

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Candida parapsilosis* KÖKENLERİNİN
SALGISAL ASİT PROTEİNAZ, FOSFOLİPAZ VE BİOFİLM OLUŞTURMA
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NEJLA CEBECİ GÜLER

HAZİRAN 2007

TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Candida parapsilosis* KÖKENLERİNİN
SALGISAL ASİT PROTEİNAZ, FOSFOLİPAZ VE BİOFİLM OLUŞTURMA
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

NEJLA CEBECİ GÜLER

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 11.07.2007

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 10.08.2007

Tez Danışmanı : Yard.Doç.Dr.İlknur TOSUN

Jüri Üyesi : Yard.Doç.Dr.Neşe KAKLIKKAYA

Jüri Üyesi : Prof.Dr.Asım ÖREN

Enstitü Müdürü : Prof.Dr.Orhan DEĞER

HAZİRAN 2007

TRABZON

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince tecrübeleri ışığında uğraş verdiğim sayın hocam Yard. Doç. Dr. İlknur TOSUN' a yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca benden esirgemediği bilgi ve hoşgörüsü için teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince önderliklerinde çalıştığım değerli hocalarım Prof. Dr. Murat ERTÜRK, Doç. Dr. Faruk AYDIN, Yard. Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU, Yard. Doç. Dr. C. Kurtuluş BURUK ve Yard. Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA' ya ufkumun ve bilgi dağarcığımın genişlemesine katkı sağlayan yaklaşımlarından dolayı teşekkür ederim.

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı' nda bulunduğum süreçte birlikte emek sarf ettiğimiz yüksek lisans, doktora ve uzmanlık eğitimi alan arkadaşlarıma ve araştırma-rutin hizmet laboratuvarlarındaki çalışma arkadaşlarıma faydalı paylaşımları ve dostlukları için teşekkür ederim.

Yaşamımın ayrılmaz parçaları annem, babam ve kardeşlerime, beni sevgiyle destekledikleri için; sevgili eşime yaşama sevincimi ve bakış açımı zenginleştirdiği için teşekkür ederim.

Nejla CEBECİ GÜLER

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u> <u>No</u>
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. TARİHÇE	4
2.2. MANTARLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ	4
2.2.1. <i>Candida</i> cinsi mantarların sınıflandırılması	5
2.2.2. <i>Candida</i> cinsi mantarların morfoloji ve boyanma özellikleri	6
2.2.3. <i>Candida</i> cinsi mantarların üreme ve biyokimyasal özellikleri	8
2.2.4. <i>Candida</i> cinsi mantarların patogenezi	8
2.3. <i>Candida parapsilosis</i>	9
2.3.1. <i>C. parapsilosis</i> 'in genel özellikleri	9
2.3.2. <i>C. parapsilosis</i> 'in epidemiyolojisi	9
2.3.3. <i>C. parapsilosis</i> 'in patogenezi	11
2.4. VİRULANS ÖZELLİKLERİ	11
2.4.1. Salgısal asit proteinaz (Sap) enziminin genel özellikleri	12
2.4.2. Salgısal asit proteinaz enziminin virulans özellikleri	14
2.4.3. Fosfolipaz (PL) enziminin genel özellikleri	17
2.4.4. Fosfolipaz enziminin virulans özellikleri	19
2.4.5. Biofilm ve virulans özellikleri	21
3. MATERYAL VE METOD	24
3.1. MATERYAL	24
3.1.1. Kökenler	24
3.1.2. Kimyasallar ve Besiyeriler	26
3.1.3. Düzenekler	26
3.1.4. Tampon çözeltiler	26

3.1.4.1. Sitrik asit - disodyum hidrojen fosfat pH 4.4 hazırlanması	26
3.1.4.2. 0.114 M Sodyum asetat pH 5.2 hazırlanması	27
3.1.4.3. 0.05 M Sodyum sitrat pH 4.0 hazırlanması	27
3.2. METOD	27
3.2.1. İzolasyon	27
3.2.2. İdentifikasyon	29
3.2.2.1. Germ tüp testi	29
3.2.2.2. Karbonhidrat yıkım özelliklerinin test edilmesi	29
3.2.2.3. Mısır unu - tween 80 agar testi	31
3.2.2.4. Kromatik agar testi	32
3.2.3. <i>C. parapsilosis</i> kökenlerinin Sap aktivitesinin araştırılması	32
3.2.3.1. Sığır serum albuminli sıvı besiyerinin hazırlanması	32
3.2.3.2. Süt tozu agaroz yöntemi ile Sap aktivitesinin belirlenmesi	33
3.2.3.3. Spektrofotometrik yöntem ile Sap aktivitesinin belirlenmesi	33
3.2.4. <i>C. parapsilosis</i> kökenlerinin PL aktivitesinin araştırılması	34
3.2.4.1. Yumurta sarılı agar yöntemi ile PL aktivitesinin belirlenmesi	34
3.2.5. Slime oluşumunun tesbiti	35
4. BULGULAR	36
4.1. <i>C. parapsilosis</i> kökenlerinin süt tozu agaroz yöntemi ile Sap aktivitesinin değerlendirilmesi	37
4.2. <i>C. parapsilosis</i> kökenlerinin yumurta sarılı agar yöntemi ile PL aktivitesinin değerlendirilmesi	39
4.3. <i>C. parapsilosis</i> kökenlerinin glukozlu sıvı sabouraud besiyeri (GSSB) ve glukozlu triptik soy buyon besiyeri (GTSB) kullanılarak plastik test tüplerinde slime oluşumunun değerlendirilmesi	40
5. TARTIŞMA	43

6. SONUÇ ve ÖNERİLER	48
7. ÖZET	49
8. SUMMARY	50
9.KAYNAKLAR	51

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>Candida</i> türlerini diğer mayalardan ayıran mikroskopik özellikler	6
Tablo 2. Klinik örneklerden üretilen <i>Candida</i> türlerinin kültür, mikroskopik ve biyokimyasal özellikleri	7
Tablo 3. Avrupa, Kanada, Latin Amerika ve Amerika Birleşik Devletleri'nde kan kültürlerinden izole edilen <i>Candida</i> türlerinin dağılımı	10
Tablo 4: Çalışma kökenlerine ait izolat no, kod, örnek tipi, örneğin alındığı klinik -poliklinik ve izolasyon tarihi	25
Tablo 5. Slime faktör araştırmak için GSSB ve GTSB kullanılarak yapılan iki farklı tüp tutunma deneyinin sonuçları	40
Tablo 6. <i>C. parapsilosis</i> kökenlerinin Sap, PL enzim aktivite düzeyleri ve slime oluşturma özellikleri	42

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Çeşitli fosfolipazların etki noktaları	19
Şekil 2. <i>C. parapsilosis</i> kökenlerinin izole edildikleri örnek tipleri ve sayıları	24
Şekil 3. <i>C. parapsilosis</i> 'in direk (solda), gram boyalı (ortada) mikroskopik görüntüleri ve kolonilerinin SDA'daki görünümü (sağda)	29
Şekil 4. API 20 C AUX düzeneği ve analitik görünüm çizelgesi	31
Şekil 5. Kromatik agarda <i>C. parapsilosis</i> kolonilerinin beyaz görünümü (solda) ve mısır unu –tween 80 agar'da yalancı hif ve blastosporları (sağda)	32
Şekil 6. Fosfolipaz aktivitesi için Pz değerinin hesaplanması	35
Şekil 7. Süt tozu agaroz yöntemi ile Sap aktivitesinin değerlendirilmesi	37
Şekil 8. Örnek tiplerine göre kökenlerin Sap aktivitesi düzeyleri	38
Şekil 9. Örnek tiplerine göre (kan-diğer) kökenlerin Sap aktivitesi düzeyleri	38
Şekil 10. Yumurta sarılı agarda, fosfolipaz aktivitesi pozitif kökenin koloni etrafında oluşturduğu zon (A; pozitif kontrol) ve fosfolipaz negatif kökenlerin koloni görünümü	39
Şekil 11. A, B,C: Slime pozitif test tüpleri; D: Slime negatif test tüpü; E: Negatif kontrollerin görünümü	41
Şekil 12. Slime pozitif tüpün çeperlerinden hazırlanan preparatta <i>C. parapsilosis</i> kökeninin gram boyaması	41

KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

BSA: Bovine (Sığır) Serum Albumini

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

GSSB: Glukozlu Sabouraud Sıvı Besiyeri

GTSB: Glukozlu Triptik Soy Besiyeri

HIV: Human Immunodeficiency Virus

Ig: İmmünglobulin

NNIS: National Nosocomial Infection Surveillance

OD: Optik Dansite

PL: Fosfolipaz enzimi

plb: Fosfolipaz geni

Pz: Presipitasyon zonu

RIA: Radio Immun Assay

SAP: Salgısal asit proteinaz geni

Sap: Salgısal asit proteinaz enzimi

SDA: Sabouraud Dekstroz Agar

SDS: Sodium Dodecyl Sulphate

YEPD: Yeast Ekstract Pepton Dekstroz

YNB: Yeast Nitrogen Base

GİRİŞ ve AMAÇ

Yeryüzünde yüzbinden fazla mantar türü olduğu bilinmekle beraber, çok azı insanlarda enfeksiyona neden olmaktadır. *Candida* türleri insanlarda görülen en yaygın fungal patojenlerdir (1). İnsanlarda deri ve mukozalarda sıklıkla kommensal olarak bulunmalarına karşın, *Candida* türlerine bağlı ciddi enfeksiyonlarda son yirmi yılda önemli bir artış gözlenmiştir (2, 3). Bu organizmalar invaziv olmayan yüzeysel enfeksiyonlardan derin dokuları tutan enfeksiyonlara kadar geniş bir hastalık spektrumuna sahiptir (1).

Geniş etki alanlı antibiyotik kullanımı, bağışıklık sistemi baskılanmış hasta sayısının artışı, organ nakilleri, damar içi aletler ve protez cihazlarının uygulanması gibi nedenlerle, hem hastane dışı hem de hastane kaynaklı *Candida* enfeksiyonlarının sıklığı artmaktadır (1).

İkiyüzden fazla *Candida* türü bulunmaktadır (1). Önceleri *Candida* cinsi içerisinde yalnızca *C. albicans*'ın patojen olduğu düşünülmüş, 1960'lerden sonra klinik deneyim ve çeşitli deneysel çalışmaların sonuçlarına dayanarak *C. albicans*, *C. catenulata*, *C. dattila*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. pulcherrima*, *C. tropicalis*, *C. zeylanoides* olmak üzere 15 türün patojen olduğu kabul edilmiştir. Bugünkü yaklaşım, diğer *Candida* türlerinin de patojen olabileceği yönündedir (4). Konak hücre hasarını, *Candida*'ların virulans faktörleri ve konağın savunma mekanizmaları aracılığı ile mantara karşı oluşturduğu immun cevap belirler (1). *Candida* cinsi mantarların türüne ve kökenine bağlı olan bazı faktörler konağın bağışıklığını yenmek için birlikte rol oynarlar (4).

Candida türleri tarafından salgılanan hidrolitik enzimlerin virulans faktörlerinden biri olduğu gösterilmiştir (5). Bu hidrolitik enzimler salgısal asit

proteinaz (Sap) ve fosfolipaz (PL)'dir (2). Sap, proteinlerdeki peptid bağlarını kırarak hücre yüzey moleküllerinin ve hücre membranının yapısını bozar. PL ise biyolojik membranların temel bileşenlerinden olan fosfolipitlerdeki ester bağlarını kırarak etkili olur. Bu şekilde konak dokuya invaze olurlar (6).

Hidrolitik enzimler sıklıkla *C. albicans* kökenlerinde çalışılmıştır. Ancak *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* gibi bazı türlerin de bu enzimleri salgıladığı tesbit edilmiş ve patojenite ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür (7, 8). *C. albicans* klinik örneklerden en yaygın şekilde izole edilen tür olması bakımından önemliyken *C. parapsilosis* görülme sıklığındaki artışla dikkat çekmektedir (7), çeşitli çalışmalarda en yaygın şekilde izole edilen ikinci tür olarak bildirilmiştir (9, 10). Yapılan son çalışmalarda hastane kaynaklı *Candida* fungemilerinin % 30'dan fazlasının başta *C. parapsilosis* olmak üzere *albicans* dışı *Candida* türlerine bağlı olduğu belirtilmiştir (3, 11, 12).

Candida, hastane kaynaklı fungal enfeksiyonların en sık rastlanan etkenidir (2, 3). Hastane kaynaklı kan enfeksiyonlarının ise en yaygın dördüncü etkenidir. Fungal kan enfeksiyonlarının artan sıklığı, katater ve implantların kullanımındaki artıştan kaynaklanmaktadır. İntravenöz kataterlerinden *Candida* izole edilen hastaların % 40'ında fungemi gelişmiş ve katater ilişkili kandidemilerin yaklaşık % 40'ı ölümlerle sonuçlanmıştır (7). *C. parapsilosis* enfeksiyonları çoğunlukla invaziv girişimler veya damar içi gereçlerle ilişkili olarak ortaya çıkmaktadır (12).

Araştırmacılar *C. parapsilosis* fungemilerinin artışını, bu organizmanın özellikle kateterlere ve benzeri plastik yüzeylere tutunma eğiliminin yüksek olmasıyla açıklamaktadırlar (12). Yüzeylere tutunma kapasitesi biofilm oluşumuyla bağlantılıdır. Biofilm oluşumu, *Candida*'larda böyle enfeksiyonlara yol açan temel faktördür. İzole edilen kökenlerde biofilm oluşumunun gösterilmesi, bir biofilm odağının olası varlığının ve antimikotik tedavi sırasındaki olası farklılıkların belirleyicisidir (3, 13). Biofilm oluşumu *C. albicans* ile yapılan birçok çalışmada gösterilmiş (7), ancak *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*'in de önemli miktarlarda biofilm ürettiği bildirilmektedir (14).

Bu çalışmada, mantar enfeksiyonu düşünölen olguların kan költürlerinden ve diğer klinik materyallerinden izole edilen *C. parapsilosis* kökenlerinin, virulans faktörü olarak kabul edilen salgısal asit proteinaz ve fosfolipaz hidrolitik enzimlerinin ve biofilm oluşturma özelliklerinin araştırılması ve bu türe bağlı olarak gelişen mantar enfeksiyonlarında özellikle hangi faktör ya da faktörlerin rol alabileceğinin belirlenmesi ve kökenlerin izole edildikleri klinik örneklere göre (kan ve diğerleri) sahip oldukları virulans faktörlerinde bir farklılık bulunup bulunmadığının araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

1665'de Galen ve Pepy pamukçuğu tanımlamış, 1839'da Langanbek oral lezyonlu bir hastadan mayayı izole etmiştir. 1940'larda antibiyotiklerin klinik kullanıma girmeleri ile önceden rastlanmayan *Candida* enfeksiyonlarının çeşitli klinik şekilleri görülmeye başlamıştır (15).

ABD'de NNIS sistemine dahil 124 hastanede, 1980-1989 yılları arasında, kan enfeksiyonu tanımlanmış 25.000'den fazla hastada yapılan bir çalışmada stafilokoklardan sonra en büyük oranda artışı (% 219'dan % 487'ye) *Candida* türleri göstermiştir (16).

Son 20 yıl boyunca tüm dünyada mukokutanöz ve derin fungal enfeksiyonların arttığı bildirilmektedir. NNIS'ye göre hastanelerde görülen fungal enfeksiyonlar 1980'den 1990 yılına kadar % 6'dan % 10.4'e artış göstermiştir. Bu fungal enfeksiyonların % 80'inden *Candida* türleri sorumludur (17). Hastane enfeksiyonu etkeni olarak da, tüm sepsislerin % 8'inden *Candida* türleri izole edilmiştir (18).

2.2. MANTARLARIN GENEL ÖZELLİKLERİ

Mantarlar gerçek bir çekirdeğe sahip ökaryotik mikroorganizmalardır. 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 testlerin geliştirilmesinde önemlidir. Morfolojik yapılarına göre mantarlar küf ve maya olmak üzere iki grupta incelenir. Küfün temel yapı birimi hif olarak adlandırılan tübümsü yapılardır. Mayalar tek hücreli mantarlardır. *Candida* cinsi mantarlar maya gurubunda yer alır. Tomurcuklanma (blast formasyonu) veya ortadan ikiye bölünme (füzyon) ile çoğalırlar. Yavru hücreye blastokonidyum adı verilir. Küf ve maya şekli 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 koşullarda ve 35-37 °C'de maya şeklinde ürerler (19).

2.2.1. *Candida* Cinsi Mantarların Sınıflandırılması

Candida cinsi, *Myceteae* aleminin *Amastigomycota* şubesine, *Deuteromycetes* sınıfına, *Slastomyces* alt sınıfına ait *Cryptococcaceae* ailesinde bulunur (20).

Candida'lar eşeyli ve eşeysiz sporları aracılığı ile iki şekilde ürerler, üreme şekilleri esas alınarak sınıflandırılırlar (21).

Bir kese içinde bulunmayan eşeysiz üreme yapıları konidyum olarak adlandırılır. Konidyum oluşturan *Candida* türlerinin tümü *Deuteromycota* (*Fungi Imperfecti*) içinde *Cyptococcaceae* ailesinde sınıflandırılır. *Candida* türleri içinde en sık etken *C. albicans*'tır. Bunu *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. kefyri*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii* izler.

Clavispora, *Debaryomyces*, *Jssatchenkia*, *Kuyveromyces*, *Pichia* eşeyli spor oluşturan *Candida* türleri olarak sınıflandırılmaktadır (21).

2.2.2. *Candida* Cinsi Mantarların Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Candida türleri tek hücreli, tomurcuklanan mantarlardır. Hücre duvarında kitin ve/veya sellüloz içeren ökaryotik organizmalardır. Tomurcuklanma veya ortadan ikiye bölünme ile çoğalırlar (21, 22). Bir maya hücresinin bir veya birkaç noktasından tomurcuklanma olur, olgunlaşarak ana hücreden koparak yavru hücre oluşur. Yavru hücreye blastokonidiyum denir (22). *Candida*'ların üremesi sırasında oluşan blastokonidiyumlar, ana hücreden ayrılmadan uzayarak aralarında boğumlar oluşturup yalancı hif (pseudohif) meydana getirebilirler. Gerçek hifte ise hücre duvarları birbirine paraleldir (21, 22). Klinik örneklerinde ve kültürlerinde 3-6 µm büyüklüğünde oval veya yuvarlağımsı, tomurcuklanan hücreler şeklinde görülürler (23).

