

T.C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
Prof. Dr. Bülent BAYSAL  
ANABİLİM DALI BAŞKANI

131819

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
*CANDIDA ALBICANS* TÜRÜ MAYA  
MANTARLARINDA VİRULANS  
FAKTÖRLERİNİN (Proteinaz, Slime ve Fosfolipaz)  
İN-VİTRO ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Uğur ARSLAN

Y.Ü. YÜKSEK  
DOKÜMAN

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Duygu FINDIK

KONYA-2003

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>Sayfa</b>
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. MANTARLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	3
2.1.1. <i>Candida</i> 'ların Sınıflandırılması.....	3
2.1.2. <i>Candida</i> 'ların Morfoloji ve Boyanma Özellikleri.....	4
2.1.3. <i>Candida</i> 'ların Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri.....	5
2.1.4. <i>Candida</i> 'ların Patogenezi.....	6
2.2. İDENTİFİKASYON.....	8
2.2.1. Direkt Mikroskopik İnceleme.....	8
2.2.2. Kültür.....	8
2.2.3. Germ Tüp Testi.....	9
2.2.4. Biyokimyasal Özellikler.....	10
2.2.4.1. Karbonhidrat asimilasyon testleri.....	10
2.2.4.2. Üreaz testi.....	10
2.2.4.3. Fenol oksidaz testi.....	10
2.2.4.4. Nitrat asimilasyon testleri.....	11
2.2.5. Serolojik Testler.....	11
2.2.6. Moleküler Tanı Yöntemleri.....	11
2.3. <i>CANDIDA ALBICANS</i> 'IN GENEL ÖZELLİKLERİ.....	12
2.4. <i>CANDIDA</i> 'LARDA VIRULANS FAKTÖRLERİ.....	12
2.4.1. Adezyon.....	13
2.4.2. Proteinaz Enzimi.....	13
2.4.3. Fosfolipaz Enzimi.....	17
2.4.4. Slime Faktör.....	19
2.4.5. Germ Tüp- Hif Oluşumu (Dimorfizm) .....	19
2.4.6. Toksinler.....	20
2.4.7. Fenotipik Değişim.....	20
2.4.8. Hücre Duvarı-Mannoprotein.....	21

3. MATERYAL VE METOD.....	22
3.1. İZOLASYON VE İDENTİFİKASYON.....	22
3.1.1. Örneklerin Seçimi.....	22
3.1.2. Kültür ve İzolasyon.....	22
3.1.2. Germ Tüp Oluşturma Özelliği.....	24
3.1.3. Cornmeal Agar Morfolojisi.....	24
3.1.4. Karbonhidrat Asimilasyon Özelliklerinin Test Edilmesi.....	24
3.2. VIRULANS FAKTÖRLERİNİN BELİRLENMESİ.....	26
3.2.1. Proteinaz Aktivitesinin Saptanması.....	26
3.2.2. Fosfolipaz Aktivitesinin Saptanması.....	30
3.2.3. Slime Faktörün Tespiti.....	31
3.3. İSTATİSTİK.....	33
4. BULGULAR.....	34
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇ.....	45
7. ÖZET.....	47
8. SUMMARY.....	48
9. KAYNAKLAR.....	49
10. TEŞEKKÜR.....	57

## 1. GİRİŞ

*Candida* türleri insanlarda görülen en yaygın fungal patojenlerdir. Doğada geniş bir dağılım gösteren *Candida* türleri insan ve hayvanların normal florasında da bulunmaktadır. Bu organizmalar invaziv olmayan yüzeysel infeksiyonlardan, derin dokuları tutan infeksiyonlara kadar geniş hastalık spektrumuna sahiptir. Özellikle geniş etki alanlı antibiyotik kullanımı, intravasküler aletler, immünoşüpresif hasta sayısının artışı, organ transplantasyonları ve protez cihazlarının implantasyonu gibi nedenlerle, hem hastane dışı hem de nozokomiyal *Candida* infeksiyonlarının sıklığı artmaktadır.

200'den fazla *Candida* türü bulunmaktadır. Bunlardan; *C.albicans* başta olmak üzere, *C.guilliermondii*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.pseudotropicalis*, *C.lusitaniae*, *C.dublinsiensis* ve *C.glabrata* gibi türlerin insanlarda daha sıklıkla patojen olduğu bilinmektedir. *C.albicans* ise bu patojenler arasında en yaygın etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Vajinal kandidoz etkenlerinin yaklaşık %84'ünden, nozokomiyal mantar infeksiyonlarının %52-63'ünden, mantarlara bağlı idrar yolu infeksiyonlarının yaklaşık %60.8'inden ve kandidemilerin % 60'ından *C.albicans* sorumlu tutulmaktadır.

*C.albicans* insanların deri/mukoza yüzeylerinde normal kommensal yapının bir üyesidir. İnsanların çoğunda yaşamları boyunca *Candida* infeksiyonuna karşı "doğal direnç" vardır. Konak hücre hasarını *Candida*'ların virulans faktörleri ve mantara karşı savunma mekanizmaları aracılığı ile verilen konak immün cevabı belirler. *Candida*'ların türüne ve kökenine bağlı olan bazı faktörler konağın bağışıklığını yenmek için birlikte rol oynarlar. Patojenite kriterleri denilen bu faktörler *C.albicans* ve diğer *Candida* türlerinin virulansını belirler. Virulans faktörlerinin önemi en iyi *C.albicans* türünde gösterilmiştir. Bu faktörler içinde en sık karşılaşılan *C.albicans*'ın konak hücreye ve yapay yüzeylere adezyonu için gerekli olan slime; ayrıca epitel hücrelerine girerek derin dokulara doğru ilerleyebilmesinde rol oynayan proteinaz ve fosfolipaz enzimleri olduğu ileri sürülmektedir.

Bu çalışmada değişik klinik örneklerden izole edilen *C.albicans* kökenlerinde önemli virulans faktörlerinden proteinaz, fosfolipaz ve slime aktivitelerinin invitro saptanması, fosfolipaz ve proteinaz enzimi arasında bir korelasyonun olup olmadığı ve suşların izole edildikleri vücut bölgelerine göre sahip oldukları virulans faktörlerinde bir farklılık bulunup bulunmadığının araştırılması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. MANTARLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ

Mantarlar gerçek bir çekirdeğe sahip ökaryotik mikroorganizmalardır. Doğada 250,000 tür mantar saptanmasına karşılık 150 tür insan ve hayvanlar için primer patojendir.

Mantarlar klorofil içermemeleri ile yüksek bitkilerden ayrılır. Ayrıca hücre duvarında bulunan kitin, mantarın bakteri ve yüksek bitkilerden ayrılmasını sağlar. Hücre duvarında peptidoglikan, gliserol ve lipopolisakkaritleri içermezler. Bunların yerine mantar hücre duvarında kitin, mannanlar, glukanlar ve diğer kompleks yapılar bulunur. Mantarların hücre duvarında peptidoglikan bulunmaması, mantarların serolojik (mannoprotein yapısı) tanısında ve yeni antijenik testlerinin geliştirilmesinde önemlidir (1).

Morfolojik yapılarına göre mantarlar küf ve maya olmak üzere iki grupta incelenir. Küfün temel yapı birimi hif olarak adlandırılan tübümsü yapılardır. Bunlar; kalın, paralel duvarlı tüp benzeri hücre uzantıdır. Hif topluluğuna miçel denir. Mayalar tek hücreli mantarlardır. Tomurcuklanma (blast formasyonu) veya füzyon (ortadan ikiye bölünme) ile çoğalırlar. Yavru hücreye blastokonidyum adı verilir. Küf ve maya formu dışında; bazı türler ise çevre şartlarının durumuna bağlı olarak iki şekilde üreyebilirler. Dimorfik mantarlar olarak adlandırılan bu mantarlar; doğal ortamda ve oda ısısındaki besiyerlerinde küf, in vivo ve 35-37°C'de maya şeklinde ürerler (1-3).

#### 2.1.1. *Candida*'ların Sınıflandırılması

*Candida* türleri üreme şekilleri baz alınarak sınıflandırılırlar. *Candida* 'lar eşeyli ve eşeysiz sporları aracılığı ile iki şekilde ürerler (1,4).

Bir kese içinde bulunmayan eşeysiz üreme yapılarına konidiyum denir. Konidiyum oluşturan *Candida* türlerinin tümü *Deuteromycota (Fungi Imperfecti)* içinde *Cryptococcaceae* ailesinde sınıflandırılır. Bu aile içinde yaklaşık 200 tür bulunmaktadır. *Candida* cinsinin içinde bulunduğu türlerin taksonomik ilişkileri tanımlanamamıştır. Bu aileye giren *Candida* türleri içinde en sık etken *C.albicans*'tır. Bunu *C.tropicalis*, *C.glabarata*, *C.parapsilosis*, *C.krusei*, *C.pseudotropicalis*, *C.lusitaniae*, *C.dublinsiensis* *C.guilliermondii* izler ve bunlar %50-70 oranında etkendirler. Bu grupta diğer hastalık etkeni olabilecek *Candida* türleri ise; *C.catemulata*, *C.cifererrii*, *C.haemulonii*, *C.intermedia*, *C.kefyr*, *C.lambica*, *C.lipolytica*, *C.norvegensis*, *C.pelliculosa*, *C.pulcherrima*, *C.rugosa*, *C.utilis*, *C.viswanathii* ve *C.zeylanoides*'dir. Bu sayı ve bu sıralama gün geçtikçe değişebilir.

*Clavispora*, *Debaryomyces*, *Issatchenkia*, *Kuyveromyces*, *Pichia* eşeyli spor oluşturan *Candida* türleri olarak sınıflandırılmaktadır (4).

### 2.1.2. *Candida*'ların Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

*Candida* türleri tek hücrelidir. Hücre duvarında kitin ve/veya sellülöz içeren ökaryotik kemoheteretrof organizmalardır. Tomurcuklanma (blastospor) veya ortadan ikiye bölünme ile çoğalırlar (4). Klinik örneklerinde ve kültürlerinde 3-6µm büyüklüğünde oval veya yuvarlağımsı, tomurcuklanan hücreler şeklinde görülürler (1,3). *Candida*'ların üremesi sırasında oluşan blastokonidiyumlar ana hücreden ayrılmadan uzayarak aralarında boğumlar oluşturarak yalancı hif meydana getirirler. *Candida*'lar bir hifin ucunda veya arada bulunan tek hücreli, kalın duvarlı, oval geniş yapı olan klamidospore oluşturabilirler (1,4). *Candida* türleri arasında *C.albicans* blastokonidiyum ve yalancı hif yanında hücre duvarları birbirine paralel gerçek hif de oluşturarak dimorfik özellik gösterir (1).

*Candida* türleri Gram boyama ile boyanırlar ve Gram olumludurlar (1,4). Bunun yanında floresan boyalardan potasyum hidroksit-Kalkoflor beyazı ile boyanabilirler. Kalkoflor beyazı maya hücre duvarındaki kitin ve sellüloza nonspesifik bağlanarak yeşilden maviye değişen

renklerde floresan verirler. Bu boya özellikle maya hücrelerinin örnekler içinde aranmasında kullanılır (4). *Candida* türlerini mayalardan ayıran mikroskopik özellikler tablo-1'de özetlenmiştir.

**Tablo 1. *Candida* türlerini diğer mayalardan ayıran mikroskopik özellikleri (3)**

Organizma	Yalancı Hif	Gerçek hif	Blastokonidyum	Antrokonidyum	Anellokonidyum	Klamidospor	Askospor
<i>B.capitatus</i>	x	x	x		x		
<i>C.albicans</i>	x	x	x			x	
<i>Candida spp.</i>	x	x	x				x <sup>a</sup>
<i>Cryptococcus spp.</i>			x				
<i>Geotrichum spp.</i>		x		x			
<i>Hansenula spp.</i>	x <sup>a</sup>		x				x
<i>Rhodotorula spp.</i>			x				
<i>Saccharomyces spp.</i>	x <sup>a</sup>		x				x
<i>Trichosporon spp.</i>	x	x	x	x			

a: Çeşitli türlerde

### 2.1.3. *Candida*'ların Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

*Candida* türlerinin çoğu yaygın kullanılan mikolojik ve bakteriyolojik besiyerlerinde iyi ürer. Üreme genellikle 24 saatte görülmesine rağmen, belirgin üreme genellikle 48-72 saat arasında oksijenli/oksijensiz ortamda oluşur. Mayalar genellikle 37°C'de ürerler, özellikle patojen türler 25-37°C'de, saprofitler ise daha düşük ısıda üreyebilirler (3). Mayaların üreyebilmesi için besiyeri pH'sının 2-8 arasında olması ve besiyerinde glukoz, amonyum tuzu, fosfat, biotin ve serbest metallerin (Fe, Zn, Ca gibi) bulunması yeterlidir. *Candida* türleri kemoheterotrofturlar, bu nedenle organik bir azot ve karbon kaynağına gereksinimleri vardır. Besinlerini absorpsiyon yolu ile buldukları ortamdan kolayca sağlayabilmeleri için üreme ortamının relatif nem oranı % 95-100 oranında olmalıdır (4). *Candida* türlerinin kolonileri genellikle kirli beyaz veya krem renginde, buruşuk veya düzgün kenarlı, nemli, yumuşak kıvamlı, maya kokan koloni oluştururlar (1,3,4).



Çeşitli *Candida* türlerinin bazı kültürel, mikroskopik morfoloji ve biyokimyasal özellikleri tablo-2’de özetlenmiştir.

**Tablo 2. Klinik örneklerden üretilen *Candida* türlerinin kültür, mikroskobik ve biyokimyasal özellikleri (3)**

TÜRLER	37°C’de üreme pseudo/gerçek hif	Klamidospor	Germ tipi	ASİMİLASYON										FERMANTASYON										
				Glikoz	Maltoz	Sükroz	Laktöz	Galaktöz	Mellebiyoz	Sellebiyoz	İnositol	Ksiloz	Rafinoz	Trehaloz	Dulisit	Glikoz	Maltoz	Sükroz	Laktöz	Galaktöz	Üreaz	KNO <sub>3</sub>	Askaspor	
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+d	-	+	-	-	-	+	-	+	-	F	F	-	-	F	-	-	-	-
<i>C. catenulata</i>	+d	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	Fd	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. dubliensis</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. famata</i>	+	-	-	-	+	+	+d	+	+	+	-	+	+	+	+d	Fd	-	Fd	-	-	-	-	-	-d
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	F	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	F	-	F	Fd	F	-	-	-	-d
<i>C. kefyri</i>	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+d	+	+d	+	F	-	F	Fd	F	-	-	-	-d
<i>C. krusei</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	+	-	-	-d
<i>C. lambica</i>	+d	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-d
<i>C. lipolytica</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-d
<i>C. lusitaniae</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	F	-	F	-	F	-	-	-	-d
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. pelliculosa</i>	+	+	-	-	+	+	+d	-	+	+	+	+	+	+	-	F	Fd	F	-	F	-	+	+	+
<i>C. pintolopestisii</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. rugosa</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	-*	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	F	F	F	-	F	-	-	-	-
<i>C. zeynaloides</i>	-	+	-	-	+	-	-	-d	-d	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: olumlu, -: olumsuz, d: değişken, F: Fermantasyon olumlu, Fd: Fermantasyon değişken,

\*: *C. tropicalis* nadir olarak klamidospora benzer yapılar oluşturabilir.

#### 2.1.4. *Candida*’ların Patogenezi

*Candida*’lar, insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde yaygın olarak bulunan maya grubu mantarlardan patojenik potansiyeli olan fırsatçı mikroorganizmalardır (5,6). Bu nedenle kandidozlar çoğu kez endojen kaynaklıdır. Kandidozların temel özelliği fırsatçı infeksiyon niteliğinde olmalarıdır ve gelişmelerinde uygunsuz konak faktörü ön plandadır. Uygunsuz koşullar düzelmediği sürece gerekli tedavilere rağmen hastaların iyileşmeleri oldukça güçtür. *Candida* infeksiyonlarının patogenezi konak savunma mekanizmaları

çeşitli yollarla olaya katılır. Savunma mekanizmalarında yer alan hücreler, faktörler, yapılar ve bunların fonksiyonlarındaki defektler konağın savunma mekanizmasındaki rolünü belirler.

