu 61,122 olarak hesaplanan bir asidik protein çerçevesinden ibarettir. Antijen domaini N-terminalinde 3. proteinde lokalizedir. Proteinin geri kalanı, bolca hidroksi aminoasit içerir ve glikozfosfatidilinositol (6PI) ile post-translasyonel modifikasyona uğramış 15 aminoasitlik tipik bir sırayla biter³¹.

Analizler sonucunda *HWP1'*in ekstraselüler boşluğa bağlanan uzatma fonksiyonu olan, serin-tireoninden-zengin bölgeleri ile glukana-bağılantılı bir protein olduğunu göstermiştir³².

II. f. Bakteriyal Biyofilmler

Koagölaz negatif stafilokoklar (Örn. *Staphylococcus epidermidis*) normal deri ve mukoza florasının bir parçasıdır. Son yıllarda, *Staphylococcus epidermidis* hastane enfeksiyonlarının önemli bir etkeni olarak öne çıkmıştır. *Staphylococcus epidermidis* ile oluşan sepsis sıklıkla damar içi kateter ve diğer tıbbi araçların kullanımıyla ilişkilidir³³.

Polimer yüzeye yapışan *Staphylococcus'* lar polimer ilişkili enfeksiyonların patogenezi desteklemektedir. Son veriler bakteriyal biyofilmlerin iki aşamalı oluştuğunu göstermektedir. Yani başlangıçta bakteriyal tek katman, bakteri ve ekstrasellüler slime faktörden oluşan biyofilmlerle kaplanır³⁴.

S. epidermidis' in başlangıçtaki bağlanmasında, 60-kDa'luk yüzey ilişkili bir protein işe karışır. Bu protein, operon yapısındaki intrasellüler adezyon geninden (*ICA A,B,C,D*) oluşan gen lokusu ile kodlanmaktadır³⁵.

Biyofilm oluşumuna katılan polisakkarit intrasellüler adezin (*PIA*) proteini, *ICA A* geni ile kodlanan *N*-asetilglukozamin transferaz enzimi tarafından sentezlenir³⁵.

Polisakkarit sentezi genetik kontrol altındadır ve spesifik intersellüler adezyon (*ICA*) bölgelerini ve özellikle de *ICA A* ve *ICA D* genlerini içerir³⁶.

Diğer gen *ICA B*' nin görevi henüz bilinmemektedir. Uzun poli-*N*-asetilglukozamin zincirlerinin sentezi *ICA A*, *ICA C* ve *ICA D* genlerinin eş zamanlı ekspresyonu ile mümkün olmaktadır³⁶.

Tablo 3: Bakterilerde Adezyondan Sorumlu Bazı Genler

Gen	Protein/fonksiyon	Tür
Adezyon		
ABPA	Amilaza bağlanma	<i>S. gordonii</i>
SSPA/B	Insan tükürük protein ve kollejene bağlanma	<i>S. gordonii</i>
GBPA	Polisakkarit oluşturma	<i>S. mutans</i>
TARC	Glukozil transferaz S in regülatörü ve glukun bağlayan protein	<i>S. mutans</i>
ICA ABCD	Intersellüler adhezin sentezi	<i>S. aureus</i> , <i>S.epidermidis</i>
HLA	Hemolitik toksin	<i>S. aureus</i>
CLFA	Kümeleşme faktörü A (CFA), fibrinojen bağlayan protein	<i>S. aureus</i>
DLTA	Teikoik asidin D-alanine esterifikasyonu	<i>S. aureus</i>
ATLE	Otolizin/adezyon	<i>S.epidermidis</i>
AAP	Akümülayon ilişkili protein	<i>S.epidermidis</i>
BOPABCD	Plastik yüzey operonları	<i>E. faecalis</i>
ESP	Enterokokkal yüzey proteinleri	<i>E. faecalis</i>
AGN43	Agregasyonda yer alan antijen protein	<i>E.coli</i>

II. g. Biyofilmdeki Mikroorganizmalar Arası İletişim

Çoğunluğu algılama (Quorum Sensing), mikroorganizmaların kendi nüfus yoğunluklarını izledikleri ve yoğunluk değiştikçe, davranışlarını düzenledikleri hücreden hücreye iletişime verilen isimdir. Düzenlenen davranışlardan biri de biyofilm oluşumudur³⁷.

Hücre yoğunluğuna bağlı olarak mikroorganizmalar küçük işaret moleküllerinin birikimine yanıt verirler, ortamı tararlar, salınımda bulunurlar. Bu tür etkileşimlerin sonucunda da bir grup hedef genin düzenlenmesini sağlarlar³⁷.

Quorum sensing yoluyla belirli bir işaret yoğunluğuna ulaşıldığında bazı genlerin ekspresyonu kesinleşir. Bir insan patojeni olan *P. aeruginosa*'nın virölansı, çoğunluğu algılama ile denetlendiği için işaretleşmeyi engelleyen maddeler, yeni antibakteriyal geliştirilmesinde kullanılabilir. Bu dizgenin tepkime kinetiği belirlendiği zaman, uygulanacak maddelerin etkileri ile ilgili bazı matematiksel modeller de yaratılabilir ve antibakteriyal uygulamalarda bu modellerden yararlanılabilir³⁸.

Tablo 4: Bakterilerde Quorum Sensing' den Sorumlu Bazı Genler

Gen	Protein/fonksiyon	Tür
Quorum sensing		
COMX	Yeterlilik	<i>S. gordonii</i>
COMABCDE	Yeterlilik	<i>S. mutans</i>
LUXS	Quorum sensing	<i>S. mutans</i>
LASL	3OC12-HSL Quorum sensing sinyalinin sentezlenmesi	<i>P. aeruginosa</i>

Son yirmi yıl içinde birçok tipte hücreden hücreye iletişimi sağlayan açillenmiş homoserin lakton³⁹, hidroksil palmitik asit metil ester⁴⁰ furanozil borat (AI-2)⁴¹, metil dodesenoik asit⁴² gibi moleküller tanımlanmıştır.

Bir insan patojeni olan *Candida albicans*' ın hücre morfolojisinin "*farnesol*" tarafından kontrol edildiği 2001 yılında gösterilmiştir⁴³. Üç farklı tetikleyicinin (L-proline, N-acetylglucosamine, domuz ve sığır serumları) varlığında farnesol adı verilen molekülün germ tüp oluşumunu önlediği gösterilmiştir. Bu ekstrasellüler molekülün oldukça termostabil olduğu, 23-43°C aralığında maya hücre miktarıyla doğru orantılı miktarlarda üretildiği, farklı *C.albicans* kökenleri üzerinde etkili olduğu ve besiyeri bileşimi ve yapısından etkilenmediği saptanmıştır⁴³.

Kırtan fazla farnesol analogunun test edildiği bir çalışmada, QS aktivitesinin molekülün yapısıyla oldukça ilişkili olduğu, bu bulgunun da bir farnesol reseptörü ile özgün iletişimden kaynaklandığı gösterilmiştir⁴⁴.

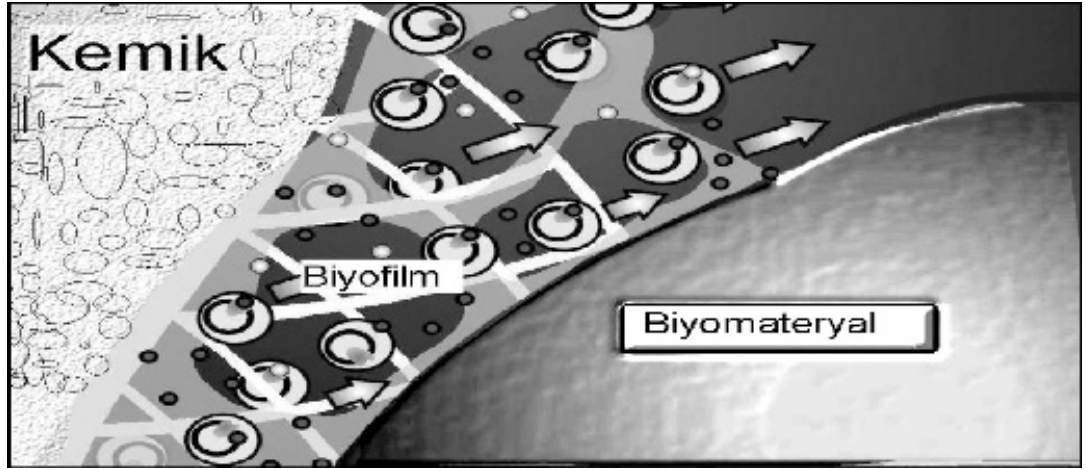
Aynı araştırmacılar QS aktivitesi gösteren işaretli problemlerle yaptıkları incelemeler sonucunda QS moleküllerinin hücre içine alındığını göstermişlerdir⁴⁴.

II. h. Biyofilm Oluşumu İle Hastalıklar Arasındaki İlişki

Biyofilm oluşturan bakteriler ile doğal kapak endokarditi, otitis media, kronik bakteriyel prostatit, kistik fibrozis, periodontit gibi hastalıklar arasındaki bağ artık kanıtlanmıştır. Ayrıca protez kapak, santral venöz kateter, üriner kateter, ortopedik protez, kontakt lens gibi yabancı cisimlerin enfeksiyonları biyofilm oluşumu ile ilişkilidir⁴⁵.

II. h. 1. Canlı Dokularda Oluşan Biyofilmler:

Mikroorganizma canlı dokuya tutunarak zengin besin elde eder, kısa sürede çoğalmaya başlar ve biyofilm oluşturur. Normal bir bakteriyel floranın da patojenik hale geçmesi de söz konusu olabilir. Bu geçiş doku-yüzey kimyasındaki değişim, antibiyotik tedavisi, yaşlanma sonucu ortaya çıkabilir. Dokular üzerine kolonize olan mikroorganizmalar diğer patojenlere karşı vücudu korurlar. Örneğin: mide-barsak kanalı, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri ile kolonize olmuştur. Oluşan bu biyofilm, vücudun doğal mikroflorası olup, bu bölgede patojenlerin yerleşmesini engeller⁴⁵.



Şekil 1: Hem kemik hem de biyomateryal üzerinde oluşan biyofilm tabakasının şematik çizimi (mikroorganizmalar ve fibriller yapı).

Vücuda Yerleştirilen Biyomalzemeler Üzerinde Oluşan Biyofilmler :

Malzeme yüzeyindeki mikroorganizmanın varlığı şu nedenlerden kaynaklanmaktadır:

- Biyomalzemenin steril halde implante edilmemesi,
- Solunum ve sindirim sistemi aracılığı ile mikroorganizmanın vücuda girmesi,

- Mikroorganizmanın zaten vücudun normal florasında bulunması⁴⁵.

Yabancı cisim enfeksiyonlarından izole edilen gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus epidermidis*' in *Staphylococcus aureus* gibi çok sayıda ekzotoksini yoktur. Bu nedenle biyofilm oluşturmaları en önemli virülans faktörüdür⁴⁶.

Staphylococcus' ların iyi bilinen adezinleri fibronektin, fibrinojen ve kollagen gibi konak-doku ligandlarına bağlanırlar. *Staphylococcus*' lar yabancı cisim yüzeyine yapıştıktan sonra, teikoik asit ve şekerden oluşan ekstrasellüler matriksi oluştururlar⁴⁶.

Koagülaz negatif *Staphylococcus*' larda Polisakkarit İntersellüler Adezin (PIA) biyofilm oluşumunda önemli rol oynar. Bu mikroorganizmalarda çok katlı biyofilm oluşumunda önemli rolü olan *ICA* geni, beta laktam antibiyotiklere dirençte çok önemlidir. Bu gen, enfeksiyon etkeni suşlarda sadece kontaminasyona yol açan suşlardan daha çok izole edilir⁴⁶.

Tablo 5: Tıp Alanında Kullanılan Bazı Yabancı Cisimler, Enfeksiyon ve Katkıda Bulunduğu Mortalite Oranı

Alet	İnfeksiyon Oranı %	Katkıda Bulunduğu Mortalite
Üriner kateter	10-30	Düşük
Santral venöz kateter	3-8	Orta
Kırık fiksasyon aleti	5-10	Düşük
Dental implant	5-10	Düşük
Eklem protezi	1-3	Düşük
Vasküler graft	1-5	Orta
Kalp pili	1-7	Orta
Meme implantı	1-2	Düşük
Kalp kapağı	1-3	Yüksek
Penil implant	1-3	Düşük

Tablo 6: Bazı Mikroorganizmalar ve Biyofilm Oluşturduğu Malzemeler

Mikroorganizma	Biyofilm oluşturduğu malzeme
<i>Candida albicans</i>	Ses protezleri, Santral venöz kateterleri, Rahim içi araçlar, Üriner kateterler
<i>Koagülaz negatif stafilokoklar</i>	Ses protezleri, Kalça protezleri, Rahim içi araçlar Santral venöz kateterleri, Kalp kapağı protezleri, Üriner kateterler
<i>Enterokoklar</i>	Kalça protezleri, Santral venöz kateterleri, Rahim içi araçlar, Kalp kapağı protezleri, Üriner kateterler
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Santral venöz kateterleri Üriner kateterler
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rahim içi araçlar Santral venöz kateterleri Üriner kateterler

Gram negatif bakteriler, gram pozitif bakterilere göre daha az yapışır. *Proteus stuartii* genellikle uzun süreli kalan üriner kateterlere bağlanır. Bu bağlanma tip 3 fimbria aracılığı ile olur. *E. coli*'nin üriner kateterlere bağlanması daha az sıklıkla görülür. Üriner sistemdeki yabancı cisimlere *E. coli* nin bağlanması kateterin konulduğu yere ve bakterinin predominansına göre değişir. Tip 1 fimbriyası olan *E.coli* suşları mesaneyi infekte ederken, P fimbriyası olanlar böbreği infekte etmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* kistik fibrozis ve diğer kronik akciğer hastalıklarında ve yabancı cisimlerde biyofilm oluşumunda etkilidir⁴⁷.

II. h. 2. Vücut Dışındaki Biyofilmler:

Biyofilmler, su ve petrol dağıtım sistemlerinde, soğutma sistemlerinde, filtrasyon sistemlerinde, gemilerin yüzeylerinde ve doğada bulunan birçok yüzeyde oluşabilmektedir. Çevredeki su ve minerallerle oluşturdıkları hücre dışı polisakkaritler ile beslenerek yaşamlarını sürdürürler⁴⁸.

Su dağıtım sistemlerindeki biyofilmler, suda koku ve tat değişimine neden olurlar. Bu suyun kullanımı ciddi sağlık sorunlarına neden olabilmektedir⁴⁸.

Süt, et ve birçok besin maddesinin üretimi sırasında, besinin sahip olduğu proteinler (kazein, jelatin), üretimde kullanılan cihazlar üzerinde bir film oluşturarak, *Bacillus cereus*, *Streptococcus thermophilus*, *Listeria monocytogenes* gibi mikroorganizmaların yapışmasını kolaylaştırır⁴⁸.

Gıda üretiminde biyofilm oluşumunun engellenmesinde en etkili yol, polisakkarit matriksi parçalamak için EDTA gibi deterjanlar ve alfa amilaz, glukonaz gibi enzimler kullanılmasıdır. Ayrıca oluşan biyofilm manyetik alanlar ve elektrik alanları ile de yok edilebilir⁴⁸.

II. 1. Biyofilm ve Kateter Enfeksiyonları

Intravasküler kateterler yaklaşık 50 yıl önce klinik kullanıma girmiştir. Günümüzde periferik, santral, arteriyel ve venöz olmak üzere çeşitli kateter uygulamaları değişik amaçlarla yapılmaktadır. Bugün hastaneye yatan hastaların, Avrupa ülkelerinde %63'ünde, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) ise %50'sinde intravasküler kateter kullanıldığı bilinmektedir⁴⁹⁻⁵⁰. Santral venöz kateterler (SVK) özellikle yüksek doz kemoterapi ve kök hücre nakli uygulamalarının artmasıyla Hematoloji ve Onkoloji Üniteleri'nde kullanılır hale gelmiştir. Özellikle kan örneği alınmasını, santral venöz basınç takibini, uzun süreli kemoterapi, antibiyoterapi ve kan ürünlerinin infüzyonunu kolaylaştırması nedeniyle SVK uygulanması, hematolog ve onkologların standart yaklaşımı haline gelmiştir. Hastaların büyük çoğunluğunun immun sistemleri ve hematopoetik dokuları geçici olsa da baskılanmış olduğu için, deri bütünlüğünü bozan geçici SVK'ler, ciddi infeksiyon kaynağı olmaya devam etmektedirler⁴⁹⁻⁵⁰.

Santral venöz kateterler ile ilişkili komplikasyonlardan en önemlisi kateterle ilişkili infeksiyonlardır⁵¹. Kateter infeksiyonları yaşamı tehdit edebilen önemli nozokomiyal infeksiyonlardandır. Kateter infeksiyonlarında en sık izole edilen mikroorganizmalar Koagülaz Negatif Stafilokoklar ve *Staphylococcus aureus*' dur. Hastanın normal deri florasında bulunan bu etkenler kateterin dış yüzeyini kolonize ederek infeksiyona neden olurlar⁵².