Candida türleri gram olumlu boyanırlar (19, 23). Floresan boyalardan potasyum hidroksit-kalkoflor beyazı ile de boyanabilirler. Kalkoflor beyazı maya hücre duvarındaki kitin ve sellüloza bağlanarak yeşilden maviye değişen renklere floresan verir, bu bağlanma özgül değildir. Bu boya özellikle maya hücrelerinin örnekler içinde aranmasında kullanılır (21). *Candida* türlerini diğer mayalardan ayıran mikroskobik özellikler tablo-1'de özetlenmiştir.

Tablo 1: *Candida* türlerini diğer mayalardan ayıran mikroskobik özellikler (23).

Organizma	Yalancı hif	Gerçek hif	Blastokonidiyum	Antrokonidiyum	Anellokonidiyum	Askospor
<i>B.capitatus</i>			x		x	
<i>Candida spp.</i>	x		x			x ^a
<i>Cryptococcus spp.</i>			x			
<i>Geotrichum spp.</i>				x		
<i>Hansenula spp.</i>	x ^a		x			x
<i>Rhodotorula spp.</i>			x			
<i>Saccharomyces spp.</i>	x ^a		x			x
<i>Trichosporon spp.</i>	x		x	x		

a: çeşitli türlerde

Tablo 2: Klinik örneklerden üretilen *Candida* türlerinin kültür, mikroskobik ve biyokimyasal özellikleri (23).

TÜRLER	37°C'de üreme	Pseudo/gerçek hif	Klamidospor	Germ tüp	Glikoz	Maltoz	Sukroz	Laktoz	Galaktoz	Mellobiyoz	Sellobiyoz	İnositol	Ksiloz	Rafinoz	Trehaloz	Dulsitol	Glikoz	Maltoz	Sukroz	Laktoz	Galaktoz	Üreaz	KNO3	Askaspor
<i>C.albicans</i>	+	+	+	+	+	+	d	-	+	-	-	-	+	-	+	-	F	F	-	-	F	-	-	-
<i>C.catenulata</i>	+d	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	Fd	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.dublinensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-						-	-	-
<i>C.famata</i>	+	-	-	-	+	+	+	d	+	+	+	-	+	+	+	+d	Fd	-	Fd	-	-	-	-	-
<i>C.glabrata</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	F	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.quilliermondii</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	F	-	F	Fd	F	-	-	-
<i>C.kefyr</i>	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+d	-	+d	+	+d	-	F	-	F	Fd	F	-	-	-
<i>C.krusei</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	+d	-	-
<i>C.lambica</i>	+d	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-
<i>C.lipolytica</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>C.lusitanae</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	F	-	F	-	F	-	-	-
<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

F: fermantasyon olumlu

Fd : fermantasyon değişken

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

2.2.3. *Candida* Cinsi Mantarların Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

Candida türlerinin çoğu yaygın kullanılan mikolojik ve bakteriyolojik besiyerlerinde iyi ürerler. Üreme genellikle 24 saatte görülmesine rağmen, belirgin üreme 48-72 saat arasında oksijenli veya oksijensiz ortamda oluşur. Mayalar genellikle 37 °C'de ürerler. Ancak özellikle patojen türler 25-37 °C'de ürerken saprofitler daha düşük ısıda üreyebilirler (23). Üredikleri pH = 4,5-5 arasındadır. Ancak pH=3-7,5 arasında üreyebilen türleri de bulunmaktadır (24). Mayaların üreyebilmesi için 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 nisbi nem oranı % 95-100 oranında olmalıdır. *Candida* türleri genellikle kirli beyaz veya krem renginde, buruşuk veya düzgün kenarlı, nemli, yumuşak kıvamlı, maya kokan koloni oluştururlar (21).

2.2.4. *Candida* Cinsi Mantarların Patogenezi

Candida'lar insan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinde yaygın olarak bulunan maya gurubu mantarlardan, patojen olabilen fırsatçı mikroorganizmalardır. Bu nedenle kandidozlar çoğu kez endojen kaynaklıdır. Kandidozların temel özelliği fırsatçı enfeksiyon niteliğinde olmalarıdır ve gelişmelerinde uygunsuz konak faktörü ön plandadır. *Candida* enfeksiyonlarının patogenezinde konağın savunma mekanizmaları çeşitli yollarla olaya katılır (25). Konakta *Candida*'lara karşı özgül ve özgül olmayan savunma mekanizmaları mevcuttur. Sıvısal ve hücrel bağışıklık gelişmekle beraber hücrel bağışıklığın rolü daha büyüktür (26). Özgül olmayan savunma mekanizmalarını yerleşik flora, normal hormonal denge, sağlam deri ve mukoza ile nötrofil, monosit ve eozinofillerin fagositik aktiviteleri oluşturur (27).

Candida enfeksiyonlarının gelişiminde konak faktörlerinin yanında virulans faktörlerinin de önemi büyüktür (25). *Candida*'ların virulansı, konak

savunmasının üstesinden gelmek adına çeşitli faktörlerin birlikte çalışmaları sonucu artar. Bu faktörlerden herhangi birinin yokluğu veya azlığı enfektiviteyi olumsuz yönde etkiler ve *Candida*'nın yerleşimini zorlaştırır (28).

2.3. *Candida parapsilosis*

2.3.1. *Candida parapsilosis*'in Genel Özellikleri

C. parapsilosis, 2.0-3.5 x 3.0-4.5 µm boyutlarında bir mayadır (29).

Mısır unu-tween 80'li agar'da ürediğinde çok sayıda ağaç şeklinde dallanmış yalancı hif (pseudohif) ve yalancı hifler boyunca tek tek veya ufak kümeler halinde blastosporlar oluşturur. Önemli bir özelliği, iri hiflerin görülmesidir. Bu iri hifler, dev hücreler olarak adlandırılır (30).

C. parapsilosis kökenleri SDA'ya ekildiklerinde, 37 °C'de 24-48 saatte düzgün, krem rengi koloniler oluştururlar. Glukozu fermente ederken laktozu fermente edemezler. Bazı kökenler sükroz, maltoz ve trehaloz fermentasyonu yaparlar. Glukoz, laktoz, maltoz, trehaloz, D-ksiloz, L-arabinoz, ribitol, D-mannitol ve sükroz yıkımını gerçekleştirirler ancak potasyum nitrat, laktoz, raffinöz, inositol, salisin, D-arabinoz yıkımını gerçekleştirmezler (29).

2.3.2. *Candida parapsilosis* 'in Epidemiyolojisi

C. parapsilosis, *C. albicans* ve *C. tropicalis*'in tersine doğada oldukça geniş bir yayılım göstermektedir. İnsan derisinin normal florasında bulunabilmektedir (31). Sağlık personelinin ve sağlıklı gönüllülerin ellerinden en sık izole edilen mantar (sırasıyla % 41.38 ve % 53.1 oranlarında) olduğu saptanmıştır (32). Sağlıklı kişilerin sindirim sistemlerindeki *Candida* taşıyıcılık oranının yaklaşık olarak % 80 olduğu ve bunun % 5.4'ünü *C. parapsilosis*'in oluşturduğu belirtilmiştir. Pişmemiş deniz ürünleri ve et ürünlerinden de izole edilmektedir (33). Hastane kaynaklı mantar enfeksiyonları sıralamasında üriner sistem enfeksiyonları ilk, fungemiler ikinci sırada yer almaktadır. *C. parapsilosis*

bir çalışmada kandidürili olgulardan % 6 ile dördüncü en sık izole edilen etken olmuştur (33).

Kan izolatlarının baskın mantar enfeksiyonu etkeni *Candida* cinsi mayalardır. Bu cins içinde en sık izole edilen türler *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* ve *C. krusei* olarak belirtilmiştir (34). Fungemi gelişen hastalarda *C. albicans* izolasyon oranının azaldığı, *C. parapsilosis* izolasyon oranının ise arttığı bildirilmektedir (11). Kandidemi, çocuklarda % 20, yetişkinlerde ise % 50 oranlarla mortalite ile ilişkilendirilmiştir (35).

1981-1993 yılları arasında Taiwan'da *C. parapsilosis* kandidemilerinin 4-6 kat arttığı (36), 1987-1990 yılları arasında İtalyada *C. parapsilosis*'in neden olduğu kandidemi sıklığının % 8'den % 30'a yükseldiği ve bu artışın 1991-1994 yılları arasında da devam ederek kandidemi olgularının 1/3'ünde *C. parapsilosis*'in etken olduğu bildirilmiştir (11). ABD'de yapılan bir çalışmada, *C. parapsilosis* tüm maya izolatlarının % 8'ini, kandan izole edilen *Candida* izolatlarının % 27'sini, intravenöz kateterlerden izole edilen *Candida* izolatlarının da % 17'sini oluşturmuştur (12). Brezilya'da kandidemi olgularından izole edilen türlerin oranları *C. albicans* % 37.5, *C. parapsilosis* % 24.3, *C. tropicalis* % 15.7, *C. guilliermondii* % 10 olarak bildirilmiştir (33). *C. parapsilosis*, 1997 yılında kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türleri arasında, Avrupa, Kanada ve Latin Amerika'da ikinci sırada, ABD'de üçüncü sırada yer almıştır (37) (Tablo 3).

Türler \ (n)	ABD	Avrupa	Kanada	Latin Amerika
<i>C. albicans</i>	56	53	53	41
<i>C. parapsilosis</i>	9	21	23	38
<i>C. glabrata</i>	19	12	11	2
<i>C. tropicalis</i>	7	6	8	12
<i>C. guilliermondii</i>	1	4	-	2
<i>C. krusei</i>	2	1	2	-

Tablo 3. Avrupa, Kanada, Latin Amerika ve ABD'de kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımı.

2.3.3. *C. parapsilosis* 'in Patojenitesi

Uzun bir dönem, patojen olmayan tür olarak kabul edilen *C. parapsilosis*'in sıklıkla yüzeysel ve sistemik enfeksiyonlardan izole edilen, çoğunlukla bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde hastalık oluşturma yeteneğinde bir fırsatçı patojen olduğu belirlenmiştir (12).

Son yıllarda fungemi nedeni olarak *C. albicans* ve *C. tropicalis* kadar önem kazanan *C. parapsilosis* kökenlerinin virulans faktörleri araştırılmaya başlanmıştır. Sap ve fosfolipaz hidrolitik enzimlerinin bu türe enfeksiyon oluşturabilme yeteneği kazandıran virülans faktörleri arasında önemli olduğu sonucuna varılmıştır (28, 38). Biofilm oluşumunun ise özellikle kateter ve buna benzer yabancı cisim uygulamaları ile ilişkili *C. parapsilosis* enfeksiyonlarında önemli olduğu gösterilmiştir (3, 13).

C. parapsilosis enfeksiyonları için risk faktörleri çok yönlü incelemelerle; önceden fluconazole tedavisi görmek, hiperalbuminemi, damar içi araç kullanımı olarak belirlenmiştir (39, 40).

C. parapsilosis; fungemi, septik artrit, endokardit, peritonit, vajinit, bağırsak enfeksiyonları, bronkopulmoner enfeksiyonlar gibi önemli enfeksiyonlara yol açan, hastane kaynaklı enfeksiyon oluşturma özelliği fazla olan, ekzojen yolla bulaşla epidemilere yol açan bir patojendir (41, 42).

2.4. VİRULANS ÖZELLİKLERİ

Konak hücreye invazyon, öncelikle penetrasyonu ve dış hücre zarfının harabiyetini gerektirir. Bu geçiş süreci, büyük olasılıkla fiziksel veya enzimatik yoldan ya da ikisinin birarada bulunması yolu ile gerçekleşir (43). Mantarlar, konağın hücre zarlarında işlev bozukluğuna sebep olarak dokuda ilerlemelerine (invazyon) yardımcı olan enzimler oluşturma yeteneğine sahiptirler. Zarların yapısında bulunan temel kimyasal bileşenler olan lipid ve proteinler enzimlerin hedefini oluştururlar. Patojen mantarlar tarafından üretilen böyle enzimler hemen hemen yalnızca *C. albicans*'la ilgili olarak bildirilmiştir. Bu mantarın salgıladığı ve

patogenezle ilgisi olduğu düşünölen enzimler iki ana grupta toplanmaktadır; (i) peptid bağlarını hidrolizleyen proteinazlar, (ii) fosfoglisericidleri hidrolizleyen fosfolipazlar ile lizofosfoglisericidleri hidrolizleyen lizofosfolipazlar (4, 43).

2.4.1. Salgısal Asit Proteinaz (Sap) Enziminin Genel Özellikleri

Candida'ların hidrolitik enzimleri arasında en iyi tanımlanmış olan Sap'dır (44). *Candida* proteinaz enzimi, asit pH'da aktivite gösterdiği için asit proteinaz, pepstatin A ile inhibe olduğu için karboksil proteinaz, çok miktarda aspartik asit rezidüleri içerdiğinden aspartat proteinaz olarak adlandırılmıştır (33).

İlk kez Blank ve ark. 1957 yılında *Candida* türlerinin, üremek için nitrojen kaynağı olarak keratinden yararlanabilme yeteneğine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgu, bu organizmalar tarafından hücre dışı proteolitik aktivitenin oluşturulduğu ihtimalini akla getirmiştir (45). İlk kez Staib, 1965 yılında *C. albicans* kökenlerinde Sap üretimini tesbit etmiştir (46).

Proteolitik enzimlerin önemli bir patojenlik göstergesi olduğuna dair deliller bulunmaktadır (4). *C. albicans* ve diğer bazı *Candida* türleri, tek nitrojen kaynağı olarak protein içeren besiyerlerinde geliştiklerinde proteinaz salgırlarlar (4, 44). Azot kaynağı olarak yalnızca protein bulunan ortamlarda enzim üretimi artmaktadır. Amino asitler ya da amonyum tuzları gibi düşük moleköl ağırlıklı azot kaynaklarının bulunduğu Sabouraud buyyonu gibi ortamlarda enzim üretimi olmamakta ya da çok düşük düzeyde gerçekleşmektedir (47). En fazla *C. albicans*'da olmak üzere, daha az derecede *C. tropicalis*, orta derecede *C. parapsilosis* kökenleri olmak üzere yalnızca en patojen *Candida* türleri tarafından salgılanmaktadır. Klinikle ilişkili diğer *Candida* türleri, hücre dışı proteinaz üretmiyor gibi görünmektedir. Bu durum *Candida* türlerinin insandaki virulans sıralamasına yansımaktadır (4).

Sap'ın substratları incelendiğinde, geniş bir substrat özgüllüğüne sahip olduğu görölmüştür. *Candida* proteinazı; albumin, hemoglobin, kazein, keratin ve kollajeni parçalama yeteneğindedir. Test edilen *Candida* proteinazlarının çoğunun insan IgG'yi ve mukoz membranların major Ig'i olan salgısal IgA'yı parçalama

yeteneğinde olduğu ve bu parçalanmanın genellikle ağır zincirde olduğu gösterilmiştir (34). İmmüoglobulinlerin in vivo parçalanması fungusun varlığını sürdürmesini kolaylaştırmaktadır (48).

Hücre dışına salınan enzimin aktivitesi sığır albumini, kazein ya da sığır hemoglobini gibi proteinlerin bulunduğu basit agar besiyerlerinde ya da bunların veya başka proteinlerin bulunduğu ortamlarda, triklor-asetik asit (TCA) gibi çözücülerde çözünebilir ürünlerin ölçümüne dayanan yöntemler ile saptanabilmektedir. Bu yöntemlerin yanısıra, insan ve deney hayvanlarında asit proteinaz antijenini ve buna karşı oluşan antikoru saptamak amacıyla, presipitasyon ve daha duyarlı olan ELISA gibi immünolojik yöntemlerle de çalışmalar yapılmıştır (49, 50).

Sap enziminin hücre içinde biriktirilmediği, sentezlendikten hemen sonra salındığı gösterilmiştir. Ancak *C. albicans* kökenlerinde hücreye bağlı kalan membran asit proteinaz enzimi de saptanmıştır (33, 44).

Enzimin inhibisyon profilini incelemek amacıyla çeşitli maddeler ile çalışmalar yapılmıştır. Enzimin en güçlü ve özgül olarak, bir karboksil peptidaz inhibitörü olan pepstatin tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (51).

C. albicans CBS 2730 kökeninin kültür sıvılarından elde edilen asit proteinaz, kromatografi yöntemleriyle saflaştırılabilmektedir. Enzim, glikoprotein yapısında olup, N ucunda triptofan ve C ucunda lösin bulunan bir polipeptid zincire sahiptir. İyonik olmayan deterjanlara (örneğin SDS) ve dondurulmaya karşı dayanıklıdır (51).

C. parapsilosis asit proteinazının moleküler ağırlığı yaklaşık 33.000 dalton olup, *C. albicans* ve *C. tropicalis* asit proteinazına göre oldukça küçüktür. Enzim aktivitesi için optimum pH 4.3'dür; 7.0 ve daha yüksek pH değerlerinde dönüşümsüz olarak denatüre olur (33, 44).

C. parapsilosis ve *C. tropicalis* tarafından salgılanan proteinazlar, *C. albicans*'inkiyile antijenik yönden benzerdir (33). Bazı biyokimyasal farklılıklar gösterebilen bu izoenzimler, patolojik aktiviteleri açısından fark göstermediğinden dolayı, "asit proteinaz" adı altında toplanmışlardır (52).

2.4.2. Salgısal Asit Proteinaz Enziminin Virulans Özellikleri

C. albicans'a ek olarak, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*'i de içeren çoğu patojenik *Candida* türlerinin SAP geni taşıdığı ve hücre dışı proteinaz ürettiği belirlenmiş durumdadır. Sap'ın virulans faktörü olarak değerlendirildiği çalışmalar genellikle *C. albicans* kökenleri kullanılarak yapılmıştır. *C. parapsilosis* için bu enzimin virulans faktörü olarak rolü kesinlik kazanmamıştır (53).