Bunlar;

- a. Mikrobiyal antogonizma ve *Candida* kolonizasyonu,
- b. Birinci basamak savunma  
Deri ve mukoza
- c. İkinci basamak savunma  
Sıvısal savunma mekanizmaları  
Hücresel savunma mekanizmaları
- d. Konak savunmasını etkileyen faktörler  
Beslenme ve yaş
- e. Konak savunmasına etki eden hastalıklar  
Lösemi ve Lenfoma                      Kronik renal yetmezlik  
Alkolizm ve hepatik siroz              Orak hücre anemisi  
İnfeksiyonları
- f. İmmüniteyi baskılayan ilaçlar  
Glukokortikosteroidler  
İmmüniteyi baskılayan başka ilaçlar
- g. Işınlama

*Candida* infeksiyonlarının gelişiminde konak faktörlerinin yanında virulans faktörlerinin de önemi büyüktür. *Candida*, virulans özellikleri sayesinde, konak hücre membranının bütünlüğünü ve işlevlerinin bozulmasına neden olur ve bu sayede hücre ölümü ile konak hücresi içine invazyon yapar. *Candida* türlerinin virulans özelliklerinde, “hücre duvarı ve zarı” ile “hücre dışına salınan enzimler” en önemli rolü oynar (5,7).

Hücre duvarı ve hücre zarının hücreye şeklini vermesi, dış ortamlardan koruması ve madde alışverişini sağlaması gibi bilinen çok önemli görevleri vardır. Ayrıca “maya formundan hif formuna geçmede, “adezyonda” ve “immunmoderatör etkide” rol oynayarak virulansı artırır ve bu konuda en geniş kapsamlı çalışmalar *C.albicans* türlerinde yapılmıştır (5).

*Candida*'ların hücre dışına salgıladıkları enzimlerden fosfolipazlar ve proteinazlar insan hücre yapısında bulunan fosfolipitleri ve proteinlerin peptit bağlarını hidrolize ederek konak hücre membranının yapısında hasar oluşturur (5,7).

## **2.2. İDENTİFİKASYON**

### **2.2.1. Direkt Mikroskopik İnceleme**

Klinik örneklerin direkt mikroskopik incelemesi ile henüz kültürde fungal üreme belirgin değilken, yaklaşık, hatta kesin tanıya ulaşma olanağı vardır. Klinik örnekte mantar hücrelerini gözlemlemek kültürde izole etmekten daha değerli olabilir. Mantarların mikroskopik incelemelerinde tanıya yardımcı olabilecek faktörler; hücrenin şekli ve boyutu, tomurcuklanan hücrelerin bağlanma şekli, kapsül, yalancı hif ve artokonidiya varlığıdır (3).

Deri ve tırnak gibi sert doku örneklerinden %15-20'lik KOH veya Kalkoflor beyazı kullanılarak preparat hazırlanır ve ışık mikroskobu veya floresan mikroskobunda incelenir. BOS (beyin omurilik sıvısı) ve idrar gibi sıvı örneklerden santrifüj yapılarak, çökeltiden inceleme yapılır. Vajen ve balgam gibi örneklerden direkt ve diğer örneklerin distile sudaki süspansiyonlarından mikroskopik inceleme yapılabilir. Mikroskopik inceleme; direkt veya boyama (Gram ve kalkoflor) ile yapılabileceği gibi kapsül varlığını göstermek için de çini mürekkebi preparatlarının hazırlanması uygundur (1,3,8).

### **2.2.2. Kültür**

Mayaların büyük bir kısmı yaygın kullanılan mikolojik ve bakteriyolojik besiyerlerinde iyi ürer. Koloniler genellikle 24 saatte görülmesine rağmen en iyi üreme süresi 48-72 saattir. Üreme için ortam pH'sının 2-8 arasında olması yeterlidir. Ayrıca besinlerinin absorpsiyonu için ortamın gerekli rölatif nem oranı %95-100 olmalıdır (1,3,4).

Tüm örnekler Sabouraud-dekstroz agar (SDA) gibi rutin besiyerine ekilerek oda ısısında (22-26°C) ve 37°C'de bekletilir. Mayaların 37°C'de üreyebilmeleri önemli özelliklerindedir. Özellikle patojen olan türler 25-37°C'de kolayca ürerken, saprofitler yüksek ısı derecelerinde üreyemezler (4).

SDA'da üreyen mayaların saf kültüründen mısırunu-Tween 80 besiyerine ekim yapılarak yalancı hif ve/veya gerçek hif yapıp yapmadığı, blastokonidyumların büyüklüğü, şekli ve dizilimleri, ayrıca kökenin klamidospore oluşturup oluşturmadığı araştırılır (1,4).

*C.albicans* tanısı germ tüp testi ve mısırunu Tween 80 agarda tipik klamidospore ile konabilir. Klamidospore oluşumu, germ tüp testi olumsuz olan *C.albicans* suşlarının kesin identifikasyonunda yeterli sonuç verir. Klamidospore oluşumu *C.albicans* için tipiktir fakat *C.tropicalis* ve *C.dublinskiensis*'de klamidospore yapabilir. Fakat *C.tropicalis*'deki klamidosporeların kalın bir duvarının olmaması ve stoplazma içerisinde yansıma yapan globüllerin bulunmaması ile, *C.dublinskiensis*'deki klamidosporeların ise çok fazla küme yapmış olması ile *C.albicans* klamidosporelarından ayrılır (2,9).

Mayaların besiyerinde gösterdikleri özellikleride türlerin tanımlanmasına yardımcıdır. *C.tropicalis*, *C.krusei* ve *Trichosporon* Sabouraud dekstroz gibi sıvı besiyerlerinde yüzeyde ince zar yaparlar. Ayrıca *C.albicans* kanlı agarda yıldız şeklinde çıkıntılar oluşturur (1,3,4).

### 2.2.3. Germ Tüp Testi

Germ tüp testi ilk defa 1954 yılında Johnson tarafından izlenmiş, bu olayın *C.albicans*'ın ayırt edilebilmesi için bir yöntem olarak kullanılması daha sonraki çalışmalarda gösterilmiştir (9). Bu test *C.albicans*'ın tanısında hızlı bir testtir ve hem primer hem de saf kültürlerden yapılabilir. Klinik örneklerden izole edilen *C.albicans*'lar 37°C'de 2-3 saat serumda bekletilince izolatların % 90'dan fazlası germ tüp oluşturur. Maya hücrelerinden direk olarak

oluşan ve kısa bir hif başlangıcı olan germ tüpler, maya hücresi ile bileşim bölgesinde boğumlanmamanın olmaması ile yalancı hiflerden ayrılır (1,3,10).

Germ tüp testi, karbonhidrat asimilasyon ve fermentasyon testleri ile yaklaşık % 99 oranında uyumlu bulunmuştur (11).

## **2.2.4. Biyokimyasal Özellikler**

### **2.2.4.1. Karbonhidrat asimilasyon testleri**

Karbonhidrat asimilasyon testleri tüm mayaların tür düzeyinde identifikasyonunda temel yöntemdir. Maya hücresinin, oksijen varlığında tek karbon kaynağı olarak spesifik bir karbonhidratı kullanma yeteneğini ölçer. Karbonhidrat kullanma özelliği Wickerham'ın asimilasyon ve fermentasyon yöntemi ile incelenir. Klinik laboratuvarların çoğunda bu testlerin yerini API 20 C, ID 32 C, ve Uni-Yeast-tek gibi hazır ticari test kiti almıştır. Bu testler içinde en yaygın kullanılanı API kitleridir (1,3).

### **2.2.4.2. Üreaz testi**

*Basidiyomycetes* mayalarının üreyi hidrolize edebilme yetenekleri vardır. *Cryptococcus*, *Rhodotorula* ve *Trichosporon* türleri üreaz oluşturur. Klinik önemi olan *Candida* türlerinden *C.lipolytica* ve bazı *C.krusei* suşları haricinde üreaz enzimi yoktur.

Maya, üre agarı ekim yapıldıktan sonra 30°C'de 4-5 gün inkübe edilir. Üreaz enzimi varlığında ürenin parçalanması ile ortaya çıkan amonyakın neden olduğu alkali pH, renk indikatörünü (fenol red) pembeye dönüştürür (1,4).

### **2.2.4.3. Fenol oksidaz testi**

*Cryptococcus neoformans* membrana bağlı fenol oksidaz oluşturur. Bu enzim L-dopa, L-dopamin, klorojenik asit ve kafeik asit gibi çeşitli O-difenolik bileşiklerin oksidasyonunu

katalize eder. Mayalar bu bileşikleri içeren besiyerlerinde üretildiklerinde, beş gün içerisinde substrata bağlı olarak koyu kahve-siyah renkli koloniler oluştururlar (2,4).

#### **2.2.4.4. Nitrat asimilasyon testleri**

Nitrat asimilasyon testleri *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* ve *Hansenula* türlerinin tanımlanmasında kullanılır. Bu testler maya hücrelerinin tek nitrojen kaynağı olarak nitrata kullanma yeteneğini ölçer (1,3).

#### **2.2.5. Serolojik Testler**

Özellikle son yıllarda hasta serumu ve vücut sıvılarında anti-*Candida* antikörlerini, *Candida* antijenlerini, metabolitlerini ve hücre duvar komponentlerinin gösterilmesini sağlayan testler geliştirilmiştir. Bu testler özellikle fungeminin doğrulanmasında kullanılan yardımcı testlerdir. Bu gelişmelere rağmen invaziv kandidozların tanısına ilişkin sorunlar henüz tam çözülememiştir. Bu testlerin özgüllük ve duyarlılıkları sınırlıdır, dikkatle yorumlanmalıdır (1,10).

#### **2.2.6. Moleküler Tanı Yöntemleri**

Mayalarda moleküler tanı yöntemleri; mantarın klinik örneklerde direk varlığını saptama ve/veya tanımlama çalışmalarında, epidemiyolojik amaçlarla izolatlar arasındaki genotipik farklılıkların ortaya konmasında, antifungal dirençlilik gibi virulans faktörlerinin varlığının genotipik olarak saptanmasında, genom baz dizisi ve mutasyon analizlerinde, klinik örneklerde bulunan fungusun canlılığının ortaya konmasında ve taksonomik incelemelerde kullanılmaktadır (12). Bu nedenlerle genomik DNA'nın restriksiyon endonükleaz analizi (REA), southern hibridizasyon analizi, pulsed field jel elektroforezi, polimeraz zincir reaksiyonu gibi DNA bazlı ve immunoblot finger printing, hücresel proteinlerin poliakrilamid

jel elektroforezi, multilokus enzim elektroforezi gibi protein bazlı yöntemler geliştirilmiştir (13).

### **2.3. CANDIDA ALBICANS'IN GENEL ÖZELLİKLERİ**

*Candida* infeksiyonlarında en sık görülen etkidir. Vücudun her yerinde akut, subakut ve kronik infeksiyon yapabilir.

Koloni morfolojisi olarak krem renğinde, yumuşak krem gibi veya tereyağı kıvamında düzgün koloni oluştururlar. Kanlı agarda yıldız şeklinde çıkıntılar oluşturabilir.

Mikroskobik morfolojisi, dimorfik özelliktedir, yani yalancı hif bazende gerçek hif oluşturur. Corn-meal ve Tween 80 agar da 25°C'de 72 saatte yalancı hifalar oluşturur, bunun yanında kümeler yapan blastokonidyumlar (blastospor) (3-7 x 3-14 µm) ve yalancı hiflerin üzerinde iri, küre şeklinde, kesif refle veren klamidospore oluşturur.

Klinik örneklerden izole edilen *C.albicans*'lar 37°C'de 2-3 saat serumda bekletilince izolatların % 90'dan fazlası germ tüpü oluşturur. Maya hücrelerinden direk olarak oluşan ve kısa bir hif başlangıcı olan germ tüpleri, maya hücresi ile bileşim bölgesinde boğumlanmamanın olmaması ile yalancı hiflerden ayrılır.

*C.albicans*'ın biyokimyasal testlerinden, üreaz ve nitrat aktivitesi yoktur. Glikoz, maltoz, sükröz, galaktoz, ksiloz ve trehalozu asimile edebilir. Sükröz asimilasyonu değişkendir (1,8,4).

### **2.4. CANDIDA'LARDA VİRULANS FAKTÖRLERİ**

*Candida* infeksiyonlarının gelişmesi ve patogenezi için yapılan çalışmalarda, konakçı savunma sisteminin önemi yanında *Candida*'ya ait virulans faktörlerinin de önemi

belirtilmektedir (14,15). Her ne kadar *Candida* türleri düşük virulanslı mikroorganizmalar olarak değerlendirilirse de patojen olarak izolasyonları hızla artmaktadır (5). *Candida*'ların virulanslarındaki en önemli rolü hücre duvar, hücre zarı ve hücre dışı enzimler oynar. Özellikle *Candida*'lar için konakçı epitel ve endotel hücrelerine adezyon, proteinaz, fosfolipaz, slime faktör, germ tüp oluşturma, toksinler, fenotipik değişimi ve hücre yüzeyi virulansı patogeneizde rol oynamaktadır. Yüzeysel infeksiyondan yaygın kandidoza kadar değişen infeksiyonlarda tek bir virulans faktörünün etken olmadığı düşünülmektedir. Bu faktörlerin türlere göre dağılımı farklılık göstermektedir (14-17). Virulans faktörlerinin önemi en iyi *C.albicans* türleriyle yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (14).

#### 2.4.1. Adezyon

*Candida*'ların mukozal epitel hücrelerine veya endotel hücrelerine bağlanması ilk ve çok önemli bir basamaktır. *C.albicans*'ın kornea, yanak epitel hücreleri, parotid ve tükürük proteinleri, vajinal epitel hücreleri, gastrointestinal sistem mukoza hücrelere ve endotel hücrelere adezyonu gösterilmiştir (14,18). Bu da *C.albicans*'ın en sık karşılaşılan tür olma özelliğini açıklar. Adezyon *C.albicans* ve *C.tropicalis*'de yüksek iken, *C.parapsilosis*'de bu oran düşüktür. *C.krusei*, *C.kefyr* ve *C.guilliermondii*'de adezyon gösterilememiştir (14).

Maya hücrelerinin epitel hücrelere yapışmasında yüzey lipidlerinin ve glikolidlerinin de yapışma olayında rollerinin olabileceği, bunların giderildiği takdirde bağlanmanın % 48-54 azaldığı ileri sürülmüştür (19).

#### 2.4.2. Proteinaz Enzimi

*Candida* infeksiyonlarının patogenezinde en önemli virulans faktörlerinden biri de salgısal aspartik proteinaz enzimidir (7). Proteinaz enzimi *Candida*'lardan başka diğer medikal önemi olan mantarlardan *Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*, *Paracoccidioides brasiliensis* ve *Sporothrix schenckii*'de de virulans faktörü olarak tanımlanmıştır (14,20). Bu enzim



*Candida*'lardan en fazla *C.albicans*, sonra daha az derecede *C.tropicalis*, orta derecede *C.parapsilosis* kökenlerinde bulunmaktadır. Bu enzim sadece en patojen *Candida* türlerinden salgılanmaktadır. Diğer klinik ile ilişkili *Candida* türlerinde hücre dışı proteinaz enzimi yok gibi görünmektedir. Aspartik proteinaz salgılayan türlerin virulansı daha fazladır ve bu türlere infeksiyonlarda etken olarak daha sık rastlanır (7,19,21).

Bu enzimin asit pH'da (pH 2.5-4) aktivasyon göstermesi nedeniyle "asit proteinaz", çok miktarda aspartik asit rezidüleri içerdiğinden "aspartat proteinaz", pepstatin ile inhibe olduğu için "karboksil proteinaz" gibi adlarla anılmakla beraber, 1993'de "American Society for Microbiology" tarafından salgısal aspartik proteinaz olarak kabul edilmiştir (5,15).

Salgısal aspartik proteinazların virulans etkisi birkaç olası mekanizma ile gerçekleşir. Bunlar; i) konak proteinlerini sindirmesi ile oluşan konak doku zedelenmesiyle adezyonun kolaylaşması, ii) konak proteinlerinin yıkılmasıyla konak immun yanıtının bozulması, iii) peptid yıkım ürünleri ile hücre nitrojen kaynaklarının arttırılması, iv) endotel hücre hasarı v) konakta proteolitik mekanizmaları uyarmak yoluyla (7).

Yapılan çalışmalarda proteinaz salgılayan *Candida* türleri ile bu *Candida*'ya ait proteinaz defektili mutant suşların karşılaştırmasında; mutant suşların atasal kökenlere oranla daha az virulan oldukları ve fagositoza daha duyarlı hale geldikleri gözlemlenmiştir. Proteinaz salgılayan *Candida*'lar parçalı çekirdekli lökositler tarafından daha zor fagosite edilmekte ve hücre içinde daha az oranda öldürülmektedir (7,21).

Aspartik proteinaz enziminin vücutta fizyolojik önemi olan: albumin, immunoglobulin, laktoferin, laktoperoksidaz, müsün ve sistatin A gibi substratları sindirdikleri ve böylece daha kolay invaze oldukları gösterilmiştir (7,14). Ayrıca aspartik proteinaz enzimi, mukozal bağışıklıkta önemli rol oynayan salgısal IgA1, IgA2 ve IgA'yı parçalamasıyla *Candida*'nın adezyonundan da sorumlu tutulmaktadır (22,23).