Kateter infeksiyonu gelişiminde çeşitli değişkenler rol oynamaktadır⁵²:

1. Mikroorganizmanın giriş yeri:

a. Deride kolonizasyon ve kateter dış yüzeyinden mikroorganizmanın girmesi: Kateter infeksiyonun gelişmesinde en önemli yoldur. Genellikle deride kolonize olan mikroorganizma infeksiyon etkeni olarak soyutlanmaktadır.

b. Kateter iç yüzeyinden kaynaklanan infeksiyon: Mikroorganizmalar kateter ile infüzyon seti bağlantısından girmektedir.

c. İnfüzyon sıvılarının kontaminasyonu ile enfeksiyon gelişimi:

d. Uzak bir enfeksiyon odağından hematogen yayılım:

2. Konak ile ilişkili patojenik faktörler:

Kateter yerleştirildikten kısa süre sonra konak yanıtına yol açar ve kateter yüzeyi fibrin tabaka ile kaplanır. Bu tabaka fibrin ve fibronektinden zengin olup *S. aureus*' un ve *Candida* türlerinin adheransını kolaylaştırır.

3. Mikroorganizmaya ait patojenik faktörler:

Özellikle koagülaz negatif stafilokoklar kateter yüzeyine doğrudan yapışma yeteneğine sahiptirler. Glikokaliks katmanı oluşturarak konağın immün yanıtından korunurlar. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida* türleri de benzer patojenik faktörlere sahiptirler.

4. Kateter tipi ve yapısı ile ilgili faktörler:

Birden çok lümenli, kafsız kateterlerde enfeksiyon riski daha yüksektir. Polivinil klorid ve polietilenden yapılan kateterler silikon, poliüretan ya da teflon kateterlere göre daha risklidirler. Bakterilerin tutunmasının en zayıf olduğu kateterler silikon yapıda olanlardır.

Kateter enfeksiyonlarının % 65' i kateter giriş yerinden, % 30' u kateter ağzından kaynaklanmaktadır. Kısa süreli takılı geçici kateterlerde çoğunlukla enfeksiyon kaynağını kateter giriş yerinde kolonize olan deri mikroorganizmaları oluştururken, uzun süreli takılı kalan kalıcı kateterlerde enfeksiyon kaynağı çoğunlukla kateter ağzıdır⁵³.

Geçici kateterlerde, kateter giriş yerindeki mikroorganizmalar kateter dış yüzeyi boyunca ilerleyerek kateter ucuna ulaşırlar ve damar içi enfeksiyona sebep olurlar⁵⁴.

Kalıcı kateterlerde ise manipölasyon ve kullanılma sıklığının daha fazla olmasından dolayı kateter ağzı kaynaklı infeksiyonlar daha sık olarak saptanmaktadır. Bu tip enfeksiyonlarda mikroorganizmalar kateter ağzına çoğunlukla sağlık çalışanlarının elleri aracılığı ile bulaşmaktadır. Kateter ağzına bulaşan mikroorganizmalar, kateter iç yüzeyi boyunca ilerleyerek damar içi infeksiyona neden olurlar⁵⁴.

II. i. Antimikrobiyal Direnç

II. i. 1 Antibiyotik Direnci

Biyofilm içerisindeki bakterilerin en önemli özelliklerinden birisi konak cevabından kurtulup antibiyotiklere direnç göstermeleridir. Laboratuvar koşullarında yapılan testlerde, biyofilm bakterilerinin serbest bakteriler için belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonundan (MİK) birkaç yüz veya bin kez fazla antibiyotik konsantrasyonuna bile direnç gösterdiği bulunmuştur. Antibiyotikler serbest bakterileri öldürerek infeksiyon riskini azaltabilir, fakat antibiyotik tedavisi kesildiği anda biyofilm oluşumu yeniden gözlenmektedir.

II. i. 2. Antifungal Direnci

Candida albicans tarafından oluşturulan biyofilmlerde, azol grubu ilaçlara ve amfoterisine karşı direnç gösterilmiştir. Genellikle fungal biyofilmler ekinokandinlere karşı duyarlıdır. *Candida albicans*' ın oluşturduğu biyofilmlerde antifungal ilaçlara direncin görülmesi bir çok faktörün sonucudur. Biofilmlerdeki hücrelerin ergosterol içeriği, sıvı kültürdeki hücrelerinkinden daha azdır.

Candida albicans hücre duvarında, ATP bağlayan kaset (ABC) üst ailesi proteinleri ve majör fasilitatör (MF) üst ailesi proteinleri olmak üzere, iki farklı sınıf dışa atım pompası bulunmaktadır. ABC proteinleri *CDR1* ve *CDR2* genleri, MF proteinleri ise *MDR* genleri tarafından kodlanmaktadır. Biyofilm içindeki *Candida albicans* hücrelerinde saptanan yüksek seviye ilaç direnci ile bu genlerin tümünün ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Candida biyofilminin antifungal direnç göstermesi infeksiyonların patogenezi açısından önemli bir özelliktir⁵⁵. Direnç gelişiminin muhtemel mekanizmaları;

- ESM,
- yavaş üreme hızı,
- membran lokalize atılım pompalarının fazla ekspresyonu,
- sterol miktarı

olarak belirlenmiştir.

Bu konudaki çalışmalar halen devam etmektedir, fakat günümüzde bu mekanizmaların hiçbirinin tek başına sorumlu olmadığı ve direncin kompleks bir mekanizma ile geliştiği düşünülmektedir.

Hastalıkların patogenezi açısından baktığımızda biyofilmin en önemli özelliği buradaki organizmalar tarafından oluşturulan antimikrobiyal dirençtir.⁵⁵ PVC disklerindeki *Candida albicans* biyofilmlerinin planktonik hücrelerle kıyaslandığında 100 kat veya daha fazla flukanozole, 20-30 kat daha fazla da amfoterisin B'ye dirençli olduğu saptanmıştır ⁵⁶⁻⁵⁷.

Diğer çalışmalarda selüloz, polystrene, silikon elastomer, poliüretan ve akrilik yüzeylerde oluşan *Candida* biyofilmlerinin antifungal direnç gösterdiği bildirilmiştir⁵⁸⁻⁵⁹. Bununla birlikte, son yıllarda, yeni antifungal ajanların bazılarının *Candida* biyofilmine etkili olduğu ileri sürülmektedir. *C. albicans* ve *C. parapsilosis* biyofilmleri yeni triazollere (Vorikonazol ve ravukonazol) direnç gösterdiği halde, amfoterisin lipid formülasyonu ve iki ekinokandin türevinin (Kaspofungin ve mikafungin) antibiyofilm aktivitesi olduğu saptanmıştır⁶⁰. Caspofunginin *C. albicans* biyofilmine in vitro etkinliği diğer araştırmacılar tarafından da gösterilmiştir ⁶¹⁻⁶².

Kaspofungin bilindiği gibi *Candida* hücre duvar komponenti olan β 1,3-glukan sentezini inhibe etmektedir. O halde, glukan sentezi biyofilm oluşumunun inhibisyonu için etkili bir hedef gibi görünmektedir ⁵⁵.

C. albicans prostaglandinlerinin fungal kolonizasyonda önemli rol oynadığının ileri sürülmesi, siklooksijenaz inhibitörlerinin (örn, aspirin) *C. albicans* biyofilm inhibisyonunda etkili olabileceğini düşündürmüştür⁶³. Aspirinin 0.1-1 mM konsantrasyonunun *Candida* biyofilmlerinin metabolik aktivitesinin %70 azalmasına neden olduğu saptanmıştır⁶⁴. Bununla birlikte, biyofilm inhibisyonunda aspirinin rolü hakkında daha geniş çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

II. i. 3. Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesinde Kullanılan Yöntemler⁶⁵:

II. i. 3. 1. Mikroskopik yöntemler:

Farklı mikroskoplar kullanılarak oluşan biyofilm tabakası ve hücre morfolojisine bakma esasına dayanır. Bunlar:

- Confocal laser scanning microscopy
- Transmission electron microscopy
- Scanning electron microscopy
- Epifluoresans microscopy
- Interference reflection microscopy
- Atomic force microscopy

ile yapılmaktadır.

II. i. 3. 2. Ölçüm Yöntemleri :

II. i. 3. 2. a. Kuru Ağırlığın Ölçülmesi:

Biyofilm tabakasının hücre kazıyıcıları ile kazınarak ağırlığının ölçülmesi esasına dayanır.

Ölçüm: II. i. 3. 2. b. Tetrazolium Tuzu ile (XTT) Spektrofotometrik

Tetrazolium tuzu biyofilm tabakasının üzerine eklenerek bir süre inkübe edilir ve kolorimetrik bir değişim gözlenir.

II. i. 3. 3. Moleküler Yöntemler :

Son yıllarda adezyondan ve slaym oluşumundan sorumlu genlerin gösterilmesine dayalı moleküler yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Bu moleküler yöntemlerden en çok kullanılan, genellikle hedeflenen bir gen bölgesinin çoğaltılıp görüntülenmesine dayalı polimeraz zincir reaksiyonudur. (PCR)

İlk kez Kary Mullis tarafından uygulamaya başlatılan PCR, spesifik primerler aracılığıyla bir DNA parçasının çoğaltılmasına dayalı in vitro bir yöntemdir⁶⁶. Bir test tüpü içinde gerçekleştirilen PCR'da, in vivo nükleik asit çoğaltılması örnek alınmıştır.

PCR reaksiyonu temel olarak çoğaltılması planlanan hedef bölgenin iki ucundaki DNA dizilerini özgül olarak tanıyıp karşı iplikçiklerini hibridize eden iki oligonükleotid primer, primerlere bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan DNA polimeraz, sentez için gerekli olan deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP; adenin (A), guanin (G), sitozin (C), timin (T)), polimerazın çalışması için gerekli olan tampon maddeler ve kofaktör olan Mg²⁺ iyonlarını kullanarak, bir DNA parçasının çoğaltılması esasına dayanmaktadır.

PCR temel olarak üç aşamalı bir yöntemdir. Bunlar;

1 - Denatürasyon: Çift iplikli kalıp DNA'nın birkaç saniye 94-96 °C ısı ile tek iplikli DNA'ya ayrılmasıdır.

2 - Bağlanma (annealing): Örnek birkaç dakika 30-60 °C'de tutularak primerin ssDNA'daki hedef bölgelere hibridizasyonu sağlanır. Bu hidrojen bağlarının yardımı ile olur. Bağlanma ısı sadece DNA/DNA eşleşmesine imkan sağlayacak kadar yüksek olmalıdır.

3 - Uzama (extention=elongasyon): DNA polimeraz enzimi yardımı ile ssDNA kalıplarına bağlanan primerlerin 5'-3' yönde uzatılmasıdır.

PCR çalışmalarında reaksiyonun gerçekleşmesi için küçük miktarda hedef DNA (1-100ng kadar) içeren örnek çalışma solüsyonu içerisine ilave edilir. Daha sonra örnekteki hedef çift sarmal (ds) DNA'nın, tek sarmal (ss) DNA'ya dönüştürülmesi sağlanır (denatürasyon). Tek DNA iplikçiklerinin karşıtı, 20-30 baz çifti (bp) uzunluğundaki sentetik oligonükleotit diziler, DNA/RNA heterodupleksini oluşturmak üzere primer gibi kullanılır. Spesifik bir bölgenin amplifikasyonu için hedefi sınırlamak amacıyla ikinci primer kullanılır. Primerlerden birisi ssDNA zincirinde başlatıcı bölgeyi oluştururken, ikincisi de diğer zincir üzerinde sonlandırıcı bölgeye bağlanır (annealing). Taq DNA polimeraz enziminin yardımıyla, primerlerin bağlandığı bölgeden itibaren her ssDNA zincirinin komplementeri oluşturulur (extention). Böylece iki adet dsDNA oluşur. Oluşan dsDNA'lar, yeni amplifikasyon için kalıp görevini üstlenir. Bu işlem 30 siklus tekrarlandığında birkaç saat içerisinde, hedefin milyarlarca kopyası elde edilebilir⁶⁷.

Her primerin uzayan ürünü diğer primere kalıp görevi gördüğünden, her siklus, bir önceki siklusta meydana gelmiş olan DNA parça miktarını ikiye katlamaktadır. Bu geometrik birikim ile birkaç saat içindeki özgül hedef parçanın milyonlarca kopyası oluşmaktadır⁶⁶.

II. i. 3. 3. a. Oligonükleotid Primerler

Hedef DNA bölgesini çoğaltmak için genellikle 20-30 nükleotid uzunluğunda primerler kullanılmaktadır. Daha uzun primerler kullanıldığında özgüllükte bir yükselme olmadığı gibi gereksiz yere maliyet artışı olmaktadır. Daha kısa primerler kullanıldığında ise istenmeyen bölgelere bağlanma meydana gelebilmekte ve özgül olamayan çoğaltma ürünleri ortaya çıkabilmektedir. Primerlerin mümkün ise, ortalama olarak 4 bazın her birinden eşit sayıda içermesi ve tekrarlayan, pürin veya pirimidin dizilerinden kaçınılması gereklidir. Primerlerin 3' ucunun guanin (G) ve sitozin (C) den zengin olması bağlanmayı artırdığından tercih edilmelidir. Ayrıca primerlerin kendi kendilerine ve birbirleri üzerine bağlanabilirliğinin olmamasına dikkat edilmelidir. İki primerin ayrılma-bağlanma sıcaklıkları (Melting temperature= T_m) birbirine mümkün olduğunca yakın seçilmelidir ⁶⁶⁻⁶⁷⁻⁶⁸.

II. i. 3. 3. b. DNA Polimeraz

PCR tekniğinde ısıya dayanıklı DNA polimerazlarının kullanılmaya başlanması, PCR'ın araştırma ve klinik laboratuvarlarda rutin bir teknik haline gelmesine neden olmuştur. PCR çalışmalarında kullanılmak üzere *Thermus aquaticus* adlı sıcak sularda yaşayan bir bakterinin ısıya dayanıklı olan DNA polimerazı (Taq DNA polimeraz) izole edilmiştir. Taq DNA polimerazın optimum çalışma sıcaklığının 72 °C civarında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 95 °C'de 40 dk. bekletildiğinde enzim aktivitesinin %50'sinin korunduğu görülmüştür. Taq DNA polimerazın kullanılmaya başlaması ile hem her döngüden sonra reaksiyon karışımına yeniden polimeraz eklenmesine gerek kalmamış, hem de primerlerin özgül bölgelerine bağlandıktan sonra 37°C gibi düşük bir sıcaklığa inilmediği için, istenmeyen yerlere bağlanmaları engellenmiştir ⁶⁷⁻⁶⁹.

DNA polimerazlar, orijinal ana DNA zincirlerinden bir tanesi kalıp olarak kullanılarak yeni bir tamamlayıcı DNA zinciri oluşturulurken, monomer deoksinükleotid trifosfatlardan uzun polinükleotid zincirlerin sentezini katalize eden enzimlerdir. Yalnızca DNA polimeraz enzimi yardımı ile genomun tamamı değil, spesifik bölgelerin kopyalanması gerçekleştirilir. Kullanılan polimeraz enzimine bağlı olarak kopyalanarak çoğaltılacak olan bölgenin uzunluğu Taq DNA polimeraz için 2 kilobazdan (kb) küçük, en fazla ise 40-50 kb olabilmektedir ⁶⁶⁻⁶⁹.

II. i. 3. 3. c. Deoksinükleozid trifosfatlar (dNTPs)

Saf deoksinükleosid trifosfatların dördünün ayrı ayrı bulunduğu veya dördünün bir arada bulunduğu stok solüsyonlar mevcuttur. Stok solüsyonların çoğunun pH sı NaOH ile 7.5' e ayarlanmıştır.

PCR için genel olarak 100 uM dNTP konsantrasyonu gerekli olmakla birlikte daha düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 uM) Taq DNA polimeraz daha iyi çalışmaktadır. Bununla birlikte optimal dNTP konsantrasyonları $MgCl_2$ konsantrasyonuna, reaksiyon durumuna, primer konsantrasyonuna, çoğaltılan ürünün uzunluğuna ve PCR döngü sayısına bağlıdır. Bazen optimizasyonu sağlamak için en uygun dNTP konsantrasyonunun ampirik olarak belirlenmesi gerekebilmektedir⁶⁶⁻⁶⁷.

II. i. 3. 3. d. Tamponlar

PCR da DNA polimerazın daha iyi çalışmasını sağlayan birçok tampon bulunmaktadır. Fakat 1988 yılında Saiki ve ark. nın tanımlamış olduğu tampon veya buna benzer tamponlar genel olarak kullanılmaktadır. Bu tampon final konsantrasyon olarak 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, % 0.01 jelatin, %0.01 NP40 ve % 0.01 Tween 20 içermektedir.