Candida asit proteinaz aktivitesinin, asit pH'da sınırlı kalması, başlangıçta enzimin virulansdaki rolünde kuşku yaratmıştır. Ancak ortamdaki zayıf bir asitleşmenin bile fungus çoğalmasını ve proteinaz üretimini artırdığının gösterilmesi, asit ortamda enzimin virulansını desteklemektedir. Mikroorganizmaların bulunduğu çevredeki şekerlerin varlığına bağlı olarak oluşan asitleşmenin, *Candida*'ya bağlı vajen ve ağız mukozası enfeksiyonlarında tetikleyici olabildiği bildirilmiştir (50). Germaine ve Tellefson (1981), *Candida* proteinazlarının, pH 6'dan daha yüksek değerlerde denatüre olmasına dayanarak, ağız boşluğunda *Candida*'ların patojenliğine anlamlı olarak katılmadığı sonucunu çıkarmışlardır. Ancak, kanser hastaları gibi bazı hastaların ağız boşluğunda tükürük pH'sının daha asitli olduğu da bilinmektedir. Ayrıca *C. albicans*'ın nötral pH değerlerinde proteolize izin veren nötral proteinazlar salgılayabilmesi de bu enzimlerin patojenlikteki rolünün bir kanıtıdır (4).

Yapılan çalışmaların çoğunun sonuçlarına göre, proteinaz üretmeyen *C. albicans* ve diğer türlere ait kökenlerin proteinaz üreten kökenlere oranla daha zayıf patojen oldukları veya patojen olmadıkları gösterilmiştir (33).

MacDonald ve Odds (1983), bir proteinaz salgılayan köken ile bir de proteinaz özürlü mutantını kullanarak hücre dışı proteinazın virulansın derecesinde önemli bir faktör olduğunu öne sürmüşlerdir. Kwon-Chung ve ark. proteinaz üreten ebeveyn, proteinaz özürlü mutant ve spontant revertant olmak üzere üç *C. albicans* kökeni kullanarak farelerde hücre dışı proteinaz ve virulans arasındaki ilişkiyi incelemişler; hücre dışı proteinaz üretiminin çeşitli kökenlerin patojenliğini önemli derecede belirlediğini bulmuşlardır. Yedi köken tipi gösteren 53 *C. albicans* kökeni ile yapılan ve proteinaz üretimini araştıran deneylerde 23 kökünde ağız epitel

hücrelerine yapışma ile ve ayrıca 14 kökünde farelerde öldürücülük ile proteinaz enzimi arasında bağlantı kurulmuş; aynı köken tipindeki izolatlar arasında ve farklı köken tipleri arasında proteinaz üretimi ve yapışmanın çeşitlilik gösterdiği sonucu çıkarılmıştır. Ayrıca ağız epitel hücrelerine çok kuvvetle bağlanan kökenlerin göreceli olarak en yüksek proteinaz etkinliğine sahip oldukları ve dokuda daha yüksek derecede kolonizasyon gösterdikleri belirlenmiştir. Dolayısıyla bu faktörler hem patojenlik hem de kommensallik için eşit önemde olmalıdırlar sonucuna varılmıştır (4).

Başka bir çalışmada nitrosoguanidin kullanılarak, SAP-yoksun *C. albicans* mutantları üretilmiş ve bu mutantların sıçanlarda Sap üreten kökenlerden daha az virulan olduğu gözlemlenmiştir (54). Kuştimur ve ark. da (55), yaptıkları çalışmada proteinaz pozitif kökenlerin enjekte edildiği farelerin 10 gün içinde % 80'inin, 16. güne kadar da % 100'ünün öldüğünü, bununla birlikte proteinaz negatif kökenlerin enjekte edildiği fare grubunda 9. günde sadece 1 farenin öldüğünü ve 30. güne kadar başka ölenin olmadığını gözlemleyerek benzer sonuçlar elde etmişlerdir.

Sap üreten ve mutasyonla SAP'dan yoksun hale dönüştürülen *C. albicans* kökenlerinin kullanıldığı bir başka çalışmada, yalnızca proteinaz üreten kökenlerin civciv koryoallantoik membranını invaze ettikleri gösterilmiştir. Aynı çalışmada ek olarak, asiditesi (pH<6) uzun süre korunan kültür ortamındaki SAP üreten kökenler, asiditesi daha kısa süreyle muhafaza edilen kültür ortamındaki diğer proteolitik kökenlere göre daha invaziv ve daha virulan olarak bulunmuştur (56).

Bir çalışmada, konak dokuyu istila eden fungal hücrelerin bulunduğu bölgede *Candida* proteinazının varlığı ve kandidozlu hastaların serumlarında yüksek titrede asit proteinaza karşı özgül antikorların saptanmıştır. Bu enzimin in vivo salgılandığını ve *Candida* enfeksiyonunun patogenezinde önemli rolü olduğunu kuvvetle desteklemektedir (49).

C. parapsilosis'in deri ve kan izolatlarının virulansının karşılaştırıldığı bir çalışmada, kutanöz izolatların hepsinin Sap aktivitesi gösterirken, kan izolatlarının bir kısmının bu aktiviteyi gösterdiği ve aynı zamanda deri izolatlarının enzim aktivitesinin 4 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada deri

izolatlarının fare vajinit modelinde kan izolatlarına oranla daha yüksek vajinopatik olduğu gösterilmiştir (57, 58).

Bernardis ve ark. (50), aktif semptomatik vajinitli hastalardan izole edilen 10 *C. parapsilosis* kökeninin kuvvetli asit proteinaz üreticisi olduklarını ve kökenlerin sıçanlarda vajinal kolonizasyona yol açtıklarını saptamışlardır. Bunun yanı sıra araştırmacılar 4 vajinal *C. parapsilosis* izolatının, sıçanlardaki invaziv enfeksiyon oluşturma kapasitesini araştırmışlardır. Çalışma kapsamında kökenler, güçlü bir bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaç olan siklofosfamid (Cy) uygulanmış ve uygulanmamış sıçanlara periton içi yoldan verilmiş ve bunların yalnızca Cy uygulanmış sıçanlarda ölüme neden olduğu gözlenmiştir.

Candida vajinitli HIV+ kadınların, HIV+ *Candida* taşıyıcısı ve HIV- *Candida* vajinitli kadınlardan anlamlı derecede daha yüksek Sap düzeyi gösteren kökenlerle enfekte oldukları bildirilmiştir (4).

Asit proteinaz üreten *C. albicans* kökenlerinin, üretmeyen kökenlere oranla daha zor fagosite olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular, *Candida*'lar tarafından aktif proteinaz üretilmesinin, virulansa katkıda bulunan faktörlerden biri olduğunu göstermektedir (50).

Ağız kandidiyazında Sap'ların rolünü histolojik değişmeler oluşmasıyla araştıran bir in vitro insan epidermi modelinde, Sap inhibitörü pepstatin A'nın etkisi ile, ayrıca *C. albicans* yabancı tip kökenlerle SAP genleri etkisizleştirilmiş mutantların virulansı incelenmiş; yabancı tip kökenin sebep olduğu histolojik lezyonların pepstatin A ile önemli oranda azaldığı, virulansı oldukça azaltılmış fenotipin enfeksiyonda daha az oranda bulunduğu gözlemlenmiştir (4)

Bu çalışmalardan proteinazların *Candida*'ların patojenliğine katıldığı izlenimi edinilmekteyse de hem mayayla hem de konakla ilgili diğer faktörler de göz önüne alınmalıdır; aslında belirli bir kökende proteinaz üretme yeteneğinin bulunması virulansı garanti etmemektedir. *C. parapsilosis*'in in vitro proteinaz ürettiği bilinmekle beraber enfeksiyon koşullarında üretimini artırma yeteneği bulunmadığından bu türün çoğu kökenleri düşük virulansa sahiptir (4).

2.4.3. Fosfolipaz Enziminin (PL) Genel Özellikleri

Fosfolipazın pek çok mantarda bulunduğu ve patojenitede rol oynadığı kanıtlanmıştır. Fosfolipaz aktivitesi ilk kez 1968 yılında Costa ve ark. tarafından *C. albicans*'da gösterilmiştir (8).

Fosfolipaz, gliserofosfolipitlerdeki bir veya daha fazla ester bağına hidrolize etme yeteneğindeki enzimleri ifade etmektedir. Tüm fosfolipazlar substrat olarak fosfolipitleri hedeflese de her enzim, özgül bir ester bağına parçalamaktadır (47). Fosfolipaz enzimi hücre zarında bulunan fosfolipitlerin yıkımında rol oynar. Bu enzimin aktivasyonu ile fosfolipidlerden lizofosfolipidler meydana gelir ve bu durum biyolojik membranın bozulmasına neden olur. Fosfolipazlar (PL) parçaladıkları özgül ester bağlarına göre A, B, C ve D olmak üzere dört tipe ayrılmışlardır (25). *C. albicans*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus* gibi fırsatçı patojen mantarlarda hücre dışı fosfolipazın potansiyel bir virulans faktörü olduğu görüşü ağırlık kazanmıştır (53).

Fosfolipaz enziminin varlığı kadar miktarı da virulans açısından önem taşımaktadır (8). Fosfolipaz B'nin enfeksiyon sırasında in vivo salgılandığı, hasta serumu ile fosfolipaz B'nin etkileşime girdiği gösterilerek belirlenmiştir (59).

Bu enzim tipleri arasında ilk saptanan fosfolipaz A ve bunun yıkım ürünü olan lizofosfolipidleri parçalayan lizofosfolipazdır (25, 59).

İlk yapılan çalışmalarda fosfolipaz enzimi için A, B ve C tipleri tanımlanmıştır (25). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise fosfolipaz D enziminin varlığı da bildirilmiştir (60). Fosfolipazın tüm tipleri *C. albicans*'da tanımlanmış ve genleri klonlanmıştır (61).

Fosfolipaz D enziminin, özellikle *C. albicans*'ın dimorfik geçişinde önemli bir role sahip olduğu gözlenmiştir (60). Fosfolipaz C ise bazı önemli hücre fonksiyonları kontrol eder. Özellikle plazma membran reseptörlerine gelen sinyallerin alınmasında çok önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (62).

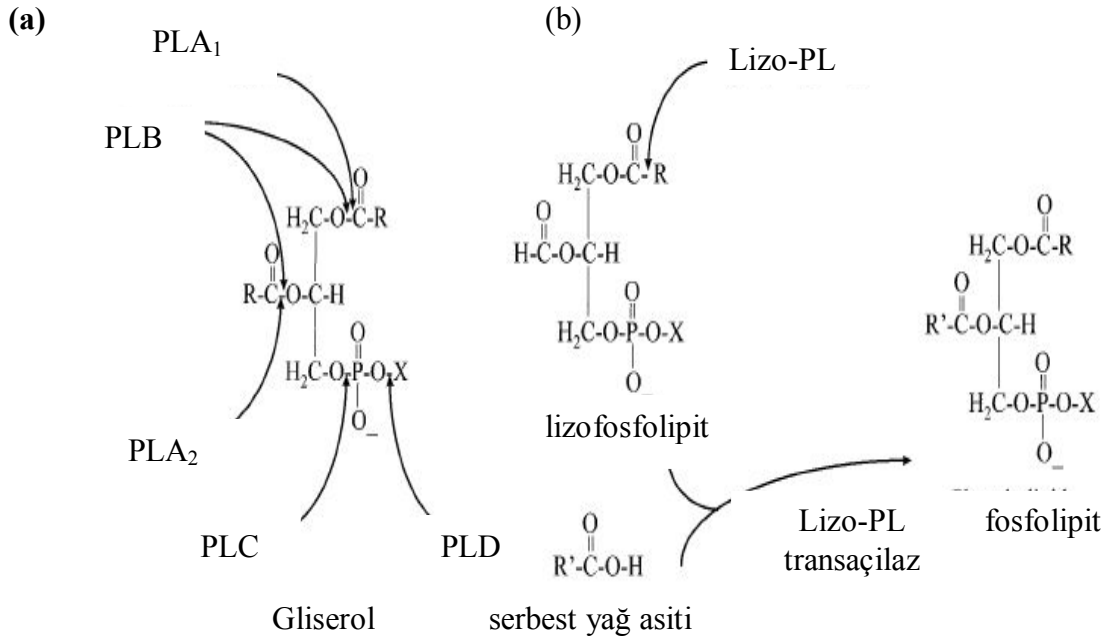
Bugün fosfolipaz aktivitesinde en önemli rolü fosfolipaz B'nin oynadığı düşünülmektedir (25). Fosfolipaz B aktivitesi, pH 4.0-5.0 arasında optimumdur (53). Bu enzimler hiflerde ve blastosporlarda hücre zarına yakın yerleşirler (25).

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 (63).

Fosfolipaz B 1995 yılında saflaştırılabilmiş, aminoasit dizilimi ve bu dizilimi kodlayan genler (plb1) belirlenerek klonlanması ile fosfolipaz salgılanması için açısından mutant kökenler elde edilmiştir (25). Mutant kökenlerin, in vitro fosfolipaz aktivitesinin ve in vivo fareye uygulandığında virulansının düşük olduğu gösterilmiştir (25). plb1 delesyonunun tutunmada herhangi bir bozukluğa yol açmadığı ancak invazyon yeteneğinin azalmasına neden olduğu açıklanmıştır (64).

Fosfolipaz A1 gliserol molekülünün birinci çift bağlı karbon pozisyonundaki yağ açıl ester bağlarını, fosfolipaz A2 ise aynı molekülün ikinci çift bağlı karbon pozisyonundaki bağları parçalamaktadır (şekil 1a). Lizofosfolipite bağlı kalan yağ asidi ise lizofosfolipaz olarak adlandırılan diğer bir enzim tarafından kesilmektedir (şekil 1b). Fosfolipaz C ise fosfolipitlerdeki fosfodiester bağı hidrolize ederek 1,2 diaçil gliserol oluşumunu sağlamaktadır. İkinci fosfodiester bağı ise fosfolipaz D tarafından kesilmektedir (şekil 1a) (43).

Fosfolipaz B (PLB) hem birinci çift bağlı karbon hem de ikinci çift bağlı karbon pozisyonundaki bağlara etki edebilmektedir. Bu etki PLB'nin hem hidrolaz (yağ asitlerinin salınımı) hem de lizofosfolipaz-transaçilaz aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Hidrolaz aktivitesi, hem lizofosfolipitlerden hem de fosfolipitlerden yağ asitlerinin koparılmasını sağlar; öte yandan transaçilaz aktivitesi ise serbest yağ asitlerinin lizofosfolipitlere transfer edilmesini sağlayarak fosfolipit oluşumuna neden olmaktadır (şekil1b) (43).



Şekil 1: Çeşitli fosfolipazların etki noktaları (a) PLA₁, Fosfolipaz A₁; PLA₂, Fosfolipaz A₂; PLB, Fosfolipaz B; PLC, Fosfolipaz C; PLD, Fosfolipaz D; (b) Lizo-PL, Lizofosfolipaz; Lizo-PL transaçilaz, Lizofosfolipaz transaçilaz'ı ifade etmektedir.

C. albicans yumurta sarısı ve lesitin içeren besiyerinde geliştirildiğinde; fosfolipaz etkinliğinin ürünleri olan gliserilfosfokolin, fosfokolin ve lizolesitinin gösterilebilmesi fosfolipaz etkinliğinin varlığına delil oluşturmaktadır (4).

2.4.4. Fosfolipaz Enziminin Virulans Özellikleri

Farklı türlerden 41 kökenle yapılan bir çalışmada, *C. albicans* kökenlerinin % 79'u fosfolipaz üretirken *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* izolatlarının hiç birinin bu enzimi üretmediğinin gözlemlenmesi bu enzim aktivitesinin yalnızca bu türle sınırlı olduğunu düşündürmektedir (65). Başka bir çalışmada ise, fosfolipaz etkinliği pozitif *C. albicans* kökenleri % 94 olarak bulunmuştur. Kan, yara ve idrardan izole edilmiş farklı *C. albicans* kökenleri arasında bu enzim etkinliğinin farklı olduğu da bildirilmiştir (28).

C. albicans CA 30 (invaziv köken) ve CA 87 (invaziv olmayan köken) ile yapılan ve fosfolipaz üretimlerinin karşılaştırıldığı çalışma sonucunda, hücre dışı fosfolipaz üretiminin invaziv hastalıkların gelişimiyle bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber, invaziv olmayan üstelik düşük fosfolipaz üreten CA 87 kökeninin gastrik mukozaya kolonize olma yeteneğinde olduğu gözlemlenmiştir. Bu da fosfolipaz üretiminin mukozal kolonizasyon için tek başına gerekli bir şart olmadığını göstermektedir (66).

Barrett-Bee ve ark. (8), sıçan modeli kullanarak, hücre dışı *Candida* fosfolipazının virulansdaki rolünü değerlendirmişlerdir. Fareler için en patojenik tür olan ve yanak epitellerine güçlü tutunan *C. albicans* kökenlerinin, yüksek fosfolipaz aktivitesine sahip olduklarını; buna karşılık, epitellere zayıf tutunan *C. albicans* kökenleri ile farelere daha az patojen olan *C. parapsilosis* ve *Saccharomyces cerevisiae* kökenlerinin daha düşük oranda fosfolipaz ürettiklerini göstermişlerdir. Fosfolipaz etkinliği ile patojenlik ve mukoza epitel hücrelerine yapışma arasında bir bağlantı bulunmuş, böylece mantarın ağız epitel hücrelerine daha kuvvetli tutunduğu ve yüksek fosfolipaz etkinliğine sahip olanların farelerde daha patojen olduğu gösterilmiştir (28).

Sitokimyasal teknikler kullanılarak yapılan bir çalışmada, fosfolipaz A ve lizofosfolipaz aktivitesinin, civciv koryoallantoik membranını enfekte eden *C. albicans*'ın hiflerinde ve blastosporlarında yer aldığı belirlenmiştir. Özellikle hif yapısının uç kısmında oldukça yüksek enzim aktivitesi gösterilmiştir, enzim salgılanmasının hiflerin büyüme noktalarıyla sınırlı olduğu anlaşılmıştır. Hiflerin yaşlı kısımlarında fosfolipaz etkinliği hücre içine yöneliktir ve otoliz yapar (8). Bu sonuçlara göre; *C. albicans* fosfolipazı, hem mantarda çoğalmayı hem de hücre zarının harabiyeti sonucu konak dokusuna invazyonu kontrol ederek, iki yönlü işlevsellik göstermektedir (28).