Glikoprotein yapısındaki bu enzimin karboksil ucunda lösin, azot ucunda triptofan bulunur. Tek bir yapıda olduğu düşünülen enzimin daha detaylı incelemelerinde farklı biyokimyasal özelliklere sahip olduğu; molekül ağırlıklarının 42-49 kDa arasında değişmesinden, izoelektrik noktalarının ve primer dizilimlerinin değişik olmasından farklı izoenzimlerden oluştuğu anlaşılmış ve tanımlanmıştır. *C.albicans*'la ilişkili moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda bu izoenzimleri farklı kodlayan bir çok gen (Sap) kodlanmıştır (5,19). Bu gen ailesinde dokuz (Sap1, Sap2, ...,Sap9) farklı gen bulunduğu tespit edilmiştir (24-26). Sap gen salınımının bu mantarın mayadan hife geçişi (dimorfizmi) ve fenotip değişimi ile ilgili olduğu açıklanmıştır. Sap1, Sap2, Sap3 maya hücrelerinden, buna karşın Sap4, Sap5 ve Sap6 hif hücrelerden salınır (19,27). Ayrıca Sap1'in *C.albicans*'ın opak fenotipinde, Sap2 ve Sap3'ün ise *Candida*'nın hem opak hem de beyaz tip de salındığı belirtilmiştir (19,28). Aspartik proteinaz salınımı ortamın içeriğine de bağlıdır, Sap4, Sap5 ve Sap6 nötral pH'da aktive olurken Sap2 asidik pH'da aktif olduğu belirlenmiştir (15,28).

Sap genleri dokuya invazyonda aracılık ederler ve infeksiyonun farklı dönemlerinde, farklı salınım sağlarlar (30). Çalışmalarda belli Sap genlerinin (Sap1-3) deri ve mukoza infeksiyonlarında, diğerlerinin ise sistemik infeksiyonlarda (Sap4-6) önemli olduğu anlaşılmıştır (14,31,32). Sap4-6 geniş hifal formasyondan, Sap8 penetrasiyondan ve Sap1-2 ise erken invazyondan sorumlu tutulmaktadır (33).

Kutanöz kandidiyazis vakalarında en fazla salınan salgısal aspartik proteinaz Sap1 ve Sap2'dir, bunları sırasıyla miktarlarına göre Sap8 > Sap6 > Sap3 izler. *C.albicans*'ın neden olduğu Stratum corneum yüzeysel infeksiyonları sırasında da Sap1 ve Sap2 tespit edilmiştir. Derin invazyonda ise ek olarak Sap8'in salındığı saptanmıştır (34).

Sap ailesi üyelerinden, Sap1 ve Sap2 *Candida* vajinitlilerinde önemli bir role sahiptir. Bu infeksiyonların tedavisinde alternatif olarak orjinal bir hedef oluşturmaktadır (14,35).

Oral kandidiazisli hastalarda ve oral *Candida* taşıyıcısı hastaların *C.albicans*'ında Sap2, Sap4, Sap5 ve Sap6 baskın olarak bulunurken, Sap1 ve Sap3 yalnız oral kandidiazisli

hastalarda saptanmıştır (25,36). Sap1-3 mantarların dokuya invazyonundan 42 saat içinde salınmaktadır (33). Yapılan bir çalışmada *C.albicans* kökenlerinin glikoz katılmış insan tükürüğünde Sap salgılanması non-*albicans* göre daha proteolitik bulunmuştur. Oral kandidiyazisli vakalarda tükürüğün total protein içeriğinin salgısal aspartik proteinaz salgılanmasını etkilediğini ve oral kandidiyazis oluşturmasında karbonhidrat diyeti ile de bu enzimin etkin rol oynamalarının kuvvetli olasılık olduğu bildirilmiştir (37).

In vivo çalışmalarda gastrointestinal infeksiyonlarda Sap 4-6'nın çok önemli olduğu ayrıca Sap1-3'ünde rol oynadığı bildirilmiştir. Özellikle Sap2 gastrointestinal sistemdeki musin tabakasını hasara uğratmakla ilişkilendirilmiştir (36). Özafagial mukozanın kandidiyazisinde Sap5 ve Sap6 güçlü aktivite gösterir, bununla beraber Sap1-4'ün aktivitesi daha düşük düzeylerle sınırlıdır (38).

Intraperitoneal infeksiyonlarda, karaciğer ve böbrek tutulumundan 48 saat sonra çok güçlü bir Sap6 aktivasyonunun ardından, daha az oranda Sap2 ve Sap5 aktivasyonu olmaktadır (38).

HIV hastalarında salgısal asit proteinaz enzimi varlığını araştıran çalışmalarda *Candida* vajinitli HIV pozitif kadınların, HIV pozitif *C.albicans* kolonizasyonlu ve HIV negatif vajinitlilerden anlamlı derecede daha yüksek salgısal asit proteinaz düzeyi gösterdikleri bulunmuştur (39). Ayrıca HIV pozitif oral kandidiyazisli hastalarda salgısal asit proteinaz varlığı kontrol gruplarına göre yüksek olduğu gözlemlenmiştir (40). Diğer yandan *Candida* proteinazlarının HIV proteinazlarına benzerliğinin fark edilmesi ile, bundan faydalanılarak bir kısım HIV aspartik proteinaz baskılayıcı ilaçların *C.albicans*'ların yapışmayla ilgili olan Sap1, Sap2 ve Sap3'ü de baskıladığı ve yapışmayı engellediği ileri sürülmektedir (35).

Salgısal aspartik proteinaz yüksek virulans özelliğinden dolayı gelecekte antimikotiklerin yeni tipleri için en önemli hedef durumuna gelmiştir (40). Proteinaz inhibitörü olan pepstatin A kullanımının *C.albicans*'ın öldürücü infeksiyonunu önleyebilecek, kuvvetli bir proflaktik ajan olabileceğine yönelik invivo hayvan modeli çalışmalar yapılmaktadır (41).

Bunun yanında proteinaz üretimi ile çoklu ilaç direnci arasında ilişki olduğu ve bu direncin efluks pompasını kodlayan genin daha fazla salınımı ile korele olduğu ifade edilmiştir. Buna göre *C.albicans*'lar, subinhibitör konsantrasyondaki flukonazolle karşılaştıklarında hücre dışı proteinaz enzimi salınımında artış gözlemlenmiştir. Bu suşlarla enfekte olan hastalara suboptimal dozlarda flukonazol tedavisi verildiğinde *C.albicans* suşlarının virulansının artacağı bildirilmiştir (42).

### 2.4.3. Fosfolipaz Enzimi

Fosfolipaz enzimi hücre zarında bulunan fosfolipitlerin yıkımında rol oynar. Bu enzimin aktivasyonu ile fosfolipidlerden, lizofosfolipidler meydana gelir ve bunlar biyolojik membranın bozulmasına neden olur (5,22). Fosfolipazlar (PL) parçaladıkları özgül ester bağlarına göre A, B, C ve D olmak üzere dört tipe ayrılmışlardır (5,14).

Hücre dışı fosfolipaz aktivasyonu *Rickettsia rickettsii*, *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* gibi bazı bakterilerde ve bazı protozoonlarda patojenite faktörü olarak gösterilmiştir. Ayrıca yılan ve çeşitli artropod zehirlerinde de bulunmaktadır (43,44). Mantarlardan *C.albicans*, *C.glabrata*, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus* gibi fırsatçı patojen mantarlarda hücre dışı fosfolipazın potansiyel bir virulans faktörü olduğu görüşü ağırlık kazanmıştır (30,45).

İlk yapılan çalışmalarda *C.albicans* tipi maya mantarlarında bulunan fosfolipazların A, B ve C tipinde olduğu, D tipinin bulunmadığı bildirilmiştir (5,19). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise fosfolipaz D enziminin varlığı da bildirilmiş ve PLD1 adlı gen tarafından kodlandığı gösterilmiştir. Bu genin özellikle *C.albicans*'ın dimorfik geçişinde önemli bir role sahip olduğu gözlemlenmiştir (46).

Fosfolipaz A hücrenin mikrozomlarından , fosfolipaz C ise hem mikrozomlardan hem de hücrenin sitozolünden salınır (47).

Bu enzim tipleri arasında ilk saptanan fosfolipaz A ve bunun yıkım ürünü olan lizofosfolipidleri parçalayan lizofosfolipazdır. Bu enzimlerin çevreye salınması ile maya hücrelerinin kendilerine yol açarak invazyon yaptıkları gösterilmiştir (5,48).

Daha sonraki yapılan çalışmalar da bu enzimlere ek olarak fosfolipaz B tespit edilmiştir. Bugün fosfolipaz aktivitesinde en önemli rolü fosfolipaz B'nin oynadığı düşünülmektedir. Bu enzimler hiflerde ve blastosporlarda hücre zarına yakın lokalizedirler (5). Mayanın blastosporları konak hücre membranına bağlanınca değişim için uyarım başlar ve üreme ucunda fosfolipaz enziminin yoğunlaşması ile hif gelişir. Hiflerin membran ile direkt teması enzim aktivitesini artırır ve hifler membranda yayılmaya başlar (14,49).

Fosfolipaz B 1995 yılında pürifiye edilebilmiş, aminoasit dizilimi ve bu dizilimi kodlayan genler (plb1) belirlenerek klonlanması ile fosfolipaz sekresyonu açısından mutant kökenler elde edilmiştir (5). Yapılan çalışmalarda fosfolipaz salgılayan *C.albicans* ile bu enzimi kodlayan genin defekti ile elde edilen enzim eksikli mutant köken fare modellerinde karşılaştırılmıştır. Fosfolipaza sahip ana köken *C.albicans*'ın mutant kökene göre çok virulan olduğu bulunmuştur (5,50). plb1 delesyonunun aderansda herhangi bir bozukluğa yol açmadığı ancak invazyon yeteneğinin azalmasına neden olduğu açıklanmıştır (29).

Son yapılan çalışmalarda fosfolipaz B'yi kodlayan genlerden plb1b aktivasyonun doku invazyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca plb1b'nin hidrolaz ve lizofosfolipaz salınımından da sorumlu olduğu düşünülmektedir (33).

Fosfolipaz C ise mantarlar da dahil bazı önemli hücresel fonksiyonları kontrol eder. Özellikle plazma membran reseptörlerine gelen sinyallerin alınmasında çok önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (51).

#### 2.4.4. Slime Faktör

Slime faktör %40 karbonhidrat ve %27 protein içeren glikokaliks yapısında hücre dışı bir maddedir (52). Slime üretimi *Candida*'lar için bir patojenite faktörü olarak kabul edilmektedir (14,53). Bu faktör, mikroorganizmanın konak hücreye ve yapay yüzeylere adezyonunu sağlayarak etkili olduğu gösterilmiştir (54-56). Bu nedenle slime faktör *Candida*'ların kataterlere, düz yüzeylere, plastik araçlara ve prostatik aletlere yapışmasından büyük oranda sorumlu tutulmaktadır. *Candida*'lar bu yüzeylerde fibrin, fibronektin ve slime faktörü ile birlikte biyofilm tabakası oluşturarak kolonizasyon meydana getirmektedirler. *Candida*'ların bu biyofilmden ayrılmaları ise çoğu kez sepsise yol açmaktadır (52). Fungeminin en yaygın nedeni olan *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.krusei* ve *C.glabrata* gibi *Candida*'larda slime yapımı önemli bir virulans faktörüdür. Özellikle *C.albicans* ve *C.parapsilosis* katatere yapışarak hastane infeksiyonlarına neden olmaktadır (19).

Slime faktör mikroorganizmayı kaplayarak vücudun savunma mekanizmalarından korur. Bu maddenin kemotaktik etkisinin de olduğu, fakat slime tarafından uyarılan polimorf nüveli lökositlerde miyeloperoksidaz salınımının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Bu mikroorganizmanın hücre içinde yaşam süresinin uzamasına ve fagositozdan korunmasına neden olmaktadır (57). Ayrıca slime üreten mikroorganizmalara bağlı infeksiyonların tedavisinin daha güç olduğu gözlemlenmiştir (54).

#### 2.4.5. Germ Tüp- Hif Oluşumu (Dimorfizm)

Hif oluşumu *Candida*'ların aktif semptomatik infeksiyonu ile ilişkilidir. Hif gelişmesi konak dokuya penetrasyonu sağlamaktadır. Hif şekli ile infeksiyon arasındaki sebep sonuç ilişkisi; i) hifin dokuya maya hücrelerinden 50 kat daha fazla yapışması, ii) fagositler tarafından sindirilememesi, iii) klinik örneklerden sıklıkla izole edilmesi, iv) plastik yüzeylere yapışmayı sağlayan fibriller yüzey tabakası oluşturması ve v) lezyondan kazınan materyalde *C.albicans*'ın ekseri hifli şekilde gözlenmesi virulansdaki rolünü kanıtlayan bulgulardır.

*C.albicans*'ların maya formundan hif formuna geçişte hücre yüzey bileşiminde bir çok değişiklikler olmakta ve çeşitli adezinler salınmaktadır. Bu adezinlerden çok yakın zamanda *C.albicans*'da gösterilen Int1p adezinin morfogenezde rolü olduğu ve bu adezini kodlayan INT1 genindeki delesyonun hif oluşumunu ve virulansı önlediği bildirilmiştir (14,15).

#### 2.4.6. Toksinler

*C.albicans*'ın mayamsı fazında da endotoksin benzeri toksinler olduğu gösterilmiştir. Bu toksinler

- i) Yüksek molekül ağırlıklı toksinler (glikoprotein ve kandidoksin): Sağlam hücre ve hücre duvarında bulunurlar. *C.albicans* glikoproteinleri, özellikle mannoproteinler toksik rollerine ek olarak, vücut yüzeylerinde kolonileşmede adhesin olarak görev yaparlar
- ii) Düşük molekül ağırlıklı toksinler: Birbirlerine çok benzerler. Bu toksinler şok oluşturan ve/veya öldürücü aktivite gösteren olarak ayrılırlar (15,19)

#### 2.4.7. Fenotipik Değişim

*C.albicans*'ın fenotipik değişim sistemi ilk defa Soll ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. *C.albicans* kökenlerinin yaklaşık %2-4'ü beyaz-opak değişim sistemine sahiptir. Belirli kökenlerde hücreler yüksek sıklıkla ( $10^{-2}$ - $10^{-4}$ ) ileriye yani yeni hücrelere geçebilir veya geri dönüşebilir. Bu şekilde ve en az yedi koloni tipi arasında, opak fenotip(O) veya beyaz (W) fenotip olarak adlandırılan iki renk arasında sıçrama göstermektedirler. Bu özellik hücre ve koloni yapısı olarak fark edilebilmektedir.

Beyaz fenotipde düzgün (S) yüzeyli beyaz renkli koloniler ve tomurcuklu hücreler meydana gelmektedir. *C.albicans* kökenlerinin çoğu beyaz fenotipindedir. Opak fenotipde geniş yüzeyli, yassı, yüzey pürtüklü (R) gri koloniler ve uzun büyük hücreler oluşmaktadır. Her iki fenotipin özgül gen sayıları farklıdır. Opak tipin hücreleri beyaz tipin hücrelerinin üç

katı kadardır. Opak ve beyaz koloni tiplerinin hücreleri arasında hif oluşturma yeteneği, generasyon süresi , düşük ve yüksek sıcaklıklara duyarlılık farklı olmaktadır (19).

Ayrıca *C.albicans*'ın antifungallere karşı gösterdiği direncin açıklanmasında fenotipik değişim mekanizmalarının tanımlanmasının önemli olduğu ileri sürülmüştür. Azollere direncin mekanizmalarından, antifungallerin dışarı atılımını hızlandırma ve sitokrom P450 hedef enziminin fazla yapımının fenotip değişim ile ilişkisi olduğu düşünölmektedir. Yapılan çalışmalarda beyaz fenotipli kolonilerin flukonazol direnci opak kolonilere göre yüksek bulunmuştur (15).

#### **2.4.8. Hücre Duvarı-Mannoprotein**

*Candida*'ların hücre duvar komponentlerinden mannoprotein, önemli bir virulans proteini olup antijen olarak konağa sunulur. Bu komponentler immünomodölatör etkisi kuvvetli moleküllerdir. Mannan hücrenel veya humoral yanıtı artırır veya baskılar ve bu da infeksiyonun sürekliliğine neden olur. Ayrıca mannan infeksiyonun erken ve serolojik tanısı için en uygun antijendir (14,22).