II. i. 3. 3. e. $MgCl_2$

Mg^{+2} , DNA polimeraz enziminin çalışmasını sağlayan önemli bir kofaktördür. $MgCl_2$ ün son reaksiyon karışımındaki konsantrasyonu farklı oranlarda olabilmektedir. Bu nedenle en uygun olan $MgCl_2$ konsantrasyonunu belirlemek için 0.5-5.0 mM aralığındaki $MgCl_2$ konsantrasyonlarının denenmesi gereklidir. Mg^{+2} iyonları, polimerizasyon sırasında dNTP'ların yeni yapılmakta olan zincire eklenmesi için çok önemlidir. Ayrıca polimeraz aktivitesini stimüle ettikleri gibi çift zincirli DNA'nın ayrılma-bağlanma sıcaklıklarını artırır ve primerlerin kalıp DNA'ya bağlanmalarını kolaylaştırır. $MgCl_2$ konsantrasyonun PCR ürünü ve özgüllük üzerine önemli etkileri vardır. 1.0 - 1.5 mM $MgCl_2$ konsantrasyonu genellikle ideal olmakla birlikte, bazı durumlarda, farklı Mg^{+2} miktarları gerekli olabilmektedir⁶⁷.

II. i. 3. 3. f. Sıcaklık Döngüleri

PCR'ın üç değişik sıcaklıktan oluşan denatürasyon, primer birleşmesi ve uzama basamakları bir döngüyü oluşturur. Bu döngülerin tekrarlanması ile DNA çoğaltılır. PCR karışımlarını içeren tüpler otomatik programlanabilen cihazlarla (Thermal cycler) sıra ile bu sıcaklıklarda, istenilen sürelerde tutulur. Bütün DNA zincirleri 94 °C' de denatüre olduğu için hangi primer kullanılıyor olursa olsun ve hangi DNA çoğaltılırsa çoğaltılsın denatürasyon için genel olarak bu sıcaklık kullanılır.

Primer birleşmesi için kullanılan sıcaklık primerin nükleotid içeriğine göre değişir ve primerlerin ayrılma-bağlanma sıcaklıklarına göre belirlenir. Uzama sıcaklığı ise enzimin en iyi çalıştığı sıcaklıkta (Taq polimeraz için 72 °C' de) hep aynı tutulur. Bu sıcaklıklarda denatürasyon, primer birleşmesi ve uzama için gereken süre aslında birkaç saniyedir. Ancak cihaz içerisindeki tüplerdeki karışımların tamamının bu sıcaklıklara ulaşması biraz süre gerektirebilir. İnce çeperli tüplerin kullanılması bu sürelerin kısaltılmasını sağlayabilir. PCR reaksiyonlarına ilk başlarken ortamdaki bütün DNA'ların tamamının denatürasyonu için biraz uzunca bir süre gerekebilir. İnce çeperli tür kullanılan tipik bir PCR programı şu şekildedir; 94 °C'de 3 dakika denatürasyon sonrası 94 °C' de 30-45 saniye denatürasyon, primer bağlanma sıcaklığında (primere göre 50-70 °C arasında bir sıcaklıkta) 30-45 saniye primer birleşmesi ve çoğaltılan DNA'nın büyüklüğüne göre 45-60 saniye 72 °C'de polimerizasyon olmak üzere 35-45 döngü yapılır. En son 72 °C' de 3-7 dakika daha tutulması yarım kalan zincirlerin tamamlanmasını sağlar⁶⁶⁻⁶⁷⁻⁶⁹.

II. i. 3. 3. g. Hedef

Tanısal PCR'ın özgülüğü çoğaltım için uygun bir hedef dizisi seçilerek sağlanabilmektedir. Özgülük, hedef dizi ile farklı cins veya türlerin DNA dizileri arasındaki homoloji derecesine bakılarak belirlenir. Örneğin; tüm mantarlarda ortak olan bir genin fazlaca korunmuş olan bir bölgesinin PCR protokolünde hedef dizi olarak seçilmesi bir enfeksiyonun bakteriyel veya mantar kaynaklı olduğunu göstermek için uygundur. Bu strateji birçok araştırmacı tarafından, çoğaltım için hedef dizi olarak fungal ribozomal RNA (rRNA) içindeki oldukça korunmuş bölgeler veya universal bölgeler seçilerek uygulanmıştır. rRNA genleri oldukça korunmuş bölgeler içerdikleri için ve tüm DNA'ların çoğaltılmasında kullanılabildiğinden ayrıca birbirine yakın türlerin identifikasyonunda kullanılabilen oldukça değişken bölgelere sahip olduklarından en fazla tercih edilen hedef genlerdir. rRNA genlerinin diğer bir avantajı da PCR duyarlılığını arttıran yüksek kopya sayısı göstermeleridir.

Alternatif olarak özel cins veya türleri saptamak için bir genin oldukça değişken bir bölgesi daha yüksek bir özgüllük sağlayabildiğinden tercih edilmektedir. Bu amaçla rRNA genlerinin yanında mantar DNA genleri de hedef olarak seçilmiştir.

Fungal genotiplendirme çalışmalarında değişik gen bölgeleri hedef olarak kullanılmaktadır. Bu bölgeler kitin sentaz ve beta-tubulin gibi protein kodlayan intron bölgeleri olabilecekleri gibi, rDNA gibi protein kodlamayan genler de olabilir. Ribozomal DNA gen bölgesinin seçilme sebepleri arasında; çoklu tekrar sayısı, bazı bölgelerinin çok iyi korunmuş, bazı bölgelerinin ise aşırı değişken oluşu sayılabilir. Fungal nükleer ribozomal DNA (rDNA), internal transcribed spacer (ITS) olarak adlandırılan bölgelerde ayrılan üç genden oluşur (Geniş subünit gen (25S), küçük subünit gen (18S ve 5.8 gen). ITS bölgesi fungal tanıda özellikle önemli olan bir alandır. Bu alanlar iyi korunmuş, yüksek çeşitlilik gösterir ve fungal türlerin tanınmasında spesifik PCR primerlerinin geliştirilmesinde ideal bir başlatıcıdır⁶⁹⁻⁷⁰.

Günümüzde PCR; adli tıp, kalıtsal hastalıkların belirlenmesi, patojen mikroorganizmaların saptanması, prenatal tanı, DNA dizi analizi, bilinmeyen dizilerin tayini, polimorfizmlerin saptanması, fosil DNA' sının incelenmesi ve rekombinant DNA teknolojisi gibi çeşitli alanlarda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır.

PCR işlemi yalnız DNA üzerinde uygulanabilmektedir, bu sebeple RNA içeren mikroorganizmalara ait genetik materyalin PCR ile tespiti istendiğinde öncelikle RNA'nın DNA'ya çevrilmesi gerekmekte, bu amaçla RNA, PCR çalışmasından önce 'revers transcriptase' (RNA bağımlı DNA polimeraz) enziminin yardımı ile tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) çevrilerek bilinen PCR prosedürüne devam edilmekte ve bu teknik de 'Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction' (RT-PCR) olarak adlandırılmaktadır.

RT-PCR, RNA hedeflerinin amplifikasyonu (çoğaltma) için geliştirilmiştir. RT-PCR, mRNA ve viral RNA gibi RNA hedef dizilerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılır. Bu işlemde, RNA hedefleri önce 'reverse transcriptase' (RT) ile cDNA'ya çevrilmekte ve daha sonra PCR ile amplifiye edilmektedir.

Thermus thermophilus' dan elde edilen ısıya dayanıklı DNA polimeraz ve bunun diğer organizmalardan elde edilen kuzenleri etkin revers transkripsiyon aktivitesine sahiptir. Bu enzimler ayrı bir RT adımına gerek duyulmadan RNA hedeflerinin amplifikasyonlarında kullanılabilir. Böylece RT ürünlerinin ayrı bir PCR tüpüne transferinin yorucu, zaman alan ve kontaminasyona açık işlemlerinden kaçınılmış olunur. Reaksiyon ısısının yüksekliği primer hibridizasyonundaki sıklığı artırır ve primer bağlanması, uzaması veya her ikisini de engelleyebilecek olan RNA ikincil yapısının oluşmasını önler⁶⁷.

II. i. 3. 3. h. Real Time PCR (Gerçek Zamanlı PCR):

'Real Time' reaksiyon boyunca veri toplanması ve analizin aynı anda devam etmesi demektir. Real Time PCR da amplifikasyon ve analiz birlikte yapılmaktadır. DNA boyaları ya da floresan probalar gibi analiz için gerekli olan reaktifler, PCR karışımına amplifikasyondan önce eklenmektedir. Veriler amplifikasyon süresince aynı tüp/kapiller içinden ve aynı cihaz ile toplanır. Örnek transferi, reaktif eklenmesi ve jel ayırımı yoktur⁷¹.

Belirleme yöntemi olarak özel boyalarla işaretli problemlerin kullanıldığı Taqman®, moleküler beacons, FRET®, Scorpions®, Amplifluor™ gibi yöntemler ya da SYBR Green®, etidyum bromür gibi özgül olmayan floresan boyaların kullanıldığı yöntemler kullanılır⁷¹.

SYBR Green, fluorojenik bir boyadır ve çözeltide az miktarda floresan yaymaktadır. Çift sarmallı DNA'ya bağlandığında güçlü floresan yaymaktadır. Böylece PCR ürünleri çoğalırken, floresan artar. SYBR Green reaksiyonlarda primer\dimers ve özgül olmayan reaksiyon ürünlerini de içeren çift zincirli bütün DNA' lara bağlanmaktadır⁷¹.

Miktar tayini RT-PCR kullanılarak, örnekteki özgül mRNA sekansının saf miktarı ölçülerek yapılmaktadır.

Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır.

Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir⁷¹.

II. i. 3. 3. 1.. Standart Eğri Yöntemi

Real Time PCR' da kantitasyon için en sık kullanılan yöntemdir.

Standart eğri ilk olarak bilinen RNA konsantrasyonundan yola çıkılarak düşünülmüştür. Daha sonra bilinmeyen konsantrasyonlardaki mRNA miktarına ulaşmak için referans yöntem olarak kullanılmıştır. Ek olarak RNA standartları cDNA plazmid konsantrasyonu içermekte ve in vitro ortamda RNA standartları içinde kopyalanmaktadır. Saf RNA standartlarının miktarı saf kopyanın üretilmesinde yardımcı olmaktadır. Ayrıca, diğer nükleik asit örnekleri standart eğri oluşumunda kullanılabilir. Bunlar, saf plazmit dsDNA'sının vitro ortamda üretilmiş dsDNA ya da belirli hedef geni kodlayan, herhangi bir cDNA olabilmektedir⁷¹.

Spektrofotometrik yöntemler ile 260 nm de DNA konsantrasyonları belirlenmekte ve örneğin moleküler ağırlığına dayanan kopya sayısına dönüştürülmektedir. cDNA plazmitleri standart eğri tayininde daha çok tercih edilmektedir. Ancak cDNA plazmitlerinin tersinir transkripsiyon basamağındaki varyasyonları kontrol edilememektedir. Bu yöntem yalnız mRNA ekspresyonundaki değişiklikler hakkında bilgi vermektedir. Bu yöntem ve varyasyonları, çeşitli RNA bilgisini ortaya çıkarmakta ve 'housekeeping' genin varlığı ile doğrulanmaktadır⁷¹.

Bu çalışmada, adezyon ve biyofilm oluşumundan sorumlu *C.albicans*' a ait *ALS*, *HWP* genleri ve *S.epidermidis*' e ait *ICA* genlerinin, in vitro biyofilm modelinde kantitatif analizinin yapılması amaçlanmıştır.

III.GEREÇ VE YÖNTEM

III. a. Gereçler

III. a. 1. Cihazlar

III. a. 1. 1. Thermal Cyclor (Apollo, Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

III. a. 1. 2. Real Time PCR (Light Cyclor Roche, Almanya)

III. a. 1. 3. Santrifüj Cihazı (HERMLE Z380, Almanya)

III. a. 1. 4. Etüv (Elektro-mag, Türkiye)

III. a. 1. 5. Vorteks (İnterLab, Türkiye)

III. a. 1. 6. Otoklav (Sanyo, Türkiye)

III. a. 1. 7. Kuru Isı Bloğu (GFL, Almanya)

III. a. 1. 8. Elektroforez tankları (Vilber Lourmat, Almanya)

III. a. 1. 9. Translimünatör (Vilber Lourmat, Almanya)

III. a. 1. 10. Bilgisayar (Fotoğraf çekimi için) (LG, Kore)

III. a. 1. 11. - 20 °C Derin Dondurucu (Uğur, Türkiye)

III. a. 1. 12. Çalkalayıcı (GFL, Almanya)

III. a. 1. 13. Sınıf II Biyogüvenlik Kabini (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

III. a. 1. 14. Hassas Terazı (Shimadzu, Japonya)

III. a. 1. 15. Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)

III. a. 1. 16. Mikrosantrifüj (Heraeus, Almanya)

III. a. 2. Kimyasallar

III. a. 2. 1. Heliosis Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

III. a. 2. 2. DNA Lysis Binding Solution (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

III. a. 2. 3. DNA Precipitation Solution (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

III. a. 2. 4. DNA Washing Solution (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

III. a. 2. 5. DNA Sample Diluter (Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

III. a. 2. 6. Proteinase K (Sigma, Almanya)

III. a. 2. 7. Digestion Buffer (Sigma, Almanya)

III. a. 3. Candida albicans' a özgül primerler

III. a. 3. 1. ALS F-R (Metabion, Almanya, Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

III. a. 3. 2. HWP F-R (Metabion, Almanya, Metis Biyoteknoloji, Türkiye)

III. a. 4. Staphylococcus epidermidis' e özgül primerler

Türkiye) III. a. 4. 1. ICA F-R (Metabion, Almanya, Metis Biyoteknoloji,

III. a. 5. Laboratuvar Malzemeleri

III. a. 5. 1. DNA Saklama Kutusu

III. a. 5. 2. Buz Aküsü

ABD) III. a. 5. 3. Otomatik Mikropipetler ve Uçları (Beta Pette™,

III. a. 5. 4. Spor (Tüplük)

III. a. 5. 5. Kısa Kalın Cam Tüp

III. a. 5. 6. Cell Scraper (Hücre Kazıyıcı)

III. a. 5. 7. 0,2, 0,5, 1,5 ml' lik Steril Ependorf

III. a. 5. 8. Pamuk

III. a. 6. Kateter Örnekleri

III. a. 6. 1. Tek Kullanımlık Lateks Foley Kateter (Well Lead Silicone Coated Foley Catheter), Well Lead Medical Ins; China

III. a. 6. 2. Tracheal Tube 8.0 Oral/Nasal Bıçakçılar, Türkiye, Medimark Europe, France

III. a. 6. 3. Nasogastric Catheter-Levin Bıçakçılar, İstanbul, Türkiye, Medimark Europe, France

III. a. 6. 4. Neumann Aspirasyon Sondası, Fujian Kanglite Group, Fuzhou, PRC

III. a. 7. Mikroorganizmalar

III. a. 7. 1. *Candida albicans* (Klinik Örnekler)

III. a.7. 2. *Staphylococcus epidermidis* (Klinik Örnekler)

III. b. Yöntem

Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans*; germ tüp oluşturma, mısır unu agarda morfoloji ve karbonhidrat assimilasyonu özelliklerine göre tanımlandı.

Staphylococcus epidermidis; gram boyama, katalaz testi, novobiosin diskine duyarlılık özelliklerine göre tanımlandı.

Öncelikle; klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* ve *Staphylococcus epidermidis* türlerinde slaym faktör oluşumu gösterildi. Pozitif örnekler, biyofilm çalışmasında kullanıldı.

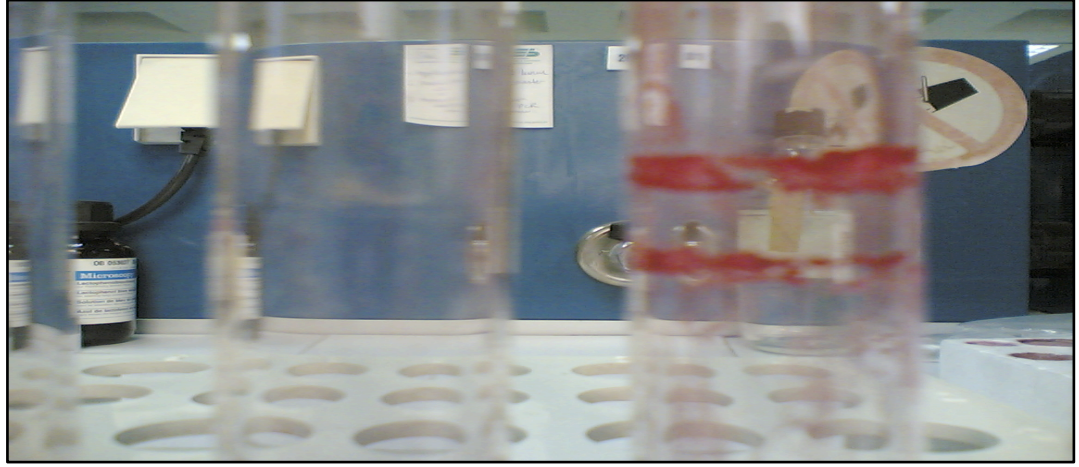
III. b. 1. Slaym faktör oluşumunu gösteren yöntemler:

Slaym faktör, mikroorganizmaların katetere adezyonu ve kolonizasyonu ile ilgili bir virülans faktörüdür. Bu faktörü gösteren yöntemler başlıca yöntemler:

III. b.1.1. Christensen Yöntemi (Tüp Adherans Testi):

Slaym faktör oluşumu için kullanıldı.