Başka bir çalışmada, farklı düzeylerde fosfolipaz üreten *C. albicans* izolatlarının patojenitesi sıçan modellerinde karşılaştırılmıştır. Çalışma kapsamında kökenlerin tutunma özellikleri ve asit proteinaz üretimleri de araştırılmıştır. Her bir izolat ile enfekte edilen sıçanların ölüm oranları ortaya çıkarılmış ve ölüm için her bir virulans faktörün tahmini değeri belirlenmiştir. Çalışılan virulans faktörleri

arasında sadece hücre dışı fosfolipaz aktivitesinin ölüm için belirleyici olduğu saptanmıştır. *C. albicans* ile sınırlı olan bu bulgular *Candida* patogeneğinde fosfolipazın önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir (66).

2.4.5. Biofilm ve Virulans Özellikleri

Bazı mikroorganizmaların doğada saprofit olarak veya insan vücudunda yaşamaya uyum sağladıklarında katı yüzeylere yapışma ve kalınlığı birkaç mm'ye varan hücre tabakalarından oluşan biofilm oluşturma özelliklerinin bulunduğu, bu yapışmanın özgün olabildiği veya olmadığı bilinmektedir (4).

% 40 karbonhidrat ve % 27 protein içeren glikokaliks yapısında hücre dışı bir madde olan (67,68) slime faktörü, konağın matriks proteinleri fibrin, fibronektin, vitronektin veya laminini ile birlikte biyofilm tabakası oluşturur. Mikroorganizmalar konağın bu matriks proteinlerine yapışıp, kolonizasyon meydana getirmektedirler (67). Biyofilmler, bir yüzeye ağ şeklinde bağlanmış mikrobiyal topluluklar olup, iki tabakalı, mayalar, hifler ve yalancı hiflerden oluşan yapılardır. Alttaki tabaka maya hücrelerinden, daha kalın üstteki tabaka ise hiflerden meydana gelmiştir (68).

Slime faktör, plastik ve metal yüzeylere yapışmayı sağlayan, mikroorganizma hücresine antifagositer özellik kazandıran, ayrıca antimikrobik maddelerin mikroorganizma hücresine girişini engelleyen hücre dışı bir polisakkarittir (69). Slime faktör mikroorganizmayı kaplayarak vücudun savunma mekanizmalarından korur. Bu maddenin kemotaktik etkisinin de olduğu, fakat slime tarafından uyarılan polimorfonükleer lökositlerde miyeloperoksidaz salınımının yetersiz olduğu gösterilmiştir. Bu, mikroorganizmanın hücre içinde yaşam süresinin uzamasına ve fagositozdan korunmasına neden olmaktadır (70). Ayrıca slime üreten mikroorganizmalara bağlı enfeksiyonların tedavisini daha güç olduğu gözlemlenmiştir (71). Bu nedenle yapışma veya slime yapımı önemli bir virulans faktörü olarak kabul edilmektedir (69, 72).

Slime faktör üretimi özellikle koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonlarında ayrıntılı biçimde incelenmiş ve mikroorganizmanın virulansını

artırdığı saptanmıştır (69). Slime üretimi *Candida*'lar için de patojenite faktörü olarak kabul edilmektedir (73). Bu faktörün, mikroorganizmanın konak hücreye ve yapay yüzeylere tutunmasını sağlayarak etkili olduğu gösterilmiştir (71). Bu nedenle slime faktör *Candida*'ların kataterlere, düz yüzeylere, plastik araçlara ve prostatik aletlere yapışmasından büyük oranda sorumlu tutulmaktadır (4). Slime faktör varlığında *Candida*'ların konak hücrelerine, protez ve kateterlere tutunup daha kolay kolonizasyon ve enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmektedir (74). Özellikle *C. albicans* ve *C. parapsilosis*, katetere yapışarak kolonizasyon sonucunda hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açabilmektedirler. Biyofilm, damar içi kateter veya protez uygulamalarında komplikasyon olarak gelişen enfeksiyonlara yol açabilmektedir (4). *Candida*'ların bu biyofilmden ayrılmaları ise çoğu kez sepsise yol açmaktadır (67).

Kateterde ortaya çıkan biyofilme hem mikroorganizmaya hem de konağa ait faktörlerin rol oynadığı; bu yapışma ve kolonizasyon için mantarın slime faktörünün, konağın da fibrin ve fibronektinlerinin gerekli olduğu; diğer patojenlik faktörlerinin yanısıra *C. albicans* ve *C. albicans* dışı kökenlerde biyofilmlerin önemli bir virulans faktörü olduğu öne sürülmüşse de son dönemde yapılan araştırmalarda mucin, fibronektin ve mannan bağlayan protein gibi tükürük veya serum proteinlerinin *Candida* biyofilmi oluşmasını kolaylaştırmadığı; *Candida* biyofilmi oluşmasının karmaşık bir olay olduğu bildirilmiştir (75).

Kateterler, hücre dışı matriks içinde biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ile kolonize olmakta ve mikroorganizmanın bu biyofilmden ayrılması çoğu kez sepsis ile sonuçlanmaktadır. Hastane kaynaklı kan dolaşımı ile ilgili enfeksiyonların başında gram negatif bakterilerden sonra mantarlar gelmektedirler. Fungeminin en yaygın etkeni olan *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata* gibi *Candida*'ların slime yapımı da virulansta etkili olmaktadır. Ancak proteolitik enzimler, fosfolipaz, dimorfizm gibi diğer virulans faktörlerinden daha az öneme sahip olabileceğinin de öne sürüldüğü bilinmektedir. Bu yorum, slime faktörünün virulans etkisinin diğer etmenlerde olduğu gibi tüm vücut bölgeleri için genel anlamda geçerli olmayıp yalnızca kateter gibi yabancı bir cisme bağlı enfeksiyonlarla sınırlı bir çerçevede kalmasından

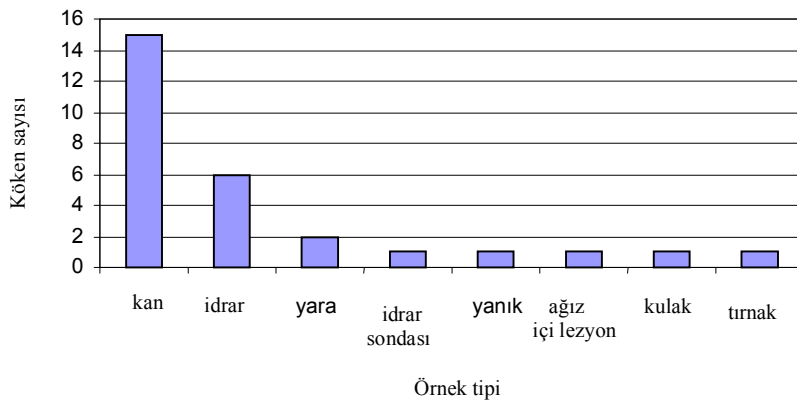
kaynaklanmakta olmalıdır. Ancak; geçtiğimiz on yıl içerisinde hızla öne çıkmış olan ve bağışıklığı bozulmuş kimselerde görüldüğü kabul edilen, çoğu ölümlerle sonuçlanan fırsatçı mantarların sebep olduğu enfeksiyonlara ek olarak; son dönemde bu gibi hususların da bir yansıması olarak artık bağışıklığı tam konaklarda da yaşamı tehdit eden fırsatçı mikozlardan söz edilmeye başlandığı dikkate değerdir (4).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1. Kökenler

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesinde Ekim 2005 ve Mart 2007 tarihleri arasında farklı poliklinik ve servislerden Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen kan ve kan dışı örneklerden izole edilen *C. parapsilosis* kökenleri çalışmaya dahil edildi. 28 kökenin 15'i kan kültürlerinden, diğerleri farklı klinik örneklerden izole edildi (Şekil 2).



Şekil 2: *C. parapsilosis* kökenlerinin izole edildikleri örnek tipleri ve sayıları

Tablo 4: Çalışma kökenlerine ait izolat no, kod, örnek tipi, örneğin alındığı klinik - poliklinik ve izolasyon tarihi

İzolat No	Kod	Örnek Tipi	Klinik- Poliklinik	İzolasyon Tarihi
1	C-2	Kan	Cerrahi Yoğun Bakım Servisi	03.10.2005
2	C-88	Kan	Dahiliye-Gastroenteroloji Servisi	08.11.2005
3	C-125	Kan	Kardiyovasküler Yoğun Bakım Servisi	07.11.2005
4	C-402	Kan	Pediyatrik Hematoloji Servisi	16.04.2006
5	C-497	Kan	Pediyatrik Hematoloji Servisi	28.05.2006
6	C-575	Kan	Genel Cerrahi Servisi	22.07.2006
7	C-608	Kan	Pediyatri-Adölesan Servisi	14.08.2006
8	C-612	Kan	Cerrahi Yoğun Bakım Servisi	24.08.2006
9	C-617	Kan	Pediyatri-Süt Çocuğu Servisi	10.10.2006
10	C-618	Kan	Cerrahi Yoğun Bakım Servisi	23.11.2006
11	C-630	Kan	Kardiyovasküler Yoğun Bakım Servisi	25.12.2006
12	C-644	Kan	Cerrahi Yoğun Bakım Servisi	23.12.2006
13	C-672	Kan	Nöroşirurji Yoğun Bakım Servisi	05.03.2007
14	C-673	Kan	Nöroşirurji Yoğun Bakım Servisi	05.03.2007
15	C-684	Kan	Pediyatri-Süt Çocuğu Servisi	25.03.2007
16	C-634	İdrar	Pediyatri-Adölesan Servisi	22.12.2006
17	C-637	İdrar	Enfeksiyon Servisi	08.12.2006
18	C-640	İdrar	Beyin Cerrahisi Servisi	30.11.2006
19	C-641	İdrar	Dahiliye-Nefroloji Servisi	27.12.2006
20	C-646	İdrar	Pediyatrik Nefroloji Polikliniği	15.02.2007
21	C-671	İdrar	Beyin Cerrahi Servisi	16.02.2007
22	C-636	İdrar sondası	Kardiyovasküler Yoğun Bakım Servisi	25.12.2006
23	C-661	Yara	Dahiliye-Endokrin Servisi	01.02.2007
24	C-685	Yara	Enfeksiyon Servisi	26.03.2007
25	C-653	Yanık	Genel Cerrahi Servisi	23.01.2007
26	C-648	Tırnak	Dermatoloji Polikliniği	01.02.2007
27	C-692	Ağız içi lezyon	Pediyatri-Süt Çocuğu Servisi	05.04.2007
28	C-693	Kulak	Kulak Burun Boğaz Polikliniği	24.04.2007

3.1.2. Kimyasallar ve Besiyeriler

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve besiyerleri farklı firmalardan sağlandı. Dekstrozu, pepton, agar Oxoid'den, sabouraud dekstrozu agar (SDA), glukoz monohidrat ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$), sodyum klorit ($NaCl$), kalsiyum klorür ($CaCl_2$), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), asetik asit (CH_3COOH), sodyum sitrat ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$), perklorik asit ($HClO_4$), safranin, tween 80, kazein pepton, soya peptonu, dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) Merck'den; sodyum asetat ($C_2H_3O_2Na$), sığır serum albumini (BSA) Sigma'dan; yeast extract Lab M'den; corn meal agar Himedia'dan; kromatik agar CHROMagar'dan; sitrik asit ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) Horasan Kimya'dan; aminoasit ve amonyum sülfat içermeyen yeast nitrogen base (YNB) Difco'dan; agaroz Prona'dan, hidroklorik asit (HCl) Riedel-deltaen'den temin edildi.

3.1.3. Düzenekler

Terazi (Sartorius laboratory), etüv (memmert), otoklav (Kermanlar), pastör fırını (Heraeus), santrifüj (Sigma, eppendorf), vorteks (Heidolph), manyetik karıştırıcı (Yellow^{line}), çalkalayıcı su banyosu (GFL), ışık mikroskobu, spektrofotometre, filtre (0.45 μm 'lik) (Schleicher&schuell), cam tüp, mezür, erlenmayer, beher, petri kapları, otomatik pipetler, cam pipetler, falkon tüp, enjektör, eküvyon.

3.1.4. Tampon Çözeltiler

3.1.4.1. Sitrik asit - Disodyum hidrojen fosfat pH 4.4 hazırlanması

A) 0.1 M sitrik asit ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$): 21.01 gr / 1000 ml deiyonize su

B) 0.2 M disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4): 28.40 gr / 1000 ml deiyonize su

56.4 ml A ve 43.6 ml B karıştırılır. Bu çözelti sitrik asit-disodyum hidrojen fosfat pH 4.4 tamponudur.

3.1.4.2. 0.114 M Sodyum asetat pH 5.2 hazırlanması

A) 0.2 M sodyum asetat ($C_2H_3O_2Na$): 8.2 gr / 500 ml deiyonize su

B) 0.2 M asetik asit (CH_3COOH): 2.88 ml / 247.11 ml deiyonize su

39.5 ml A ve 10.5 ml B karıştırılır, 100 ml' ye tamamlanır. Bu çözelti 0.2 M sodyum asetat pH 5.2 tamponudur.

57 ml 0.2 M sodyum asetat ve 43 ml deiyonize su karıştırılır. 0.114 M sodyum asetat pH 5.2 tamponu hazırlanmış olur.

3.1.4.3. 0.05 M Sodyum sitrat pH 4.0 hazırlanması

A) 0.1 M sitrik asit ($C_6H_8O_7.H_2O$): 21.01 gr / 1000 ml deiyonize su

B) 0.1 M sodyum sitrat ($C_6H_5O_7Na_3.2H_2O$): 29.41 gr / 1000 ml deiyonize su

33.0 ml A ve 17.0 ml B karıştırılıp 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti 0.1 M sodyum sitrat pH 4.0 tamponudur.

Bu tampon 1:1 oranında sulandırılarak 0.05 M sodyum sitrat pH 4.0 tamponu hazırlanmış olur.

Hazırlanan tampon çözeltiler ve besiyeriler otoklavda 121 °C'de 1.1 atm'de 15 dakika steril edilir.

3.2. METOD

3.2.1. İzolasyon

Kan konulmuş kan kültür şişeleri laboratuvara geldikten sonra Bactec otomotize sistem kabinine yerleştirildi. Otomotize Bactec sisteminin çalışma prensibi, kan kültür şişelerindeki CO₂ seviyesinin bir indikatör aracılığı ile takibine dayanmaktadır. Sistem kültür şişelerini 37 °C'de tutar. Saatte bir CO₂ seviyesini ölçerek genel olarak 7 gün boyunca takip eder. Bu sürenin uzatılması mümkündür. Üremesi olan kültür şişelerindeki etkenler oluşturdukları CO₂ ile şişenin CO₂ seviyesini değiştirir. Bu değer standart kritik seviyeye ulaştığında otomatize Bactec

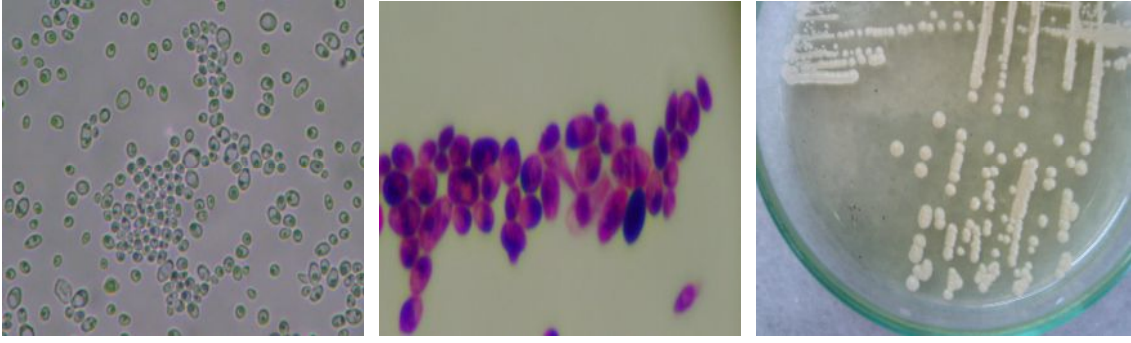
sistemi sesli ve görüntülü sinyal verir. Sinyal veren şişelerden alınan örnekler gram boyama ile incelendi. Mantar hücresi görülenler mikolojiye yönlendirildi ve kan kültürü şişesinden SDA'ya 0.01 ml'lik öze ile seyreltme ekim yöntemi ile pasaj yapıldı. Bakteriyel etkenlerin olası varlığı nedeniyle kanlı, eozin metilen blue ve çikolatamsı agar'a da ekim yapıldı.

Mikolojiye gelen diğer örneklerle de gram boyama yapıldı. Mantar hücresi görülüp görülmediği not edildi. Örneklerden 0.01 ml'lik steril öze ile seyreltme ekim yöntemi ile sabouraud dekstroz agara da ekim yapıldı. Bakteriyel etkenlerin olası varlığının tesbiti için kanlı, eozin metilen blue ve çikolatamsı agara da ekim yapıldı.

Ekim yapılan besiyerler 37 °C'de 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirildi. 0.5-1 mm çapında, beyaz veya krem renkli, genellikle düzgün kenarlı, yumuşak kıvamlı ve kendine özgü maya kokusu olan kolonilerden direkt ve boyalı preparatlar (gram, çini mürekkebi) hazırlanarak mikroskopik inceleme yapıldı. Mayalar mikroskopta genellikle 5-10 µm çapında , yuvarlak veya oval görünümünde, çekirdekli, tomurcuklanan, hif ya da yalancı hif oluşturabilen gram olumlu boyanan hücreler şeklinde görünürler.

Germ tüp testi ile *C. albicans* diğer *Candida*'lardan ayrıldı. *C. albicans* dışındaki *Candida* türleri için API 20C AUX (Bio Merieux, France) ticari kiti kullanılarak tiplendirme yapıldı. *C. parapsilosis* olarak tiplendirilen kökenler Mısır unu-tween 80 agardaki morfolojik görünümüne ve kromatik agarda oluşturdukları renklerle de değerlendirildi.

C. parapsilosis olarak tanımlanan kökenler YEPD sıvı besiyer içerisinde, -80 °C'de çalışmalarda kullanmak üzere saklandı. YEPD besiyeri % 1 yeast extract, % 2 pepton, % 2 dekstroz, % 20 gliserol içerecek şekilde distile su ile hazırlandı.