### **3. MATERYAL ve METOD**

Ağustos 2001-Eylül 2002 tarihleri arasında, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesinin çeşitli poliklinik ve kliniklerinden Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na kültür için gönderilen çeşitli materyallerden elde edilmiş 100 *C.albicans* suşu seçilerek incelemeye alınmıştır. Kökenlerin alındıkları vücut bölgelerine göre dağılımı ve suş sayıları; dolaşım sisteminden 10, vajina salgısı 40, idrar 40 ve oral sürüntüsünden 10'dur.

#### **3.1. İZOLASYON VE İDENTİFİKASYON**

##### **3.1.1. Örneklerin Seçimi**

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi; yoğun bakım servislerinde yatan sondalı ve damar katateri olan hastalara ait idrar ve kan örneklerinde üreyen maya mantarları, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniğine çeşitli jinekolojik yakınmalarla (vajinal akıntı, dış genital bölgede kaşıntı, yanma) başvuran hastalardan istenen vaginal kültürlerden izole edilen maya mantarları, değişik kliniklerden laboratuvarımıza oral kandidiyazis kuşkulu hastalardan istenen oral sürüntü kültürlerinden izole edilen maya mantarları çalışmaya alındı.

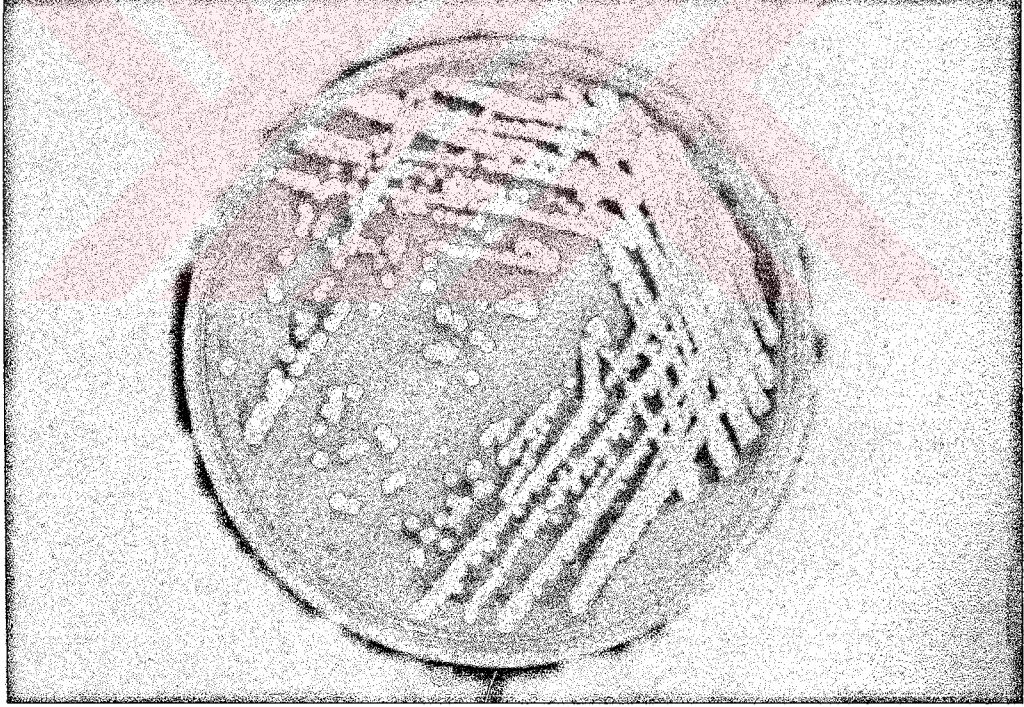
Standart suş olarak, *C.albicans* ATCC 10231 ve *C.albicans* ATCC 90628 suşları kullanıldı.

##### **3.1.2. Kültür ve İzolasyon**

Vajinal akıntı, oral sürüntü, idrar ve diğer mantar kültürü istenen örnekler Sabouraud dekstroza agara (OXOID) ve %5 insan kanlı Mueller-Hinton agara (OXOID) ekilerek, 72 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi.

Kan örnekleri ise BACTEC 9050 kan kültür şişeleri ile laboratuvara gönderilen örnekler, BACTEC 9050 otomatize kan kültür sisteminde ve 37°C'de 5 gün süre ile bekletildi. Üreme sinyali veren örneklerden Sabouraud dekstroza ve %5 insan kanlı Mueller-Hinton agara pasaj yapıldı ve 48-72 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi.

Tüm örnekler için üreme olup olmadığı günlük kontrol edildi. Besiyerlerinde inkübasyon sonrası krema kıvamında, 0,5-1 mm çapında ve kendine has maya kokusu bulunan kolonilerden basit boyama yapılarak, maya kolonisi olduğu kesinleştirildi (Resim-1). Maya olduğu anlaşılan mikroorganizmalara identifikasyon testleri (germ tüp oluşturma, cornmeal agar morfolojisi, karbonhidrat asimilasyon özelliklerinin test edilmesi) yapıldı.



Resim 1. Sabouraud dekstroza agarda *C. albicans* kolonileri (Çalışmamızdan)

### 3.1.2. Germ Tüp Oluşturma Özelliği

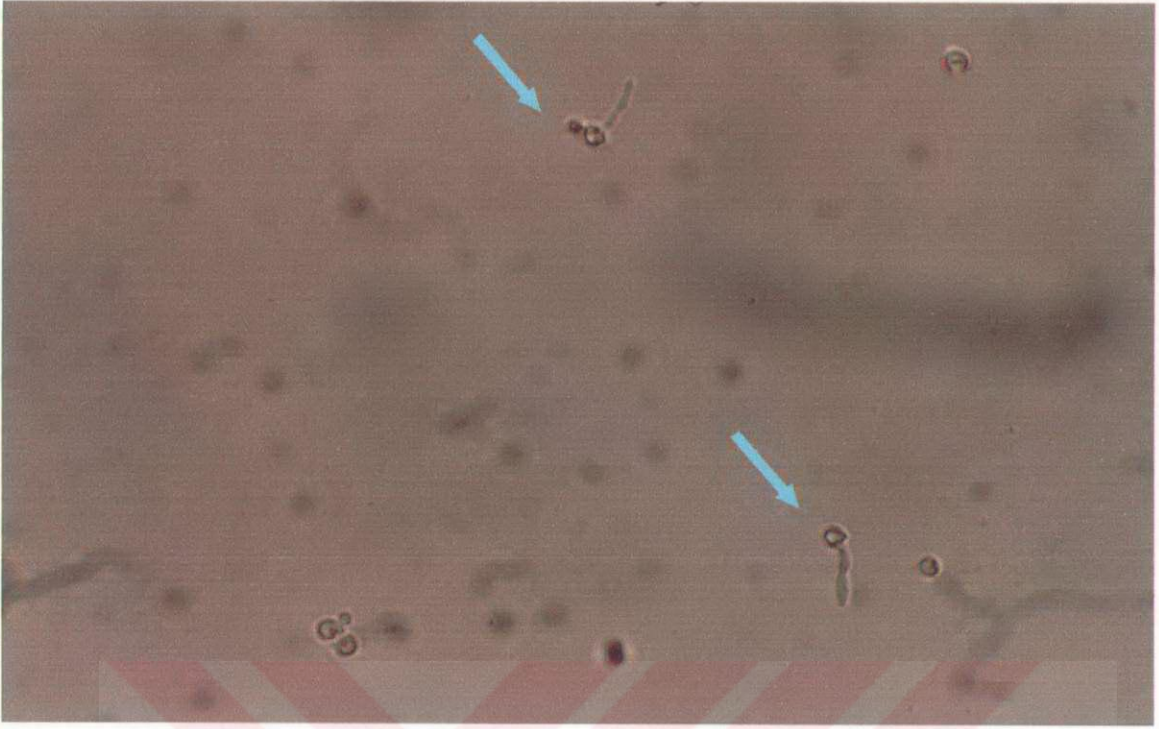
Test edilecek maya kolonisi, 0,5 ml insan serumu bulunan tüp içerisine eklenerek karıştırıldı. 37°C'de 3 saat inkübe edildikten sonra, direkt preperat hazırlanarak ışık mikroskopunda x40 objektifle incelendi. Blastospordan köken alan, başlangıç noktasında boğumlanma göstermeyen ve maya hücresinin 3-4 katı uzunluğundaki hif benzeri yapılar, germ tüp olarak kabul edildi. Ana hücreden boğumlanma göstererek oluşan yapılar, pseudogerm tüp oluşumu olarak değerlendirildi. Germ tüp üreten maya kökenleri *C.albicans* olarak tanımlandı (1,3,10).(Resim-2)

### 3.1.3. Cornmeal Agar Morfolojisi

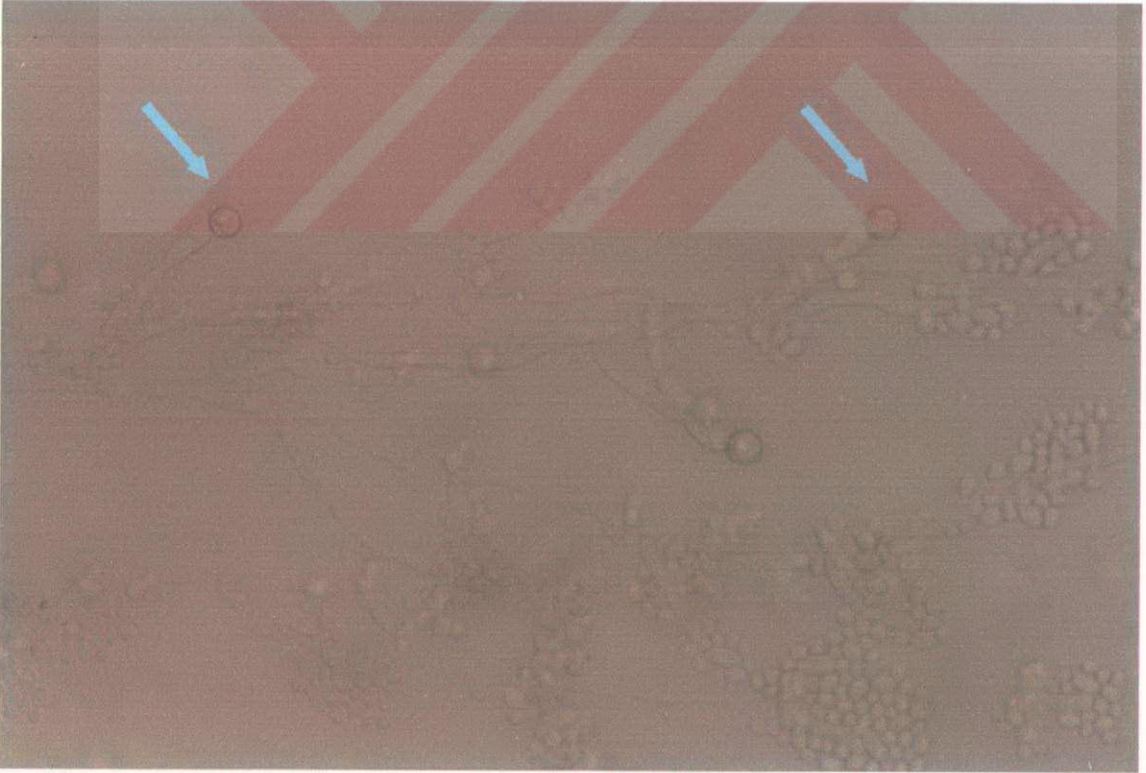
SDA ve %5 insan kanlı Mueller-Hinton agardaki saf maya kolonilerinden iğne uçlu öze ile alınarak cornmeal agar besiyerine, birbirine paralel 3-4 çizgi şeklinde ekim yapıldı. Ekim çizgilerinin üzerini kaplayacak şekilde steril bir lamel kapatıldı. 26°C'de 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüm maya izolatları; ışık mikroskopunda x40 objektif ile klamidospore, blastospore, artrospore, psödohif ve hif oluşturma özelliği yönünden incelendi. Stoplazma içerisinde globüllerin bulunduğu, çok fazla küme yapmamış ve kalın duvarlı klamidosporelara sahip mayalar *C.albicans* olarak tanımlandı (2).(Resim 3)

### 3.1.4. Karbonhidrat Asimilasyon Özelliklerinin Test Edilmesi

Mayaların karbon kaynağı olarak karbonhidratları kullanmaları API ID 32C (bio Mérieux, France) ile test edildi. Bu test panelleri mayaların değişik şekerlere enzimatik etkilerini belirleyen 32 asimilasyon testinden oluşmaktadır. Üretici firmanın doğrultusunda kullanılan başlıca şekerler; sorbitol, D-ksiloz, riboz, gliserol, ramnoz, palatinoz, eritrol, melibioz, glukuronat, melezitoz, glukonat, levulinat, glikoz, sorboz, glikozamin, eskülin, galaktoz, aktidin, sükroz, N-astil-glikozamin, DL-laktat, L-arabinoz, sellobioz, rafinoz, maltoz, trehaloz, 2-keto-glukonat,  $\alpha$ -metil-D-glukozid, mannitol, laktoz, inositol'dür.



Resim 2: *C.albicans* tarafından germ tüp oluşturulması (Çalışmamızdan)



Resim 3: *C.albicans*'ın cornmeal agarda klamidospor ve blastospor oluşturması (Çalışmamızdan)

### **Testin Uygulanması**

Ticari kit içindeki süspansiyon besiyerinde McFarland 2'ye göre maya süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan maya süspansiyonundan sıvı haldeki C besiyerine 100µl aktararak homojenize edildi. C besiyerinden, dehidrate substrat (şeker) içeren 32 kuyucuğun herbirine 135µl dağıtılarak inoküle edildi. Plak daha sonra 30°C'de 48-72 saat inkübe edildi.

### **Test Sonuçlarının değerlendirilmesi**

24-48 saat inkübasyon sonrası; negatif kontrol kuyucuğundan daha bulanık olan kuyucuklar pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi. 48 saat sonra değerlendirilemeyen testler 24 saat daha inkübe edilerek tekrar incelendi ve puanlama sistemi ile gözle veya Mini API (bio Mérieux, France) cihazı ile otomatik olarak tiplendirildi.(Resim 4)

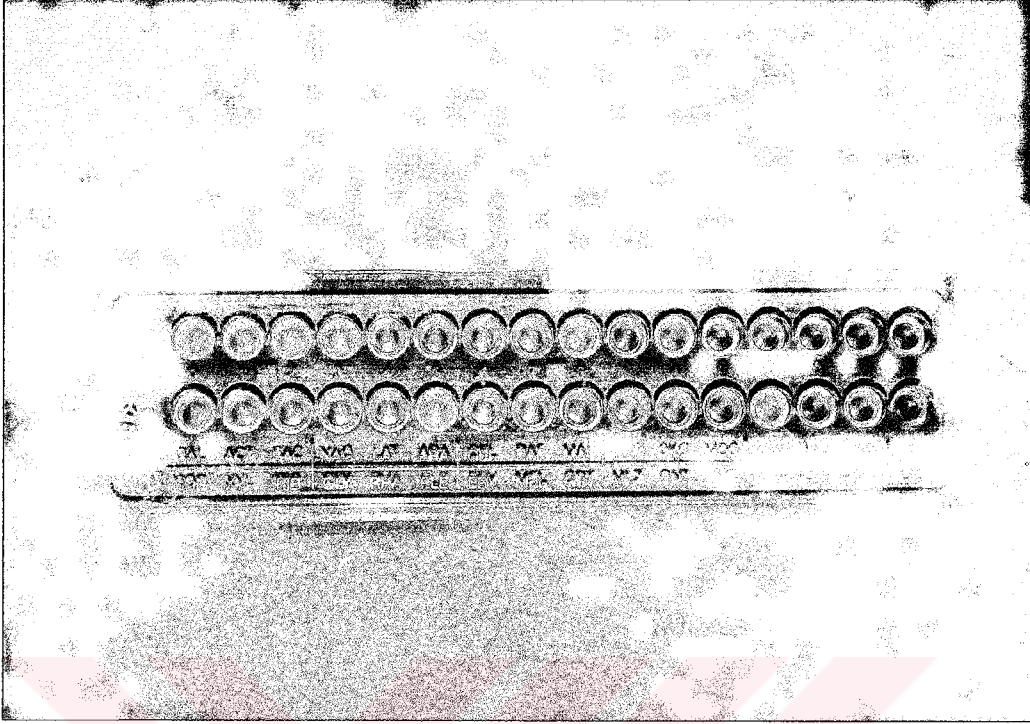
## **3.2. VİRULANS FAKTÖRLERİNİN BELİRLENMESİ**