SDA' da 24 - 48 saat inkübe edilmiş *Candida* kolonilerinden bir öze dolusu alınıp % 8 glikoz eklenmiş, 10 ml' lik SDB içeren tüplere inokule edildi. Tüpler 35 °C' de 24 saat çalkalanarak inkübe edildi. Tüpler iki kez distile su ile yıkanıp % 1' lik safranin ile boyandı. Tüp duvarında kırmızı-pembe renkli yapışkan tabaka varlığı olumlu olarak kabul edildi. Tüpler makroskopik incelemeye alındı. Besiyeri ve hava kesişimindeki boya tutulması negatif olarak değerlendirildi. Her suş iki kez test edildi. Birbirinden bağımsız iki kişi tarafından yorumlandı.



Resim 2 : Tüp Adherans Testi Sonucunda Slaym Negatif (solda) ve Slaym Pozitif (sağda) Örnekler

III. b. 2 İn Vitro Biyofilm Modeli Oluşturma:

Model için 10 ml serum fizyolojik içeren 1cm² çapındaki cam laboratuvar tüplerine, 0.5 × 0.5 cm lik parçalar halinde kesilmiş, kateter/sonda parçaları kondu. Ayrı ayrı tüplerdeki örnekler üzerine 24 - 48 saat SDA' da inkübe edilmiş *C.albicans* kolonisinden 10⁶, veya kanlı agarda inkübe edilmiş *S.epidermidis* kolonisinden 10⁸/ml hücre içerecek şekilde hazırlanan mikroorganizma süspansiyonundan, 500 µl eklendi. 37°C' de çalkalanarak 24 saat inkübe edildi.

III. b. 3. RNA Eldesi

RNA eldesi için *Candida albicans* ve *Staphylococcus epidermidis* biyofilm modeli oluşmuş kateter/sonda örneklerinden biyofilm tabakası kazınarak ayrıldı. Tabakalar ependorf tüplere kondu. Biyofilmden, mantara veya bakteriye ait RNA, Heliosis Ekstraksiyon Modülü (Metis Biyoteknoloji, Türkiye) kullanılarak elde edildi. Yaklaşık 100 µl' lik biyofilm süspansiyon örneği üzerine 400 µl RNA lizis bağlama solüsyonundan eklendi ve vortekslendi. Karışım 65 °C' de 10 dakika, + 4 °C' de 2 dakika bekletildi. Spin santrifüj yapıldıktan sonra üzerine 500 µl RNA çöktürme solüsyonu eklendi ve vortekslendi. 15 dakika 13000× rpm' de santrifüj edildi. Üst kısım çökeleğe dokunmadan pipetle tamamen alındıktan sonra 500 µl RNA yıkama solüsyonu eklendi ve vortekslendi. Beş dakika 13000× rpm' de santrifüj edildi. Üst kısım pipetle tamamen alındı ve tüpler 10 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. 20 µl RNA dilüsyon solüsyonundan konuldu,

vortekslenip spin santrifüj edildi. Tüm RNA örnekleri çoğaltma işlemine kadar - 20' de bekletildi.

Tablo 7 : RT-PCR Çalışmasında Kullanılan Primerler

İsim	Primer dizi
<i>C. albicans ALS1 Forward</i>	5'-GAC TAG TGA ACC AAC AAA TAC CAG A-3'
<i>C. albicans ALS1 Reverse</i>	5'-CCA GAA GAA ACA GCA GGT GA-3'
<i>C. albicans HWP1 Forward</i>	5'-ATG ACT CCA GCT GGT TC-3'
<i>C. albicans HWP1 Reverse</i>	5'- TAG ATC AAG AAT GCA GC-3'
<i>S.epidermidis ICA Forward</i>	5'- TAG TAA TCA CAG CCA ACA TCT T-3'
<i>S.epidermidis ICA Reverse</i>	5'- AAA CAA ACT CAT CCA TCC GAA T -3'

III. b. 3.1. Ters transkripsiyon

Hem mantar hem bakteri RNA' sı daha sonra 1 dakika 95 °C' de, 1 saat 50 °C' de, 5 dakika 4 °C' de ters transkripsiyona uğratıldı. Ters transkripsiyon karışımı; 100 pmol/L *ALS*, *HWP* ve *ICA* primerleri (Metabion), ters transkriptaz(RT Enzim) (Fermentas), 5x buffer (Fermentas), 4 mmol/L deoksinükleotid trifosfat (dNTP) karışımı (Roche) içerecek şekilde, komplementer DNA (cDNA) - 20 °C' de saklandı.

III. b. 3. 2. ALS, HWP ve ICA Genlerinin Konvansiyonel PCR' ı

PCR' da kullanılan primerler Metabion tarafından sentez edilmiştir. PCR; *ALS*, *HWP* ve *ICA* için yaklaşık 10 µl cDNA kullanarak yapıldı; toplam hacim 25 olacak şekilde 0,5 ml'lik bir tübe 20 pmol oligonükleotid primerleri, herbirinden 250 µM olmak üzere dATP, dTTP, dCTP and dGTP, 3 mM MgCl₂, 2.5 U Taq DNA polimeraz ve 10X tampon (Bioron) eklendi. Amplifikasyon / çoğaltma işlemi 95 °C' de 1 dakika denatürasyonla başladı, takiben 95 °C' de 30 saniye boyunca her bir primer için önerilen yapışma sıcaklığında 45 saniye ve 72 °C' de 60 saniye olmak üzere 45 devir, ve son olarak 72 °C' de 5 dakika uygulama yapıldı (Hybaid, UK). Yapışma sıcaklığı *ALS* için 57 °C, *HWP* için 50 °C ve *ICA* için 58 °C' ydi. Ürünler, 0.5 µg/ml etidyum bromid içeren % 2 'lik (w/v) agaroz jelde yürütüldü ve UV ışık kaynağı altında görüldü.

III. b. 3. 3. ALS, HPW ve ICA' yı Kodlayan cDNA' nın Real Time Cihazında Çoğaltılması

PCR için kullanan primerler Metabion tarafından sentez edildi. *ALS*, *HWP* ve *ICA* için 10 µl cDNA kullandı. DNA LightCycler cihazı (Roche Diagnostics, Tenay, Turkey) ve LightCycler yazılımının 3.5 versionu kullanıldı. LightCycler Hybridization Probes Master Mix kit (Roche diagnostics, Tenay, Türkiye). *ALS*, *HWP* ve *ICA* genlerine özgü iki iç hibridizasyon probu kullanıldı; ilki fosforla LC Red 640 ,ikincisi ise florasana işaretli idi. Gerçek-zamanlı PCR amplifikasyon karışımı kalıp cDNA, 2xSYBR Green master karışım tamponu ve her bir primerden 200 nM içermekteydi.

ALS için yapılan PCR; 95 °C' de 1 dakika süreyle denatürasyonla başladı, 45 devir boyunca 95 °C' de 30 saniye, 20 saniye 57 °C'de ve 20 saniye 72 °C' de çoğaltıldı.

HWP için yapılan PCR; 95 °C' de 1 dakika süreyle denatürasyonla başladı, 45 devir boyunca 95 °C' de 30 saniye, 20 saniye 50 °C'de ve 20 saniye 72 °C' de çoğaltıldı.

ICA için yapılan PCR; 95 °C' de 1 dakika süreyle denatürasyonla başladı, takiben 95 °C' de 30 saniye 45 devir boyunca, 20

saniye 58 °C' de ve 20 saniye 72 °C' de denatüre edildi. Floresans her uzama basamağında toplandı.

III. b. 3. 4. Real-Time PCR'da ALS, HWP ve ICA Gen Ekspresyonunun Kantitatif Analizi:

Ölçümler Light Cycler aygıtı ve FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche) ile, toplamda hacmi 10 µl olacak şekilde 1 µl cDNA veya plasmid seyreltisi, her primerden (Proligo) 3.75 pmol kullanarak yapıldı. Real Time PCR 3 faza ayrıldı; denatürasyon, amplifikasyon, füzyon. Amplifikasyon 3 aşamada gerçekleştirildi; denatürasyon (95°C' de 15 saniye, sıcaklık değişimi 20°C/saniye), hibridizasyon (zaman ve sıcaklık primerlere bağlı, sıcaklık değişimi 20°C/saniye), uzama (72°C' de primerlere göre değişen zamanlarda, sıcaklık değişimi 20°C/saniye). Floresans kazanımı uzama basamağının sonundaki tek modda 72°C' de sona erdi. Amplifikasyon basamağı her bir kapillerde floresans maksimuma çıktığında veya maksimum 45 döngüden sonra durduruldu. 3. aşama olan füzyon 55 - 90°C arasında (sıcaklık değişimi 0,2 °C/saniye) basamaklı olarak floresans kazanımıyla gerçekleştirildi. Böylece, (rastgele konsantrasyonlarda) bir cDNA havuzunun 6 farklı dilüsyonu üç farklı kopya olarak ölçüldü. Siklus sayısı (Cp) ile versus ekspresyonunun logaritmik konsantrasyonu lineer regresyonla kalibrasyon eğrisi çizimini sağladı.

Mutlak ölçüm (Absolute quantification), örnekteki hedef ile standartların bilinen konsantrasyonunu standart eğri üzerinde karşılaştırmaktadır. Standart eğriler, 10 kat seri dilüsyonlarla (10^1 - 10^6 kopya/µl), ölçülerek (kuantifiye edilerek) oluşturuldu.

Genlerin sayısal analizi, (Absolute quantification) hedefin kopya sayısı ile oluşturulan standart eğrinin karşılaştırılması ile hesaplandı.

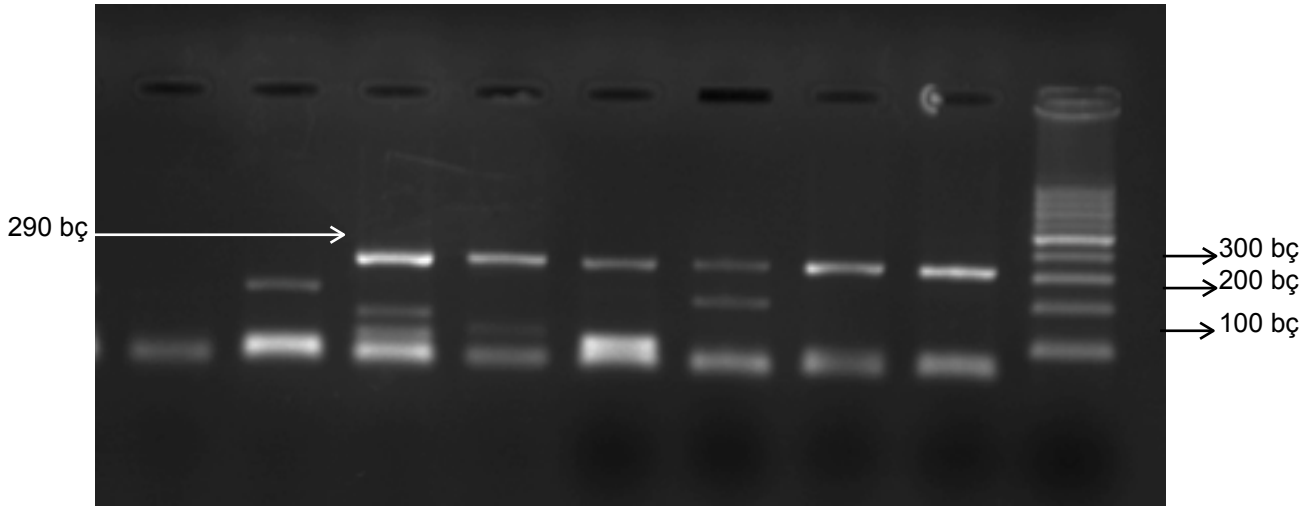
IV. BULGULAR

IV. a. Adezyon / Slaym Faktör Sonuçları:

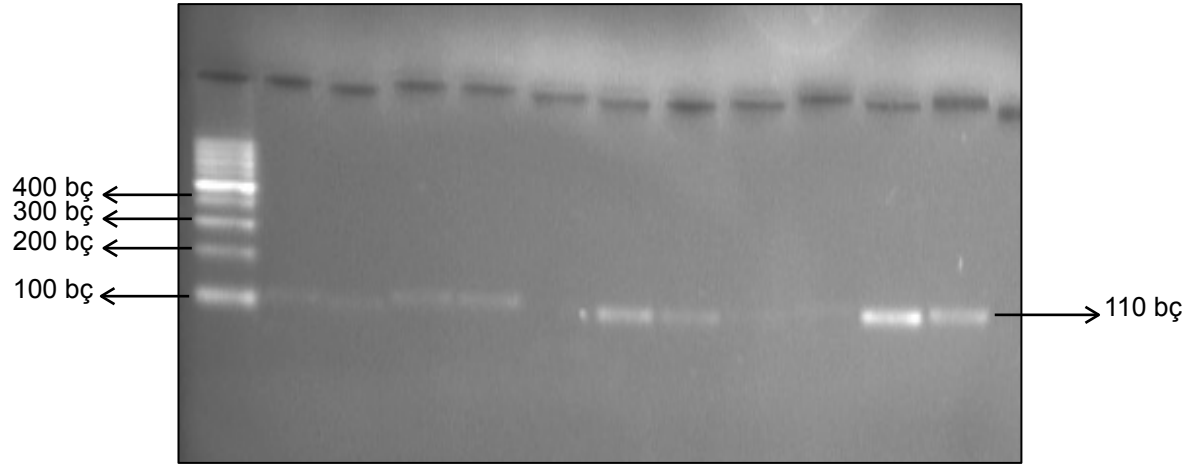
C. albicans ve *S. epidermidis* ' e ait 60 klinik izolatın, tüp adhe rans testi uygulanarak slaym faktörleri araştırıldı. Slaym faktör pozitif olan klinik örnekler çalışmaya alındı.

IV. b. Konvansiyonel PCR Sonuçları

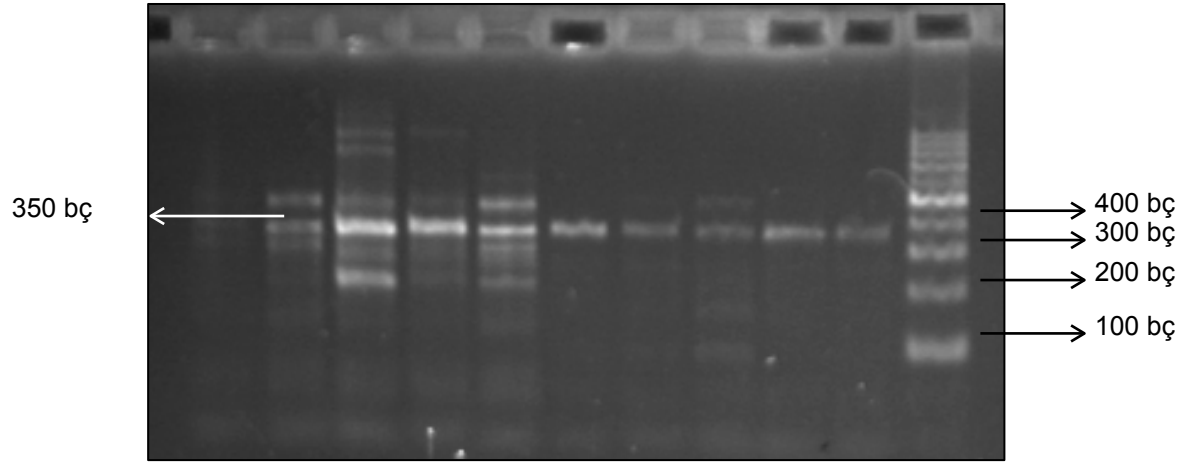
Slaym pozitif klinik izolat kullanılarak oluşturulan in vitro modelde kateter örneklerinden elde edilen biyofilm tabakasından *Candida albicans* ve *Staphylococcus epidermidis*'e ait mRNA' lar izole edildi. *ALS*, *HWP* ve *ICA* gen bölgeleri RT-PCR işlemi ile cDNA'ya çevrildi. Bu cDNA'lar PCR ile çoğaltıldı. PCR işleminden sonra elde edilen agaroz jel elektroforezi sonuçları aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 2: Kateter yüzeyinden kazınarak konvansiyonel PCR ile çoğaltılan *Candida albicans*' a ait ALS1 cDNA amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü (290 bç)

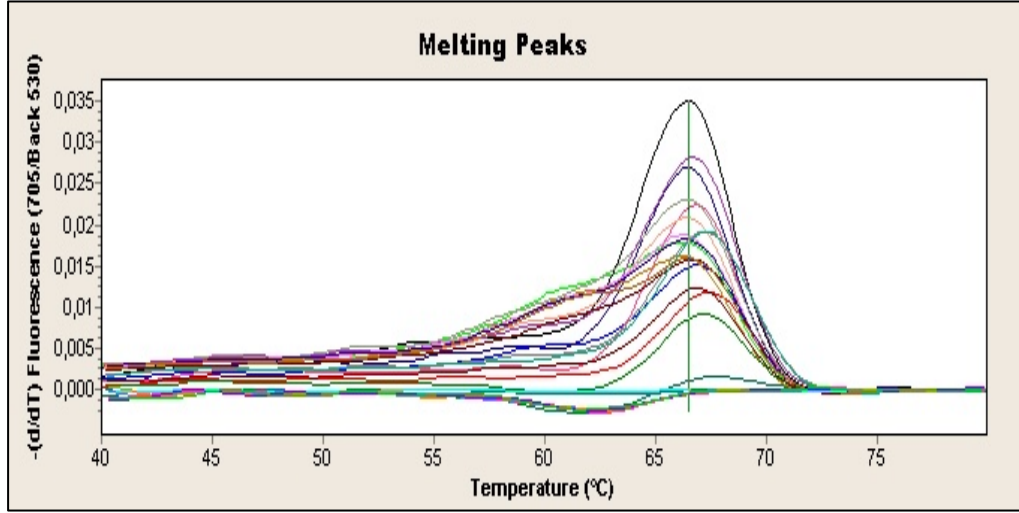


Şekil 3: Kateter yüzeyinden kazınarak konvansiyonal PCR ile çoğaltılan *Candida albicans*' a ait HWP1 cDNA amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü (110 bç)

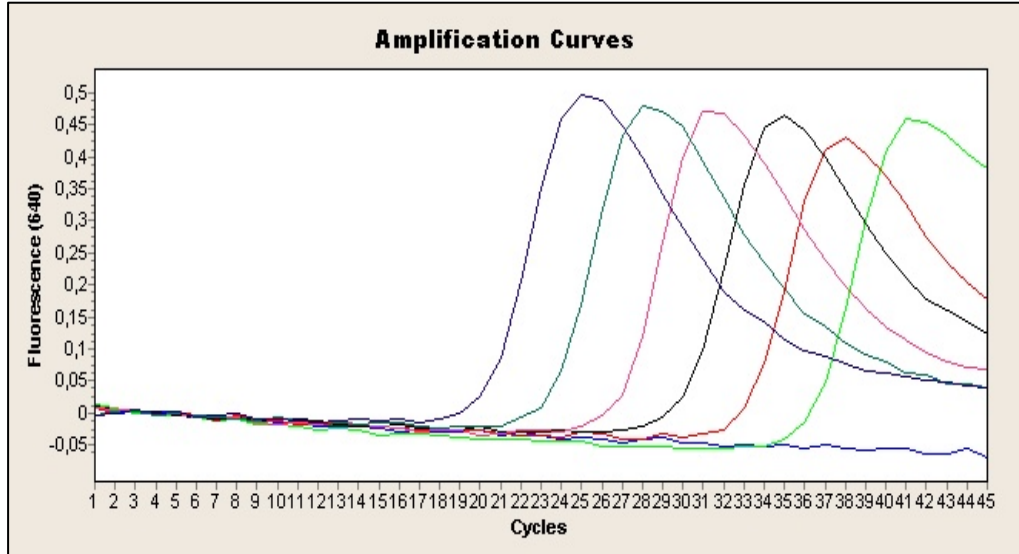


Şekil 4: Kateter yüzeyinden kazınarak konvansiyonal PCR ile çoğaltılan *Staphylococcus epidermidis*' e ait ICA cDNA amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü (350 bç)

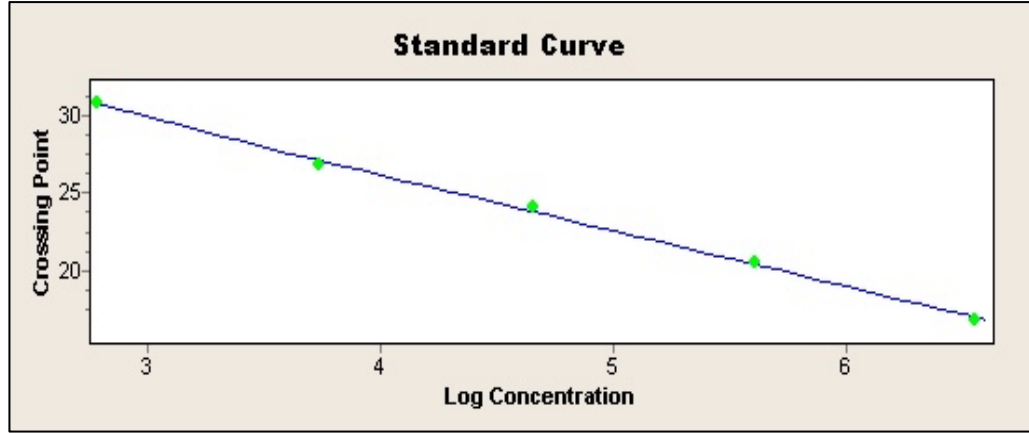
IV. c. Real Time PCR Sonuçları



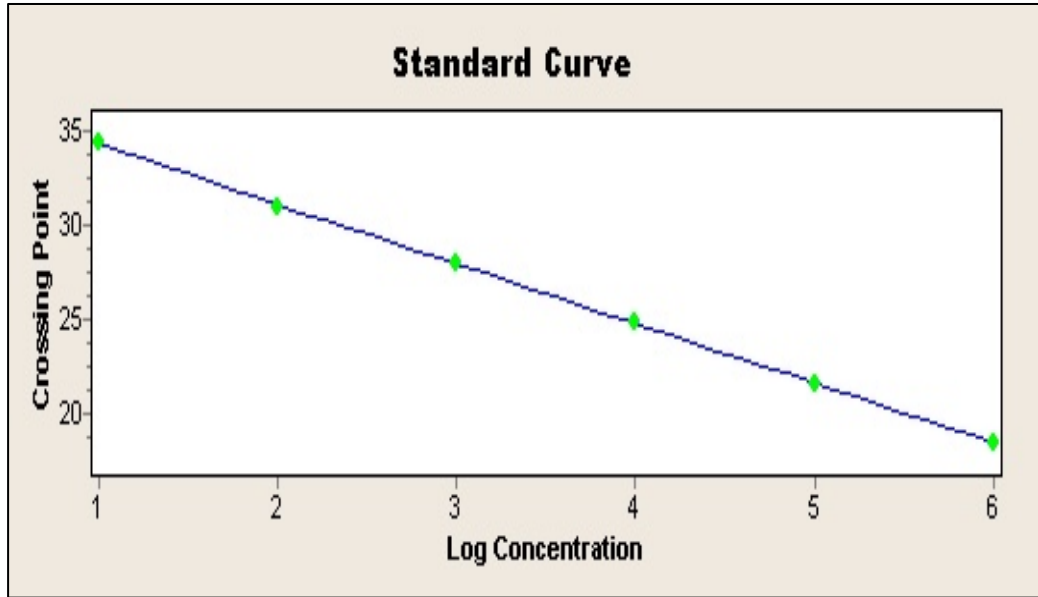
Şekil 5: Kantitatif analiz için 10^1 ile 10^6 kopya/ml arasındaki standart DNA'lardan elde edilen erime eğrilerini (melting curve) gösteren Real Time PCR ekran görüntüsü



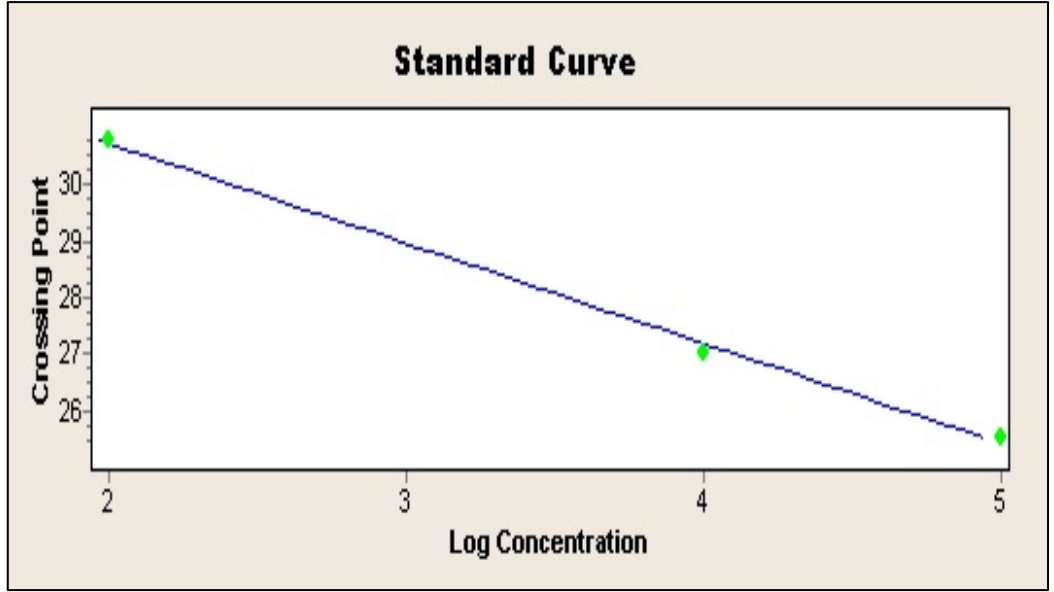
Şekil 6: Kantitatif analiz için 10^1 ile 10^6 kopya/ml arasındaki standart DNA'lardan elde edilen PCR döngüleri ile floresans düzeylerinin karşılaştırıldığı Real Time PCR ekran görüntüsü



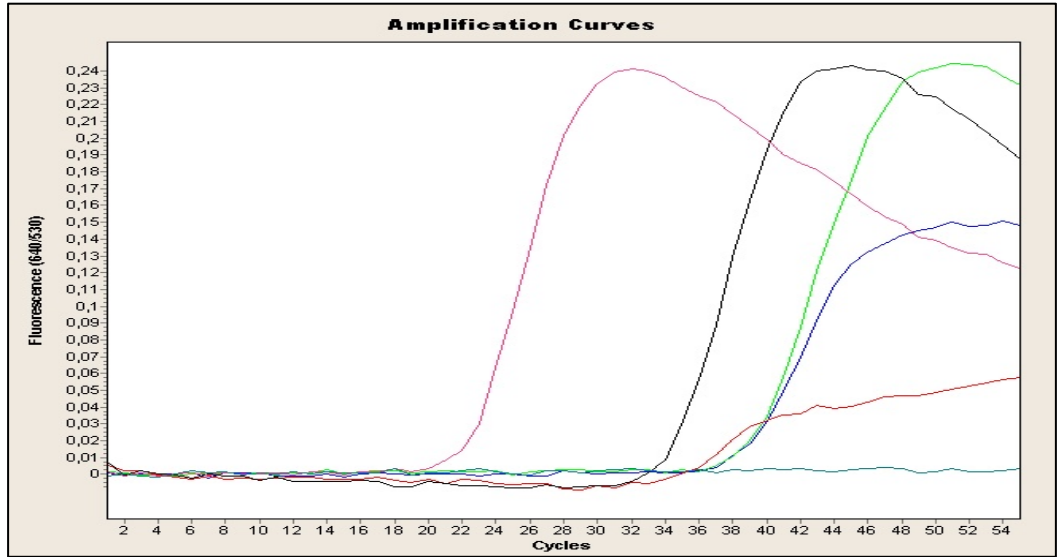
Şekil 7: *HWP*: Kantitatif analiz için 10^1 ile 10^6 kopya/ml arasındaki standart DNA'lardan elde edilen standart eğrinin Real Time PCR ekran görüntüleri



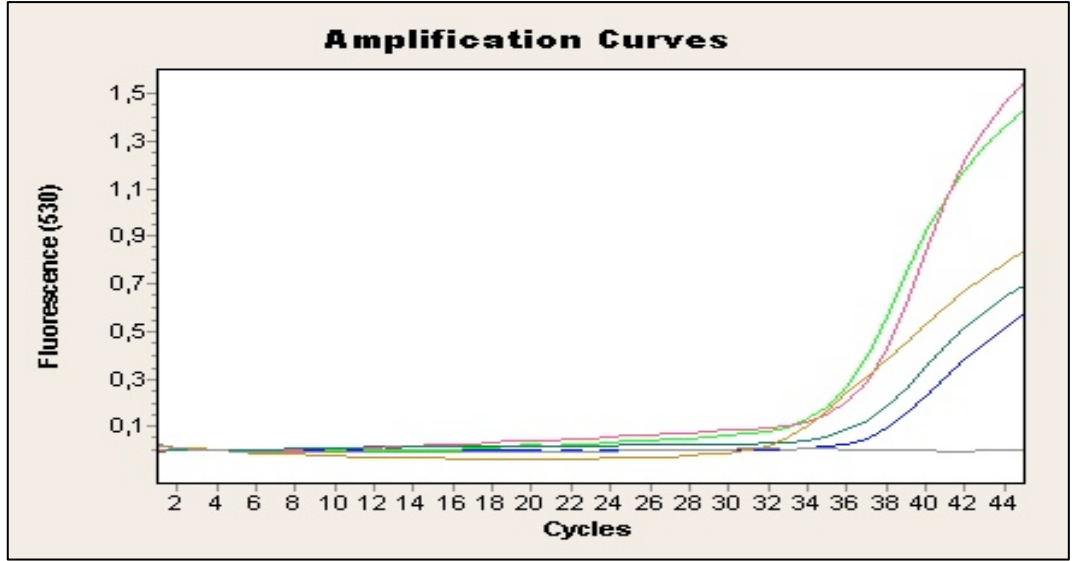
Şekil 8: *ALS*: Kantitatif analiz için 10^1 ile 10^6 kopya/ml arasındaki standart DNA'lardan elde edilen standart eğri görüntüleri



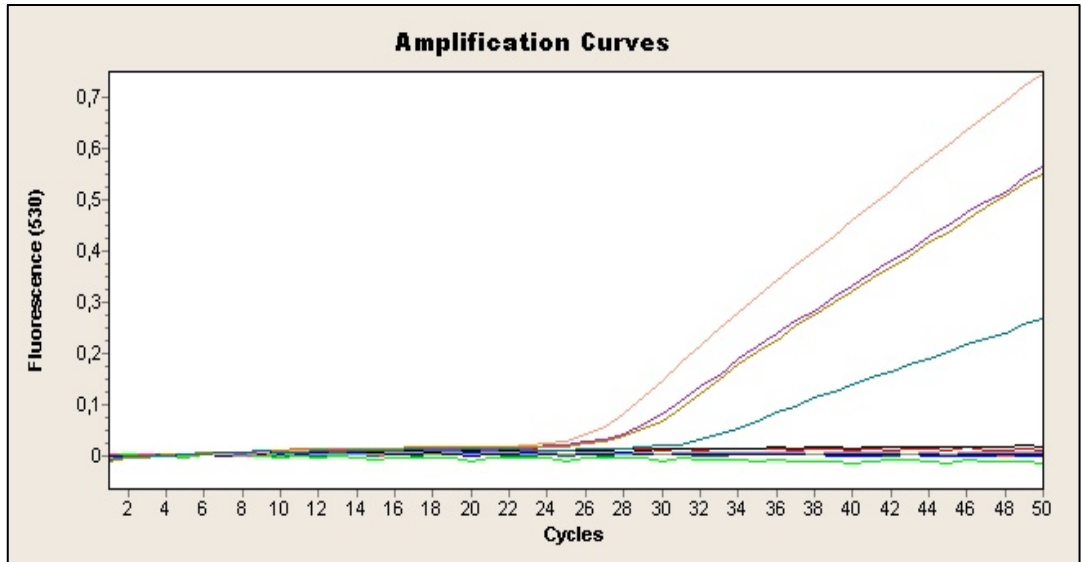
Şekil 9: ICA: Kantitatif analiz için 10^1 ile 10^6 kopya/ml arasındaki standart DNA'lardan elde edilen standart eğrinin Real Time PCR ekran görüntüleri



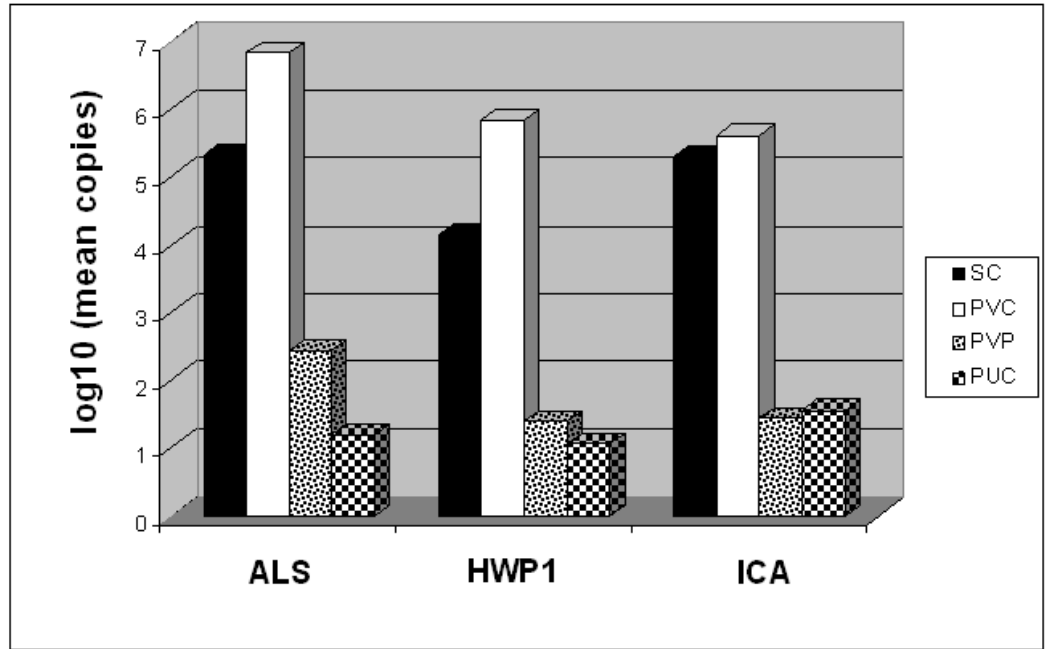
Şekil 10: ALS genine ait amplifikasyon eğrilerinin Real Time PCR' da ekran görüntüsü



Şekil 11: *HWP* genine ait amplifikasyon eğrilerinin Real Time PCR' da ekran görüntüsü



Şekil 12: *ICA* genine ait amplifikasyon eğrilerinin Real Time PCR' da ekran görüntüsü



Grafik 1: Kateter tiplerinin gen ekspresyonu açısından karşılaştırılması

Her bir kateter örneği en az 10 kez *C. albicans* ve *S. epidermidis* ile karşılaştırılarak biyofilm modeli oluşturuldu. Her kateterden elde edilen biyofilm tabakasında *ALS*, *HWP*, *ICA* gen ifadelerinin sayıları karşılaştırıldı.

Silikon kaplı idrar sondası yüzeyinde (SC) oluşan biyofilmde *ALS* ve *HWP* genlerinin kopya sayıları ortalaması sırasıyla 2.50×10^5 ve 1.30×10^4 kopya/ml, *ICA* geninin kopya sayısı ortalaması ise 1.80×10^5 olarak bulunmuştur.

Polivinil klorid kaplı trakeal tüp yüzeyinde (PVC) oluşan biyofilmde *ALS* ve *HWP* genlerinin kopya sayıları ortalaması sırasıyla 7.56×10^6 ve 6.88×10^5 kopya/ml, *ICA* geninin kopya sayısı ortalaması ise 4.20×10^5 olarak bulunmuştur.

Polivinil propilen kaplı poliüretan nazogastrik tüp yüzeyinde (PVP) oluşan biyofilmde *ALS* ve *HWP* genlerinin kopya sayıları ortalaması sırasıyla 2.70×10^2 ve 2.27×10^1 kopya/ml, *ICA* geninin kopya sayısı ortalaması ise 2.30×10^1 olarak bulunmuştur.

Poliüretan kaplı aspirasyon sondası yüzeyinde (PUC) oluşan biyofilmde *ALS* ve *HWP* genlerinin kopya sayıları ortalaması sırasıyla 1.50×10^1 ve 1.20×10^1 kopya/ml, *ICA* geninin kopya sayısı ortalaması ise 3.10×10^1 olarak bulunmuştur.

Polivinil propilen kaplı poliüretan nazogastrik tüp yüzeyinde (PVP) ve poliüretan kaplı aspirasyon sondasında (PUC) *ALS*, *HWP*, *ICA* genlerinin kopya sayısı kontrollerden istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p < 0.05$).

Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında *Candida albicans* ve *Staphylococcus epidermidis*' e ait en yüksek oranda adezyon gen ekspresyonu polivinil klorid (PVC) kaplı trakeal tüp yüzeyinde, sonrasında silikon kaplı (SC) idrar sondası yüzeyinde görülmüştür. Polivinil propilen (PVP) kaplı trakeal tüp ve poliüretan (PUC) kaplı aspirasyon sondası yüzeylerinde görülen gen ekspresyonları hücre içeren kontrollerden farklı bulunmamıştır.

İnvaziv girişimler sırasında kullanılan sentetik malzemelerin mayalar tarafından kaplandığı ve biyofilm oluştuğu gösterilmiştir. Bu oluşum, kateter enfeksiyonu gelişmesinde temel basamaktır.

Bu çalışma sırasında kantitatif Real Time PCR protokolü oluşturulmuştur. Oluşturulan bu protokol istenilen bütün hedefler için uyarlanabilir. Bu sonuçlar ışığında, vücutta kullanılan sentetik malzemelerin SC ve PVC değil, PVP veya PUC olarak seçilmeleri önerilebilir.

V. TARTIŞMA

Modern teknolojinin gelişimiyle birlikte çok sayıda kateter, yapay kalp kapakçığı ve eklem protezleri gibi tıbbi gereçlerin kullanımında artış gözlenmektedir. Bu artış, özellikle vücuda implante edilen gereçlerle ilgili enfeksiyon komplikasyonlarının oluşmasına yol açmıştır⁷²⁻⁷³.

Enfeksiyon oluşmasında temel basamak mikroorganizmaların yüzeye tutunmasıdır. Bu yüzey sentetik materyal ya da konak dokunun kendisi olabilir. Sentetik materyale mikroorganizmanın tutunması konak dokuya tutunmasından daha güçlüdür. Ayrıca kateter gibi sentetik biyomateryallere mikroorganizmanın tutunması biyofilm oluşumu ve kateter enfeksiyonu ile sonuçlanmaktadır⁷³.

Tıbbi gereçlerin implantasyonundan sonra ilk olay tükrük, mukus, serum veya kan gibi gereci çevreleyen farklı vücut sıvılarındaki çeşitli makromoleküllerin (fibrinojen, fibronektin, kollajen ve laminin vb.) yüzey üzerinde birikerek, “conditioning film = hazırlayıcı film” oluşturmalarıdır⁷⁴.

Mikroorganizmalar genellikle çıplak gerecin yüzeyine değil, bu film tabakasına tutunurlar. İlk adezyon geri dönüşümlü gevşek bir tutunma tarzındadır. Bu ekzopolimer üretimi ile sıkı bir tutunmaya dönüşebilir. Ekzopolimerler, makromoleküllerin oluşturduğu film tabakasını sararak glikokaliks (slaym) denen tabakayı oluşturur. *Staphylococlar* ve bazı *Candida* türleri slaym benzeri yapılar oluşturmaktadır⁷⁴. Mikroorganizmalar bu slaym tabakası içinde çoğalarak kalın bir film tabakasına yol açarlar. *Candida* türlerinin tıbbi gereçlere slaym faktörü aracılığı ile tutunması sonucunda hem sürekli bir enfeksiyon odağı gibi rol oynaması hem de vücudun savunma mekanizmalarından ve antifungal tedavinin etkisinden kurtulabilmesi, nozokomiyal mantar enfeksiyonları açısından önemli bir durumdur⁷⁵.

Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlarda etken tek bir bakteri veya bakteri-mantar karışımı olabilir. Son yıllarda bakteriyel biyofilmler ve enfeksiyondaki rolleri geniş olarak araştırılmışken, fungal biyofilmler hakkında çok az bilgi bulunmaktadır⁷⁶⁻⁷⁷.

Yaptığımız bu çalışmada adezyonun oluşmasından sorumlu temel yüzey proteinlerini kodlayan *C. albicans* ALS ve HWP genlerinin, *S. epidermidis* ICA geninin ekspresyonları incelenmiştir.

Kateter enfeksiyonlarında sorumlu dış etkenlerden en önemlisi deri florasından kaynaklanmaktadır. Tıbbi gereçler ile ilişkili enfeksiyonların çoğunda gram pozitif bakteriler, sıklıkla stafilokoklar, etken olduğu halde, gram negatif bakteriler ve mantarlar ile oluşan enfeksiyonlar daha ciddi seyirlidir ⁷⁸. Fungal enfeksiyonlar çoğunlukla patojenik *Candida* türleri, özellikle *Candida albicans*, *Candida tropicalis* ve *Candida parapsilosis* ile olmaktadır ⁷⁹. *Candida* türlerinin, günümüzde hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan ana etkenler arasında sıklığı artmakta ve gram-negatif bakterilerden sonra 3. veya 4. sıklıkta izole edilmektedirler ⁸⁰⁻⁸¹. Bu enfeksiyonların mortalitesi ve tedavi maliyeti yüksektir ⁸².

Sağlık personelinin ellerinde yüksek oranlarda kolonize olabilen *Candida* türleri arasında en sık *C. albicans* bunun ardından da *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* izole edilmektedir.

Barbut ve ark. kateter enfeksiyonların %84'ünde gram pozitif ve %16'sında gram negatif bakterileri izole etmişlerdir⁸³.

Blot ve ark. (18) kateter ilişkili enfeksiyonlarda ve kateter kolonizasyonunda en sık izole edilen etkenin *S. aureus*, koagülaz negatif stafilokoklar ve *P. aeruginosa* olduğunu saptamışlardır⁸⁴.

Bazı çalışmalarda en sık etken olarak *S.epidermidis* bazılarında ise genel olarak koagülaz negatif stafilokoklar izole edilmiştir⁸⁵.

Geçtiğimiz on yıl içerisinde hızla öne çıkmış olan ve immunsupressif hastalarda görülen, çoğunluğu ölümlü sonuçlanan fırsatçı mantarların sebep olduğu enfeksiyonlara ek olarak immunsupressif olmayan kişilerde de yaşamı tehdit eden fırsatçı mikozlardan söz edilmeye başlandığı dikkati çekmektedir⁸⁶.

Santral venöz kateterleri olan hastalarda en önemli ve en sık gözlenen kateter ile ilişkili komplikasyon enfeksiyondur⁸⁷.

Kateterin yapıldığı maddeden farklı olarak türü açısından da birçok araştırma yapılmış ve türlere göre farklılıklar gözlenmiştir⁸⁷.

Hickman tipi kateter ile, geçici subklaviyan kateteri karşılaştıran çalışmalarda, Hickman tipi kateterlerde, kateter enfeksiyonu oranları daha düşük bulunmuştur ⁸⁷.

Albo Lopez ve ark.⁸⁸'nin çalışmasında 171 kateterden 36'sı (%21), Broadwater ve ark.⁸⁹'nin çalışmasında geçici perkutan SVK'lerin % 8'i, Hughes ve ark.⁹⁰'nin çalışmasında Hickman tipi kateterlerin % 8.5'u kateter enfeksiyonu nedeniyle çıkarılmıştır.

Newman ve ark.⁹¹ Hickman tipi kateteri olan hastaları ortalama 195 gün takip etmişler, %57'sinde bakteriyemi, %23'ünde giriş yeri enfeksiyonu ve %7'sinde tünel enfeksiyonu saptamışlardır.

Mullan ve ark.⁹² kateteri olan hastalarda gözlenen en sık komplikasyonun (%72) kateter enfeksiyonu olduğunu bildirilmişlerdir.

Bir çok çalışmada kateter ile ilişkili en sık görülen geç komplikasyonun kateter enfeksiyonu olduğu ve sıklığının % 15 - 85 arasında değiştiği bildirilmektedir⁹³.

Kısa süreli, kafsız, tünelsiz, tek ya da birden fazla lümenli, juguler yada subklaviyan venden yerleştirilen SVK'lerde kateter enfeksiyonu gelişme oranı, uzun süreli, kafli, tünelli kateterlerden daha yüksektir ⁹³.

Blot ve ark.⁸⁴'nin serisinde 438 hastaya 817 kateter uygulanmış ve ortalama 14 ay takip edilmiş ve 93 (% 11.4) kateter, enfeksiyon şüphesi nedeniyle çıkarılmıştır. Bu kateterlerin 24 (%26)'ü kateter ile ilişkili sepsis şüphesi nedeniyle çıkarılmış ve 20'sinde de kateter ucu kültüründe anlamlı üreme ($>10^3$ cfu/ml) olmuştur. Bu hastaların %75 (18/24)'inde bakteriyemi saptanmıştır⁸⁴.

Kateter türünden farklı olarak, kateterin yapıldığı maddenin de biyofilm oluşturmada önemli rolü bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar ve bizim çalışmamız da bunu desteklemektedir. Çalışmamızın sonuçlarında da görüldüğü gibi, mikroorganizmaların farklı yapıdaki kateter yüzeylerine adezyonu birbirinden farklı olabilmektedir.

Kateter enfeksiyonları ile ilgili yapılan birçok çalışmalarda ise yüzeyin kimyasal yapısının biyofilm oluşum hızını etkilemekte olduğu kanısına varılmış; PVC'ye kıyasla lateks yüzeylerde daha fazla, poliüretan ve %100 silikonda ise azalmış olarak saptanmıştır⁹⁴.

Selüloz filtrelerde oluşan *Candida* biyofilm yapısı kateter disklerinden farklıdır. Bu da yüzey temasıyla indüklenen gen ekspresyonunu akla getirmektedir. Yüzeyin hidrofobisitesi de biyofilm oluşumunu pozitif etkilemektedir⁹⁵.

Silikon elastomer veya PVC disklerinin hidrofobik yüzeylerinde bifazik yapıda hücrelerin olduğu; bazal tabakada maya hücrelerinin bulunduğu; ESM içerisinde ise hifal elementlerin sıralandığı; buna rağmen düzensiz veya pürüzlü 'polymethylmethacrylate' yüzeylerde olgun biyofilmin sadece maya hücreleri ve ESM'den oluştuğu gözlenmiştir. Ortamdaki artmış glukoz miktarı da biyofilm oluşumunu hızlandırır⁹⁶.

Yaptığımız çalışmada, in vitro biyofilm modelinde adezyon genlerinin lateks silikon kaplı (SC), polivinil klorid (PVC), poli (vinilpyrrolidon) (PVP)-kaplı poliüreten ve poliüretan kateter (PUC) deki dağılımları incelenmiştir. Bu dağılımın, mikroorganizmanın adezif proteinleri ve adezyon genlerinin ekspresyonu ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Birçok çalışmada, bizim çalışmamızla uyumlu olarak, planktonik hücrelerle biyofilm arasında gen ekspresyonlarında farklılık görülmüştür⁹⁶.

Çalışmamızda, adezyondan sorumlu glikoproteinleri kodlayan *C. albicans'* a ait *ALS*, *HWP* ve *S. epidermidis'* e ait *ICA* genlerinin ekspresyonunu incelenerek, bu genlerin kullanılan materyale tutunmada etkisinin olabileceği ve bu tutunmanın da, biyofilm oluşumuyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Yaptığımız çalışmada, biyomateryalden kazınan biyofilm hücrelerinde gen ekspresyon seviyelerinin farklı olduğu bulunmuştur. PVC kaplı yüzeyden alınan biyofilimde *ALS1*, *HWP1* ve *ICA* genlerinin yüksek seviyede ekspresyonları gözlenmiştir. SC' de ise adezyon genlerinin az miktarda ekspre oldukları görülmüştür.

PVP ve PUC yüzeylerde adezyon genlerinin kopya sayısı ile planktonik hücreler arasında belirgin fark bulunamamıştır. SC, PVC, PVP, PUC yüzeyleri arasında ise, biyofilm oluşturan genler açısından anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Tıpta kullanılan silikon kauçuk ya da diğer adıyla silastik; kolaylıkla modifiye edilebilen ve de insan ve hayvanlarda uzun dönem kullanılan yumuşak bir biyomateryaldir. PVC kaplı biyometaryel ise sıklıkla kullanılan diğer bir biyomateryal olup, biyofilm oluşumuna uygun olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda bu iki materyalin biyofilm oluşumu ile ilişkisi incelenmiştir.

Poliüreten ve polivinilprolidon kaplı kateter yüzeyler ise nem çekici özellikte olup PVP kaplı materyal vücut sıvılarına karşı hidrofilik özellik göstermektedir⁹⁷. PVP ve PUC kaplı kateterlerde biyofilm oluşumu gözlenmemesi nedeniyle, bu kateterlerin insan vücuduna biyofilm oluşturmamaya daha uyumlu olduğu kanısına varılmıştır. PVC ve silikonize latekse (SC) bakteriyel adezyonun, PVP ve PUC yüzeylere göre daha yüksek oranda olduğu bilinmektedir. Poliüreten, diğer materyallerle karşılaştırıldığında, en az adezyon görülen biyomateryaldir⁹⁸.

Bizim yaptığımız çalışmadaki Real Time PCR' da *ALS* ve *HWP* gen ekspresyon sonuçları sırasıyla, silikon kaplı idrar sondası (SC) yüzeyinde 2.50×10^5 ve 1.30×10^4 kopya/ml, polivinil klorid kaplı trakeal tüp yüzeyinde (PVC) 7.56×10^6 ve 6.88×10^5 kopya/ml, polivinil propilen kaplı poliüreten nazogastrik tüp yüzeyinde (PVP) 2.70×10^2 ve 2.27×10^1 kopya/ml, poliüreten kaplı aspirasyon sondasında (PUC) 1.50×10^1 ve 1.20×10^1 kopya/ml olarak bulunmuştur.

Real Time PCR' da *ICA* geni ekspresyonu sırasıyla, silikon kaplı idrar sondası (SC) yüzeyinde 1.80×10^5 kopya/ml, polivinil klorid kaplı trakeal tüp (PVC) yüzeyinde 4.20×10^5 kopya/ml, polivinil propilen kaplı poliüreten nazogastrik tüp (PVP) yüzeyinde 2.30×10^1 kopya/ml, poliüreten kaplı aspirasyon sondasında (PUC) ise 3.10×10^1 kopya/ml bulunmuştur.

Bu sonuçlara bakarak, her iki mikroorganizmaya ait en yüksek oranda adezyon gen ekspresyonunun, polivinil klorid (PVC) kaplı trakeal tüp yüzeyinde bunu takiben ise silikon kaplı (SC) kaplı idrar sondası yüzeyinde olduğu görülmüştür. Polivinil klorid (PVP) kaplı trakeal tüp yüzeyinde ve poliüreten kaplı (PUC) aspirasyon sondasında görülen gen ekspresyonlarının, planktonik hücrelerde olduğundan, farklı olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$).

Koagülaz negatif stafilokoklar fibronektine bağlanmaktadır. Fibrine ise bağlanmazlar. Biyofilmin mikrobiyal tabakasındaki fibroz glikokaliks madde ya da ekstrasellüler slaym önemli bir mikrobiyal faktördür. Koagülaz negatif stafilokoklar gibi slaym üreten organizmalar, bu glikokaliks materyal sayesinde yapışma yeteneklerini arttırırlar⁹⁹.

Kateter enfeksiyonun oluşumunda adezyon dışındaki virülans faktörlerinin de rolü bulunmaktadır. Adezyon oluşumundaki virülans faktörlerinden en önemlisi enzim üretimidir¹⁰⁰.

S. aureus ve *C. albicans* koagülaz üretmektedir. Bu özellik, biyofilmde bulunan fibrin ve fibronektine sıkıca yapışmayı sağlar¹⁰¹. Fungeminin en yaygın etkeni *C. albicans*; *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata* gibi türlerin slaym üretimleri de virülansda etkili olmaktadır. Ancak proteolitik enzimler, fosfolipaz üretimi, dimorfizm gibi diğer virülans faktörlerinden daha az öneme sahiptir. Bu yorum, slaym faktörünün virulansa etkisinin, diğer etmenlerde olduğu gibi tüm vücut bölgeleri için genel anlamda geçerli olmayıp, yalnızca kateter gibi yabancı bir cisme bağlı enfeksiyonlarda, sınırlı bir çerçevede kalmasından kaynaklanmaktadır¹⁰².

Catalanotti ve ark.'nın bilateral bakteriyel konjunktiviti olan ve yumuşak kontakt lens kullanan 97 hastanın konjunktival sürüntü örneklerinin % 67.41' i slaym pozitif *S. epidermidis*, % 74.1'i ve %61.1'inin slaym pozitif *S. aureus* olduğu ICA A ve ICA D genlerine sahip oldukları, ayrıca slaym üreten *S. epidermidis* ve *S. aureus* suşlarının yüzey hidrofobisitelerinin, slaym üretmeyenlere göre daha fazla olduğu gösterilmiştir¹⁰³.

Biyofilm oluşumu *Candida albicans* için sadece ALS ve HWP genlerinden ibaret olmayıp yapılan çalışmalar doğrultusunda birçok genin de etkili olduğu sonucuna varılmıştır¹⁰⁴.

Biyofilm oluşumunda rol oynayan faktörlerden biri de *Candida* morfogenezidir. Bir çalışmada, morfogenetik sinyal yolunda rol alan *EFG1P* ve *CPH1P* transkripsiyon faktörlerini içermeyen ve filamentöz forma geçişte defekti olan *C. albicans* mutantlarının kateterlerde daha zayıf kolonize oldukları gösterilmiştir¹⁰⁵.

Aynı şekilde, *EFG1* geni eksik olan, filamentasyon özellikleri mutant suşların, plastik yüzeylerde sadece tek katlı gevşek bir maya hücresi tabakası oluşturduğu gösterilmiştir¹⁰⁶. Bu sonuçlar, biyofilm oluşumunda *EFG1P* sinyal yolunun önemini göstermektedir.

Biyofilm oluşumunda morfogenezin rolünü inceleyen başka bir çalışmada, wild-type (sokak suşu) mutantının iki katmanlı biyofilm, hif-negatif mutantın sadece bir bazal tabaka, maya-negatif mutantın kateter diskinden kolayca ayrılabilen sadece dış katmanı oluşturduğu gözlenmiştir¹⁰⁷.

Bu sonuçlar, biyofilm oluşumunda ve yapılanmasında dimorfizmin gerekli olabileceğini ve *C. albicans*'ın patojenik potansiyelinde önemli bir faktör olduğunu göstermektedir¹⁰⁷.

Diğer birçok cerrahi alanında sorun olan biyofilmler ortopedide de karşı konulamaz bir problem haline gelmiştir. Örneğin, Arciola ve ark yaptıkları bir çalışmanın sonucunda, klinik izolatlardan elde ettikleri *S.epidermidis* türünün virülansında *ICA* geninin önemli rol oynadığını, yüksek oranda slaym ürettiğini ve *ICA A* ve *ICA D* genlerinin ekspresyonu nun ortopedik implant ile ilişkili enfeksiyonların patogenezinde önemini ortaya çıkarmışlardır¹⁰⁸.

Başka iki çalışmada ise Baillie ve ark ile Chandra ve ark. *C. albicans*' ı diğer planktonik hücreler ile kıyaslamışlar ve *C. albicans* biyofilmindeki hücrelerin glukoz miktarının fazla olmasını, biyofilm oluşumu sırasında karbonhidrat sentezinde rol alan enzimleri kodlayan genlerin regülasyonuna bağlamışlardır. Ayrıca *C. albicans*' ın konak yüzeyine adezyonunda görevli proteinleri kodlayan, bizim de çalışmamızın hedefini oluşturan, *ALS* ailesine ait genlerin ekspresyon profilleri de araştırılmıştır. Bu çalışmalarda, yine planktonik hücreler ile karşılaştırıldığında biyofilmdaki *ALS* gen ekspresyonunun farklı olduğu gözlenmiştir¹⁰⁹⁻¹¹⁰.

Cheng ve ark. jinekoloji kliniği ile yaptıkları başka bir çalışmada ise RT-PCR ile *ALS* geni izolasyonu yapmışlar ve kullandıkları vajinal sürüntü örneklerinde yüksek oranda *ALS1*, *ALS2*, *ALS3* ve *ALS9* ekspresyonunu gözlemlemişlerdir. *ALS4* ve *ALS5* daha az olmakla birlikte, nadir olarak ise *ALS6* ve *ALS7* tespit edilmiştir¹¹¹.

Garcia ve ark. yaptıkları bazı çalışmalarda biyofilmdeki mikroorganizmaların anlamlı olarak fenotipik ve genotipik değişimler gösterdiğini saptanmışlardır. Mikroorganizmanın biyomateryaller ile ilişkisi sonrası adezyon gen ekspresyonundaki artış, planktonik hücrelerinkinden farklıdır¹¹².

Biyofilmdeki hücre yoğunluğu planktonik kültürdekine göre daha yüksektir. Bu sebeple biyofilm hücrelerinin gen ekspresyonlarının diğer serbest hücrelerden farklı olması şaşırtıcı değildir. Birçok tıbbi gereçde oluşan biyofilm değişik kültür tekniği, SEM, mikrobiyal çeşitliliğin tanımlanması gibi yöntemler ile, yaklaşık 20 yıldır çalışılmaktadır. In vitro olarak çeşitli biyofilm modelleri geliştirilmiştir¹¹³. Moleküler yöntemler kullanılarak, özellikle kantitatif Real Time PCR ile biyofilmdeki gen ekspresyon seviyeleri belirlenmektedir¹¹⁴.

Yaptığımız çalışmada bazı eksiklikler de bulunmaktadır. Çalışma sadece in vitro koşullar ile sınırlı bir çalışma olduğu için, ilk olarak in vivo çalışmalar ile desteklenmelidir. İkinci olarak, *C. albicans* ve *S. epidermidis* de sadece üç adezyon geni incelendiğinden diğer adezyondan sorumlu genlerin de incelenmesi ile çalışma detaylandırılabilir. Üçüncü olarak ise, oluşturduğumuz biyofilmin ağırlığının ölçülmesi çalışmamızı zenginleştirebilir. Yine de, sonuçlarımız biyomateryal araştırmalarında yeni bir çalışma alanı oluşturması açısından önemlidir.

Kateter üzerinde biyofilm oluşumunu engellemek için kullanılan stratejiler; antimikrobiyal merhem ve kayganlaştırıcı içeren kateterler, mesane yıkanması, toplama çantalarına antimikrobiyal ajanlar eklenmesi, antimikrobiyal ajan (gümüş oksit) emdirilmiş kateterler kullanılması, kateterize edilen hastalarda koruma/profilaksi için sistemik antibiyotiklerin kullanılması gibi yaklaşımlardır.

Bu çalışma sonucunda, yukarıda listelenen stratejilere ek olarak kateterin yapıldığı malzemenin de biyofilm ve kateter enfeksiyonu gelişmesinde önemli olduğu gösterilmiştir. Buna göre kateter enfeksiyonu gelişmesini engelleyecek bir başka strateji, kateterin yapıldığı malzemelerin SC veya PVC değil, PVP ve PUC olarak seçilmesidir.

VI. SONUÇ

Çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında *Candida albicans* ve *Staphylococcus epidermidis*' e ait en yüksek oranda adezyon gen ekspresyonu polivinil klorid (PVC) kaplı trakeal tüp yüzeyinde, sonrasında silikon kaplı (SC) idrar sondası yüzeyinde görülmüştür. Polivinil propilen (PVP) kaplı trakeal tüp ve poliüretan (PUC) kaplı aspirasyon sondası yüzeylerinde görülen gen ekspresyonları hücre içeren kontrollerden farklı bulunmamıştır.

VII. ÖZET

***Candida albicans* 'a ait ALS, HWP ve Staphylococcus epidermidis 'e ait ICA genlerinin farklı biyomateryallerdeki ekspresyonlarının Real Time PCR ile kantitatif analizi.**

Çalışmamızda lateks-slikon, polivinil klorid, polivinilprolidon kaplı poliüretan ve poliüretan kateter yüzeyinde oluşturulan in vitro biyofilm modelinde adezyon genlerinin ekspresyonları karşılaştırılmıştır. Karşılaştırılan adezyon genleri sırasıyla *Candida albicans* 'a ait ALS1 ve HWP1, *Staphylococcus epidermidis* 'e ait ICA 'dır. Oluşan biyofilm kütlesi kateter yüzeyinden kazınmış ve mRNA 'ları izole edilmiştir. Bu mRNA 'lar cDNA 'ya çevrilmiş ve real time PCR 'da kantitatif analizleri yapılmıştır. Çalışmamızın sonunda slikonize materyalden yapılmış kateter üzerindeki ALS1 ve HWP1 genlerinin kopya sayısı sırasıyla $2,50 \times 10^5$ kopya/ml ve $1,30 \times 10^4$ kopya/ml, ICA geninin ise $1,80 \times 10^5$ kopya/ml olduğu bulunmuştur. Adezyon genleri polivinil klorid kateterde slikonize olanlardan daha çok eksprese edilmiş olarak bulunmuştur. Polivinil klorid kateter üzerindeki ALS1 ve HWP1 genlerinin kopya sayısı sırasıyla $7,56 \times 10^6$ kopya/ml ve $6,68 \times 10^5$ kopya/ml olarak, ICA geninin ise $4,20 \times 10^5$ kopya/ml olarak bulunmuştur. Minimum gen ekspresyonu polivinilprolidon kaplı poliüretan ve poliüretan kateterlerde de saptanmıştır. Biyofilm ilişkili genler PVP ve PUC yüzeyinde veya planktonik hücrelerde farklı bulunmamıştır.

Bu çalışmada, adezyonla ilişkili genlerin ekspresyonunun materyalin yapısından etkilendiği bulunmuştur. Bu klinik kullanımda, bir materyalin diğerine tercih edilmesiyle sonuçlanabilir.

VIII. SUMMARY

The Quantitation and Comparison of gene expression levels in different biomaterials for *ALS1* and *HWP1* in *Candida albicans*, for *ICA* in *Staphylococcus epidermidis* in Real Time PCR.

This study describes a comparison of latex-silicone coated, polyvinyl chloride, polyvinylpyrrolidone coated polyurethane and polyurethane catheters for the delivery of adhesion genes in an in vitro biofilm model. *ALS1*, *HWP1* genes of *Candida albicans* and *ICA* gene for *Staphylococcus epidermidis* were targeted for the comparison of four different biomaterials. Biofilm mass was separated from the surface of the catheter and mRNA of the strains were isolated. Isolated mRNA was transcribed into cDNA and quantified in a real time PCR assay. As a result of our study, *ALS1* and *HWP1* gene copy numbers were found to be 2.50×10^5 and 1.30×10^4 copy/ml, respectively and *ICA* gene copy number was found to be 1.80×10^5 copy/ml on the biofilm of the catheter made from siliconized material. Adhesion genes were found as expressed in higher levels on the polyvinyl chloride catheter than those in siliconized ones. *ALS1* and *HWP1* gene copy numbers were found to be 7.56×10^6 and 6.88×10^5 copy/ml, respectively and *ICA* gene copy number was found to be 4.20×10^5 copy/ml on the polyvinyl chloride catheter. Minimum gene expression levels were detected in polyvinylpyrrolidone coated polyurethane and polyurethane catheters. Biofilm related genes were not expressed differently between planktonic cells or on the surfaces of those catheters.

In this study, the expression of the adhesion related genes were found to be affected from the structure of the materials. It may result in the preferation of one material from other in the clinical use.

IX. KAYNAKLAR

1-Donlan, R.M., Costerton, J.W: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol Rev 2002; 15: 167-93.

2-Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ N: *Candida* türlerinde 'slime' üretiminin incelenmesi. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi, 4-6 Mayıs 1999, Tutanaklar Kitabı, s: 179 İzmir (1999).

3-Gümüşderelioğlu M: Mikrobiyal Biyofilmler ve İnsan Sağlığı Açısından Önemleri. 31.Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 14-23 Eylül 2004, Tutanaklar Kitabı, s: 206 Aydın (2004).

4-Costerton, J.W: Introduction to biofilm. Int J Antimic Agents. 1999, 11: 217-221.

5-Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber ,D.R: Microbial Biofilms. Annu Rev Microbiol, 1995, 49: 711-45.

6-Costerton, J.W., Steward, P.S., Greenberg E.P: Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. Science,1999, 284: 1318-22.

7-Lewis K: Riddle of biofilm resistance. Antimicrobial Agents Chemother, 2001; 45: 999-1007.

8-Zhang, L.H: Quorum queching and proactive host defense . Trends Plant Sci, 2003, 238-44.

9-Donlan, R.M., Costerton, J.W: Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev, 2002, 15: 167-93.

10-Allison, D.G., Ruiz, B., Sanjose, C., Jaspe, A., Gilbert, P: Extracellular products ad mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. FEMS Microbiol Lett, 1998, 167: 179-84.

11-Stickler, D.J., Morris, N.S: Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum sensing signal molecules in situ and in vitro., 1998, 64: 3486-90.

12-Dong, Y.H., Zhang, L.H: Quorum sensing and quorum quenching enzymes. J. Microbiol Spec No, 2005, 43: 101-9.

13-Patti, J.M., Allen, B.L, Mc Gavin, M.J., Hook M: Mediated adherence of microorganisms to host tissues. Annu Rev Microbiol, 1994, 48: 585-617.

14-Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., Greenberg, E.P: Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Nature, 2001, 413: 860-64.

15-Wolz, C., Goerke, C., Landmann, R., Zimmerli, W: Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related. Infect Immun, 2002, 70: 2758-62.

16-O' Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R: Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol, 2000, 54: 49-79.

17-Jefferson, K.K., Pier, D.B., Goldmann, D.A., Pier, G.B: The teicoplanin-associated locus regulator (*TCAR*) and the intercellular adhesin locus regulator (*ICAR*) are transcriptional inhibitors of the *ICA* locus in *Staphylococcus aureus*. Bacteriol, 2004, 186: 2449-56.

18-Baillie, G.S., Douglas, L.J: Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. J. Med. Microbiol 1999, 48: 671-9.

19-Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A: Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture and drug resistance. J .Bacteriol 2001, 183: 5385-94.

20-Baillie, G.S., Douglas, L.J: Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. J Antimicrob Chemother 2000, 46: 397-403.

21-Kuhn, D.M., Chandra, J., Mukherjee, P.K., Ghannoum, M.A: Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. Infect Immun 2002, 70: 878-88.

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

23-Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A: Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. J. Bacteriol 2001, 183: 5385-94.

24-Jabra-Rizk, M.A., Falkler, W.A., Meiller, T.F: Fungal biofilms and drug resistance. Emerg Infect Dis 2004, 10: 14-9.

25-Dong, Y.H., Zhang, L.H: Quorum Sensing and Quorum Quencing Enzymes. J Microbiol 2005, 43: 101-9.

26-Green, C.B., Cheng, G., Chandra J, et al: RT-PCR detection of *Candida albicans* ALS gene expression in the reconstituted human epithelium (RHE) model of oral candidiasis and in model biofilms. Microbiol 2004, 150: 267-275.

27-Green, C.B., Zhao, X., Yeater, K.M., Hoyer, L.L: Construction and real-time RT-PCR validation of *Candida albicans* PALS-GFP reporter strains and their use in flow cytometry analysis of ALS gene expression in budding and filamenting cells. Microbiol 2005, 151: 1051-1060.

28-Sundstrom, P: Adhesion in *Candida* spp. Cell Microbiol 2002; 4: 461-469.

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

30-Staab, J.F., Ferrer, C.A., Sundstrom, P: Developmental expression of a tandemly repeated, proline and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces of *Candida albicans*. J. Biol. Chem. 1996, 271: 6298-6305.

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

32-Tsuchimori, N., Sharkey, L.L., Fonzi, W.A., French, S.W., Edwards, J.E Jr., Filler, S.G: Reduced virulence of *HWP1*-deficient mutants of *Candida albicans* and their interactions with host cells. Infect Immun 2000, 68: 1997-2002.

33-Albo, Lopez C., Rodriguez, D., Constenla, M.I., Jimenez Blanco A., Araujo, L.F, Garcia-Medina: J. Infectious and non-infectious complications of tunneled central catheters in hematologic patients. Sangre 1999, 44(3): 176-181.

34-Blot, F., Nitenberg, G., Chachaty, E et al: Diagnosis of catheter-related bacteraemia: a prospective comparison of the time to positivity of hub - blood versus peripheral - blood cultures. Lancet 1999, 354: 1071-1077.

35-Rupp, M.E., Fey, P.D., Heilmann. C., Gotz, F: Characterization of the importance of *Staphylococcus epidermidis* autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular-catheter associated infection in a rat model. J Infect Dis 2001, 183: 1038–1042.

36-Francois, P., Tu Quoc, P.H., Bisognano, C., Kelley, W.L., Lew D.P et al: Lack of biofilm contribution to bacterial colonisation in an experimental model of foreign body infection by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 35: 135-140.

37-Chen, X., Schauder, S: Structural Ident. of a Quorum Sensing Signal Containing Boron. *Natura* 2002, 415: 545-9.

38-Pearson, J.P., Gray, M.K., Passador, L., Tucker, D.K, Eberhard, A., Iglewski, H.B: Structure of the Autoinducer Required for Expression of *Pseudomonas* Virulence Genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 197-201.

39-Chen, X., Schauder, S: Structural Ident. of a Quorum Sensing Signal Containing Boron. *Natura* 2002, 415: 545-9.

40-Whang, H.L., Weng, X.L., Dong, H.Y: Specifity and Enzyme Kinetics of the Quorum –Quencing N-Acyl Homoserine Lacton Lactonase *J Biol Chem* 2004; 279: 13645-51.

41-Anguige, K., King, JR: Mathematical Modelling of Therapies Targeted at Bacterial Quorum Sensing. *Math Biosci* 2004, 192: 39-83.

42-Gümüşderelioğlu, M., Daşdan, M: Biyofilmler. *Biyotek.* 2003, 15: 50-53.

43-Hornby, J.M., Jensen, E.C., Lisec, A.D, et al: Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by Farnesol. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 2982-2992.

44-Shchepin, R., Hornby, J.M., Burger, E., Niessen, T., Dussault, P., Nickerson, K.W: Quorum sensing in *Candida albicans*: probing farnesol's mode of action with 40 natural and synthetic farnesol analogs. *Chem Biol* 2003,10: 743-750.

45-Patti J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., and Hook M: MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol* 48, 1994; 585-617.

46-Shiau, A.L., Wu,C.L: The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. *Microbiol Immunol* 42, 1998; 33-40.

47-Donlan, R.M: Biofilms and Device Associated Infections Emerging Infectious Dis 2001; 7: 277-81.

48-Martins, M., Henriques, M., Azeredo, J., Rocha, S.M., Coimbra, M.A., Oliveira, R: Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. Eukaryot Cell. 2007, 6(12): 2429-2436.

49-Donlan, R.M: Biofilm formation: a clinical relevant microbiological process, Clin.Infect. Dis. 2001, 33: 1387-1392.

50-Sticker, D: Biofilms, Curr. Opin. Microbiol. 1999,2: 270-275.

51-Russel, A.D: Mechanism of bacterial insusceptibility to biocides, Am. J. Infect. Cont. 2001,29: 259-261.

52-Wilson M., Bacterial biofilms and human disease, Sci. Prog. 2001, 84: 235-254.

53-M. De Cicco, C, Campisi: Central venous catheter related bloodstream infections, Pathogenesis factors, new perspectives in prevention and early diagnosis. The Journal of Vascular Access 2003, 4: 83-91.

54-Öncü, S: Santral venöz kateter infeksiyonları ve tedavisi, Klimik Dergisi, 2003,16: 45-51.

55-Kojic, E.M., Darouiche, R.O: *Candida* infections of medical devices. Clin Microbiol Rev 2004;17: 255-67.

56-Baillie, G.S., Douglas, L.J: Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother 1998, 42:1900-5.

57-Chandra, J., Mukherjee, P.K., Leidich, S.D., Faddoul, F.F., Hoyer, L.L., Douglas, L.J et al: Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. J Dent Res 2001, 80: 903-8.

58-Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A: Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture and drug resistance. J Bacteriol 2001, 183: 5385-94.

59-Baillie, G.S., Douglas, L.J., Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. J. Med Microbiol 1999, 48: 671-9.

60-Kuhn, D.M., George, T., Chandra, J., Mukherjee, P.K., Ghannoum, M.A: Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: Unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. Antimicrob Agents Chemother 2002, 46:1773-80.

61-Bachmann, S.P., VandeWalle, K., Ramage, G., Patterson, T.F., Wickes, B.L., Graybill, J.R et al: In vitro activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2002, 46: 3591-6.

62-Ramage, G., VandeWalle, K., Bachmann, S.P., Wickes, B.L., Lopez-Ribot, J.L: In vitro pharmacodynamic properties of three antifungal agents against preformed *Candida albicans* biofilms determined by time-kill studies. Antimicrob Agents Chemother 2002, 46: 3634-6.

63-Noverr, M.C., Toews, G.B., Huffnagle, G.B: Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi. Infect Immun 2002, 70: 400-2.

64-Alem, M.A., Douglas, L.J: Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 41-7.

65-Mangold, S., Harneit, K., Rohwerder, T., Claus, G., Sand W: Novel combination of atomic force microscopy and epifluorescence microscopy for visualization of leaching bacteria on pyrite. Appl Environ Microbiol. 2008, 74: 410-5.

66-Arı, Ş: DNA' nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Çoğaltılması. İçinde Temizkan G., Arda N., editörler. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2004: 101-120.

67-Hayden, R.T., Dolapçı, İ: In Vitro Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri. İçinde: Persing D.H., Tenover F.C., Versaloviç J., Tang Y., Unger E., Relman D.A., White T. J., editörler. Moleküler Mikrobiyolojide Tanı Prensipleri ve Uygulamalar.1.baskı. Ankara: Palme Yayınevi; 2006: 43-69.

68-Ponton, J., Moragues, M.D., Quindos, G: Non-Culture-Based Diagnostics. In: Calderone R.A., editors. Candida and Candidiasis, 1st ed. Philadelphia: ASM Press; 2002: 395-441.

69-Köksal F: Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. İçinde: Durmaz R(ed), Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji(2.baskı) Nobel Kitapevi, Malatya 2001:15-34.

70-Atkins, S.D., Clark, I.M: Fungal Molecular Diagnostics: A Mini Review. J Appl Genet 2004, 45: 3-15.

71-Persing, D.H: Moleküler Mikrobiyoloji; Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. Tekeli, A., Ustaçelebi, Ş., Çeviri editörleri. Ankara Palme Yayınevi; 2006: 71.

72-Kojic, E.M., Darouiche, R.O: Candida infections of medical devices. Clin Microbiol Rev 2004, 17: 255-67.

73-Richards, M.J., Edwards, J.R., Culver, D.H., Gaynes, R.P: Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. Crit Care Med 1999, 27: 887-92.

74-Pascual, A: Pathogenesis of catheter-related infections: Lessons for new designs. Clin Microbiol Infect 2002, 8: 256-64.

75-Pittet, D., Li, N., Woolson, R.F., Wenzel, R.P: Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: A 6-year validated, population-based model. Clin Infect Dis 1997, 24:1068-78.

76-Lapin-Scott, H.M., Costerton, J.W: Microbial Biofilms, Cambridge: Cambridge University Press. 9th ed. Jones, K & Bradshaw, SB, 1995:118-30.

77-Bacterial biofilms in human gastrointestinal tract. In: Allison D.G., Lappin-Scott H.M., Wilson, M: Community Structure and Co-operation in Biofilms. Cambridge: Cambridge University Press; 2000: 65-85.

78-Dougherty, S.H: Pathobiology of infection in prosthetic devices. Rev Infect Dis 1988,10: 1102-17.

79-Cox, G.M., Perfect, J.R: Fungal infections. Curr Opin Infect Dis 1993, 6:422-6.

80-Douglas, L.J: Candida biofilms and their role in infection. Trends Microbiol 2003,11: 30-6.

81-Ellis, M: Invasive fungal infections: Evolving challenges for diagnosis and therapeutics. Mol Immunol 2002, 38: 947-57.

82-Calderone, R.A: Introduction and historical perspectives. In: Calderone R.A, ed. Candida and Candidiasis. Washington, DC: ASM Press; 2002:3-13.

83-Guiguet, M., Barbut, F., Meynard, J.L: Comparison of infectious complications of long-term and short-term central venous catheterization. Presse Med 1999, 28: 1347-51.

84-Blot, S.I., Depuydt, P., Annemans, L., Benoit, D., Hoste, E., De Waele, J.J., Decruyenaere, J., Vogelaers, D., Colardyn, F., Vandewoude K.H: Clinical and economic outcomes in critically ill patients with nosocomial catheter-related bloodstream infections Clin Infect Dis. 2005, 41: 1591-8.

85-Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A: Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol 2001;183: 5385-94.

86-Ellis, M: Invasive fungal infections: Evolving challenges for diagnosis and therapeutics. Mol Immunol 2002, 38: 947-57.

87-Bouza, E., Burillo, A., Munoz, P: Catheter-related infections: Diagnosis and intravascular treatment. Clin Microbiol Infect 2002, 8: 265-74.

88-Albo López, C., López Rodríguez, D., Constenla Camba, M.I., Jiménez Blanco, A., Araujo, L.F., García-Medina J. Infectious and non-infectious complications of tunneled central catheters in hematologic patients. 1999, 44: 491.

89-Broadwater, J.R., Henderson, M.A., Bell, J.L., Edwards, M.J., Smith, G.J., McCready, D.R., Swanson, R.S., Hardy, M.E., Shenk, R.R., Lawson, M et al: Outpatient percutaneous central venous access in cancer patients. Am J Surg. 1990,160(6): 676-80.

90-Hughes, D.B., Ullery, B.W., Spigland, N: Formation of a calcified "cast" in a long-term indwelling central venous catheter: a case report. J Pediatr Surg 2006, 41:1927-9.

91-Newman, C.D: Catheter-related bloodstream infections in the pediatric intensive care unit. Semin Pediatr Infect Dis. 2006,17: 20-4.

92-Mullan, F.J., Hood, J.M., Barros, D'Sa A.A: Use of the Hickman catheter for central venous access in patients with haematological disorders. Br J Clin Pract 1992, 46:167-70.

93-O'Grady N.P., Alexander, M., Dellinger, E.P., Gerberding, J.L., Heard, S.O., Maki, D.G et al: Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep 2002, 51: 1-29.

94-Shin, J.H., Kee, S.J., Shin, M.G., Kim, S.H., Shin, D.H., Lee, S.K et al: Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: Comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 2002, 40: 1244-8.

95-Donlan, R.M: Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002, 8: 881-90.

96-Afif, C., Raad, I: Intravascular catheter related infections. In: Schlossberg D, ed. *Current Therapy of Infectious Diseases*. 2nd ed. St. Louis: Mosby; 2001: 416-8.

97-Goldberg, S.P., Baddley, J.W., Aaron, M.F., Pappas, P.G., Holman, W.L: Fungal infections in ventricular assist devices. *ASAIO J* 2000, 46: 37-40.

98-Gordon, S.M., Schmitt, S.K., Jacobs, M., Smedira, N.M., Goormastic, M., Banbury, M.K et al: Nosocomial bloodstream infections in patients with implantable left ventricular assist devices. *Ann Thorac Surg* 2001, 72: 725-30.

99-Nayak, N., Nag, T.C., Satpathy, G., Ray, S.B: Ultrastructural analysis of slime positive & slime negative *Staphylococcus epidermidis* isolates in infectious keratitis. *Indian J Med Res.* 2007,125: 767-71.

100-Martone, J.W., Jarvis, W.R., Edwards, J.R., Culver, D.H., Haley, R.U: Incidence and nature of endemic and epidemic nosocomial infections. *Hospital Infections'da*. Ed. Bennet JV, Brachman PS. 4th ed. Philadelphia, Lippincott, 1998: 42-70.

101-Boynukara, B., Gulhan, T., Gurturk, K., Alisarli, M., Ogun, E: Evolution of slime production by coagulase-negative staphylococci and enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from various human clinical specimens. *J Med Microbiol* 2007, 56: 1296-300.

102-Shin, J.H., Kee, S.J., Shin, M.G., Kim, S.H., Shin, D.H., Lee, S.K et al: Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: Comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 2002, 40: 1244-8.

103-Catalanotti, P., Lanza, M., Del Prete, A., Lucido, M., Catania, M.R., Gallè, F., Boggia, D., Perfetto, B., Rossano, F: Slime-producing *Staphylococcus epidermidis* and *S. aureus* in acute bacterial conjunctivitis in soft contact lens wearers. *New Microbiol* 2005, 28: 345-54.

104-Adam, B., Baillie, G.S., Douglas, L.J: Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med Microbiol* 2002, 51: 344-9.

105-Lewis, R.E., Lo, H.J: Lack of catheter infection by the *efg1/efg1 cph1/cph1* double-null mutant, a *Candida albicans* strain that is defective in filamentous growth. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46: 1153-5.

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

107-Baillie, G.S., Douglas, L.J: Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol* 1999, 48: 671-9.

108-Arciola, C.R., Campoccia, D., Baldassarri, L., Donati, M.E., Pirini, V., Gamberini, S., Montanaro, L: Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR method that recognizes the presence of *ICA* genes with two classic phenotypic methods. *J Biomed Mater Res A*. 2006, 76: 425-30.

109-Baillie, G.S., Douglas, L.J: Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *J Antimicrob Chemother* 2000, 46: 397-403.

110-Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A: Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol 2001, 183: 5385-94.

111-Cheng, G., Wozniak, K., Matthew, A: Comparison between *Candida albicans* Agglutinin-Like Sequence Gene Expression Patterns in Human Clinical Specimens and Models of Vaginal Candidiasis. Infection and Immunity, 2005:1656–166.

112-Garcia-Sanchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.M., d'Enfert, C: *Candida albicans* biofilms: A developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. Eukaryot Cell 2004, 3: 536-45.

113-Schulz, A., Vestweber, A.M., Leis, W., Stark, D., Dressler, D: An improved model of a catheterised human bladder for screening bactericidal agents. Aktuelle Urol. 2008,39: 53-7.

114-Cury, J.A., Koo, H: Extraction and purification of total RNA from *Streptococcus mutans* biofilms Anal Biochem. 2007, 365: 208-14.

X. ÖZGEÇMİŞ

SEZEN BOLAT

Doğum Tarihi: 25.07.1980

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Bekar

Meslek: Biyolog

Yazışma Adresi: Sergenler Sok. 18/11 06590 Cebeci/ANKARA

Cep Tel: 0 505 393 94 75

EĞİTİM

2005-2008 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji
Yüksek Lisans

2000-2005 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji

1986-1997 TED Ankara Koleji İlk-Orta-Lise

YABANCI DİL

İngilizce

Almanca