Şekil 3: *C. parapsilosis*'in boyasız (solda), gram boyalı (ortada) mikroskopik görüntüleri ve kolonilerinin SDA'daki görünümü (solda)

3.2.2. İdentifikasyon

3.2.2.1. Germ Tüp Testi

0.5 ml insan serumu içerisine test edilecek koloniden eklenip karıştırıldı. 37 °C'de 2.5-3 saat inkübe edildikten sonra lam lamel arası preparat hazırlandı ve 40X büyütmede incelendi. Blastosporlardan köken alan, spordan çıktığı noktada daralma olmayan filament şeklindeki yapılar germ tüp olarak değerlendirildi (76). Maya hücrelerinden direk olarak oluşan kısa bir hif başlangıcı olan germ tüpler, maya hücresi ile birleşim bölgesinde boğumlanmanın olmaması ile yalancı hiflerden ayrılır (77). Germ tüp oluşturan maya kökenleri *C. albicans* olarak tanımlandı ve çalışma dışı bırakıldı (76).

3.2.2.2. Karbonhidrat Yıkım Özelliklerinin Test Edilmesi

Karbonhidrat yıkım testleri, tüm mayaların tür düzeyinde tanımlanmasında temel yöntemdir. Maya hücresinin, oksijen varlığında (enzimatik yoldan) tek karbon kaynağı olarak spesifik bir karbonhidratı kullanma yeteneğini ölçer. Karbonhidrat kullanma özelliği Wickerham'ın yıkım ve fermentasyon

yöntemi ile incelenir. Klinik laboratuvarların çoğunda bu testlerin yerini hazır ticari test kitleri almıştır. Bu testler içinde en yaygın kullanılanı API kitleridir (19, 23).

Mayaların identifikasyonu için, API 20 C AUX (bioMerieux, France) ticari kiti kullanıldı. Bu kit 19 karbonhidrat için asimilasyon testi içeren 20 kuyucuktan oluşur. Birinci kuyucuk ürememe kontrolüdür. Test edilen karbonhidratlar glukoz, gliserol, 2-keto-D-Glukonat, L-arabinoz, adonitol, ksilitol, galaktoz, inozitol, sorbitol, α -Metil-D-Glukosid, asetil-D-Glukozamin, selobiyoz, laktoz ,nmaltoz, sukroz, trehaloz, melebiyoz ve rafinozdur. Mayalar inoküle edildikleri kuyucuktaki karbonhidratı karbon kaynağı olarak kullanıyorsa, o kuyucukta üreme olur. API 20 C AUX ile mayaların karbonhidrat asimilasyon yetenekleri 48., ve 72. saatte değerlendirilerek tür düzeyinde tanımlama yapılır.

İnkübasyon kabının içindeki kuyucuklar 5 ml distile su ile dolduruldu. Karbonhidratların bulunduğu kuyucuklardan oluşan kısım, paketi açılarak inkübasyon kabına yerleştirildi. SDA'daki 24 saatlik *Candida* kolonilerinden steril bir öze ile alınıp 2 ml'lik medium (% 0.85 NaCl) içine karıştırılarak yoğunluğu 2 McFarland olan süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyondan kit içeriğinde bulunan C medium içine 100 μ l eklendi. İnkübasyon kabının kapağı kapatıldı. 30 °C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyondan sonra bulanıklık olan kuyucuklarda üreme olduğu kabul edildi. Ürememe kontrolünde bulanıklık olmamasına dikkat edildi. Glukoz kuyucuğunda yeterli üreme yoksa inkübasyon süresi 72 saate uzatıldı. Üremeler değerlendirme kağıdına işaretlendi.

Test değerlendirme kağıdında her guruptaki karbonhidratlara 1, 2 ve 4'ten oluşan numaralar verilmiştir. Her gurup için bu numaralar toplandı ve sayısal bir görünüm elde edildi. Bu sayısal görünüm API 20 C AUX sayısal görünüm çizelgesine (Analytica Profile Index) göre değerlendirildi.



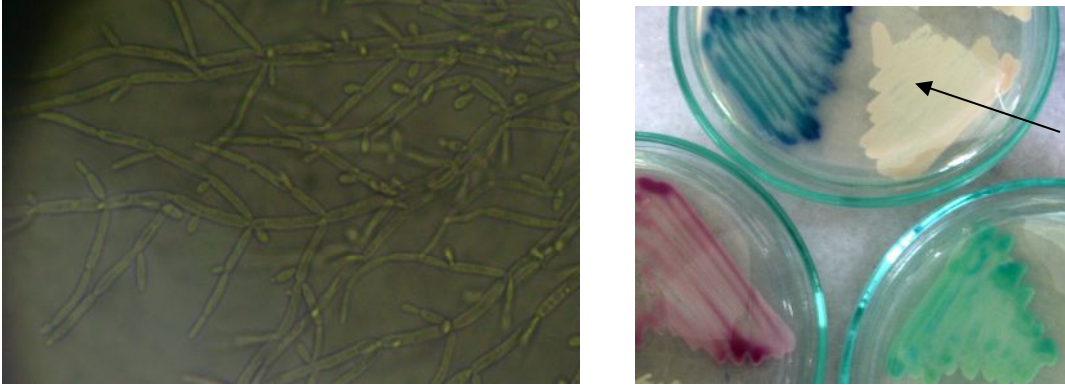
Şekil 4: API 20 C AUX düzeneği (üstte) ve sayısal görünüm çizelgesi (altta)

3.2.2.3. Mısır Unu-Tween 80 Agar Testi

% 1 tween 80 eklenmiş mısır unu agar hazırlandı. Ticari olarak elde edilen mısır unu agarın (corn meal agar) 4.25 gr'ı 250 ml distile su içinde manyetik karıştırıcıda çözünene kadar ısıtıldı. Isıtıcıdan alındıktan sonra içine % 1 oranında tween 80 ilave edildi. Otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 15 dakika steril edildi. Petrilere 4 mm kalınlığında döküldü.

Hazırlanan mısır unu-tween 80 agar yüzeyine SDA'daki saf maya kolonilerinden iğne uçlu öze kullanılarak birbirine paralel üç çizgi şeklinde ekim yapıldı. Ekim işlemi tamamlandıktan hemen sonra ekim çizgilerinin üzeri steril lamelle kapatıldı. 26 °C'de 72 saat inkübe edildi (78).

İnkübasyon sonunda spor, hif ve yalancı hif oluşumu özellikleri yönünden tüm kökenler ışık mikroskopunda 40X büyütmede incelendi. Çok sayıda ağaç şeklinde dallanmış pseudohif, pseudohifler boyunca tek tek veya ufak kümeler halinde bastosporlar ve dev hücreler olarak adlandırılan iri hiflerin gözlemlenmesi *C. parapsilosis* yönünde değerlendirildi (79).



Şekil 5: *C. parapsilosis* kolonilerinin kromatik agarda beyaz görünümü (solda) ve mısır unu–tween 80 agar’da yalancı hif ve blastosporları (sağda)

3.2.2.4. Kromatik Agar Testi

Ticari olarak elde edilen kromatik agarın (CHROMagar) 9.54 gr’ının 200 ml distile suda, manyetik karıştırıcıda ısıtılarak iyice çözünmesi sağlandı. Kaynama sıcaklığına gelmeden ısıtıcudan alınan besiyeri 45 °C’ye kadar soğuyunca steril petrilere döküldü. Hazırlanan besiyeri ekim yapılana kadar karanlık ortamda saklandı.

Test edilecek kökenin SDA’daki saf kültüründen steril bir öze ile alınan koloniler agarın yüzeyine yaygın ekim şeklinde ekildi. 35 °C’de 48 saat inkübe edildi ve oluşan beyaz renk *C. parapsilosis* yönünde değerlendirildi. CHROMagar’da, *C. albicans* yeşil, *C. glabrata* lila, *C. tropicalis* mavi, *C. quilliermondii* ıslak pembe, *C. krusei* kadifemsi pembe, *C. kefyr* kirli beyaz görünür.

3.2.3. *Candida parapsilosis* Kökenlerinin Sap Aktivitesinin Araştırılması

3.2.3.1. Sığır Serum Albümini İçeren Sıvı Besiyeri Hazırlanması

BSA içeren sıvı besiyer Banerjee ve ark. (80,81) önerdiği şekilde hazırlanarak kullanıldı. % 0.17 YNB w/o aa ve as, % 2 glukoz , % 0.2 BSA distile

suda hazırlanıp pH 4.0'a ayarlandıktan sonra 0.45 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi ve steril tüplere 2'şer ml dağıtıldı. Test edilecek maya kökenlerinden 10⁷ hücre BSA sıvı besiyer içerisine ekim yapıldı ve 30 °C'de çalkalayıcı su banyosunda 200 rpm'de 3 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda kültürler 7000 rpm'de 10 dakika çöktürüldü ve kültür süpernatantları -20 °C'de saklandı. Kültür süpernatantlarındaki Sap miktarı süt tozu agaroz yöntemi ve spektrofotometrik yöntem ile belirlendi.

3.2.3.2. Süt Tozu Agaroz Yöntemi ile Sap Aktivitesinin Belirlenmesi

Süt tozu ilaveli agaroz, % 1 yağsız süt tozu, % 1 agaroz ve 0.114 M sodyum asetat pH 5.2 tamponu ile hazırlandı (80,81). Önce agaroz tampon içerisinde eritildi, 55-60 °C'ye soğutulup yağsız süt tozu ilave edildi ve hafifçe karıştırılarak 1 mm kalınlığında cam plaka üzerine dökülüp katılaşması bekledi. Kültür süpernatantının 2.5 µl'si hazırlanan agaroz üzerine damlatıldı ve plastik kutu içerisinde oda ısısında 24 saat inkübe edildi. Süt tozu içerisindeki kazeinin parçalanması ile oluşan beyaz zonların çapları ölçülerek maya kökenlerinin Sap aktiviteleri değerlendirildi. Maya kökenlerinin süt tozu agaroz üzerine damlatma ile yapılan Sap aktivite değerlendirmelerinde presipitasyon zonlarının ölçümlerinde hiç presipitasyon zonu görülmeyenler (-), 0.5 cm ve altında zon çapı görülenler (+), 0.6-0.9 cm arasında zon çapı görülenler (+), 1-1.4 cm arasında zon çapı görülenler (+++), 1.5 cm ve üzerinde zon çapı görülenler ise (++++) olarak değerlendirildi.

3.2.3.3. Spektrofotometrik Yöntemle Sap Aktivitesinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesinin tayini için 50 mM sodyum sitrat (pH 3.2) içerisine % 2 BSA ilave edilerek substrat hazırlandı. 0.5 ml substrat, 0.1 ml 50 mM sodyum sitrat (pH 3.2) ve 0.2 ml kültür süpernatantı karıştırılarak 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Ayrıca substrat ve tampondan oluşan kontrol numunesi hazırlanarak aynı şartlarda inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon tüplerine 0.2 ml 2M perklorik asit ilave edilerek buz üzerinde 15 dakika tutuldu. Kontrol numunesine perklorik asit ilave

edilmeden önce 0.2 ml saflaştırılmış enzim solüsyonu koyuldu. Presipite olan proteinler 13000 rpm'de 5 dakika çöktürüldükten sonra süpernatantın enzim aktivitesi OD280'de ölçüldü.

3.2.4. *Candida parapsilosis* Kökenlerinin Fosfolipaz Aktivitesinin Araştırılması

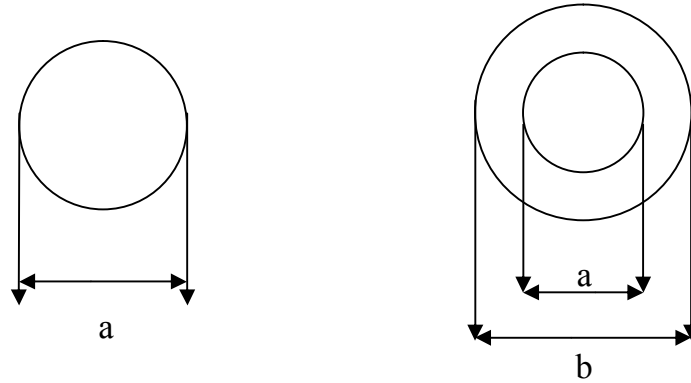
3.2.4.1. Yumurta Sarılı Agar Yöntemiyle PL Aktivitesinin Belirlenmesi

Yumurta sarılı agar besiyeri, 1.25 gr pepton, 2.75 gr $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$, 2.5 gr agar, 7.3 gr NaCl, 0.07 gr $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 115 ml distile su içinde çözülerek hazırlandı. Karışım otoklavda 121 °C'de 1.1 atmosfer basınçta 15 dakika steril edildi.

Yumurta sarısını hazırlamak için yumurtalar öncelikle % 95'lik alkolde 1 saat bekletilir. Steril koşullarda kırılarak sarısı ayrılır. Üzerine eşit hacimde serum fizyolojik eklenir ve manyetik karıştırıcıda karıştırılır. 2000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilir (33). Süpernatant besiyerine katılmak üzere ayrılır. 10 ml süpernatant ile 125 ml sitrik asit disodyum fosfat tamponu (pH: 4.4) ana besiyerine eklenir ve hazırlanan besiyeri petrilere 4 mm kalınlığında dökülür (82).

Kökenlerin SDA'da 24 saatlik inkübasyon sonucu üreyen kolonilerinden steril serum fizyolojik içinde McFarland standart bulanıklığı 0.5 olacak şekilde maya süspansiyonu hazırlanır. Hazırlanan yumurta sarılı besiyeri üzerine maya süspansiyonlarından 5 µl besiyeri yüzeyine değdirilmek suretiyle ekim yapılır ve 37 °C'de 8 gün inkübe edilir (82). Pozitif kontrol olarak *C. albicans* Alperen a E-131 kökeni kullanılmıştır.

Fosfolipaz aktivitesinin ölçülmesinde ve hesaplanmasında, koloninin etrafında oluşan belirgin halka şeklindeki presipitasyon zonu (Pz) dikkate alınmıştır. Fosfalipaz aktivitesi, koloni çapının, koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı olarak hesaplanmıştır (şekil 10). Bu sistemde Pz değeri küçüldükçe fosfalipaz aktivitesi artmakta, Pz=1.00 değeri, denenen kökenin fosfalipaz aktivitesinin negatif olduğunu göstermektedir. Bu durumda, Pz değeri 0.9-1.00 olanlar (+); 0.89-0.8 olanlar (++); 0.79-0.7 olanlar (+++); < 0.69 olanlar (++++) olarak değerlendirilmektedir (83).



$$Pz = \frac{\text{Koloni çapı}}{\text{Koloni + Presipitasyon zonu çapı}} = \frac{a}{b}$$

Şekil 6: Fosfolipaz aktivitesi için Pz değerinin hesaplanması

3.2.5. Slime Oluşumunun Belirlenmesi

Slime oluşumunun belirlenmesi amacıyla koagülaz negatif stafilokoklarda slime üretiminin belirlenmesi için tanımlanan yöntem esas alındı (69, 84). Ancak yöntem üzerinde değişiklikler yapıldı. Glukozlu sıvı sabouraud besiyeri (GSSB), 10 g pepton, 80 g glukoz, 1000 ml distile su içinde eritilip tüplere 5 ml şekilde dağıtılarak hazırlandı. Glukozlu triptik soy buyon besiyeri (GTSB), 17 g kazein pepton, 3 g soya peptonu, 5 g sodyum klorit, 2.5 g dipotasyum hidrojen fosfat, 80 g glukoz 1000 ml distile su içinde eritilip tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtıldı. Hazırlanan besiyeriler otoklavda 121 °C'de 1.1 atm'de 15 dakika steril edildi.

Sabouraud dextrose agar'daki maya kolonilerinden alınarak birer öze dolusu Sabouraud sıvı besiyeri ve triptik soy buyon içerisine inoküle edildi. Tüpler 35 °C'de 48 saat inkübe edildikten sonra sıvı besiyeri tüplerden uzaklaştırıldı ve tüplerin kenarları % 0.25'lik safranin ile boyandı. Ayrıca glukozlu sıvı sabouraud besiyeri ve glukozlu triptik soy buyon besiyerleri içeren tüpler hazırlandı; maya inokülasyonu yapılmayan bu tüpler negatif kontrol olarak kullanıldı. Tüpün kenarlarındaki slime oluşumu; var yada yok şeklinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışma kapsamında farklı klinik örneklerden izole edilen 28 *C. parapsilosis* kökeni kullanıldı. 15 köken kan örneklerinden, kalan 13 kökenin 6'sı idrar, 2'si yara, 1'i idrar sondası, 1'i yanık, 1'i ağız içi lezyon, 1'i kulak sürüntüsü, 1'i tırnak örneklerinden izole edildi.

Maya kökenlerinin tiplendirilmesi karbonhidrat yıkım testi, mısır unu-tween 80 agar ve kromatik agar kullanılarak yapıldı.

Kökenlerin Sap aktivitesinin belirlenmesi amacıyla süt tozu agaroz yöntemi ve spektrofotometrik yöntem; PL aktivitesinin belirlenmesi amacıyla yumurta sarılı agar yöntemi; biofilm oluşturma özelliğinin belirlenmesi amacıyla tüp tutunma yöntemi uygulandı.

Süt tozu agaroz deneyinde; kan izolatlarının % 80'i (++), % 20'si (+); diğer örnek tiplerinin izolatlarında ise % 84,6 oranında (++), % 15.4 oranında (+) Sap aktivitesi tesbit edildi.

Yumurta sarılı agar deneyinde; kökenlerin hiçbirinde fosfolipaz aktivitesini gösteren zon görülemedi.

Tüp tutunma deneyinde; GSSB ile; kan izolatlarının % 86.7'si slime pozitif ve % 13.3'ü slime negatif, diğer izolatların ise % 100'ü slime pozitif tesbit edilmiştir. Bütün izolatların % 92.8'inde slime oluşumu görülmüştür. GTSB ile, kan izolatlarının % 80'i slime pozitif, % 20'si slime negatif tesbit edilmiştir, diğer izolatların ise % 76.9'u slime pozitif, % 23.1'i slime negatif bulundu. Bütün izolatların % 78.5'inde slime oluşumu görülmüştür.