### **3.2.1. Proteinaz Aktivitesinin Saptanması**

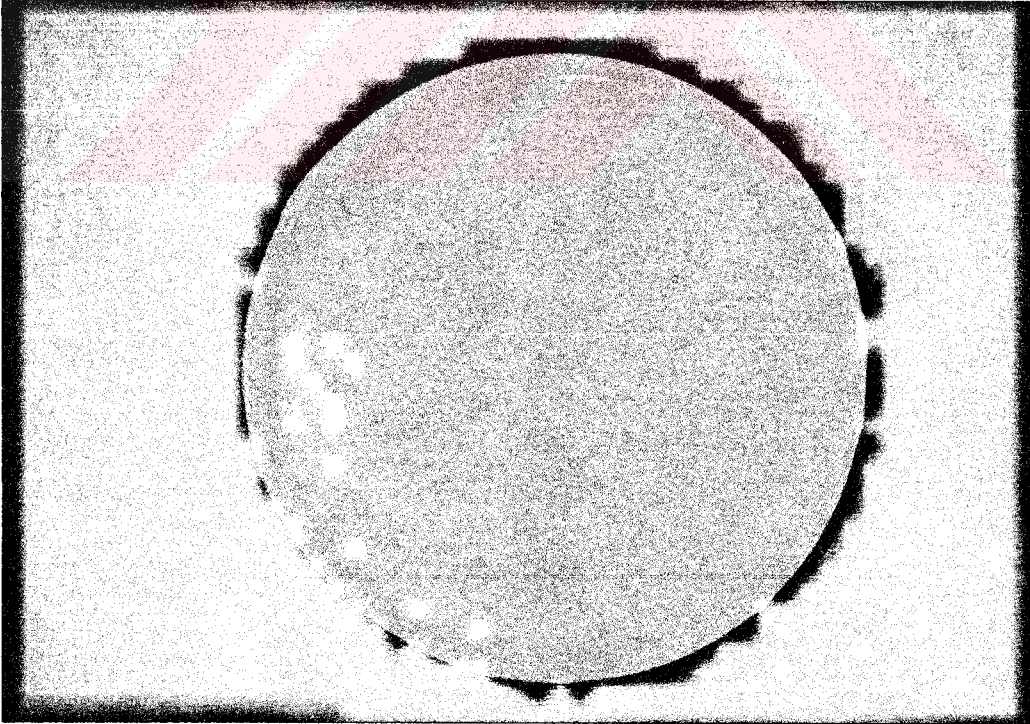
#### **Kullanılan besiyeri ve inokülasyon**

*C.albicans* kökenlerinin proteinaz aktivitesini belirlemek için sığır serum albumin agar (SSAA) kullanıldı. SSAA için %2 glikoz, %0.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, %0.05 MgSO<sub>4</sub> ve %2 agar steril edildi ve pH 4.5'a ayarlandı. Karışım 121°C'de 15 dakika tutularak steril edildi. Daha sonra üzerine %1'lik sığır serum albumin (Sigma) çözeltisi hazırlandı ve 0,20µm çapındaki membran filtre ile steril edildi. Çözelti 45-50°C'ye soğutuldu ve hazırladığımız temel besiyerine %20 oranında ilave edildi. Besiyeri 9cm'lik petri kutularına 15'er ml döküldü.

SDA'da üreyen *C.albicans* kökenleri 3ml'lik steril Sabouraud dekstroz buyyon içeren tüplere alındı ve oda ısısında 48 saat bekletildi. Buyyonda üreyen *C.albicans* suşları santrifuj edildi ve dipte kalan çökelti steril fosfat tamponu (PBS, pH:6) ile 3000 devir/dakika'da 15 dakika santrifuj edilerek 3 kez yıkandı. Çökelti ayrıldı ve steril distile su ile 2 Mc farland



Resim 4: *C.albicans*'ın API ID 32C kiti ile karbonhidrat asimilasyon özelliklerinin test edilmesi (Çalışmamızdan)



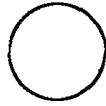
Resim 5: *C.albicans*'ın sığır serum albumin agardaki beşinci gün sonundaki koloni görünümü (Çalışmamızdan)

(yaklaşık  $10^8$  blastokonidya/ml) olacak şekilde ayarlandı. Bu süspansiyondan SSAA besiyerine tek koloni düşecek şekilde ekim yapılarak oda ısısında 96-120 saat bekletildi. 120 saatlik inkübasyon sonunda beyaz, saydam koloniler oluştu (Resim 5). Daha sonra besiyerlerine %20'lik triklor asetik asit doldurularak 15-20 dakika bekletildikten sonra boşaltıldı ve pH'sı 6 olan PBS ile yıkandı. Plaklar %0.06 amidoblack boyası ile (Merck, 45: 10: 45 oranlarında metanol, asetik asit ve distile su) 10 dakika boyandı. Çözücü (Boyasız 45: 10: 45 oranlarında metanol, asetik asit ve distile su) ile plaklar yıkanarak boya çıkartıldı. PBS ile plaklar tekrar iki kez yıkandı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı (58).

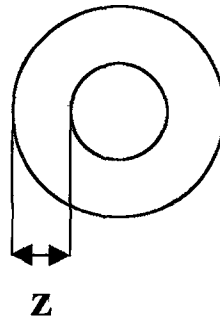
### Proteinaz aktivitesinin saptanması

Proteinaz enzimi salgılayan *C.albicans*'lar SSAA'da protein kaynağı olarak bulunan serum albumini parçalayarak koloni çevresinde şeffaf zonlar oluşturdu. Daha sonra amidoblack boyası ile plaklar boyanarak proteinazın varlığını gösteren zonların görülebilmesi sağlandı. Plaklar kurutulduktan sonra koloni çevresindeki şeffaf zonlar (Z) alttan ışık verilerek incelendi (Şekil-1). Koloni etrafında şeffaf zonu olmayanlar negatif (Resim 6), koloni köşesinden itibaren 1-2mm'lik şeffaf zon oluşturanlar bir pozitif (+) (Resim 7), 3-5 mm'lik zon oluşturanlar ise iki pozitif (++) olarak değerlendirildi (58).

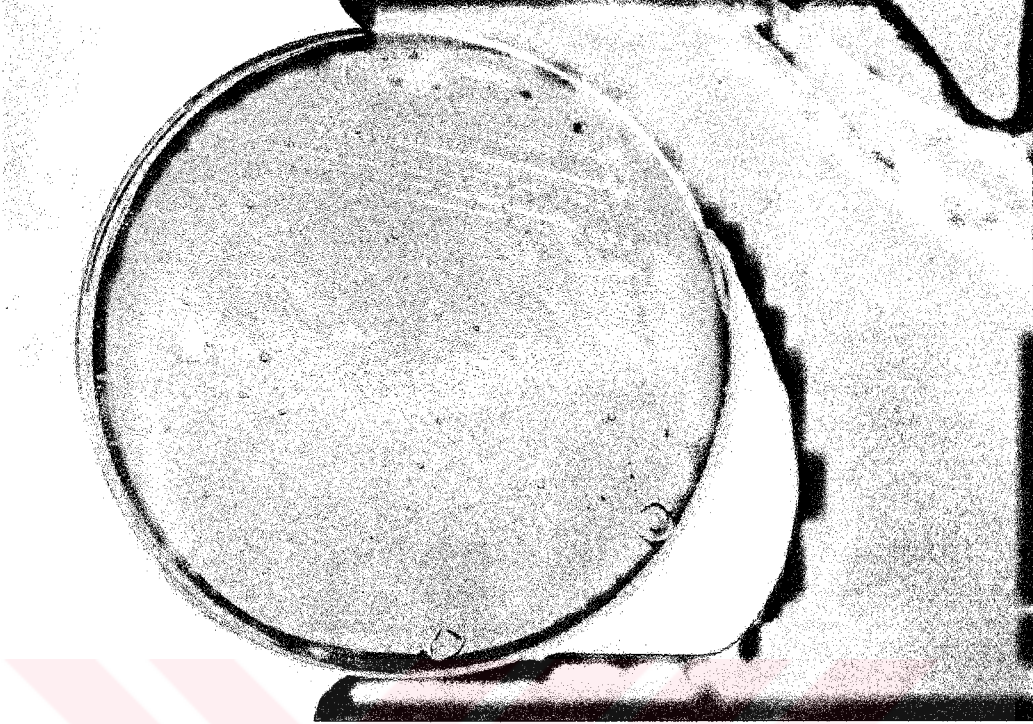
NEGATİF



POZİTİF



Şekil 1: Proteinaz aktivitesinin saptanması



Resim 6: *C.albicans*'ın sığır serum albumin agardaki proteinaz aktivitesi negatif koloni görünümü (Çalışmamızdan)



Resim 7: *C.albicans*'ın sığır serum albumin agardaki proteinaz aktivitesi pozitif koloni görünümü (Çalışmamızdan)



### 3.2.2. Fosfolipaz Aktivitesinin Saptanması

#### **Kullanılan besiyeri ve inokülasyon**

Yöntem olarak ilk defa Price ve arkadaşlarının tarif ettiği ve daha sonra Samaranayeke tarafından modifiye edilen yumurta sarılı agar (YSA) plak yöntemi kullanıldı. Besiyeri olarak 1 M sodyum klorür, 0.005 M kalsiyum klorür ve %8 steril yumurta sarısı eklenmiş SDA kullanıldı.

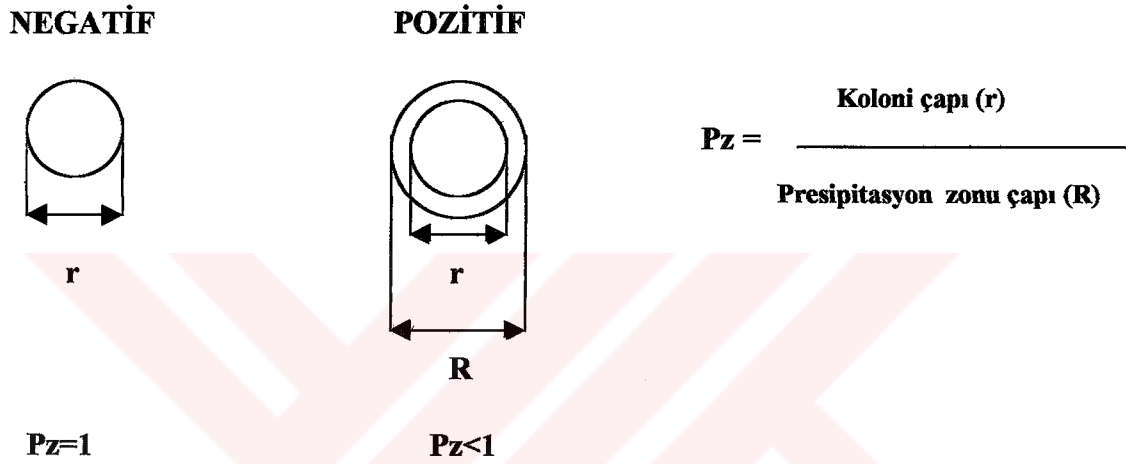
Yumurta sarısı 1000 g'de 15-20 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üstteki sıvı atıldı çökeltiyeye steril distile su eklenerek ilk volümüne getirildi. Hazırlanan yumurta sarısı içerisinde 1 M NaCl<sub>2</sub> ve 0,005 CaCl<sub>2</sub> bulunan ve 121°C'de 10 dakika tutularak steril edilen SDA'ya eklendi. Eşit miktarda sitrik asit ve disodyum hidrojen fosfat tamponu ile besiyeri steril koşullarda karıştırılarak pH 4.3 olacak şekilde ayarlandı.

SDA'da üretilen *C.albicans* kökenlerinden serum fizyolojik ile Mc Farland 1'e uygun bulanıklıkta süspansiyonlar hazırlandı. Plak 4 veya 6 eşit parçaya bölündü ve bu süspansiyondan 10µl alınarak ekimler yapıldı. Plaklar 30°C'de nemli ortamda dört gün bekletildi (59). Fosfolipaz enzimi salgılayan *C.albicans*'lar YSA'da fosfolipid kaynağı olarak bulunan yumurta sarısını parçalayarak, koloni çevresinde yağ asitleri ve kalsiyum kompleksi halinde presipitasyon zonu oluşturdu (60). Dört gün sonra koloni etrafında presipitasyon zonu oluşturanlar, fosfolipaz aktivitesi yönünden pozitif kabul edilerek aktiviteleri ölçüldü.(Resim 8)

#### **Fosfolipaz aktivitesinin saptanması**

Fosfolipaz aktivitesinin ölçülmesinde ve hesaplanmasında , dört gün sonra koloninin etrafında oluşan belirgin halka şeklindeki presipitasyon zonu (Pz) dikkate alındı. Fosfolipaz aktivitesi (Pz) koloni çapının, koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı (r/R)olarak hesaplandı.(Şekil-2)

Bulunan Pz katsayılarına göre Pz aktiviteleri dört grupta değerlendirildi; 0.9-1 (+) çok yüksek Pz grubu, 0.89-0.80 (++) yüksek Pz grubu, 0.79-0.70 (+++) düşük Pz grubu ve <0.69 (++++) çok düşük Pz grubu olarak adlandırıldı. Bu değerlendirmeye göre Pz değeri küçüldükçe fosfolipaz aktivitesi artmakta, Pz=1.00 değeri negatif fosfolipaz aktivitesini göstermektedir. Bu durumda 0.9-1.00 değerine sahip olanlar fosfolipaz aktivitesi çok düşük grubu; <0.69 olanlar fosfolipaz aktivitesi çok yüksek grubu oluşturmaktadır (61).

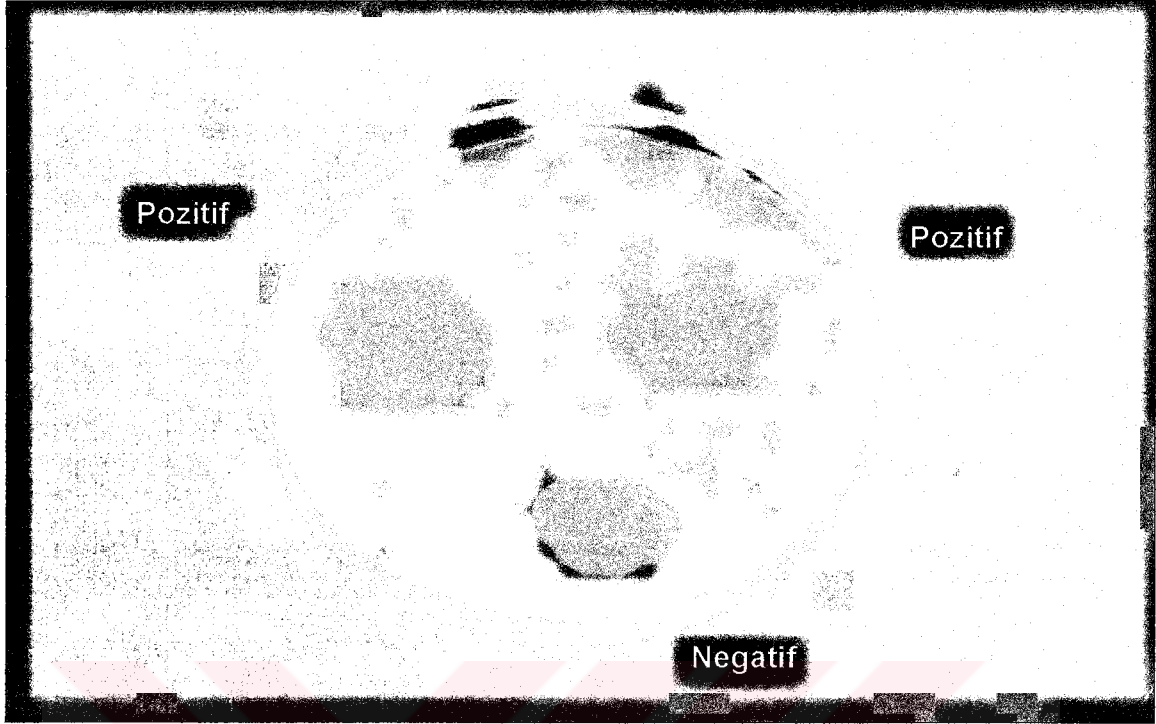


Şekil 2: Fosfolipaz aktivitesinin saptanması

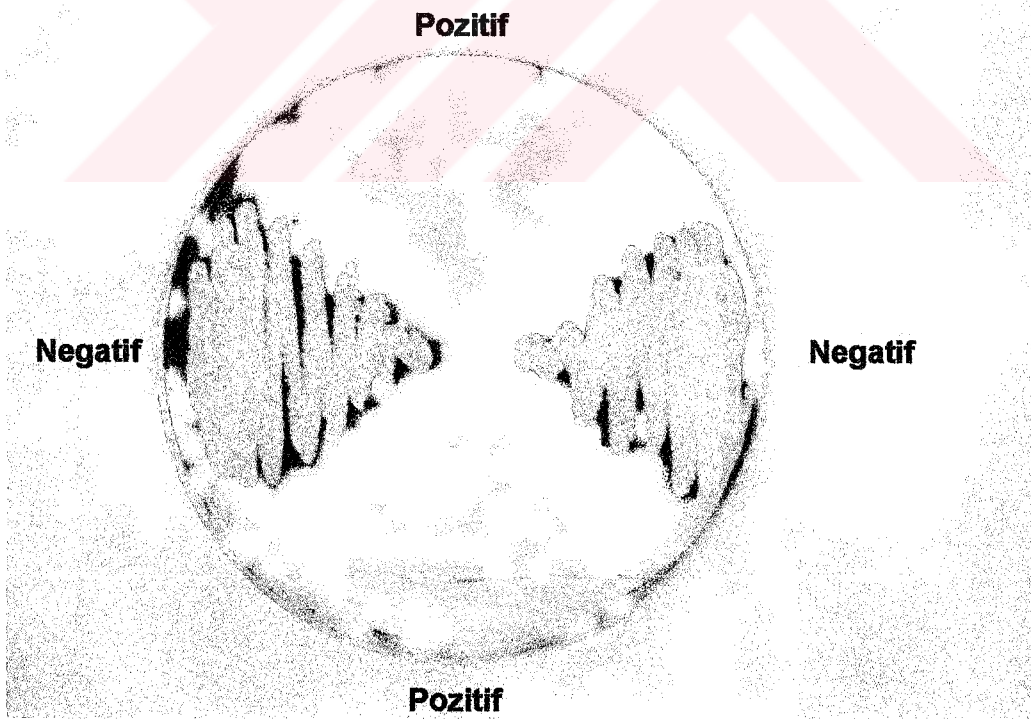
### 3.2.3. Slime Faktörün Tespiti

#### Kullanılan besiyeri ve inokülasyon

Slime faktör varlığı Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon (KKBKI) agar yöntemi ile incelendi. Daha önce stafilokoklar için tanımlanan bu besiyeri mayalar için Hilmioğlu ve ark (53) tarafından modifiye edildiği gibi litrede 80 g glikoz, 50g sakkaroz, 37g beyin-kalp infüzyon agar, 22g triptik soy agar ve 0,8g Kongo kırmızısı olacak şekilde hazırlandı (62,63). Karışıma 1000ml distile su eklenerek karıştırıldı ve otoklavda 121°C'de 10 dakika tutularak steril edildikten sonra, 9 cm'lik petrilere döküldü. SDA'daki test edilecek *C.albicans*



Resim 8: *C.albicans*'ın yumurta sarılı agardaki fosfolipaz aktivitesi pozitif ve negatif suşların görünümü (Çalışmamızdan)



Resim 9: *C.albicans*'ın kongo kırmızılı beyin kalp infüzyon agardaki slime aktivitesi pozitif ve negatif kolonilerin görünümü (Çalışmamızdan)

kökenlerin bir plakta en fazla dört köken olacak şekilde pasajları yapıldı. Pasajlar 35°C’de 48 saat inkübe edildi.

### **Slime faktörünün saptanması**

KKBKI agar yönteminde slime varlığı kongo red fenomenine göre değerlendirildi. KKBKI agar yöntemini ilk tarif eden Freeman va arkadaşları “kongo red fenomeninin” kesin mekanizmasının bilinmediğini, ama renk değişikliğinin inkübasyonun ileri aşamalarında oluşan ikinci bir ürünün olayın içine girebileceği şeklinde ifade etmişlerdir (64). KKBKI agarda süre sonunda koyu kırmızı koloni oluşturan *C.albicans*’lar slime olumlu, pembe koloni oluşturanlar ise olumsuz olarak değerlendirildi (53).(Resim 9)

### **3.3. İSTATİSTİK**

*C.albicans* suşları için elde edilen virulans faktörlerinin olumluluğu ile suşların izole edildikleri bölgeler arasındaki ilişki çok gözlü düzende  $X^2$  testi ile değerlendirildi. Fosfolipaz aktivitesi pozitif *C.albicans* suşları için elde edilen ortalama Pz değerleri ile izole edildikleri bölgeler arası ilişki ise ortalama arasındaki farkın önemlilik testi ile değerlendirildi

#### 4. BULGULAR

Bu çalışmada kan (10), idrar (40), vaginal sürüntü (40) ve oral sürüntü (10) örneklerinden izole edilen toplam 100 *C.albicans* suşu test edildi.

Çalışmada SSAA kullanılarak değişik kliniklerden izole edilen *C.albicans* suşlarının 64'ünde proteinaz aktivitesi tespit edildi. Proteinaz aktivitesi pozitif suşların hepsi bir pozitif (+) olarak saptandı, iki pozitif (++) proteinaz aktivitesi saptanmadı. Klinik örnekler arasında en yüksek proteinaz aktivitesi vajinal akıntı örneklerinden (%67.5) elde edildi (Tablo 3). Oral sürüntü örnekleri ile kan örnekleri aynı oranda (%60) proteinaz aktivitesi gösteriyordu. Fakat numunelerin alındığı yer ile suşların proteinaz üretimi arasında istatistiksel bir fark ( $P>0.05$ ) gözlenmedi.

**Tablo 3. SSAA'da *C.albicans* suşlarının klinik örneklere göre proteinaz aktiviteleeri**

Numune (Adedi)	Proteinez pozitif	(%)	(+)	(++)	Toplam
Kan (10)	6	(60)	6	-	6
İdrar (40)	25	(62.5)	25	-	25
Vajen (40)	27	(67.5)	27	-	27
Oral sürüntü (10)	6	(60)	6	-	6
TOPLAM (100)	64	(64)	64	-	64

(+): zon çapı 1-2mm, (++): zon çapı 3-5 mm, ( $\chi^2= 0.94, P>0.05$ )

Test edilen *C.albicans* izolatlarının izole edildikleri klinik örneklere göre fosfolipaz sonuçları tablo-4’de özetlenmiştir. Çalışmaya alınan izolatların %75’inde fosfolipaz aktivitesi saptandı. Klinik örneklere göre değerlendirme yapıldığında; en yüksek aktivite vajinal akıntı örneklerinde (Ort.Pz=0.819±0.12) ve en düşük aktivite oral sürüntü örneklerinden (Ort.Pz=0.906±0.094) gözlemlendi. Tüm örnekler için ortalama fosfolipaz aktivitesi 0.868±0.112 bulundu. Klinik izolatların, izole edildikleri bölgelere göre fosfolipaz değerleri ve aktivite pozitifliği açısından anlamlı farklılık ( $P<0.05$  ve  $X^2=0.93$ ,  $P>0.05$ ) göstermediği belirlendi.

**Tablo 4. *C.albicans* izolatlarının izole edildikleri klinik örneklere göre fosfolipaz sonuçları.**

Numune (Adedi)	Fosfolipaz pozitif	(%)	Ort Pz ± SD	Minimum	Maksimum
Kan (10)	7	(70)	0.884±0.114	0.68	1.00
İdrar (40)	29	(72.5)	0.865±0.107	0.64	1.00
Vajen (40)	32	(80)	0.819±0.120	0.58	1.00
Oral sürüntü (10)	7	(70)	0.906±0.094	0.76	1.00
TOPLAM (100)	75	(75)	0.868±0.112	0.58	1.00

( $P<0.05$ )( $X^2=0.93$ ,  $P>0.05$ )

Tablo 5’de test edilen *C.albicans* suşlarının kliniklere göre ürettikleri fosfolipaz ve proteinaz enzimlerinin farklı profillerinin dağılımı gösterilmiştir. Çalışmada yalnız idrar örneklerinden izole edilen *C.albicans* suşlarının salgıladıkları proteinaz ve fosfolipaz enzimleri arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $P=0,022 <0,05$ ). Diğer klinik örneklerden izole edilen *C.albicans* suşlarında böyle bir korelasyon saptanmadı.

**Tablo 5. Test edilen *Candida albicans* suşlarının kliniklere göre ürettikleri fosfolipaz ve proteinaz enzimlerinin farklı profillerinin dağılımı.**

ENZİMLER	Kan (10)	Oral sürüntü (10)	Vajen (40)	İdrar (40)	Toplam
Proteinaz (+) Fosfolipaz (+)	4	3	20	15	42
Proteinaz (+) Fosfolipaz (-)	2	3	7	10	22
Proteinaz (-) Fosfolipaz (+)	3	4	12	14	33
Proteinaz (-) Fosfolipaz (-)	1	0	1	1	3

Slime oluşumu açısından Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon agarda test edilen 100 *C.albicans* izolatının 48'i pozitif bulundu. İzolatlar arasında en yüksek slime aktivitesini idrar ve kan örneklerinde (sırasıyla %52.5 ve %50) gözlemlendi (Tablo-6). Slime aktiviteleri yönünden klinik numunelerin alındığı yerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ( $P>0.05$ ) bulunmadı.

**Tablo 6. KKBKI agarda *C.albicans* suşlarının klinik örneklerle göre slime aktiviteleri**

Numune (Adedi)	Slime pozitif	(%)	Slime negatif	(%)
Kan (10)	5	(50)	5	(50)
İdrar (40)	21	(52.5)	19	(47,5)
Vajen (40)	18	(45)	22	(55)
Oral sürüntü (10)	4	(40)	6	(60)
TOPLAM (100)	48	(48)	52	(52)

( $\chi^2=0,74$ ,  $P>0.05$ )

## 5. TARTIŞMA

Son yıllarda sistemik mikoz etkenlerinin sayısının artması ile birlikte morbidite ve mortalitede de bu artışın gözlenmesi dikkatleri bu konu üzerine çekmiştir. Mantar patogenezi için bir çok in vitro test geliştirilmiştir. Bunun yanında hayvan modellerinde infeksiyon oluşturularak konağın savunma sistemi ve *Candida*'ya ait virulans faktörlerinin önemi ortaya çıkarılmıştır. Böylece yeni tedavi alternatifleri geliştirilmeye başlanmıştır. Benzeri çalışmalar ve özellikle virulans faktörleri ile ilgili çalışmalar çoğunlukla *C.albicans* prototipi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Çünkü *C.albicans* hala en sık görülen ve tıbbi açıdan en önemli maya türüdür (15,19,65).

*Candida* infeksiyonlarının patogenezi mantarla ilgili konakçı dokusunda hasarların oluşmasında bu mantarların virulans faktörlerinin önemi büyüktür. Mantarın virulans faktörü sayesinde, konak hücre membranlarının bütünlüğünü ve işlevleri bozularak hücre ölümü gerçekleşir. Sonuç olarak doku hasarı ve mantarların invazyonu kolaylaşır (7).

*Candida*'larda asit proteinaz varlığı ilk defa 1965 yılında Staib tarafından saptanmış ve 3 yıl sonra Remold ve Fasold proteinaz enzimini saflaştırarak tiplendirmişlerdir (22,66,67). Hücre dışı proteinazların patojen *Candida*'larda doku harabiyetini, mayanın yayılımını desteklediği, mayanın mukoz membranlarda devamlı kalmasını sağladığı ve mayayı organizmanın savunma sistemine karşı koruduğu belirtilmektedir. Ray ve ark.(23) kutanöz enfeksiyonlara yol açan *Candida* türlerinde daha yüksek düzeyde asit proteinaz saptamışlar ve bunun *Candida* kolonizasyonunda ve deri invazyonunda potansiyel bir virulans faktörü olduğunu öne sürmüşlerdir. *C.albicans* suşlarının in vitro proteinaz aktivitesi amonyum içermeyen fakat nitrojen kaynağı olarak bir protein (özellikle sığır albumini) içeren besiyerlerinde gösterilmektedir (21).

Yücesoy ve ark.(58) SSAA ve yumurta sarılı agar (YSA) kullanarak yaptıkları karşılaştırmalı çalışmada YSA'nın proteinaz aktivitesini saptamada uygun bir yöntem olmadığını bulmuşlardır. Aynı çalışmada oral kandidiazisli 31 hastadan izole edilen



*C.albicans* suşlarını, sağlıklı bireylerden izole edilen 30 suşla karşılaştırdıklarında; hastaların 3'ünde (%9.7) iki pozitif, 16'sında (%51.6) bir pozitif, kontrollerin ise 10'unda (%33.3) bir pozitif proteinaz aktivitesi saptamışlardır. Her iki grup arasındaki fark anlamlı bulunmuştur.

Yapılan diğer bir çalışmada ise hemoglobin, albumin ve kazein içeren besiyerleri denenmiş ve üç besiyeri arasında uyum saptanmıştır (67). Çalışmada kullanılan 75 *C.albicans* suşunun 65'inde (42'si bir pozitif, 23'ü iki pozitif) proteinaz aktivitesi tespit etmişlerdir (67). Kazein agar yöntemi kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada 51 *C.albicans* suşunun % 49'unda proteinaz aktivitesi saptanmıştır (68).

Erdeniz ve ark.(65) *C.albicans* etken olduğu vulvovajinal kandidiyazisli hastalarda yaptıkları çalışmada, 31 suşun yedisini bir pozitif ve 24'ünü iki pozitif bulmuşlardır. Araştırmacılar çalışmalarında proteinaz aktivitesini belirlemede SSAA kullanmışlar, sonuçları kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek saptamışlardır (65).

Kantarcioglu ve ark(68)'nin değişik klinik örneklerden izole edilen *Candida* türleriyle yaptığı çalışmada 60 *C.albicans* suşunun 57'sinde (%95) proteinaz aktivitesi tespit etmişlerdir. Ener ve ark.(69) ise bu oranı %89.2 olarak bulmuşlardır. Değişik klinik örnekleri kapsayan bir diğer *C.albicans*–asit proteinaz çalışmasında Gülenç ve ark.(70) 113 *C.albicans* suşunun %50.4'de proteinaz aktivitesi saptamışlardır.

Akbaş ve ark.(71) klinik örneklerden izole ettikleri *C.albicans* izolatlarını flora üyesi *C.albicans* izolatları ile karşılaştırmış ve klinik örneklere ait 73 *C.albicans* izolatının %73.9'unda, 34 flora izolatlarının ise %29.4'ünde proteinaz aktivitesi gözlemişlerdir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Suudi Arabistan kadınlarında vajinit etkeni *Candida*'larla yapılan çalışmada; *C.albicans* ve *C.parapsilosis* izolatlarının tümünün (%100), *C.tropicalis* türlerinin %95'nin asit proteinaz ürettiği bildirilmiştir (72). Yurt dışında yapılan diğer çalışmalarda ise Rùchel ve ark.(73) 103

*C.albicans* suşunun 74'ünde, Chakrabarti ve ark.(74) 227 *C.albicans* suşunun % 60'ında proteinaz aktivitesi gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada proteinaz varlığının gösterilmesi için, Yücesoy ve ark.(58) tarafından altın standart olarak kabul edilen SAAA'ı kullanıldı. Çalışmada; 100 *C.albicans* suşunun 64'ünde (%64) proteinaz varlığı saptandı. En yüksek proteinaz aktivitesi (%67.5) vajenden elde edilen suşlarda bulundu, fakat bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu sonuçlara göre elde ettiğimiz oranlar diğer çalışmalarla uyumludur ancak çalışılan suşların hepsinde proteinaz aktivitesi bir pozitif bulunduğundan, bu aktivitenin düşük düzeyde olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

*C.albicans* izolatları için en önemli virulans faktörlerinden biri olan fosfolipaz enzimi, konak hücreyi lizise uğratmakta veya hücrenin yüzey özelliklerini değiştirmektedir. Bu değişiklikler sonucu mantarın dokuya adezyonuna ve penetrasyonuna yardımcı olduğu düşünülmektedir. Ortaya çıkan bu etkiler nedeniyle fosfolipaz enzimi infeksiyonun patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (44,75). Fosfolipaz enziminin varlığı kadar miktarıda önem taşımaktadır (43,48).

*C.albicans* izolatlarında hücre dışı fosfolipaz aktivitesi biyokimyasal ve mikrobiyolojik yöntemlerle saptanabilmektedir (43). Biyokimyasal yöntemlerin zaman alıcı olması nedeniyle, güvenilir sonuçlar veren pratik bir yöntem olarak ilk kez Price tarafından öne sürülen daha sonra modifiye edilen "plak yöntemi" kullanılmaktadır. Price tarafından önerilen 48 saatlik inkübasyonun yetersiz kalması nedeniyle, bu süre 4 güne çıkarılarak Samaranayake tarafından modifiye edilmiştir (60). Modifiye Price yöntemi ile yapılan çalışmaların güvenilir sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Bu yöntem, fosfolipaz enzimleri arasından özellikle fosfolipaz B enzimini saptamaktadır (44,76).