4.1. *C. parapsilosis* Kökenlerinin Süt Tozu Agaroz Yöntemi ile Sap Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Kökenlerin BSA sıvı besiyerdeki 72 saatlik kültür süpernatantlarından 2.5 µl süt tozu ilave edilmiş agaroz üzerine damlatıldı. Oda ısısında 24 saat inkübe edildikten sonra oluşan opak zonların çapları ölçülerek Sap aktivitesinin değerlendirilmesi, zon çapı < 0.5 cm (+), 0.5-0.9 cm (++) , 1-1.4 cm (+++), > 1.4 cm (++++), zon yok (-) şeklinde yapıldı.

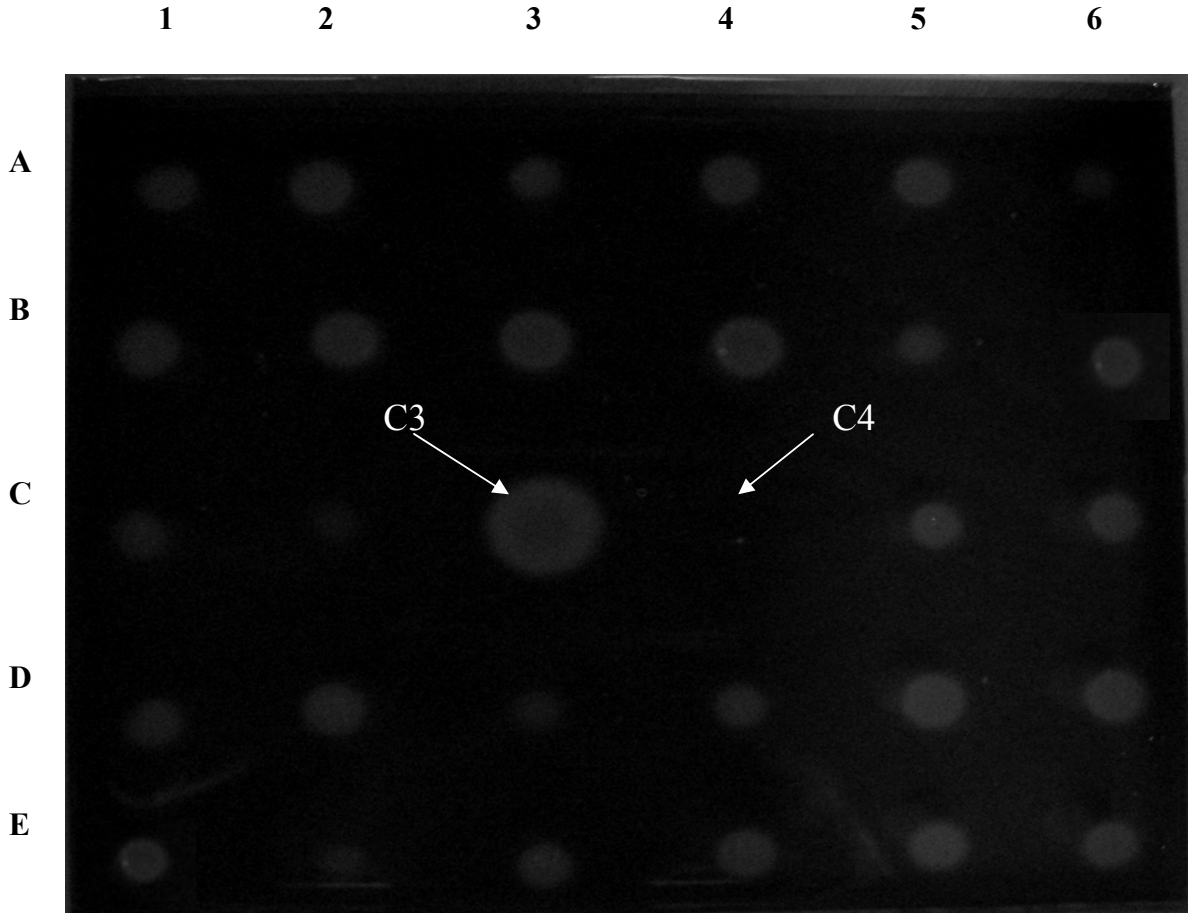
A6, B5, C2, D3, E2 ; (+)

A1, A2, A3, A4, A5 ; B1, B2, B3, B4, B6 ; C1, C3, C4, C5, C6 ; D1,

D2, D4, D5, D6 ; E1, E3, E4, E5, E6 ; (++)

C3 ; pozitif kontrol

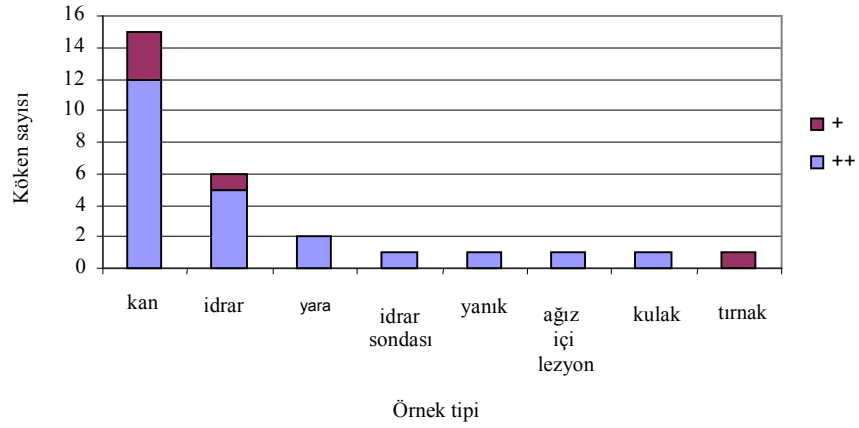
C4 ; negatif kontrol (BSA sıvı besiyer)



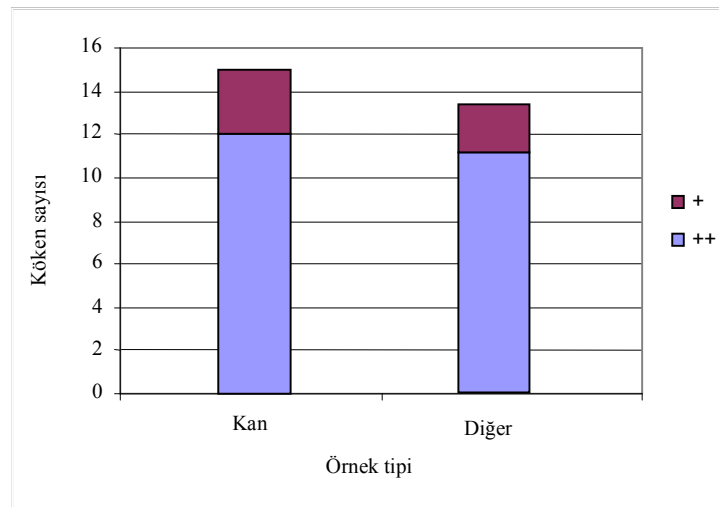
Şekil 7: Süt tozu agaroz yöntemi ile Sap aktivitesinin değerlendirilmesi

Kan izolatlarının % 80'i (++), % 20'si (+); diğer örnek tiplerinin izolatlarında ise % 84,6 oranında (++), % 15,4 oranında (+) düzeyde Sap aktivitesi tesbit edildi.

Çalışmamızda asit proteinaz aktivitesi açısından kan izolatları ile diğer izolatlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Sap aktivitesi için $P=1.00$, X^2 Test, $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi).



Şekil 8: Örnek tiplerine göre kökenlerin Sap aktivitesi düzeyleri



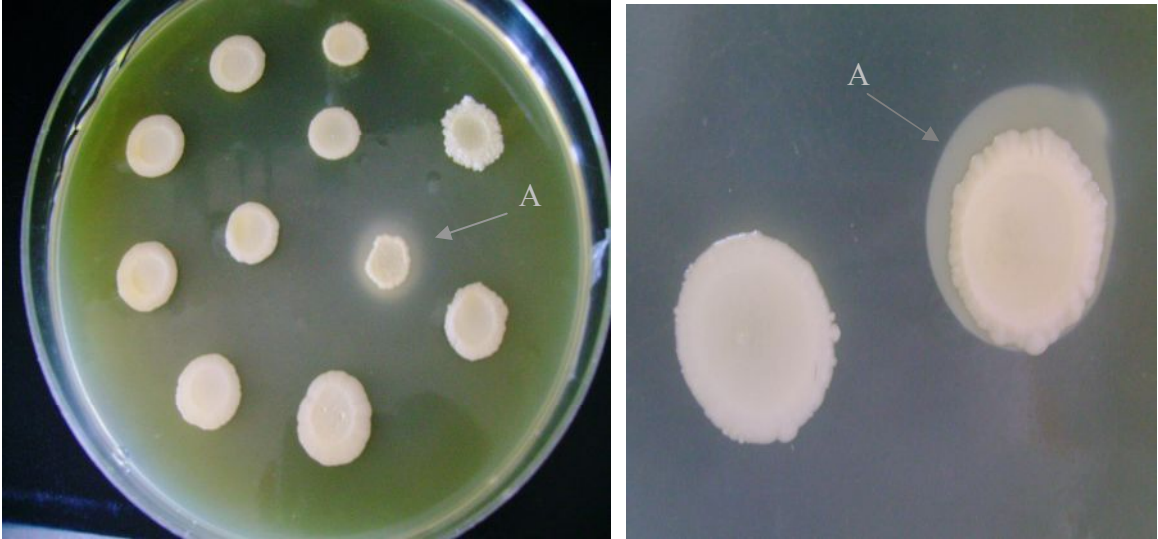
Şekil 9: Örnek tiplerine göre (kan-diğer) kökenlerin Sap aktivitesi düzeyleri

4.2. *C. parapsilosis* Kökenlerinin Yumurta Sarılı Agarda Fosfolipaz Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Yumurta sarılı agar üzerine kökenlerin MacFarland 0.5'lik süspansiyonlarından 5 µl damlatıldı. 37 °C'de 8 günlük inkübasyon sonucunda opak zon olup oluşmadığına bakıldı.

Pozitif Kontrol (A); fosfolipaz aktivitesini gösteren opak zon görüldü.

Kökenlerin hiçbirinde fosfolipaz aktivitesini gösteren zon görülmedi.



Şekil 10: Yumurta sarılı agarda, fosfolipaz aktivitesi pozitif kökenin koloni etrafında oluşturduğu zon (A; pozitif kontrol) ve fosfolipaz negatif kökenlerin koloni görünümü

4.3. *C. parapsilosis* Kökenlerinin Glukozlu Sıvı Sabouraud Besiyeri (GSSB) ve Glukozlu Triptik Soy Buyon Besiyeri (GTSB) Kullanılarak Plastik Test Tüplerinde Slime Oluşumunun Değerlendirilmesi

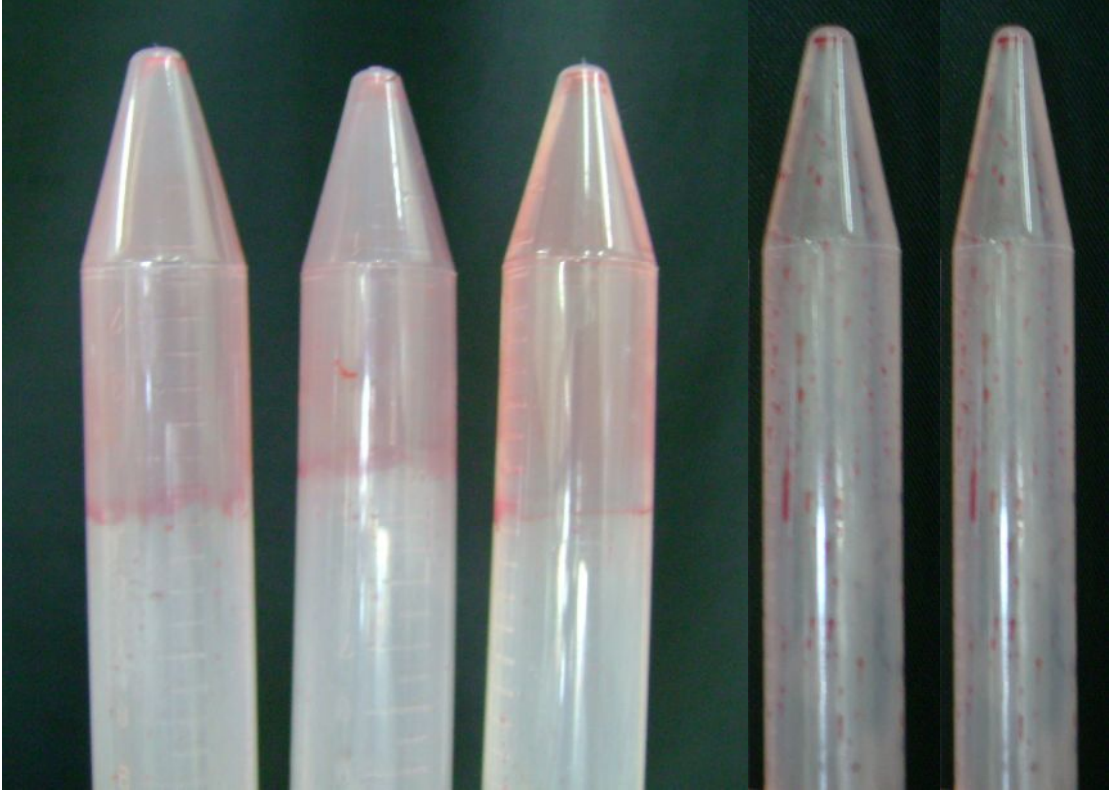
GSSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde; kan izolatlarının % 86.7'si slime pozitif ve % 13.3'ü slime negatif, diğer izolatların ise % 100'ü slime pozitif tesbit edildi. Bütün izolatların % 92.8'inde slime oluşumu görüldü. GTSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde, kan izolatlarının % 80'i slime pozitif, % 20'si slime negatif tesbit edildi, diğer izolatların ise % 76.9'u slime pozitif, % 23.1'i slime negatif bulundu. Bütün izolatların % 78.5'inde slime oluşumu görüldü.

Yalnızca 1 kan izolatu her iki yöntemde de slime negatif bulundu. Toplam 23 kökende, hem GSSB hem de GTSB kullanılan tüp deneylerinde slime oluşumu görüldü.

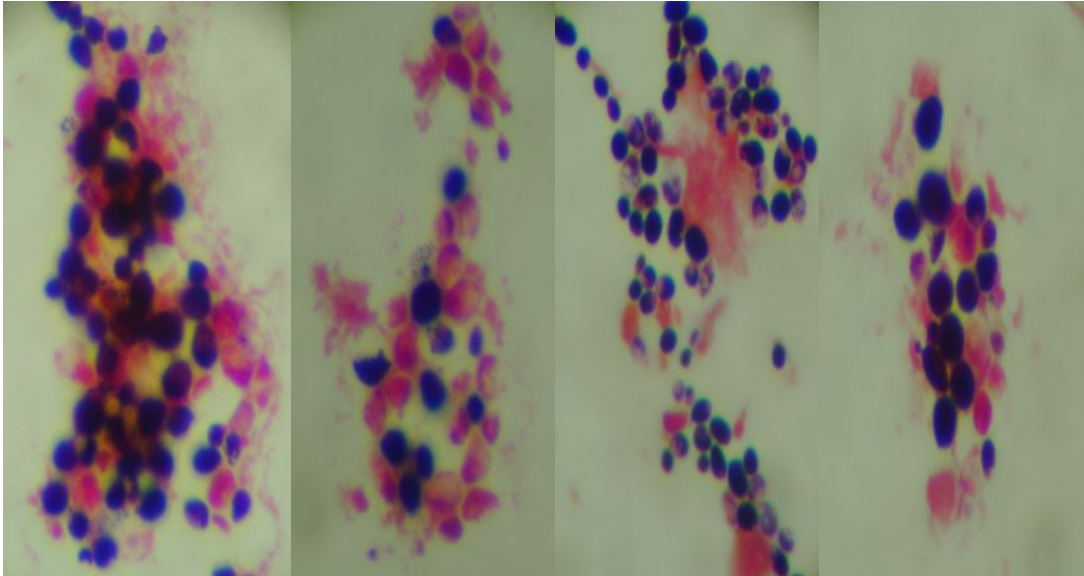
Çalışmamızda kan izolatları ile diğer izolatların slime oluşturma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. (GSSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde $P=0.484$, GTSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde $P=1.00$, X^2 Test, $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi).

Tablo 5: Slime faktör araştırmak için, GSSB ve GTSB kullanılarak yapılan iki farklı tüp tutunma deneyinin sonuçları

Örnek Tipi	Kan		Diğer		Toplam	
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
GSSB	13	2	13	–	26	2
GTSB	12	3	10	3	22	6



Şekil 11: A, B,C: Slime pozitif test tüpleri; D: Slime negatif test tüpü; E: Negatif kontrollerin görünümü



Şekil 12: Slime pozitif tüpün çeperlerinden hazırlanan preparatta *C. parapsilosis* kökeninin gram boyaması

Tablo 6: *C. parapsilosis* kökenlerinin kaynağı, Sap, PL enzim aktivite düzeyleri ve slime oluşturma özelliklerinin tümü

<u>İzolat No</u>	<u>İzolatın Kaynağı</u>	<u>Sap Aktivitesi (cm)</u>	<u>Sap Aktivitesi OD 280 (pH: 3.2)</u>	<u>PL Aktivitesi</u>	<u>Slime Oluşumu (GSSB) (GTSB)</u>		
1	Kan	0.6	(++)	0.074	(-)	+	+
2	Kan	0.7	(++)	0.065	(-)	+	-
3	Kan	0.5	(+)	0.015	(-)	+	+
4	Kan	0.7	(++)	0.053	(-)	+	+
5	Kan	0.7	(++)	0.070	(-)	+	-
6	Kan	0.6	(+)	0.048	(-)	+	+
7	Kan	0.7	(++)	0.019	(-)	+	+
8	Kan	0.7	(++)	0.092	(-)	+	+
9	Kan	0.8	(++)	0.079	(-)	+	+
10	Kan	0.8	(++)	0.063	(-)	-	+
11	Kan	0.5	(+)	0.051	(-)	+	+
12	Kan	0.6	(++)	0.057	(-)	+	+
13	Kan	0.6	(++)	0.056	(-)	+	+
14	Kan	0.3	(+)	0.049	(-)	+	+
15	Kan	0.5	(+)	0.076	(-)	-	-
16	İdrar	0.6	(++)	0.051	(-)	+	+
17	İdrar	0.5	(+)	0.251	(-)	+	+
18	İdrar	0.3	(+)	0.071	(-)	+	+
19	İdrar	0.6	(++)	0.065	(-)	+	-
20	İdrar	0.6	(++)	0.072	(-)	+	+
21	İdrar	0.7	(++)	0.038	(-)	+	-
22	İdrar sondası	0.7	(++)	0.070	(-)	+	+
23	Yara	0.7	(++)	0.153	(-)	+	-
24	Yara	0.7	(++)	0.052	(-)	+	+
25	Yanık	0.6	(++)	0.068	(-)	+	+
26	Tırnak	0.4	(+)	0.013	(-)	+	+
27	Ağız içi lezyon	0.7	(++)	0.099	(-)	+	+
28	Kulak	0.7	(++)	0.062	(-)	+	+
<i>C. albicans</i>							
CBS 2730		1.4	(+++)	0.509			
<i>C. albicans</i> E-131					(+++)		

5. TARTIŞMA

Son yıllarda sistemik mikoz etkenlerinin sayısındaki artışa paralel olarak morbidite ve mortalitede de artış gözlenmesi dikkatleri bu konu üzerine çekmiştir. Mantar enfeksiyonlarının patogenezi için bir çok in vitro test geliştirilmiştir. Bunun yanında hayvan modellerinde enfeksiyon oluşturularak konağın savunma sistemi ve *Candida*'ya ait virulans faktörlerinin önemi ortaya çıkarılmıştır. Virulans faktörleri ile ilgili çalışmalar çoğunlukla *C. albicans* türü üzerinde yoğunlaşmaktadır. Çünkü *C. albicans* hala en sık görülen ve tıbbi açıdan en önemli maya türüdür (85, 86). Ancak *C. parapsilosis* görülme sıklığındaki artışla dikkat çekmektedir (7), çeşitli çalışmalarda en yaygın şekilde izole edilen ikinci tür olarak bildirilmektedir (9,10). Yapılan son çalışmalarda hastane kaynaklı *Candida* fungemilerinin % 30'dan fazlasının başta *C. parapsilosis* olmak üzere *albicans* dışı *Candida* türlerine bağlı olduğu bildirilmiştir (3, 11, 12).

Candida enfeksiyonlarının patogenezi, konakçı dokusunda hasarların oluşmasında virulans faktörlerinin önemi büyüktür (87). Hücre dışı Sap ve fosfolipaz hidrolitik enzimlerinin bu virulans faktörlerinden olduğu gösterilmiştir (5). *Candida* 'larda asit proteinaz varlığı ilk defa 1965 yılında Staib tarafından saptanmış ve 3 yıl sonra Remold ve Fasold proteinaz enzimini saflaştırarak özelliklerini belirlemişlerdir (46, 88). Fosfolipaz aktivitesi ilk kez 1968 yılında Costa ve ark. tarafından gösterilmiş ve fosfolipaz B 1995 yılında saflaştırılmıştır (8). Bu hidrolitik enzimler konak dokuya invazyon yolu patojenitede etkili olurlar (6).

Slime faktör üretimi özellikle koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonlarında ayrıntılı biçimde incelenmiş ve mikroorganizmanın virulansını

artırdığı saptanmıştır (69). Slime üretimi *Candida*'lar için de patojenite faktörü olarak kabul edilmektedir (73). Bu faktörün, mikroorganizmanın konak hücreye ve yapay yüzeylere adezyonunu sağlayarak etkili olduğu gösterilmiştir (71). Slime faktör varlığında *Candida*'ların konak hücrelerine, protez ve kateterlere tutunup daha kolay kolonizasyon ve enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmektedir (74). Araştırmacılar *C. parapsilosis* fungemilerinin artışı, bu organizmanın slime oluşturma yeteneği ile açıklamaktadırlar (12).

Çalışmamızda değerlendirilen ilk faktör kökenlerin asit proteinaz aktivitesidir. *C. parapsilosis* kökenlerinin Sap aktivitesini tesbit etmek için süt tozu ilaveli agaroz kullanıldı ve kökenlerin kazeini hidroliz etme yetenekleri araştırıldı. Proteolitik aktiviteyi ölçmede yararlanılan spektrofotometrik yöntemde, substrat olarak BSA kullanıldı. Fakat asit proteinaz enziminin kolay stabilize edilememesi nedeniyle spektrofotometrik yöntemin duyarlılığında sapmalar gözlenmiştir (50).

Yapılan çalışmalar *C. albicans* kökenlerinin kuvvetli proteolitik, *C. tropicalis* kökenlerinin daha az proteolitik olduğunu, *C. parapsilosis* kökenlerinin ise daha da ılımlı proteolitik aktivite gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (71, 89). Çalışmamızın sonuçları, *C. parapsilosis* kökenlerinin ılımlı proteolitik aktivite gösterdiğini destekler niteliktedir.

Süt tozu agaroz yöntemi ile spektrofotometrik asit proteinaz enzim aktivitesi sonuçlarımız birbirleriyle paralellik göstermektedir.

Suudi Arabistan kadınlarında vajinit etkeni *Candida*'larla yapılan çalışmada; *C. albicans* ve *C. parapsilosis* izolatlarının tümünün (% 100), *C. tropicalis* türlerinin % 95'inin asit proteinaz ürettiği bildirilmiştir (90). Çalışmamızda da 28 *C. parapsilosis* kökeninin (15 kan izolatu ve 13 diğer izolatlar) tümünde asit proteinaz aktivitesi tesbit edilmiştir.

Brezilya'da hastanede yatan çocukların kan ve katater örneklerinden izole edilen *C. albicans* ve *C. parapsilosis* kökenlerinde proteinaz aktivitesi araştırılmış ve izole edilen 80 örneğin % 78.8'inde proteinaz aktivitesi saptanmıştır. Aynı kökenlerin % 78.8'i fosfolipaz enzimi saptanmamıştır (91).

Bernardis ve ark. (58), yaptıkları kıyaslamalı çalışmada deri izolatlarının yüksek derecede asit proteinaz üreticisi olduklarını, fakat kan kültürlerinden izole

edilen *C. parapsilosis* kökenlerinin düşük enzimatik aktivite gösterdiklerini saptamışlardır. Benzer şekilde Cassone ve ark. (92) *C. parapsilosis*' in vajinal ve kan izolatlarının salgısal asit proteinaz üretimini karşılaştırmışlar ve vajinal izolatların kan izolatlarına göre daha fazla asit proteinaz ürettiklerini gözlemişlerdir. Süt tozu agaroz yöntemi ile asit proteinaz aktivitesini araştırdığımız çalışmamızda, 15 kan izolatının 12'si (++), 3'ü (+); 13 diğer izolatın 11'i (++), 2'si (+) bulunmuştur.

Dağdeviren ve ark. toplam 33 *C. parapsilosis* kökeni ile BSA agar yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmalarında, 19 kan izolatının % 26.31'inde; 14 diğer izolatın ise % 64.29'unda asit proteinaz aktivitesi tesbit etmişlerdir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Fosfolipaz üretimini tesbit etmek için yumurta sarılı agar kullandıkları deneylerinde ise yalnızca 5 kan izolatında fosfolipaz tesbit etmişlerdir. Dolayısıyla kan izolatları ile diğer izolatlar arasında her iki enzim aktivitesi açısından da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (10). Çalışmamızda hem asit proteinaz hem de fosfolipaz aktivitesi açısından kan izolatları ile diğer izolatlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Sap aktivitesi için $P=1.00$, X^2 Test, $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi).

Çalışmamızda kökenlerin fosfolipaz aktivitesini ölçmek için yumurta sarılı besiyeri kullanıldı. Yumurta sarılı agar fosfolipit kaynağı olarak yumurta sarısı eklendi. Yumurta sarılı besiyeri başlıca fosfolipaz B aktivitesini ortaya çıkarmaktadır. İbrahim ve ark. (93) yaptıkları bir çalışmada hangi tip fosfolipazın tüm aktiviteye katkı sağladığını değerlendirmişler ve izolatların fosfolipaz B aktivitesi ile toplam hücre dışı fosfolipaz aktivitelerinin iyi korelasyon gösterdiğini saptamışlardır.

Yapılan çalışmalar sonucunda, klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin fosfolipaz aktivitesi yönünden büyük değişiklikler gösterdiği saptanmıştır. Uzun bir dönem *Candida* türleri arasında, fosfolipaz üretiminin *C. albicans*'a özgü olduğu gibi bir izlenim edinilmiştir. Samaranayake ve ark. (94), 41 *Candida* izolatının fosfolipaz üretimini yumurta sarılı agar yöntemi ile taramış ve test edilen *C. albicans* kökenlerinin % 79'unun hücre dışı fosfolipaz üretirken, *C. parapsilosis*,

C. glabrata, *C. tropicalis* kökenlerinin bu aktiviteyi göstermediğini saptamışlardır. Shimizu ve ark. (95) ile Kantarcıoğlu (96) yumurta sarılı besiyeri kullanarak yaptıkları çalışmalarında *C. parapsilosis* kökenlerinde fosfolipaz aktivitesi saptamadıklarını belirtmişlerdir. Çalışmamızda da *C. parapsilosis* kökenlerinde fosfolipaz aktivitesi saptanmamıştır. Buna karşın, Barrett-Bee ve ark. ise (8), RIA yöntemiyle *C. parapsilosis* kökenlerinin düşük oranda fosfolipaz aktivitesi gösterdiğini saptamışlardır.

Shimizu ve ark. (95) proteinaz üretmeyen kökenlerin fosfolipaz üretmeyen kökenlere göre daha az virulan olduğunu tespit etmişlerdir.

Ghannoum ve ark. (43) 1998'de yaptıkları ve toplam 51 izolatın test edildiği bir çalışmada, hem yumurta sarılı besiyeri hem de kolorimetrik yöntemler kullanılarak albicans dışı *Candida* türlerinin de hücre dışı fosfolipaz ürettiği gösterilmiştir. Bu çalışmada *C. glabrata* kökenlerinin % 41'inin, *C. parapsilosis* kökenlerinin % 51'inin, *C. tropicalis* kökenlerinin % 70'inin, *C. lusitanae* kökenlerinin % 80'inin ve *C. krusei* kökenlerinin % 100'ünün saptanabilir düzeyde fosfolipaz ürettikleri gösterilmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar, albicans dışı *Candida* türlerinde saptanan fosfolipaz aktivitesinin *C. albicans*'a göre daha düşük düzeyde olduğunu vurgulamışlardır.

Yapılan bir çalışmada *C. albicans*'ta fosfolipaz üretiminin, enfeksiyon bölgesiyle bağlantılı olduğu; kan izolatlarının, yara ve idrar izolatlarından daha yüksek oranda fosfolipaz ürettiği saptanmıştır (97). Araştırmacılar bu bulgulara göre *C. albicans*'a bağlı olarak gelişen kan enfeksiyonlarında fosfolipaz aktivitesinin önemli bir virulans faktörü olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda kan ve diğer izolatların hiçbirinde fosfolipaz aktivitesi tesbit edilmedi. Dolayısıyla çalışmamız, fosfolipaz üretiminin kan enfeksiyonlarında önemli bir virulans faktörü olabileceği yolundaki görüşü desteklememektedir.

Çalışmamızda *C. parapsilosis* kökenlerinde fosfolipaz üretimi saptanmamıştır. Literatürde rastlanan aynı ve farklı sonuçlar, köken-köken varyasyonuna veya yumurta sarılı besiyerinin hazırlanmasındaki farklılıklara bağlanabilir.

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 (98).

Yurt dışında yapılan slime aktiviteleri çalışmaları daha çok *C. parapsilosis* üzerine yoğunlaşmıştır (99, 100).

Slime üretimi *C. parapsilosis* kökenlerinde yüksek oranlarda saptanmıştır (101, 102). Özkan ve ark. (102) kan örneklerinden izole edilen 19 *C. parapsilosis* kökeninde tüp tutunma yöntemini kullanılarak yaptıkları çalışmada kökenlerin % 89.4'ünün slime pozitif olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, GSSB kullandığımız tüp tutunma deneyinde bütün izolatların % 92.8'inde slime oluşumu görüldü. GTSB kullandığımız tüp tutunma deneyinde ise bütün izolatların % 78.5'inde slime oluşumu görüldü. Dolayısıyla çalışmamızın sonuçları bu sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Yücesoy ve Karaman (103) tüp tutunma deneyi ile slime pozitifliğini *C. parapsilosis* için % 17 olarak belirlemişlerdir. Bu oran çalışmamızın sonuçları ile farklılık göstermektedir.

Kandan izole edilen *Candida* kökenlerinde slime aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada tüp tutunma yöntemi kullanılarak 4 *C. parapsilosis* kökeninin 2'si slime pozitif bulunmuştur (104). Aynı yöntemle yapılan başka bir çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen 35 *C. parapsilosis* kökeninin % 86'sı slime pozitif bulunurken, diğer örneklerden izole edilen 17 *C. parapsilosis* kökeninin % 47'si slime pozitif bulunmuştur (105).

GSSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde; kan izolatlarının % 86.7'si pozitif, diğer izolatların ise % 100'ü pozitif tesbit edildi. GTSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde, kan izolatlarının % 80'si pozitif , diğer izolatların ise % 76.9'u slime pozitif bulundu. Çalışmamızda kan izolatları ile diğer izolatların slime oluşturma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. (GSSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde $P=0.484$, GTSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde $P=1.00$, X^2 Test, $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kan ve diğerklinik örneklerden izole edilen ve *C. parapsilosis* olarak tiplendirilen 28 kökende; Sap, PL enzim aktiviteleri ve slime üretimi incelendi.

C. parapsilosis izolatlarının hepsinde Sap aktivitesi tesbit edildi. Kan izolatları ile diğeri izolatlar arasında Sap aktivitesi açısından fark görülmedi.

C. parapsilosis izolatlarının hiçbirinde PL aktivitesi tesbit edilmedi.

C. parapsilosis izolatlarının çoğunun slime ürettiği tesbit edildi. Kan izolatları ile diğeri izolatların slime oluşturma oranları birbirine yakın bulundu.

PL aktivitesinin yumurta sarılı agar kullanılarak yapılan değerlendirmesinde, türe özgü uygun deney koşullarının belirlenmesi; farklı çalışmalarda bu yöntemle *C. parapsilosis* için alınan uyumsuz sonuçların açıklanmasına yardımcı olacaktır.

Kökenlerin çoğunun slime oluşturduğunun görülmesi, bu türün yabancı cisim ilişkili enfeksiyonlardan daha sık izole ediliyor olmasını açıklar niteliktedir.

Candida türlerinin virulansı ile ilgili çalışmalarda çoğunlukla bir virulans faktörü ve etkileri üzerine yoğunlaşmış ve az sayıda tür ve köken üzerinde çalışılmıştır. Çalışmamız, aynı türün 28 kökeni üzerinde, virulansta etkili olduğu düşünülen üç faktörün incelenmesi açısından değer taşımaktadır.

Farklı klinik örneklerden izole edilen çok sayıda *Candida* türü ve kökenlerinin virulans faktörleri, farklı in vitro deney modellerinde ve hayvan deneyi modellerinde çalışılmalıdır. Bu şekilde virulans faktörlerinin herbirinin tür, köken ve enfeksiyon bölgesi düzeyinde patojenitedeki rolü hakkında geçerli bir kaniya varılması sağlanabilir.

7. ÖZET

Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen ve *C. parapsilosis* olarak tiplendirilen 28 maya izolatının Sap, PL enzim aktiviteleri ve slime oluşturma özellikleri araştırıldı.

Bütün kökenlerde süt tozu agaroz yöntemi ile düşük düzeyde Sap aktivitesi tesbit edildi. Kökenlerin hiçbirinde yumurta sarılı agar yöntemi ile PL aktivitesi saptanmadı. Tüp tutunma yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada kökenlerin çoğunda slime oluşumu görüldü.

Bu üç faktör açısından da kan ve diğer izolatların sonuçları aynı veya birbirine yakın bulundu.

8. SUMMARY

Investigation of secreted acid proteinase, phospholipase and biofilm formation properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical samples.

In this study, Sap and PL enzyme activities, and slime production of 28 *C. parapsilosis* strains isolated from clinical samples were investigated.

Low level of Sap activation was determined in all strains by skim milk agarose method. PL enzyme activation was determined in any strains by egg yolk agar method. In the study used tube adersans method , it was seen slime formation in many of the strains.

Results of tests showed no difference between the isolates from blood and the other body sites.

KAYNAKLAR

1. Arslan, U.: Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virulans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in vitro araştırılması. Uzmanlık tezi, Selçuk Üniv. Meram Tıp Fakültesi, Konya 2003
2. Mardegan, R.C., Foglio, M.A., Gonçaves, R.B., Höfling, J.F.: *Candida albicans* proteinases. Brazilian Journal of Oral Sciences, 5: 944-952, 2006.
3. Branchini, M.L., Pfaller, M.A, Rhine-Chalberg, J., Frempong, T., Isenberg, H.D.: Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. J. Clin. Microbiol., 32 (2): 452-456, 1994.
4. Yücel, A., Kantarcıoğlu, A.S., Pathogenicity determinants of *Candida*. Cerrahpaşa J. Med., 31 (3): 172-186, 2006.
5. Naglik, R.J, Challacombe, S.J, Hube, B.: *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67: 400-428, 2003.
6. Schaller, M., Borelli, C., Korting, C.H., Hube, B.: Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. Mycoses, 48: 365-377, 2005.
7. Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Clark, T.A., Pujol, C., Chandra, J., Hajjeh, R.A., Warnock, D.W., Soll, D.R., Ghannoum, M.A.: *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. Emerging Infectious Diseases, 10: 1074-1081, 2004.
8. Barrett-Bee, K., Hayes, Y., Wilson, R.G., Ryles, J.F.: A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. J. Gen. Microbiol., 131: 1217-1221, 1995.
9. Kuhn, D.M, Chandra, J., Mukherjee, P.K, Ghannoum, M.A.: Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surface. Infection and Immunity, 70: 878-888, 2002.