Fosfolipaz enzimini tespit etmek için modifiye Price plak yönteminin kullanıldığı çalışmalarda Arıkan ve ark.(60) 258 *C.albicans* suşunun 203'ünde (%78.7), Yücel ve ark.(61) 54 *C.albicans* suşunun 51'inde (%94.4), Yücesoy ve ark.(77) 175 *C.albicans* suşunun

120'sinde (%68.6), Kantarcioğlu ve ark.(68) 60 *C.albicans* suşunun 56'sında (%93.3), Ener ve ark.(69) 28 *C.albicans* suşunun 16'sında (%57.1) fosfolipaz aktivitesi bulmuşlardır. Aynı yöntemi kullandığımız çalışmada, incelenen 100 *C.albicans* suşunun 75'inde (%75) fosfolipaz aktivitesi saptandı. Çalışmada elde edilen oran, diğer çalışmalarla uyumludur.

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *C.albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesi değişik oranlarda ifade edilmektedir (60,77,78). Arıkan ve ark.(60) idrar, ağız, vajinal akıntı ve kan örneklerinden izole edilen *C.albicans* suşlarında sırasıyla %76.4, %77.9, %82,5 ve %71.4'ünde; Yücesoy ve ark.(77) oral sürüntü, kan, idrar ve vajinal sekresyon izolatlarında sırasıyla %78.6, %68.4, %66.7 ve %72.7'sinde fosfolipaz aktivitesi saptamışlardır. Yurt dışında yapılan çalışmada ise Price ve ark.(78) kan ve idrar örneklerinden soyutlanan suşlarda sırasıyla %55 ve %30'unda fosfolipaz aktivitesi tespit etmişlerdir. Bu çalışmada fosfolipaz aktivitesinin klinik bölgelere göre dağılımı incelendiğinde vajinal akıntı, idrar, kan ve oral sürüntü örneklerinden izole edilen suşların sırasıyla %80, %72.5, %70 ve %70 oranında fosfolipaz aktivitesi gösterdikleri izlendi. Çalışmada saptanan oranlar diğer çalışmaların sonuçları ile paralel doğrultudadır.

Yücesoy ve ark.(59)'nın oral kandidiyazisli hastalar ile sağlıklı bireylerin oral sürüntü örneklerini fosfolipaz aktivitesi yönünden karşılaştırdığı çalışmada; hastalardan izole edilen suşların fosfolipaz aktivitesi (%76.9) sağlıklı bireylerden izole edilen suşlardan (%55.5) anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Oral sürüntü örnekleri ile yapılan çalışmalarda Samaranayake ve ark.(79) 28 oral izolatın %79'u, Williamson ve ark.(80) 100 oral izolatın %94.1'inde fosfolipaz pozitif bulmuşlardır.

Yücel ve ark.(61) en yüksek fosfolipaz aktivitesini ürogenital sistem kökenlerinde (Ort.Pz=0.78±0.10) ve en düşük aktiviteyi de ağız boşluğundan izole edilenlerde (Ort.Pz=0.81±0.14) gözlemlemişlerdir. Yücesoy ve ark.(77) ise fosfolipaz aktivitesini ortalama olarak 0.702±112 tespit etmişlerdir

Bu çalışmada ise klinik örneklerle göre değerlendirme yapıldığında; en yüksek aktivite vajinal akıntı örneklerinden (Ort.Pz=0.819±0.12) ve en düşük aktivite oral sürüntü örneklerinden (Ort.Pz=0.906±0.094) elde edildi. Tüm örnekler için ortalama fosfolipaz aktivitesi 0.868±0.112 bulundu. Yapılan çalışmalarda (69,60,77) ve bizim çalışmamızda klinik örneklerin izole edilen *C.albicans*'ların izole edildikleri bölgelere göre fosfolipaz aktivitesi açısından anlamlı farklılık göstermediği belirlenmiştir.

Kthavade ve Panthaki(81) hayvan patojenitesi ile ilgili çalışmalarında *C.albicans* izolatlarının fosfolipaz aktivitesi ve böbrek tutulumu arasında önemli bir korelasyon olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılara göre yüksek fosfolipaz aktivitesi gösteren Pz değerleri 0.36-0.45 arasında bulunan suşların her iki böbrekte, Pz değeri 0.45-0.60 arasında olanların tek böbrekte infeksiyon yaptığını fakat 0.65-0.80 arasında aktivite gösterenlerin böbreklerde lezyon yapmadıklarını gözlemlenmiştir (81). Mayser ve ark.(82) Pz değeri 1 olan fosfolipaz negatif türlerin uzun süreler boyunca tekrarlanan ölçümlerinde yine bu değeri gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Yurt dışında yapılan çok merkezli karşılaştırmalı bir çalışmada (44); kandan elde edilen *C.albicans* izolatlarının, sağlıklı bireylerin oral florasından izole edilen izolatlarla oranla çok daha yüksek fosfolipaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (44). Ayrıca bu kan izolatlarının dissemine kandidoz oluşturma riskleri değerlendirildiğinde, yüksek fosfolipaz aktivitesine sahip suşların infekte farede 5.6 kez daha fazla ölüm relatif riskine yol açtığı saptanmıştır.

Barrett bee ve ark.(43)'nin çalışmasına göre bukkal epitel hücrelerine en fazla adhere olan ve farelerde en patojen olan *C.albicans* türlerinin yüksek fosfolipaz aktivitesine sahip oldukları gösterilmiştir. Bu ve diğer çalışmalar göstermektedir ki *C.albicans* suşlarında bu kadar yüksek oranlarda fosfolipaz aktivitesi saptanması, bu enzimin patogeneze önemli olduğunun delilidir.

Yapılan çalışmalarda fosfolipaz B'nin kandidal virulans için gerekli olduğu ve fosfolipaz enzimlerinin tam anlamı ile anlaşılmasının yeni antifungal ilaçların gelişmesinde katkıda

bulunabileceği bildirilmiştir (50). Son zamanlarda fosfolipazların amfoterisin B lipid kompleksinin antifungal aktivitesini artırdığını öne sürmüşlerdir (69). Swenson ve ark.(83) amfoterisin B ile yaptıkları çalışmada; *Candida* veya başka kaynaktan üretilen fosfolipaz enziminin, aktif amfoterisin B'nin ortaya çıkmasında amfoterisin B major lipid kompleksini hidrolize ederek önemli bir rol oynadığını ifade etmişlerdir. Amfoterisin B'ye duyarlı olan ancak amfoterisin B lipid kompleksine dirençli olan *C.albicans* mutantlarının hücre dışı fosfolipaz aktivitesinde defekt olduğunu bildirmişlerdir.

Proteinaz ve fosfolipaz enzimleri hücre dışı salgılanan virulans faktörleridir. Shimizu ve ark.(84) izole ettikleri *C.albicans* suşlarının %73'nün hyaluronidaz, konroidin sülfataz, proteinaz ve fosfolipaz ürettiğini tespit etmişler ve dört enzimi de bulunduran suşların fare deneylerinde %100 mortaliteye neden olduğunu göstermişlerdir. Enzimlerin her hangi birinin eksikliğinde virulansın azaldığını ve proteinaz üretmeyen suşların fosfolipaz üretmeyen suşlara göre daha az virulan olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar 64 *C.albicans* suşunun 46'sında hem proteinaz hem de fosfolipaz aktivitesi bulmuşlardır.

Brezilya'da hastanede yatan çocukların kan ve katater örneklerinden üretilen *C.albicans* ve *C.parapsilosis* suşlarında proteinaz aktivitesi araştırılmış ve izole edilen 80 örneğin %78.8'inde proteinaz aktivitesi saptanmıştır. Aynı suşların %78.8'i fosfolipaz enzimi saptanmamıştır (85).

Videtto ve ark.(86)'nın *C.albicans* kökenlerinde germ tüp oluşturma, fosfolipaz ve proteinaz aktivitesi ve ağız epitel hücrelerine adherensi araştırdıkları çalışmada fosfolipaz ve proteinaz üretimi arasında korelasyon tespit etmemişlerdir. Araştırmacılar fosfolipaz, proteinaz üretimi ve germ tüp arasında korelasyonu yalnızca üriner sistemde gözlemlemişlerdir (86).

Bu çalışmada da yalnız idrar örneklerinden izole edilen *C.albicans* suşlarının salgıladıkları proteinaz ve fosfolipaz enzimleri arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $P=0,022<0,05$ ). Diğer klinik örneklerden izole edilen *C.albicans* suşlarında proteinaz ve fosfolipaz üretimi açısından böyle bir korelasyon saptanmadı.

İlk defa 1982'de Christensen tarafından *Staphylococcus epidermidis* için tanımlanan slime faktör; protein, hekzoaminler, nötral şekerler, fosforlu bileşikler gibi bir çok maddenin oluşturduğu karışık bir yapıdır (63,87). 1990'lı yıllarda artan *Candida* infeksiyonlarının epidemiyolojisine paralel *Candida*'larda slime faktör ilişkisi araştırılmaya başlanmıştır (87). Slime faktörü saptamada mikrodilüsyon plate, standart tüp, Christensen ve Kongo kırmızılı agar yöntemleri gibi bir çok yöntem tanımlanmaktadır. Kongo kırmızılı agar yöntemi ilk kez 1989'da Freeman ve arkadaşları tarafından tarif edilmiştir (64). Yapılan çalışmalarda bu yöntemin özgüllüğünün ve duyarlılığının yüksek olduğu, ayrıca diğer yöntemlerle uyumlu, tekrarlanabilir, besiyerinde görülebilir ve güvenilir olduğu saptanmıştır (62-64,88).

Yurt dışında yapılan slime aktiviteleri çalışmaları daha çok *C.parapsilosis* üzerine yoğunlaşmıştır (56,89). Fakat Kuhn ve ark.(90) yaptıkları çalışmada *C.parapsilosis* biofilmlerinin *C.albicans* biofilmlerine göre daha az hacim kapladığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar *C.albicans* biofilmlerinin özellikle *C.parapsilosis* başta olmak üzere diğer *Candida* türlerine göre kalitatif olarak daha kompleks ve kantitatif olarak daha büyük biofilmler ürettiğini bulmuşlardır (90).

Orhon ve ark.(54) izole ettikleri 82 *C.albicans* suşunda tüp aderans testi ile slime pozitifliğini kateter örneklerinde %20, vaginal sürüntü örneklerinde %10 ve oral sürüntü örneklerinde %16 oranında saptamışlardır. Aynı araştırmacılar antifungal ajanlara dirençli bulunan suşların slime üretimiyle anlamlı bir ilişki bulunmadığını tespit etmişlerdir.

Karaça ve ark.(52) tarafından kan ve vajen örneklerinden izole edilen *C.albicans* suşlarında %77.8 oranında slime pozitifliği saptanmıştır. *C.albicans* izolatları ile yapılan diğer çalışmalarda Yüce ve ark.(55) %11.1, Kalkancı ve ark.(87) %9.3 slime pozitifliği bulmuşlardır. Yapılan bu çalışmalarda da modifiye tüp aderans testi kullanılmıştır (52,55,87).

Hilmioğlu ve ark.(53)'nin *Candida* izolatlarında slime faktörünü tespit etmek için kullandıkları üç farklı yöntemin karşılaştırmalı çalışmasında; Kongo kırmızılı agar yöntemini

daha kolay uygulanabilmesi, çabuk sonuç vermesi, ekonomik olması ve kolay değerlendirilebilmesi nedeniyle önermişlerdir. Bu yöntemle göre kan, vajen, idrar ve oral sürüntüden elde edilen *Candida* izolatlarından sırasıyla %52, %60, %51.1 ve %45 oranında slime pozitifliği bulmuşlardır (53). Kongo kırmızılı agar kullanılan diğer bir çalışmada Zer ve ark.(91) *C.albicans* izolatlarında %53.91 oranında slime pozitifliği gözlemlemişlerdir.

Bu çalışmada Kongo kırmızılı agar yöntemi kullanılarak çalışılan tüm *C.albicans* suşlarında slime faktör pozitifliği %48 bulundu. Sonuçlar Kongo kırmızılı agar yöntemi kullanan araştırmacıların sonuçları ile uyumludur.



## 6. SONUÇ

1. Salgısal aspartik proteinaz enzimi *Candida* infeksiyonlarının patogeneğinde en önemli virulans faktörlerinden biridir. Değişik klinik örneklerden izole ettiğimiz 100 *C.albicans* suşunda aspartik proteinaz varlığını SSAA'da araştırdık. Çalışmada *C.albicans* suşlarının 64'ünde proteinaz aktivitesi bulundu. Klinik örnekler arasında en yüksek proteinaz aktivitesi vajinal akıntı örneklerinden (%67.5) elde edildi. Ancak numunelerin alındığı yer ile suşların proteinaz üretimi arasında istatistiksel bir fark gözlenmedi. Proteinaz aktivitesi pozitif suşların hepsi bir pozitif olarak saptandı, iki pozitif proteinaz aktivitesi saptanmadı. Bu sonuçlara göre elde ettiğimiz oranlar diğer çalışmalarla uyumludur ancak çalışılan suşların hepsinde proteinaz aktivitesi bir pozitif bulunduğundan, bu aktivitenin düşük düzeyde olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

2. *C.albicans* için diğer bir virulans faktörü de fosfolipaz enzimidir. Fosfolipaz enzimi hücre zarında bulunan fosfolipitlerin yıkımında rol oynar. Çalışmada fosfolipaz enzim aktivitesini tespit etmek için modifiye yumurta sarılı plak yöntemi kullanıldı. Çalışmaya alınan izolatların %75'inde fosfolipaz aktivitesi saptandı. Klinik örnekler göre değerlendirme yapıldığında; en yüksek aktivite vajinal akıntı örneklerinde (Ort.Pz=0.819±0.12) ve en düşük aktivite oral sürüntü örneklerinde (Ort.Pz=0.906±0.094) gözlemlendi. Tüm örnekler için ortalama fosfolipaz aktivitesi 0.868±0.112 bulundu ve klinik örneklerden izole edilen *C.albicans*'ların izole edildikleri bölgelere göre fosfolipaz aktivitesi açısından anlamlı farklılık göstermediği belirlenmiştir.

3. *C.albicans* için virulans faktörü olan proteinaz enzimi ve fosfolipaz enzimi her ikisi de hücre dışı salınan enzimlerdir. Çalışmada bu enzimlerin ortak salınımı ile kliniklerden izole edilen *C.albicans*'lar arasında korelasyonu sadece idrar örneklerinden izole edilen *C.albicans* türlerinde anlamlı bulundu. Bu sonuca göre idrardan izole *C.albicans*'lar proteinaz enzimi ile uyumlu olarak fosfolipaz enzimi de salgıladıkları düşünülmüştür.



4. İzole edilen *Candida* türlerinde slime faktör varlığı Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon agar yöntemi ile incelendi. Test edilen 100 *C.albicans* izolatının 48'inde slime aktivitesi pozitif bulundu. İzolatlar arasında en yüksek slime aktivitesini idrar ve kan örneklerinde (sırasıyla %52.5 ve %50) gözlemlendi. Elde edilen oranlar aynı yöntemi kullanan araştırmacıların sonuçları ile uyumludur. Ayrıca çalışmada slime aktiviteleri yönünden klinik numunelerin alındığı yerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Patojen *Candida*'lar arasında *C.albicans* en yaygın etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Normal floranın bir üyesi olan *C.albicans* klinik örneklerden izole edildiğinde gerçek bir patojen mi yoksa floranın bir üyesi mi olduğunun ayırt edilmesi her zaman kolay olmamaktadır. Ayrıca bu potansiyel patojen mantarın nasıl olup da kolonizasyondan invazyon aşamasına geçtiği, hangi mekanizmalarla konak hasarına yol açtığı yeterince açıklanamamıştır. Tüm araştırmacılar *C.albicans*'ın neden olduğu yüzeysel infeksiyondan yaygın kandidoza kadar değişen infeksiyonlarda tek bir virulans faktörünün etkin olmadığı görüşündedirler. Çalışmamızda araştırdığımız üç virulans faktöründen (proteinaz, fosfolipaz ve slime) herhangi birinin farklı örneklerden izole edilen *C.albicans* türleri için tek başına bir virulans faktörü olmadığı, böylece *C.albicans* infeksiyon mekanizmasında bir çok faktörün rol oynayabileceği görüşünün geçerli olduğu sonucuna varılmıştır.