10. Dağdeviren, M., Çerikçiođlu, N., Karavuş, M.: Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* on strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses*, 48: 321-326, 2005.
11. Girmenia, C., Martino, P., Bernardis, F., Gentile, G., Boccanera, M., Monaco, M., Antonucci, G., Cassone, A.: Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. *Clin. Infect. Dis.*, 23: 506-514, 1996.
12. Weems, J.J.: *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin. Infect. Dis.*, 14: 756-766, 1992.
13. Ruzicha, F., Hola, V., Votava, M., Tejkalova, R.: Detection and significance of biofilm formation in yeasts isolated from hemocultures. *Clin. Microbiol. Infect.*, 12 (4): 150-155, 2006.
14. Douglas, J.L.: Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 19: 139-143, 2002.
15. Pirinçiler, M.: Maya mantarlarının tiplendirilmesi ve antifungal duyarlılığı. *Uzmanlık Tezi*, On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun 1995.
16. Banerjee, S.N., Emori, T.G., Culver, O.H., Gaynes, R.P., Jarvis, W.R., Horan T., Edwards J.R., Tolson J., Henderson T., Martone W.J.: Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States. *Am. J. Med.*, 16; 86-89, 1991.
17. Dima, A.S., Elias Anaissie, Ömrüm, U., Issam, R., Helio, P., Shahe, V.: The epidemiology of hematogenous Candidiasis caused by different *Candida* species. *Clinical Infectious Disease*, 24: 1122-1128, 1997.
18. Ener, B.: Fungal hastane enfeksiyonları: epidemiyoloji ve kontrol. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi*, 2: 150-155, 1998.
19. Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, A.T., Ustaçelebi, Ş., Tümbay, E., Mete, Ö.: Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. *Güneş Kitabevi*, 1081-1086, 1145-1148, 1159-1165, 1999.
20. Warren, N.G., Shadomy, H.J.: 1991, Yeast of medical importance, *Manual of Clinical Microbiology*, In: Balows, A, Husler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J., eds. American Society for Microbiology, 617-629, Washington.
21. Koç, A.N.: Tıbbi bakımdan önemi olan *Candida* türlerinin mikolojik özellikleri. *Candida Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu 2002*;

Simpozyum Kitabı s. 37-45, Eskişehir.

22. Kostakoğlu U.: Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi'nde görülen fungal enfeksiyonlar ve antifungal duyarlılıkları. Uzmanlık tezi, Karadeniz Teknik Üniv. Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji, Trabzon 2003.
23. Warren, N.G., Hazen, K.C.: *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C., Tenover, F.C., Tenover, R.H. Manuel of Clinical Microbiology. 6 th ed USA, ASM Press, 723-737, 1995.
24. Buckley, H.R., 1989, Identifications of yeasts, Medical Mycology, A Practical Approach, In: Evans, E.G.V., 'Richardson, M.D.' eds. Oxford University Press, s 97-109, Oxford.
25. Ener, B.: *Candida* enfeksiyonlarının patogenezi: Etkenin rolü. *Candida* Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu 2002; Simpozyum Kitabı s. 65-70, Eskişehir.
26. Bodey, G.P.: Candidiasis in Cancer Patients. Am. J. Med., 30: 13-19, 1984.
27. Edwards, J.E.Jr.: *Candida* Species. Mandeli GL, Bennett J, Dolin R, eds. Mandeli, Douglas Bennett Principles and Practice of Infectious Disease 41th ed. Churcill Livingstone, NewYork; 2289-2301, 1995.
28. Ghannoum, M.A., Abu-Elteen, K.H.: Pathogenicity determinants of *Candida*. Mycoses, 33 (6): 265-282, 1990.
29. Tümbay E.: *Candida* türleri. Ed: Ustaçelebi Ş., Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. s.1081-1086, Öncü Basımevi, Ankara, 1999.
30. Tümbay, E.: Pratik Tıp Mikolojisi. Bilgehan Basımevi, İzmir, 1982, s. 45-60.
31. Mok, W.Y., Barreto, S.: Mycoflora of the human dermal surfaces. Clin. J. Microbiol., 30(10): 1205-1209, 1984.
32. Mc Ginley, K.J., Larson, E.L., Leyden, J.J.: Composition and density of microflora in the subungual of the hand. J. Clin. Microbiol., 26(5): 950-953, 1988.
33. Dağdeviren M.: Hastanede yatan fungemili olgulardan izole edilen *Candida parapsilosis* kökenlerinin virulans faktörleri. Yüksek lisans tezi, Marmara Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2002.
34. Hazen, K.C.: Newand emerging yeast pathogens. Clin. Microbiol. Rev., 8(4): 462-478, 1995.

35. Levy, I., Rubin, L.G., Vasishtha, S., Tucci, V., Sood, S.K.: Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clin. Infect. Dis.*, 26: 1086-1088, 1998.
36. Chen, Y., Chang, S., Sun, C., Yang, L., Hsieh, W., Luh, K.: Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections at a teaching hospital in Taiwan, 1981 to 1993. *Infect. Cont. Hosp. Ep.*, 18 (5): 369-375, 1997.
37. Moran, G.P., Sullivan, O.J., Coleman, O.C.: Emergence of *non-Candida albicans Candida* species as pathogens. Ed: CRA, *Candida and Candidiasis*. s.37-53, ASM Press, Washington O.C., 2002.
38. Fernanado P., Panagoda G.J., Samaranayake L.P.: The relationship between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates of *Candida parapsilosis* to human buccal epithelial cells. *APMIS*, 107: 1034-1042, 1999.
39. Hong Nguyen, M.D., James, E.P., Arthur, J.M., David, C.T.: The changing face of candidemia: Emergence of *non-Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am. J. Med.*, 100: 617-623, 1996.
40. Wingard, J.R.: Infections due to resistant *Candida* species in patients with cancer who are receiving chemotherapy. *Clinical Infectious Diseases* 19 (suppl 1): 49-53, 1994.
41. Coşkun, Ö.: Kandidemi saptanan hastalarda bilinen risk faktörlerinin değerlendirilmesi ve hemokültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin Amfoterisin-B ve Flukonazole in vitro antifungal duyarlılıklarının incelenmesi. Uzmanlık tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Enfeksiyon Hast. ve Klinik Mik., Ankara 2000.
42. Eraykutlar, H.: Servikovajinal sürüntü örneklerinden izole edilen mayaların proteinaz, lipaz, esteraz, deoksiribonükleaz, termonükleaz enzim aktiviteleri ve slime faktörlerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2002.
43. Ghannoum, M.A.: Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13(1): 122-143, 2000.
44. Rüchel, R., Böning, B., Borg, M.: Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of the enzyme during infection in vitro. *Infect. Immun.*, 53(2): 411-419, 1986.
45. Ray, T.L., Payne, C.O., Morrow, B.J.: *Candida albicans* acid proteinase: characterization and role in candidiasis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 306: 173-183, 1991.

46. Staib, F.: Serum proteins as nitrogen source for yeast like fungi. *Sabouraudia*, 4: 187-193, 1965.
47. Tsuobi, R., Matsuda, K., Kol-J., Ogawa, H.: Correlation between culture medium pH, extracellular proteinase activity, and cell growth of *Candida albicans* in soluble stratum corneum-supplemented media. *Arch. Dermatol.*, 281: 342-345, 1989.
48. Ray, L.T., Payne, C.D.: Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein supplemented cultures. *Infect. Immun.*, 58 (2): 508-514, 1990.
49. Rüchel, R.: A variety of *Candida* proteinases and their possible targets of proteolytic attack in the host. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (A)*, 257 (2), 266-274, 1984.
50. erikciođlu N.: Klinik örneklerden izole edilen *Candida* kökenlerinde asit proteinaz enzimi varlığının ve bunun virulans ile ilişkisinin araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 1993.
51. Negi, M., Tsuobi, R., Matsui, T., Ogawa, H.: Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*. *J. Invest. Dermatol.* 83(1) : 32-36, 1984.
52. Borg, M., Rüchel, R.: Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* species during experimental infection of oral mucosa. *Infect. Immun.*, 56(3): 626-631, 1988.
53. Hube, B., Naglik, J.: Extracellular hydrolases. Ed: Calderone R.A, *Candida and Candidiasis*. s.107-122, ASM Press, Washington D.C., 2002.
54. Macdonald, F., Odds, F.C.: Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. *J. Gen. Microbiol.*, 129 (pt 2): 431-438, 1983.
55. Kuştimur, Ő., EI-Nahi, H., Altan, N.: Proteinaz-pozitif ve proteinaz-negatif *Candida albicans*'ın farede virulansı ve normal insan lkositleri tarafından ldrlmesi. *J. Med. Sci.*, 14: 593-601, 1990.
56. Ray, T.L., Payne, C.D.: *Candida albicans* acid proteinase: a role in virulence. Ed: Ayoub E.M., Cassel G.H., Branche W.C., *Microbial oeterminants of Virulence and Host Response*. s.163-178, ASM Press, Washington D.C., 1990.
57. Ray, TL., Digre, K.B., Payne, C.D.: Adherence of *Candida* species to human epidermal corneocytes and buccal mucosal cells: correlation with cutaneous pathogenicity. *J. Invest. Dermatol.*, 83(1): 37-41, 1984.
58. Bernardis, F., Mondello, F., Millan, R.S., Ponton, J., Cassone, A.: Biotyping

- and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. J. Clin. Microbiol., 37(11): 3481-3486, 1999.
59. Lane, T., Garcia, J.R.: Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. Mycoses, 34: 217-220, 1991.
 60. McLain, N., Dolan, J.W.: Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. Microbiology, 143: 3521-3526, 1997.
 61. Yücesoy, M., Karaman, M., Yulug, N.: Sağlıklı ve *Candida* enfeksiyonu olan bireylerden soyutlanan *Candida albicans* kökenlerinin fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. Enfeksiyon Dergisi, 14(3): 405-408, 2000.
 62. Bennett, D.E., McCreary, C.E., Coleman, D.C.: Genetic characterization of a phospholipase C gene from *Candida albicans*: presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*. Microbiology, 144: 55-72, 1998.
 63. Niewerth, M., Korting, H.: Phospholipases of *Candida albicans*. Mycoses, 44: 361-367, 2001.
 64. Navarro-Garcia, F., Sanchez, M., Nombela, C., Pla, J.: Virulence genes in the pathogenic yeast *Candida albicans*. FEMS Microbiol. Reviews, 25: 245-268, 2001.
 65. Samaranayake, L.P., Hughes, A., MacFarlane, T.W.: The proteolytic potential of *Candida albicans* in human saliva supplemented with glucose. J. Med. Microbiol., 17: 13-22, 1984.
 66. İbrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y., Edwards, J.E., Nozawa, Y., Ghannoum, M.A.: Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. Infect. Immun., 63(5): 1993-1998, 1995.
 67. Karaca, N., Koç, A.N., Karagöz, S.: Kan ve vajen örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin slime aktiviteleri. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg., 31: 224-226, 2001.
 68. Cengiz, S.A., Us, E., Cengiz, A.T.: Slime faktörünün klinikteki yeri ve önemi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 13(3): 193-197, 2006.
 69. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., Beachey, E.H.: Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surface. Infect. Immun., 37: 318-26, 1982.
 70. Aybay, C., Çağlar, K., İmir, T.: *Staphylococcus epidermidis* kaynaklı slaym maddesinin makrofajlardan nitrik oksit salgılanmasına etkisi. İnfeks. Derg.,

- 11: 353, 1997.
71. Orhon, H., Özbakkaloğlu, B., Sürücüoğlu, S., Tünger, Ö., Sivrel Ansoy, A.: İnfeksiyon etkeni olan *Candida albicans* suşlarında slime üretimi ve antifungal ajanlara duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg., 28: 103-106, 1998.
 72. Kotilainen, P.: Association of coagulase negative staphylococcal slime production and adherence with the development and outcome of adult septicemias. J. Clin. Microbiol., 28: 2779-85, 1990.
 73. Hilmioğlu, S., İlkit, M., Çavuşoğlu, C., Aydemir, S., Tümbay, E.: *Candida* kökenlerinde slaym (slime) üretiminin üç ayrı yöntemle gösterilmesi ve slaym üretiminin kristal viyole reaksiyonu ile ilişkisi. İnfeks. Derg., 13: 183-6, 1999.
 74. Pfaller, M.A., Messer, S.A., Hollisn, R.J.: Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 21: 9-14, 1995.
 75. Nikawa, H., Nishimura, H., Hamada, T., Yamashiro, H., Samaranayake, L.P.: Effects of modified pellicles on *Candida* biofilm formation on acrylic surfaces. Mycoses, 42: 37-40, 1999.
 76. Helvacı, S., Gedikoğlu, S., Mıstık, R.: *Candida albicans* tanısında germ tüp testi. Infect. Derg., 6: 141-143, 1992.
 77. Hilmioğlu, S.: *Candida* enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı: klasik tanıda izlenecek yol ne olmalı? *Candida* Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu 2002; Simpozyum Kitabı s. 125-131, Eskişehir.
 78. Rodriquez-Toledo, J.L., Martinez-Suarez, J.V.: Improved medium for flukonazol susceptibility testing of *Candida albicans*. Antimicrob. Agents Chemother., 38: 45-48, 1994.
 79. Tümbay, E., 1982, Pratik Tıp Mikolojisi, Bilgehan Basımevi, 45-60, İzmir.
 80. Banerjee, A., Ganesan, K., Datta, A.: Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol., 137: 2455-2461, 1991.
 81. Tosun İ.: Vajinal sürüntü örneklerinden izole edilen *C. albicans* kökenlerinin salgısal asit proteinaz (Sap) aktivitelerinin belirlenmesi ve Sap enziminin indüklenmesinde etkili faktörlerin araştırılması. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon 1999.
 82. Üİger N.T: *Candida albicans*'ın virulans faktörleri arasındaki ilişki ve bu faktörlerin kolonizasyon ve enfeksiyon ayrımındaki rolleri. Uzmanlık Tezi, Marmara Üniv. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji A.D., İstanbul 1995.

83. Yücel, A., Kantarcıoğlu, A.S.: *Candida albicans* kökenlerinin bazı virulans faktörlerinin (fosfolipaz, proteaz, çimlenme borusu ve aderens) ve aralarındaki korelasyonun belirlenmesi. *Enfeksiyon Dergisi*, 15(4): 517-525, 2001.
84. Cevahir, N., Demir, M., Mete, E., Kaleli, İ. : The Investigation of slime production in *Candida* strains by different methods. *Turkish Journal of Infection*, 17 (1): 67-70, 2003.
85. Kuştimur, S.: *Candida*'da virulans faktörleri. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi 1999; Kongre Kitabı s. 145-50, İzmir.
86. Erdeniz, H., Gürler, B.: *Candida albicans* suşlarının proteinaz aktivitesi ile vulvovajinal kandidoz arasındaki ilişkinin araştırılması. *İnfeks. Derg.*, 12: 389-92, 1998.
87. İnci, R.: *Candida* enfeksiyonlarının patogeneğinde konağın rolü. *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu 2002*; Simpozyum Kitabı s. 71-83, Eskişehir.
88. Engin, M., Kustimur, S.: Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarında proteinaz aktivitesinin kazein agar yöntemi ile gösterilmesi. *Mikrobiyol. Bülteni*, 28: 338-44, 1994.
89. Rüchel, R., Uhlemann, K., Böning, B.: Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. (A)*, 255(4): 537 -548, 1983.
90. Al-Hedaihty, S.S.: Spectrum and proteinase production of yeasts causing vaginitis in Saudi Arabian women. *Med. Sci. Monit.*, 8: 498-501, 2002.
91. Matsumoto, F.E., Gandra, R.F., Ruiz, L.S., Marques, S.A.V., Pires, M.F.C., Gambale, W., Paula, C.R.: Yeasts isolated from blood and catheter in children from public hospital of Sao Paulo, Brazil. *Mycopathologia*, 154: 63-9, 2001.
92. Cassone, A.: Biotype diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. *J. Infect. Dis.*, 171: 967-975, 1995.
93. İbrahim, A.S., Mirbod, F., Filler, S.G., Banno, Y., Cole, G.T., Kitajima, Y, Edwards, J.E., Nozawa, Y., Ghannoum, M.A.: Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 63(5): 1993-1998, 1995.
94. Samaranyake, L.P., Raeside, J.M., MacFarlane, T.W.: Factors affecting The phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia*, 22(3): 201-207, 1984.

95. Shimizu, M.T., Almeida, N.Q., Fantinato, V., Unterkircher, C.S.: Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. *Mycoses*, 39: 161-167, 1996.
96. Kantarcıoğlu, A.S.: Detection of phospholipase and proteinase production in clinical isolates of *Candida* species. Abstracts, 9th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, s.340, Abst.: p 1571, March 21- 24 Berlin. Germany, 1999.
97. Price, M.F., Wilkinson, I.D., Gentry, L.O.: Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20: 7-14, 1982.
98. Kocazeybek, B., Çakan, H., Ayyıldız, A., Küçükateş, E., Gülsoy, Ö., Ordu, A.: Cerrahi yoğun bakım ünitesinden izole edilen koagülaz negatif stafilakoklarda slime faktörü oluşturma ve bunların kemoterapötiklere dirençle ilişkisinin araştırılması. *ANKEM Derg.*, 4: 683-9, 2001.
99. Pfaller, M.A., Messer, S.A., Hollis, R.J.: Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 21: 9-14, 1995.
100. Branchini, M.L., Pfaller, M.A., Rhine-Chalberg, J., Frempong, T., Isenberg, H.D.: Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 452-456, 1994.
101. Karagöz, S., Koç, A.N., Çetinkaya, F.: Hastane enfeksiyon etkeni olarak düşünülen maya izolatlarının slime ve proteinaz aktiviteleri. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Serbest Bildiri Özetleri 1999: 39.
102. Karagöz, S., Koç, A.N., Çetinkaya, F.: Hastane enfeksiyon etkeni olarak düşünülen maya izolatlarının slime ve proteinaz aktiviteleri. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Serbest Bildiri Özetleri 1999: 39.
103. Yücesoy, M., Karaman, M.: *Candida* türlerinin biyofilm üretimi ve antifungal duyarlılık paternleri. *Mikrobiyol. Bült.*, 38: 91-98, 2004.
104. Vinitha, M., Ballal, M.: Biofilm as virulence marker in *Candida* isolated from blood. *World Journal of Medical Sciences*, 2(1): 46-48, 2007.
105. Shin, J.H., Kee, S.J., Shin, M.G., Kim, S.H., Shin, D.H., Lee, S.K., Suh, S.P., Ryang, D.W.: Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 1244–1248 2002.