## 7. ÖZET

Bu çalışmada; kan, idrar, vajen akıntısı ve oral sürüntüden izole edilen 100 *C.albicans* kökeni kullanılmıştır. Çalışmada kandidoz patogenezinde etkili virulans faktörleri arasında önem taşıyan proteinaz, fosfolipaz ve slime aktivitelerinin in vitro belirlenmesi, fosfolipaz ve proteinaz enzimi arasında bir korelasyonun olup olmadığı ve suşların izole edildikleri vücut bölgelerine göre sahip oldukları virulans faktörlerinde bir farklılık bulunup bulunmadığı araştırılmıştır.

Proteinaz aktivitesi sığır serum albumin agar (SSAA), fosfolipaz aktivitesi modifiye yumurta sarılı agar (YSA) ve slime aktivitesi ise kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon (KKBKI) agar yöntemi ile incelendi. *C.albicans* suşlarının 64'ünde proteinaz aktivitesi bulundu ve suşların hepsi bir pozitif olarak saptandı. En fazla proteinaz aktivitesi vajinal akıntı örneklerinden (%67.5) elde edildi. Fosfolipaz aktivitesi değerlendirilirken Pz değeri dikkate alındı. En yüksek aktivite vajinal akıntı örneklerinde (Ort Pz=0.819±0.12) ve en düşük aktivite oral sürüntü örneklerinde (Ort Pz=0.906±0.094) gözlemlendi. Tüm örnekler için ortalama fosfolipaz aktivitesi 0.868±0.112 bulundu. Çalışmada *C.albicans* izolatlarının 48'inde slime aktivitesi pozitif bulundu. İzolatlar arasında en yüksek slime aktivitesi idrar (%52.5) ve kan (%50) örneklerinde saptandı. Hücre dışı virulans faktörlerinden proteinaz ve fosfolipaz arasındaki korelasyon sadece idrar örneklerinden izole edilen *C.albicans* suşlarında görüldü, diğer klinik örnekler için bu korelasyon anlamlı bulunmadı. Çalışılan virulans faktörleri ile suşların izole edildikleri vücut bölgeleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi. Sonuç olarak çalışmamızda *C.albicans*'ın neden olduğu infeksiyonun oluşum mekanizmasında mikroorganizmaya ait bir çok virulans faktörünün rolü olduğu kanısına varılmıştır.

## 8. SUMMARY

### IN VITRO INVESTIGATION OF VIRULENCE FACTORS (Proteinase, Phospholipase and Slime) IN *CANDIDA ALBICANS* ISOLATED FROM CLINICAL SPECIMENS

In this study, 100 *C.albicans* isolates from blood, urine, vaginal discharge and oral cavity were used. In this study, in vitro determination of proteinase, phospholipase and slime activities which were important virulence factors and effective in candidiasis pathology were examined and also, whether there was a correlation between phospholipase and proteinase enzymes and whether there was a difference in the virulence factors of the isolates according to the parts of body they were isolated from were examined.

The proteinase activities of the isolates were examined with bovine serum albumin agar (BSAA) method, phospholipase activities with modified egg-yolk agar (EYA) method and slime with congo red brain-heart infusion agar (CRBHI) method. In the 64 of 100 *C.albicans* isolates, proteinase activities were determined as one positive. Maximum proteinase activities (67.5%) were obtained from vaginal discharge samples. In the evaluation of phospholipase activity, Pz value was taken into consideration. The higher phospholipase activities were observed in vaginal discharge samples (Average Pz=0.819±0.12) and the lower activities in oral cavity samples (Average Pz=0.906±0.094). The average phospholipase activities in all samples were determined as 0.868±0.112. In this study, slime activities were determined as positive in 48 of all *C.albicans* isolates. Among the isolates, the higher slime activities were determined in urine (52.5%) and blood (50%) samples. The correlation between proteinase and phospholipase activities which were extracellular virulence factors were only observed in *C.albicans* strains from urine samples and for other clinical samples no correlation was determined. There was no correlation between the virulence factors and the parts of the body from which strains were isolated. As a result, it is thought that more than one virulence factor play role in the infections with *C.albicans*.



13. Kuştimur S. *Candida* infeksiyonlarının tanı yöntemlerinin değerlendirilmesi. IX. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi 1999; Kongre Kitabı s. 72-4, Antalya.
14. Kuştimur S. Fungal infeksiyonlarda virulans faktörleri. X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi 2001; Kongre Kitabı s. 197-9, Adana.
15. Kuştimur S. *Candida*'da virulans faktörleri. I. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi 1999; Kongre Kitabı s. 145-50, İzmir.
16. Matthews R, Burnie J. The epidemiology and pathogenesis of candidiasis: Applications in prevention and treatment. Bull Inst Pasteur 1998; 96: 249-56.
17. Monod M, Zepelin MB. Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. Chem Immun 2002; 81: 114-28.
18. San-Blas G, Travssos LR, Fries BC, Goldman DL, Casadevall A, Carmona AK, Barros TF, Puccia R, Hostetter MK, Shanks SG, Copping VMS, Knox Y, Gow NAR. Fungal morphogenesis and virulence. Med Mycology 2000; 38 (Suppl 1): 79-86.
19. Yücel A, Kantarcioğlu AS. *Candida*'ların patojenlik belirtgenleri. Cerrahpaşa J Med 2000; 31: 172-86.
20. Hogan LH, Klein Bs, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. Clin Mic Rev 1996; 9: 469-88.
21. Kuştimur S. Kandidalarda proteinaz aktivitesinin virulans ile ilişkisi. G. Ü. Tıp Fak Derg 1987; 3: 221-7.
22. Kuştimur S. Kandida patojenizinde rol oynayan faktörler. Mikrobiyol Bülteni 1994; 28: 175-81.
23. Ray TL, Payne CD. Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. Infect Immun 1990; 58: 508-14.
24. Hube B, Sanglard D, Odds FC, Hess D, Monod M, Schafer W, Brown AJP, Gow NAR. "Distruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2 and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. Infect Immun 1997; 65: 3529-38.
25. Naglık JR, Newport G, White TC, Fernandes-Naglık LL, Greenspan JS, Greenspan D, Sweet SP, Challacombe SJ, Agabian N. In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. Infect Immun 1999; 67: 2482-90.

26. De Bernardis F, Sullivan PA, Cassone A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med Mycol* 2001; 39: 303-13.
27. Newport G, Agabian N. KEX2 influences *Candida albicans* proteinase secretion and hyphal formation. *J Biol Chem* 1997; 272: 28954-61.
28. White TC, Agabian N. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases: Isoenzyme pattern is determined by cell type, and levels are determined by environmental factors. *J Bacteriol*. 1995; 177: 5215-21.
29. Navarro-Garcia F, Sanchez M, Nombela C, Pla J. Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Reviews* 2001; 25: 245-68.
30. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* 2001; 9: 591-6.
31. Schaller M, Januschke E, Schackert C, Woerle B, Korting HC. Different isoforms of secreted aspartyl proteinases (Sap) are expressed by *Candida albicans* during oral and cutaneous candidosis in vivo. *J Med Microbiol* 2001; 50: 743-7.
32. Hube B, Naglik J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* 2001; 147: 1997-2005.
33. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 327-35.
34. Schaller M, Schackert C, Korting HC, Januschke E, Hube B. Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Invest Dermatol* 2000; 114: 712-7.
35. Kretschmar M, Felk A, Staib P, Schaller M, Heb D, Callapina M et al. Individual acid aspartic proteinases (Saps) 1-6 of *Candida albicans* are not essential for invasion and colonization of the gastrointestinal tract in mice. *Microbial Pathogenesis* 2002; 32: 61-70.
36. De Bernardis F, Arancia S, Morelli L, Hube B, Sanglard D, Schafer W, Cassone A. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida vaginitis*. *J Infect Dis* 1999; 179: 201-8.
37. Wu T, Samaranayake LP. The expression of secreted aspartyl proteinases of *Candida* species in human whole saliva. *J Med Microbiol* 1999; 48: 711-20.
38. Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Morschhauser J. Differential activation of *Candida albicans* virulence gene family during infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6102-7.

39. De Bernardis F, Mondello F, Scarevelli G, Pachi A, Girolamo A, Agatensi L, Cassone A. High Aspartyl Proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1376-80.
40. Hoegl L, Ollert M, Korting HC. The role of *Candida albicans* secreted aspartic proteinase in the development of candidoses. *J Mol Med* 1996; 74: 135-42.
41. Fallon K, Bausch K, Noonan J, Huguenel E, Tamburini P. Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun* 1997; 65: 551-6.
42. Wu T, Wright K, Hurst SF, Morrison CJ. Enhanced extracellular production of aspartyl proteinase, a virulence factor, by *Candida albicans* isolates following growth in subinhibitory concentrations of fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1200-8.
43. Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol* 1985; 131: 1217-21.
44. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, Edwards JE, Nozawa Y, Ghannoum MA. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995; 63: 1993-8.
45. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Mic Rev* 2000; 13: 122-43.
46. McLain N, Dolan JW. Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. *Microbiology* 1997; 143: 3521-6.
47. Mago N, Khuller GK. Subcellular localization of enzymes of phospholipid metabolism in *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 1990; 28: 355-62.
48. Lane T, Garcia JR. Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. *Mycoses* 1991; 34: 217-20.
49. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses* 2001; 44: 361-7.
50. Ghannoum MA. Extracellular phospholipases as universal virulence factor in pathogenic fungi. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 1998; 39: 55-9.
51. Bennett DE, McCreary CE, Coleman DC. Genetic characterization of a phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*. *Microbiology* 1998; 144: 55-72.

52. Karaca N, Koç AN, Karagöz S. Kan ve vajen örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin Slime aktiviteleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2001; 31: 224-6.
53. Hilmioğlu S, İlkit M, Çavuşoğlu C, Aydemir Ş, Tümbay E. *Candida* kökenlerinde slaym (slime) üretiminin üç ayrı yöntemle gösterilmesi ve slaym üretiminin kristal viyole reaksiyonu ile ilişkisi. İnfeks Derg 1999; 13: 183-6.
54. Orhon H, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S, Tünger Ö, Sivrel Arısoy A. İnfeksiyon etkeni olan *Candida albicans* suşlarında slime üretimi ve antifungal ajanlara duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1998; 28: 103-6.
55. Yüce A, Yücesoy M, Yuluğ N. Detection slime production among isolates of *Candida albicans*. İnfeks Derg 1996; 10: 267-9.
56. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 1994; 32: 452-6.
57. Aybay C, Çağlar K, İmir T. *Staphylococcus epidermidis* kaynaklı slaym maddesinin makrofajlardan nitrik oksit salgılanmasına etkisi. İnfeks Derg 1997; 11: 353-6.
58. Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ N. Sağlıklı bireylerden ve oral kandidiazisli olgulardan izole edilen *Candida albicans* türlerinde proteinaz aktivitesinin incelenmesi. Mikrobiyol Bülteni 2001; 35: 443-50.
59. Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ N. Sağlıklı ve *Candida* infeksiyonlu olan bireylerden soyutlanan *Candida albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. İnfeks Derg 2000; 14: 405-8.
60. Arıkan S, Sancak B, Haşçelik G, Günalp A. *Candida albicans* izolatlarında fosfolipaz aktivitesinin saptanması. Flora 1998; 3: 240-3.
61. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida albicans* kökenlerinde bazı virulans faktörlerinin (fosfolipaz, proteaz, çimlenme borusu ve aderens) ve aralarındaki korelasyonun belirlenmesi. İnfeks Derg 2001; 15: 517-25.
62. Gürdoğan K, Dizbay M, Aktaş F. Kan kültürlerinden izole edilen koagülaz negatif stafilokoklarda slime üretiminin dört farklı yöntemle araştırılması ve slime yapımı ile antimikrobiyal duyarlılık ilişkisi. Flora 1999; 4: 195-9.
63. Kocazeybek B, Çakan H, Ayyıldız A, Küçükateş E, Gülsoy Ö, Ordu A. Cerrahi yoğun bakım ünitesinden izole edilen koagülaz negatif stafilokoklarda slime faktörü oluşturma ve



- bunların kemoterapötiklere dirençle ilişkisinin araştırılması. ANKEM Derg 2001; 4: 683-9.
64. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative *Staphylococci*. J Clin Pathol 1989; 42: 872-4.
65. Erdeniz H, Gürler B. *Candida albicans* suşlarının proteinaz aktivitesi ile vulvovajinal kandidoz arasındaki ilişkinin araştırılması. İnfeks Derg 1998; 12: 389-92.
66. Çerikcioğlu N, Alaçam R. Kandida suşlarında salgısal asit proteinaz enzim varlığının proteinli agar besiyerinde gösterilmesi. Mikrobiyol Bül. 1993; 27: 344-51.
67. Engin M, Kuştimur S. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarında proteinaz aktivitesinin kazein agar yöntemi ile gösterilmesi. Mikrobiyol Bülteni 1994; 28: 338-44.
68. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. Mycoses 2002; 45: 160-5.
69. Ener B, Eskitürk A, Aydın Ö, Delialioğlu N, Berkiroğlu N, Quint W. Çeşitli *Candida albicans* izolatlarını suş düzeyinde tiplendirmede virulans faktörlerinin rolü. Mikrobiyol Bülteni 1996; 30: 391-8.
70. Gülenç S, Karadenizli A, Kolaylı F, Bingöl R. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen maya türlerinde slime faktörü ve proteinaz aktivitelerinin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2003; 33: 235-8.
71. Akbaş E, Karabıçak N, Güvener E. *Candida* türlerinde salgısal asit proteinaz varlığının araştırılması. Klimik Derg 1997; 10: 127-9.
72. Al-Hedaihty SS. Spectrum and proteinase production of yeasts causing vaginitis in Saudi Arabian women Med Sci Monit 2002; 8: 498-501.
73. Röchel R, Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA, Cole GT. *Candida* acid proteinases Sabouraudia 1992; 30: 123-32.
74. Chaḡrabarti A, Nayak N, Talwar P. In vitro proteinase production by *Candida* species. Mycopathologia 1991; 114: 163-8.
75. Banno Y, Yamada T, Nozowa Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. Sabouraudia: J Med Vet Mycol 1985; 23: 47-54.

76. Chen SCA, Muller M, Zhou JZ, Wright LC, Sorrell TC. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: A new virulence factor? J Infect Diseases 1997; 175: 414-20.
77. Yücesoy M, Yuluğ N. *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. İnfeksiyon Derg 1999; 13: 569-74.
78. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia 1982; 20: 7-14.
79. Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. Sabouraudia 1984; 22: 201-7.
80. Williamson MI, Samaranayake LP, MacFarlane TW. Phospholipase activity as a criterion for biotyping *Candida albicans*. J Med Vet Mycol 1986; 24: 415-7.
81. Kothavade RJ, Panthaki MH. Evaluation of phospholipase activity of *Candida albicans* and its correlation with pathogenicity in mice J Med Microbiol 1998; 47: 99-102.
82. Mayser P, Laabs S, Heuer K, Gründer K. Detection of extracellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodoturula rubra*. Mycopathologia 1996; 135: 149-55.
83. Swenson CE, Perkins WR, Roberts P. In vitro and in vivo antifungal activity of amphotericin B lipid complex: Are phospholipase important? Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 767-71.
84. Shimizu MT, Almeida NQ, Fantinato V, Unterkircher CS. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. Mycoses 1996; 39: 161-7.
85. Matsumoto FE, Gandra RF, Ruiz LS, Marques SAV, Pires MFC, Gambale W, Paula CR. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of Sao Paulo, Brazil. Mycopathologia 2001; 154: 63-9.
86. Videtto V, Koga-ito CY, Garramone A, Ponton J, Quindos G, Aoki S. Virulence factors, serotype distribution and adherence in *Candida albicans*. Mycoses 1999; 42:219
87. Kalkancı A, Çırak Yalınay M, Mansuroğlu H, Kuştimur S. *Candida* türlerinde slaym faktör belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1999; 29: 183-5.
88. Aydınlı A, Durmaz G, Akgün Y. Koagülaz negatif stafilokoklarda slime faktör yapımının kongo kırmızılı agar yöntemi ile araştırılması. Flora 1997; 1: 41-4.

89. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ. Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 21: 9-14.
90. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 2002; 70: 878-88.
91. Zer Y, Balci I, Meric G. Identification and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from intensive care unit patients. *New Microbiol* 2002; 25: 489-94.



## 10. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince yakın ilgi ve desteğini gördüğüm Anabilim dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Bülent BAYSAL'a ve tez hocam Sayın Prof. Dr. Duygu FINDIK'a, ayrıca eğitimim süresince yardım ve desteklerini gördüğüm hocalarım Sayın Prof. Dr. İnci TUNCER'e, Sayın Prof. Dr. Mahmut BAYKAN'a, Anabilim Dalımız araştırma görevlisi, biyolog, laborant, personel tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Dr. Uğur ARSLAN



T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
MILLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI