



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN, YENİ
GÜNCELLEŞEN ALBICANS DIŞI CANDIDA KÖKENLERİNİN
VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN VE FLUKONAZOLE KARŞI
DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ**

ÖVGÜ ÇELİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU

İSTANBUL 2011

TEZ ONAYI

ÖRNEK

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

Tez Sahibi : Özgü Çelik

Tez Başlığı : Klinik örneklerden izole edilen, yeni güncelleren albicans dışı Candida kökenlerinin virulens faktörlerinin ve flukanozole karşı duyarlılıklarının belirlenmesi

Sınav Yeri : M.Ü. Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

Sınav Tarihi : 16/9/2011

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/~~Doktora Tezi~~ olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)
Prof. Dr. Nilgün Çeritcioğlu

Kurumu
M.Ü. Tıp Fakültesi

İmza


Sınav Jüri Üyeleri (Unvan,
Adı, Soyadı)

Doç. Dr. Mustafa Özyurt

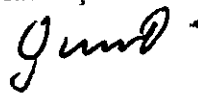
GATA Mikrobiyoloji Kliniği

Dr. Bülent Aksu

M.Ü. Tıp Fakültesi



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 06/10/2011 tarih ve 8.0 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Gülten Z. OMURTAG

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

01/09/2011

ÖVGÜ ÇELİK

I) ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca engin bilgi ve deneyimlerini büyük bir özveriyle bana aktaran ve desteğiyle her zaman bana güç veren değerli danışman hocam Prof. Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU' na,

Bilgi ve tecrübeleriyle, yüksek lisans eğitimimde büyük emeği geçen kıymetli hocalarım Prof. Dr. Güner SÖYLETİR, Prof. Dr. Ayşegül KARAHASAN, Prof. Dr. Ufuk HASDEMİR, Doç. Dr. Nurver ÜLGER ve Dr. Burak AKSU'ya,

Başta MSc. Silva POLAT olmak üzere birlikte çalışmaktan sonsuz mutluluk duyduğum tüm yüksek lisans ve asistan arkadaşlarıma,

Çok sevgili aileme teşekkür ederim.

ÖVGÜ ÇELİK

II) İÇİNDEKİLER

I) Önsöz	i
II) İçindekiler	ii
III) Kısaltmalar ve Simgeler	v
IV) Şekil, Resim ve Tabloların Listesi	vii
Özet	1
Summary	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Yeni Güncelleşen <i>Candida</i> Türlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri	6
2.2. <i>Candida</i> Türlerinin Virulans Faktörleri	8
2.2.1. Salgısal Asit Proteinaz Enzimi (SAP)	8
2.2.2. Fosfolipaz Enzimi	9
2.2.3. Esteraz Enzimi	10
2.2.4. Slime Faktör (Sıvıışık Örtü)	11
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	13
3.1. Gereçler	13
3.1.1. Çalışmaya Alınan Klinik Materyaller	13
3.1.2. Çalışmaya Alınan Yeni Güncelleşen <i>albicans</i> dışı <i>Candida</i> türleri	13
3.1.3. Standart Kökenler	13
3.1.4. Besiyerleri	13
3.1.5. Kimyasal Maddeler	14
3.1.6. Tampon Çözeltiler	15

3.1.7. Boyalar	15
3.1.8. Kullanılan Araçlar ve Aygıtlar	16
3.2. Yöntemler	17
3.2.1. Mısır unlu-Tween 80' li Agar Besiyerinde Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi	
3.2.1.1. Besiyerinin Hazırlanması	17
3.2.1.2. Deneyin Yapılışı	17
3.2.2. Eskülin Hidrolizi	18
3.2.3.1. Besiyerinin Hazırlanması	18
3.2.3.2. Deneyin Yapılışı	19
3.2.3. Salgısal Asit Proteinaz Deneyi	19
3.2.3.1. Besiyerinin Hazırlanması	19
3.2.3.2. Deneyin Yapılışı	20
3.2.4. Fosfolipaz Deneyi	22
3.2.4.1. Besiyerinin Hazırlanması	22
3.2.4.2. Yumurta Sarısının Hazırlanması	22
3.2.4.3. Deneyin Yapılışı	23
3.2.5. Esteraz aktivitesinin araştırılması	25
3.2.5.1. Besiyerinin Hazırlanması	25
3.2.5.2. Deneyin Yapılışı	25
3.2.6. Sıvıslık Örtü (Slime) Üretiminin Araştırılması	26
3.2.6.1. Glukozlu (%8) Sabouraud Dekstroz Buyyon (BD)	26
3.2.7. Flukonazol İçin Minimal İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MİK) Belirlenmesi	27

3.2.7.1. Antifungal Duyarlılık İçin Besiyerinin Hazırlanması	27
3.2.7.2. Antifungal Stok Solüsyonunun Hazırlanması	27
3.2.7.3. Deneyin Yapılışı	28
3.2.8. İstatistiksel Analiz	28
4. BULGULAR	29
4.1. <i>Albicans</i> dışı <i>Candida</i> kökenlerinde virülans faktörlerin değerlendirilmesi	31
4.1.1. <i>Candida</i> İzolatlarında Salgısal Asit Proteinaz (SAP) aktivitesinin Değerlendirilmesi	31
4.1.2. <i>Candida</i> İzolatlarında Fosfolipaz Aktivitesinin değerlendirilmesi	32
4.1.3. <i>Candida</i> izolatlarında Esteraz aktivitesinin değerlendirilmesi	33
4.1.4. <i>Candida</i> İzolatlarında Sıvıslık Örtü (Slime) Üretiminin değerlendirilmesi	34
4.1.5. <i>Candida</i> İzolatlarının Flukonazole Karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesi	35
5. TARTIŞMA	38
6. KAYNAKLAR	48
Özgeçmiş	
Etik Kurul Onayı	

III) KISALTMALAR VE SİMGELER

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ATCC: American Type Culture Collection

BAL: Bronko Alveolar Lavaj

BD: Becton- Dickinson

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DTA: Derin Trakeal Aspirat

ETA: Endo Trakeal Aspirat

Gr: Gram

HIV: Human Immunodeficiency Virus

KOB: Koloni Oluşturan Birim

MİK: Minimal İnhibitör Konsantrasyonu

Ml: Mililitre

µl: Mikrolitre

µg: Mikrogram

Mm: Milimetre

MOPS: Morfolino Propan Sulfonik Asit

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

nm: Nanometre

PAO: *Pseudomonas aeruginosa* Strain O

PEG: Perkutan Endoskopik Gastrostomi

pH: Power of Hydrogen

Pz: Presipitasyon zonu

rpm: Dakikadaki devir sayısı

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium

SAP: Salgısal asit proteinaz

SDA: Sabouraud dekstroza agar

SGA: Sabouraud glukoz agar

SGB: Sabouraud glukoz buyyon

SSA (BSA): Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumine)

TPN: Total Parenteral Nutrisyon

YEPD: Yeast extract peptone dextrose (Maya Özüü Pepton Dekstroza)

IV) ŞEKİL, RESİM VE TABLOLARIN LİSTESİ

İ. Şekillerin Listesi

Şekil 1. 60 *albicans* dışı kandida kökeninin türlerine göre dağılımı

Şekil 2. 60 *albicans* dışı kandida kökeninin yıllara göre dağılımı

Şekil 3. Fosfolipaz aktivitesi için Pz değerinin hesaplanması

ii. Resimlerin Listesi

Resim 1. Mısır unlu Tween 80' li besiyerinde yalancı hiplerin görüntüsü

Resim 2. Sığır serum albuminli besiyerinde asit proteinaz pozitif (*C. albicans*, CBS 2730) kökeninin görüntüsü

Resim 3. Sığır serum albuminli besiyerinde asit proteinaz negatif kökenin görüntüsü

Resim 4. Yumurta sarılı besiyerinde fosfolipaz pozitif (*C. albicans* SC 5314) kökenin görüntüsü

Resim 5. Yumurta sarılı besiyerinde fosfolipaz negatif kökenin görüntüsü

Resim 6. Tween 80' li besiyerinde esteraz pozitif kökenin görüntüsü

Resim 7. Tween 80' li besiyerinde esteraz negatif kökenin görüntüsü

Resim 8. Modifiye tüp aderans yöntemi ile sıvışik örtü pozitif ve negatif kökenlerin görüntüsü

iii. Tabloların Listesi

Tablo 1. Kökenlerin izole edildikleri klinik materyale göre dağılımı

Tablo 2. *Candida* türlerinin SAP aktivitesi oranları

Tablo 3. *Candida* türlerinin fosfolipaz aktivitesi oranları

Tablo 4. *Candida* türlerinin esteraz aktivitesi oranları

Tablo 5. *Candida* türlerinin sıvışik örtü aktivitesi oranları

Tablo 6. Kökenlerin flukonazole karşı duyarlılıkları

Tablo 7. *Albicans* dışı *Candida* türlerinin virölans faktör üretim düzeyleri ve flukonazol MİK değerleri

ÖZET

Çalışmamız, bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda fırsatçı invazif kandidiyazlara yol açabilen *albicans* dışı nadir ve/ veya yeni güncelleşen *Candida* türlerinin tıbbi önemlerini belirleyebilecek bazı biyolojik özelliklerini araştırmak ve bu konuda yetersiz olan literatüre katkıda bulunabilmek amacıyla kurgulanmıştır. Buna yönelik olarak, 2002 - 2009 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimi' ne gönderilen klinik örneklerden (30' u idrar) izole edilen 60 nadir kökenin asit proteinaz, fosfolipaz, esteraz ve sıvıslık örtü (slime) üretimi araştırılmış ve flukonazole karşı duyarlılıkları incelenmiştir. Bu türler *Candida lusitanae* (25), *Candida intermedia* (12), *Candida famata* (4), *Candida dubliniensis* (4), *Candida sake* (4), *Candida inconspicua* (2), *Candida lipolytica* (2), *Candida pulcherrima* (2), *Candida utilis* (2), *Candida catenulata* (1), *Candida mellibiosica* (1), *Candida pelliculosa* (1)' dir. *C. lusitanae* ve *C. intermedia*' nin diğerlerine oranla daha fazla izole edilmiş olması hastanemiz için önemli bir veridir. Çalışılan toplam 60 kökenin %63,33' ünde ılımlı (+), %8,33' ünde yüksek (++) asit proteinaz; %1,66' sında orta (++) , %3,33' ünde kuvvetli (+++) fosfolipaz; % 15 inde esteraz ve %31,67' sinde zayıf (+), %11,66' sında orta(++), %5' inde kuvvetli (+++) sıvıslık örtü üretimi saptanmıştır. Bu verilerin ve flukonazol duyarlılık sonuçlarının istatistiksel analizinde, anlamlı çıkan üç sonucumuz vardır. Birincisi, *C. lusitanae* türüne ait kökenlerin tümü flukonazol için $\leq 8\mu\text{g/ml}$ (duyarlı) MİK sonucu verirken, geri kalan 35 kökenin 30' unda (%85,7) MİK değeri $\leq 8\mu\text{g/ml}$ (duyarlı) bulunmuş olmasıdır ki iki grup arasındaki 5 dirençli kökene bağlı fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0.05$). İkincisi, 30 adet idrar izolatının 19' u (%63,3) sıvıslık örtü üretimi açısından pozitif bulunmuş ve bu sonuç idrar dışı pozitif köken sayısı (10) kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p<0.02$). Üçüncüsü ise en sık izole edilen *C. lusitanae* türüne ait 25 kökenin hiçbirinde esteraz aktivitesi görülmezken, diğer türlere ait toplam 35 kökenin 9' unda. (%25,7) esteraz aktivitesinin saptanmış olmasıdır ($p<0.006$). Özellikle idrar kaynaklı ve sıvıslık örtü pozitif idrar izolatlarının fazlalığı, nadir türler açısından öne çıkan özellikleri olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Flukonazol, nadir *Candida* türleri, virülans faktörler.

SUMMARY

Detection of virulence factors and susceptibility against fluconazole of emerging non albicans candida strains isolated from clinical samples

ÖVGÜ ÇELİK

Our study was designed to determine some biological properties of medical importance of the rare and / or emerging non-*albicans* *Candida* species which may produce opportunistic invasive candidiasis in immunocompromised patients. For this purpose, 60 strains isolated from 60 clinical materials (30 were urine) which were sent to Marmara University Hospital, Central Laboratory, Medical Microbiology Unit between 2002-2009, were investigated for acid proteinase, phospholipase, esterase, slime production and for their susceptibilities against fluconazole. The species detected, were; *Candida lusitaniae* (25), *Candida intermedia* (12), *Candida famata* (4), *Candida dubliniensis* (4), *Candida sake* (4), *Candida inconspicua* (2), *Candida lipolytica* (2), *Candida pulcherrima* (2), *Candida utilis* (2), *Candida catenulata* (1), *Candida mellibiosica* (1), and *Candida pelliculosa* (1). High isolation rate of *C. lusitaniae* and *C. intermedia* is an important finding for our hospital. Of the 60 strains studied, in 66,33 % moderate (+), 8,33% high (++) acid proteinase; in 1,66% moderate (++) , 33,3% strong (+++) phospholipase; in 15% esterase; and in 31,67% weak (+), 11,66% moderate (++) , 5% strong (+++) slime production have been detected. Statistical analyses of these data and of the susceptibility results revealed three significant results. First, all of the *C. lusitaniae* strains were susceptible to fluconazole ($\leq 8\mu\text{g/ml}$) when 30 (85,7%) out of remaining 35 strains were also sensitive to this drug ($\leq 8\mu\text{g/ml}$) and the difference resulting from 5 resistant strains was statistically significant ($p < 0.05$). Second, in 19 (63,3%) out of 30 urine isolates biofilm production was positive and when this number was compared with the strains from non- urine samples (10), the difference was statistically significant ($p < 0.02$). Third was the negative esterase activity in all of the 25 *C. lusitaniae* strains whereas the remaining 35 (25,7%) strains were esterase positive and the difference was significant ($p < 0,006$). The findings concerning high number of urine samples and slime positive urine isolates were outstanding properties of those rare species.

Key Words: Emerging *Candida* species, fluconazole, virulence factors.

ÖZET

Çalışmamız, bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda fırsatçı invazif kandidiyazlara yol açabilen *albicans* dışı nadir ve/ veya yeni güncelleşen *Candida* türlerinin tıbbi önemlerini belirleyebilecek bazı biyolojik özelliklerini araştırmak ve bu konuda yetersiz olan literatüre katkıda bulunabilmek amacıyla kurgulanmıştır. Buna yönelik olarak, 2002 - 2009 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Birimi' ne gönderilen klinik örneklerden (30' u idrar) izole edilen 60 nadir kökenin asit proteinaz, fosfolipaz, esteraz ve sıvışık örtü (slime) üretimi araştırılmış ve flukonazole karşı duyarlılıkları incelenmiştir. Bu türler *Candida lusitanae* (25), *Candida intermedia* (12), *Candida famata* (4), *Candida dubliniensis* (4), *Candida sake* (4), *Candida inconspicua* (2), *Candida lipolytica* (2), *Candida pulcherrima* (2), *Candida utilis* (2), *Candida catenulata* (1), *Candida mellibiosica* (1), *Candida pelliculosa* (1)' dir. *C. lusitanae* ve *C. intermedia*' nın diğerlerine oranla daha fazla izole edilmiş olması hastanemiz için önemli bir veridir. Çalışılan toplam 60 kökenin %63,33' ünde ılımlı (+), %8,33' ünde yüksek (++) asit proteinaz; %1,66' sında orta (++) , %3,33' ünde kuvvetli (+++) fosfolipaz; % 15 inde esteraz ve %31,67' sinden zayıf (+), %11,66' sında orta(++), %5' inde kuvvetli (+++) sıvışık örtü üretimi saptanmıştır. Bu verilerin ve flukonazol duyarlılık sonuçlarının istatistiksel analizinde, anlamlı çıkan üç sonucumuz vardır. Birincisi, *C. lusitanae* türüne ait kökenlerin tümü flukonazol için $\leq 8\mu\text{g/ml}$ (duyarlı) MİK sonucu verirken, geri kalan 35 kökenin 30' unda (%85,7) MİK değeri $\leq 8\mu\text{g/ml}$ (duyarlı) bulunmuş olmasıdır ki iki grup arasındaki 5 dirençli kökene bağlı fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0.05$). İkincisi, 30 adet idrar izolatının 19' u (%63,3) sıvışık örtü üretimi açısından pozitif bulunmuş ve bu sonuç idrar dışı pozitif köken sayısı (10) kıyaslandığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gözlenmiştir ($p<0.02$). Üçüncüsü ise en sık izole edilen *C. lusitanae* türüne ait 25 kökenin hiçbirinde esteraz aktivitesi görülmezken, diğer türlere ait toplam 35 kökenin 9' unda. (%25,7) esteraz aktivitesinin saptanmış olmasıdır ($p<0.006$). Özellikle idrar kaynaklı ve sıvışık örtü pozitif idrar izolatlarının fazlalığı, nadir türler açısından öne çıkan özellikleri olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Flukonazol, nadir *Candida* türleri, virülans faktörler.

SUMMARY

Detection of virulence factors and susceptibility against fluconazole of emerging non albicans candida strains isolated from clinical samples

Our study was designed to determine some biological properties of medical importance of the rare and / or emerging non-*albicans Candida* species which may produce opportunistic invasive candidiasis in immunocompromised patients. For this purpose, 60 strains isolated from 60 clinical materials (30 were urine) which were sent to Marmara University Hospital, Central Laboratory, Medical Microbiology Unit between 2002-2009, were investigated for acid proteinase, phospholipase, esterase, slime production and for their susceptibilities against fluconazole. The species detected, were; *Candida lusitanae* (25), *Candida intermedia* (12), *Candida famata* (4), *Candida dubliniensis* (4), *Candida sake* (4), *Candida inconspicua* (2), *Candida lipolytica* (2), *Candida pulcherrima* (2), *Candida utilis* (2), *Candida catenulata* (1), *Candida mellibiosica* (1), and *Candida pelliculosa* (1). High isolation rate of *C. lusitanae* and *C. intermedia* is an important finding for our hospital. Of the 60 strains studied, in 66,33 % moderate (+), 8,33% high (++) acid proteinase; in 1,66% moderate (++) , 33,3% strong (+++) phospholipase; in 15% esterase; and in 31,67% weak (+), 11,66% moderate (++) , 5% strong (+++) slime production have been detected. Statistical analyses of these data and of the susceptibility results revealed three significant results. First, all of the *C. lusitanae* strains were susceptible to fluconazole ($\leq 8\mu\text{g/ml}$) when 30 (85,7%) out of remaining 35 strains were also sensitive to this drug ($\leq 8\mu\text{g/ml}$) and the difference resulting from 5 resistant strains was statistically significant ($p < 0.05$). Second, in 19 (63,3%) out of 30 urine isolates biofilm production was positive and when this number was compared with the strains from non- urine samples (10), the difference was statistically significant ($p < 0.02$). Third was the negative esterase activity in all of the 25 *C. lusitanae* strains whereas the remaining 35 (25,7%) strains were esterase positive and the difference was significant ($p < 0,006$). The findings concerning high number of urine samples and slime positive urine isolates were outstanding properties of those rare species.

Key Words: Emerging *Candida* species, fluconazole, virulence factors.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Önceki yıllarda hastane enfeksiyonlarına neden olan etkenler genellikle gram negatif ve gram pozitif bakteriler iken, son yirmi yıl içinde mantar enfeksiyonlarının insidansında önemli derecede artış ortaya çıkmıştır. Bu artış, geniş spektrumlu antibiyotiklerin, immünosupresif ilaçların yaygın kullanımı, sitotoksik tedaviye bağlı uzun süren nötropeniler, artan kateter kullanımı ve yoğunlaşan majör kardiyak ve abdominal cerrahi gibi girişimsel işlemler ile ilişkilidir. Mantarlar sadece enfekte dokulardan değil, kontakt lens, periferel venöz kateterler, santral venöz kateterler ve mesane kateterleri gibi biyomateryallerden de izole edilmektedir. Nozokomiyal mantar enfeksiyonları, sıklıkla ağır seyirli, hızlı ilerleyen, tanısı zor ve tedaviye dirençli hastalıklar olduklarından, ciddi morbidite ve mortalite nedenidir. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda olmak üzere, mantar hastalıklarının görülme sıklığında artış bulunması ve sıklıkla izole edilmeleri, bunun yanı sıra yaşamı tehdit edici tablo geliştirmeleri nedeniyle hızlı ve erken tanılarının yapılması oldukça önemlidir (1, 2, 3).

Mantar hastalıklarının en sık rastlanan etkeni *Candida* türleridir ve sıklıkla; direnci zayıflamış, özellikle de hücresel bağışıklık sistemi tahrip olmuş hastalardan izole edilmektedirler. Bu enfeksiyonlarda en sık olarak mukozalar tutulmaktadır. Ancak deri ve iç organlara da yerleşim olmaktadır (4).

Candida cinsi mayalar ABD’ de kan kültürlerinde sıklık açısından koagülaz negatif stafilokoklar, *S. aureus* ve *Enterococcus* türlerinden sonra dördüncü sırada izole edilen mikroorganizmalardır. Kandidalara bağlı nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının % 25-50’ si yoğun bakım ünitelerinde meydana gelmektedir. Kandidemi, tanısı ve tedavisi zor, bunun yanında da mantar dışındaki patojenler ile ortaya çıkmış sepsisemi olgularına göre daha yüksek mortaliteye (~%40) sahip ciddi bir klinik tablodur (5).

Candida türleri arasında en önemli yere sahip olan *Candida albicans*, sıklıkla gastrointestinal sistem, vajina ve deriden normal flora elemanı olarak izole edilmektedir. Fırsatçı patojen olan bu tür, özellikle immünsuprese hastaların florasında baskın hale geçerek, derin doku ya da mukozal enfeksiyonlara neden

olmaktadır. Laboratuvar tanısında germ tüp oluşturmasıyla diğ r *Candida* türlerinden ayırt edilmekte ve ayrıca mısır unlu Tween 80 besiyerinde oluşturdukları yalancı hiflerin ve klamidosporların görüntüleri bu ayırma yardımcı olmaktadır (5, 6).

Albicans dışı kandidalara bağlı kandidemilerdeki artışın en önemli nedeni profilaktik ve ampirik olarak antifungallerin sık kullanımına bağlı olarak, etken dağılımının değişikliğe uğramasıdır. Özellikle azol türevi ilaçların yaygın kullanılmasının, *C. albicans* gibi daha duyarlı türlerin prevalansında azalmaya ve azol grubu antifungaller için daha yüksek M K değerleri ya da direnç gösteren *C. krusei* ve *C. glabrata* gibi türlerin izolasyonunda artmaya neden olduğu bildirilmektedir (3).

Son yıllarda gerek Türkiye’ de gerekse diğ r ülkelerde yeni güncelleşen nadir türlerin, klinik materyallerden artan oranda izole edildikleri görülmektedir. Bunlar arasında; *C. dubliniensis*, *C. intermedia*, *C. lusitaniae*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. norvegensis*, *C. inconspicua*, *C. pelliculosa*, *C. pulcherrima*, *C. utilis*, *C. mellibiosica* ve *C. sphaerica* dikkat çeken türlerdir. Ancak bu türlere ait epidemiyolojik verilerin yanı sıra, virülans faktörleri ve antifungallere duyarlılık profilleri hakkında yeterli bilgi birikimi oluşmamıştır. Bu türlerin insan hastalıklarında oynadıkları rolün meydana çıkması için doğru tanımlama ve türler arasında güvenilir bir ayırımın yapılması gerekmektedir (7).

Candida türleri arasında antifungal ajanlara ve özellikle kandida enfeksiyonlarının tedavisinde sıkça kullanılan azol grubu ilaçlara karşı, duyarlılık farklılığı, izole edilen kökenlerin tür düzeyinde tanımlanmasının önemini ortaya koymaktadır. Örneğin; bu yeni güncelleşen türlerden *C. famata*; insanda nadiren hastalık etkeni olan saprofit bir türdür. Özellikle katetere bağlı fungemiye neden olduğu belirtilmektedir. *Candida inconspicua*; ilk olarak HIV ile enfekte hastalardan izole edilmiştir. *Candida lusitaniae*; bağışıklık sistemi çökmüş hastalarda sistemik kandidiyaza yol açmakta ve kan, balgam, üriner ve gastrointestinal sistem örneklerinden izole edilmektedir. Amfoterisin B’ ye dirençli kökenleri bulunmaktadır. *Candida norvegensis* ise flusitozine direnç göstermektedir (1, 8).

Bu nedenle kökenlerin tür düzeyinde tanımlanması, özellikle duyarlılık testlerinin yapılmadığı merkezlerde tedavi açısından önem taşımaktadır. Dolayısıyla

Candida türlerinin hızlı ve doğru tanımlanması; tedavi stratejisinin belirlenmesi, tedavi yanıtının izlenmesi ve klinik tekrarlayan enfeksiyonların değerlendirilmesi açısından önemlidir.

Hastanemizde de, yatan hastaların çeşitli klinik materyallerinden izole edilen ve enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilen bu türlerin, 2002- 2009 yılları arasında sayısal artış göstermesi, dikkat çekicidir. Ancak, yerel ve diğer ülkelerdeki kısıtlı çalışmaların verileri, bu kökenlerin enfeksiyonlardaki olası rollerini belirleyebilecek olan özellikleri ve antifungal ilaçlara karşı duyarlılık profilleri hakkında genel çıkarsamalara olanak verecek düzeyde değildir.

Çalışmamız, yeni güncelleşen nadir *Candida* türlerine ait 60 adet klinik izolatin bazı tanımsal ve virülans ile ilişkili biyolojik özellikleri ile en sık kullanılan antifungal ilaç olan flukonazole karşı duyarlılık profillerinin belirlenmesi ve olası direnç durumunun virülans faktörleri ile bağlantısının irdelenmesi bağlamında literatüre veri sağlamak üzere planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Kandidalar deri, mukoza ve gastrointestinal sistemin normal florasında bulunur. Doğumdan kısa süre sonra mukozalarda kolonize olurlar ve endojen enfeksiyon için risk yaratırlar. Kandidalar, tek hücreli, hareketsiz, gram olumlu özellik gösteren, hücre duvarında kitin, mannan, gluklan içeren ökaryot hücre yapısına sahip kemoheterotrof mikroorganizmalardır. Kandidalar 3-5 µm çapında, yuvarlak veya oval, tomurcuklanarak çoğalan maya şeklinde mantarlardır. Birkaç istisna dışında, *Candida* cinsi içindeki mayaların koloni morfolojisi ve mikroskopik özellikleri farklılık göstermez. Çoğu, 25°C ya da 37°C' de 2-3 günde üreyebilir ve Sabouraud Dekstroz Agarda (SDA) 2-3 mm çapında, beyaz veya krem renginde, düzgün veya tümsekli ve bazıları uzayan inkübasyonla birlikte buruşuk hale gelebilen, mat ya da parlak koloniler oluştururlar (1).

2.1. Yeni Güncellenen *Candida* Türlerinin Mikrobiyolojik Özellikleri

Kandida cinsinin yaklaşık 150 türü bulunmaktadır. Ancak bunların arasında insanda hastalık etkeni olarak saptanan birkaç tür mevcuttur; halen *Candida albicans*, en sık izole edilen fırsatçı patojendir. *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *C. krusei* gibi sık izole edilen diğer türlerin yanı sıra; son 20 yıl içinde, yeni güncellenen türlere bağlı enfeksiyonlar da literatürde yer almaya başlamıştır.

Bu kısım, çalışmamızın kapsamına giren bu nadir türlerle ilgili bilgileri içermektedir.

***C. catenulata*:** Yalancı hiilere sahiptir. Çok taraflı tomurcuklanma gösterir. Eşeyli evresi yoktur. Süt ürünlerinde, kümes hayvanı etlerinde ve suda bulunur. Klinik örneklerden nadiren izole edilir ancak dışkı, kılsız deri ve ayak derisinde flora elemanı olarak bulunabilir.

C. dubliniensis: Lateralde ve uçta klamidosporeli yalancı hiflere ve germ tüp oluşturma özelliğine sahiptir. Bu nedenle *C. albicans* ile morfolojik benzerlik gösterir. Ayırt edici özelliklerden biri olarak *C. dubliniensis*, 42 °C’ de zayıf ürer veya üremez. 45 °C’ de üremez. İrlanda’ da deniz kuşlarını istila eden kenelerde bulunur. Avrupa’ da sıklıkla HIV pozitif hastaların ağızlarından izole edilir.

C. famata: Çok taraflı tomurcuklanma gösterir. Eşeyli formu 1-4 sporlu askuslar ile çoğalır. Süt ürünlerinde, suda, bitkilerde, sebzelerde ve memelilerde bulunur, klinik materyalden nadir olarak izole edilir.

C. inconspicua: Çok taraflı tomurcuklanma gösterir. Eşeyli evresi yoktur. Suda bulunur, klinik materyalden nadir olarak izole edilir. Flukonazol direnci bildirilmiştir.

C. intermedia: Yalancı hif oluşturur. Çok taraflı tomurcuklanma gösterir. Eşeyli evresi yoktur. Toprakta, üzümde ve birada bulunur, klinik örneklerden nadir olarak izole edilir.

C. lipolytica: Çok taraflı tomurcuklanma gösterir. Eşeyli formu 1-4 askospor içeren askuslar içerir. Toprakta ve bitkisel yağlarda bulunur, klinik materyalden nadir olarak izole edilir. Sağlıklı bireylerin dışkı, balgam ve orofarenksinden izole edilebilir.

C. lusitaniae: Uzamış blastokonidya zincirleri ve kıvrık yalancı hif oluşturur. Blastokonidya, yalancı hiflerin arasında herhangi bir yerde görülür, kısa bir dönemde askosporlarla eşeyli çoğalma gerçekleştirirler. Gübrede, meyvede, kuşlarda ve memelilerde bulunur, nadiren bağışıklık sistemi baskılanmış hastalardan enfeksiyon etkeni olarak izole edilebilmektedir. Bağışıklık sistemi çökmüş hastalarda sistemik kandidiyaza yol açmakta ve kan, balgam, üriner ve gastrointestinal sistem (GİS) örneklerinden izole edilmektedir.

C. mellibiosica: Yalancı hif oluşturur. Çok taraflı tomurcuklanma gösterir. Eşeyli evresi yoktur. Toprakta ve ağaçlarda bulunur. Bazı olgularda balgamdan izole edilmiştir.

C. pulcherrima: Çoklu tomurcuklanma gösterir, yalancı hif bulunabilir. Lobut şeklinde askuslar 1-2 askospor içerir. Tırnaklardan izole edilmiştir. Çok seyrek olarak bağışıklık sistemi çökmüş kişilerde hastalık etkeni olabilmektedir.

C. pelliculosa: Bitki, toprak ve meyve sularında bulunan bir türdür. Eşeyli dönemde askosporlarıyla çoğalan bir mayadır. Zaman zaman immünkompetan ve AIDS dahil immünkompromize hastalarda enfeksiyon etkeni olarak bildirilmiştir. Bu olguların büyük çoğunluğu damar içi kateter kullanımıyla ilişkilidir. Ayrıca düşük doğum ağırlıklı bebeklerde nozokomiyal serebral ventrikülit, intravenöz madde bağımlılarında endokardit ve renal transplant hastalarında idrar yolu enfeksiyonlarının etkeni olarak bildirilmiştir.

C. sake: 42°C’ de üremez. Beyaz veya krem rengi koloniler oluşturur. Çoklu tomurcuklanma gösterir. Çeşitli çiçekler ve sebzeler, kayın ağacı bitki özü, üzüm suyu, bira, şarap, Japon pirinç rakısı (sake), donmuş somonda bulunur (1, 9). AIDS hastalarının ağız boşluklarından izole edilmiştir (<http://web.gideononline.com> Erişim tarihi: 12.11.2010)

C. utilis: İnsanlarda nadiren hastalık etkeni olarak izole edilen, ısıya tolerans gösterebilen bir türdür.

2.2. Candida Türlerinin Virülans Faktörleri

Bu mantarın salgıladığı ve patogeneze ilgisi olduğu düşünülen enzimler, peptid bağlarını hidroliz eden proteinazlar, fosfoglisidleri hidrolize eden fosfolipazlar ile lizofosfoglisidleri hidrolize eden lizofosfolipazlar olmak üzere üç ana grupta toplanmaktadır (10).

2.2.1. Salgısal Aspartik Proteinaz (SAP):

Son yıllarda *Candida* türlerinin patojenitesinde rolü olabileceğine dair bulgular nedeniyle üzerinde en çok çalışılan enzimlerde salgısal asit proteinaz, Staib

tarafından 1965 yılında tanımlanmıştır. Çok miktarda aspartik asit rezidüleri içerdiği için “aspartik proteinaz” olarak da adlandırılmaktadır. Pepstatin tarafından özgül olarak inhibe edildiği için aynı zamanda bir “karboksil proteinaz” dır. Enzim en iyi pH: 2,5 - 4,0 arasında aktivite gösterir. Asit proteinazın substratları arasında sığır hemoglobini, ovalbumin, kollajen, kazein, keratin, immünoglobulin A gibi azot kaynağı oluşturan proteinler bulunmaktadır (11).

SAP, asit pH’ da ve yegane nitrogen kaynağı olarak proteinin bulunduğu ortamda salgılanır. Enzim *C. albicans* kökenlerinin çoğu tarafından ve daha az oranda *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* kökenlerince üretilir. Bu durum *Candida* türlerinin insandaki virülans sıralamasına yansımaktadır. Yüksek proteolitik etkinliğe sahip *C. albicans* kökenlerinin proteinaz salgılayarak farelerde daha yüksek oranda kolonizasyon ya da ölüme sebep oldukları gösterilmiştir (10).

Yeni güncellenen türler açısından irdelendiğinde; *C. dubliniensis* izolatları proteinaz salgılanmasına neden olan şartlar altında 10 gün inkübe edildiklerinde en iyi proteinaz aktivitesinin 7. günde saptandığı, ancak aktivite düzeyinin kökenler arasında değişebileceği bildirilmiştir (12).

Pereira-Dias ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışmada peynirden izole ettikleri *C. famata* ve *C. intermedia* kökenlerinin proteinaz aktivitesi göstermedikleri saptanmıştır (13).

Charoenchai ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptıkları çalışmada, asit proteinaz aktivitesi 2 adet *C. pulcherrima* izolatında saptanmış olup, 17 adet *C. pelliculosa* izolatının hiçbirinde saptanamamıştır (14).

Dostal ve arkadaşları 2003 yılında 245 klinik *Candida* izolatı ile yaptıkları çalışmada, tanımlanan 7 adet *C. lusitaniae* izolatının sığır serum albumini içeren besiyerinde uzun süre inkübasyon sonucu salgısal asit proteinaz enzimini zayıf bir düzeyde ürettiğini bildirmişlerdir (15).

2.2.2. Fosfolipaz:

Candida türleri konağın hücre zarlarında işlev bozukluğuna sebep olarak dokuda ilerlemelerine (invazyona) yardımcı olan enzimler oluşturma yeteneğine sahiptirler. Hücre zarı lipid ve proteinlerden yapılmış olduğundan bu biyokimyasal maddeler enzimlerin hedefini oluştururlar.

Fosfolipaz, gliserofosfolipitlerdeki bir veya daha fazla ester bağına hidrolize etme yeteneğinde olan enzim grubunu kapsamaktadır. Tüm fosfolipazlar substrat olarak fosfolipitleri hedefler ve ek olarak her bir enzim özgül bir ester bağına parçalama yeteneğindedir. Bu enzimler konak hücre zarının başlıca kimyasal bileşenlerinden olan fosfolipitleri parçalayarak, hücrenin invazyonu sürecinde rol almaktadırlar (16).

Candida albicans' in salgıladığı hücre dışı fosfolipazı ilk olarak 1960 yılında Costa ve arkadaşları belirlemiş, Werner ise; yumurta sarısı ya da lesitin içeren katı besiyerinde, lipid yıkım ürünlerinin analizine dayanarak bu enzimin varlığını saptamıştır (16).

Hücre dışı fosfolipazlar, konak hücreyi lizise uğratmak yoluyla veya hücrenin yüzey özelliklerini değiştirerek ve böylece de adezyonu ve penetrasyonu kolaylaştırarak virülansı artırmaktadır.

2.2.3. Esteraz:

Virülanstaki yeri tartışmalıdır. Ancak bir hidrolitik enzim olarak diğer benzer enzimlerle birlikte ve birbiri üzerine etkisi de araştırılmaktadır. Mayaların lipolitik aktivite gösteren enzimler salgıladığı ilk kez 1978 yılında Rudek tarafından Tween 80 opasite testi ile gösterilmiştir. Tween 80 opasite testinde *Candida* türleri tarafından salgılanan esteraz enzimi ile besiyerindeki Tween' i hidrolize edilmekte

ve açığa çıkan yağ asitleri kalsiyum ile bileşikler oluşturarak, inokülasyon bölgesinin etrafında gözle görünür bir hale meydana getirmektedir (17, 18, 19).

Lipazların, triaçil - gliserolden serbest yağ asitleri oluşturacak şekilde ester bağlarını hidroliz eden enzim ailesi oldukları bilinmektedir. Kandida kökenlerinde belirlenen hücre dışı enzimin ise, uzun zincirli yağ asitlerine sahip ve suda eriyebilen özellikteki monoesterler üzerine hidrolitik etki göstermesi nedeniyle bir lipazdan çok, esteraz olarak kabul edildiği belirtilmiştir (17).

Pereira - Dias ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışmada peynirden izole ettikleri 38 *C. famata* kökeninin tümünde, 22 *C. intermedia* kökeninin ise 1' i dışında diğerlerinin (%95) esteraz aktivitesi gösterdikleri saptanmıştır (13).

2.2.4. Sıvışık Örtü (Slime):

Sıvışık örtü; organik bir polimer matriksi içine gömülü ve birbirine ve bir katı yüzeye (veya bir ara yüzeye) tutunmuş halde yaşayan mikroorganizma topluluğu şeklinde tanımlanmıştır (20).

Sıvı ortamlardaki planktonik hücreler, özellikle yüzeyi pürüzlü katı ortamlara tutunma eğilimindedirler. Tutunmayı takiben mikroorganizmalar yoğun olarak ekzopolisakkarit salgılar ve adezyon kapasitelerini artırır. Bu süreçte çoğalarak, ekzopolisakkaritten zengin glikokaliksle çevrili bir mikrokoloni oluştururlar.

Ekzopolisakkarit sıvışık örtünün matriksini oluşturmaktadır. Bu matriks hem bir iyon değiştirici ortam, hem dış şartlardan koruyucu bir zırh, hem de bütünlüğü ve beslenme şartlarını temin eden özel bir öneme sahip bir ara maddedir. Mikrokolonileri birbirine bağlayan, por ve kanalcıklardan oluşan transport sistemi içinde sıvı fazın akış yönünde sürekli bir sıvı hareketi vardır, bir anlamda sıvışık örtü sıvı kütlesiyle sürekli olarak yıkanır (20).

Sıvışık rt üretimi kandidalar için de bir patojenite faktörü olarak kabul edilmekte ve sıvışık örtü maddesi aracılığıyla kandidanın konak hücresine, protezlere ve kateterlere daha kolay tutunarak, kolonizasyona ve invazif enfeksiyonlara yol açtığı belirtilmektedir (21). Kandidaların yol açtığı sistemik enfeksiyonların çoğunun hemen hemen değişmez bir biçimde vcoda yerleştirilen intravasküler ya da üriner kateterler, endotrakeal tüpler, yapay kalp kapakçıkları, kalp atışlarını düzenleyen aygıtlar gibi medikal biyomateryallerin üzerlerinde gelişen sıvışık örtü ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (22). *C. albicans* ve *C. parapsilosis* kökenlerinde yüksek oranda sıvışık örtü üretimi bilinmektedir (23).

Yeni güncelleşen türler arasında *C. dubliniensis*' in sıvışık örtü üreten kökenlerinde, klinik olarak uygulanan amfoterisin B gibi, flukonazol'e karşı da direnç geliştiği belirtilmiştir (24).

Candida lipolytica' da sıvışık örtü üretiminin kateter kolonizasyonu için katkıda bulunduğu gösterilmiştir (25).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışmaya alınan yeni güncelleşen *albicans* dışı *Candida* türleri

2002 - 2009 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümü' ne gönderilen klinik örneklerden izole edilen; *albicans* dışı nadir *Candida* türlerine ait 60 köken çalışmaya dahil edildi. Türlerin tanımlanması için izole edilen kökenlere germ tüp testi uygulandı. Kökenlerin mısır unlu – Tween 80' li agar besiyerinde morfolojik özellikleri belirlendi. Germ tüp negatif bulunan kökenlerin ID 32C (bioMérieux, France) ticari asimilasyon kiti ile tür düzeyinde tanımlaması yapıldı. ID 32C kiti ile *C. norvegensis* / *C. inconspicua* olarak tanımlanan kökenlere, eskülin hidrolizi testi uygulanarak ayrımları sağlandı (26).

3.1.3. Standart Kökenler:

Aşağıdaki kökenler sırasıyla; asit proteinaz, fosfolipaz, sıvıışık örtü üretimi testlerinde kontrol köken olarak kullanıldı.

- *C. albicans* CBS 2730, salgısal asit proteinaz üreten köken (Reinhard Ruchell, Almanya)
- *C. albicans* SC 5314, fosfolipaz üreten köken (Mahmoud A. Ghannoum, ABD)
- *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 (sokak tipi-wild type), sıvıışık örtü üretimi pozitif köken
- *Trichosporon asahii* CBS 2479, esteraz aktivitesi pozitif köken

3.1.4. Besiyerleri:

Sabouraud Dekstroz Agar (Oxoid)

Mısır Unlu Agar (Oxoid)

Eskülin Hidrolizi Besiyeri*

Asit Proteinaz Besiyeri*

Fosfolipaz Besiyeri*

Esteraz Besiyeri*

Maya Özütü Pepton Dekstroz Sıvı Besiyeri*

%8 glukozlu Sabouraud Dekstroz Buyyon*

Antifungal Duyarlılık Besiyeri*

*: Bkz. Yöntemler

3.1.6. Kimyasal Maddeler ve Antifungal İlaç

Sığır serum albümini Fraksiyon V (BSA) (Sigma)

KH_2PO_4 (Merck)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)

NaCl (Merck)

CaCl_2 (Merck)

MOPS (Biochemica)

RPMI (L glutaminli, sodyum bikarbonatsız) (Sigma)

Glukoz (Merck)

Flukonazol (Sigma)

3.1.7. Tampon Çözeltiler:

Sitrik asit - disodyum fosfat tampon çözeltisi

a) $C_6H_8O_7$	19.21 gr / 1000 ml distile su
(0.1 M)	
b) $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	53.66 gr / 1000 ml distile su
(0.2 M)	

a ve b çözeltileri pH 4,2 değeri elde edilene kadar karıştırılarak tampon çözelti hazırlandı.

3.1.8. Boyalar:

Safranin-O (Merck)

%1'lik Safranin-O boyasının hazırlanışı:

Safranin-O	1 gr
Distile su	100 ml

Safranin-O cam beherin içinde, distile su ile karıştırılarak çözüldü. Daha sonra koyu renk bir cam şişede karanlık bir ortamda 24 saat dinlenmeye bırakılan boya, filtre kağıdından iki kez süzüldü.

3.1.10. Kullanılan Araçlar ve Aygıtlar:

Hassas terazi (Sartorius)

Kaba terazi (Scaltec)

Etüv (Memmert)

Su banyosu (Electro-Mag)

Otoklav (Hirayama)

Pastör fırını (Memmert)
Dondurucu (-20°C) (Uğur)
Dondurucu (-40°C) (Biohit)
Buzdolabı (Arçelik)
Santrifüj (Elektro-Mag)
Vorteks karıştırıcı (Yellow line)
Manyetik karıştırıcı (Yellow line)
pH metre cihazı (İno Lab)
Işık mikroskobu (Nikon)
Tek kanallı otomatik pipetler (Biohit Isolab)
Cam pipetler 1, 2, 5, 10 ml
Enjektör 5, 10 ml
0.45 µm' lik membran filtre (Sartorius)
0.22 µm' lik membran filtre (Sartorius)
pH indikatör kağıdı (Merck)
Kağıt diskler (Oxoid)
Kurutma kağıdı
Petri kutuları
Balonlar
Tüpler
Mezürler
100 µl' lik ve 1000 µl' lik pipet uçları

3.2. Yöntemler:

3.2.1. Mısır unlu - Tween 80' li agar besiyerinde morfolojik özelliklerin belirlenmesi:

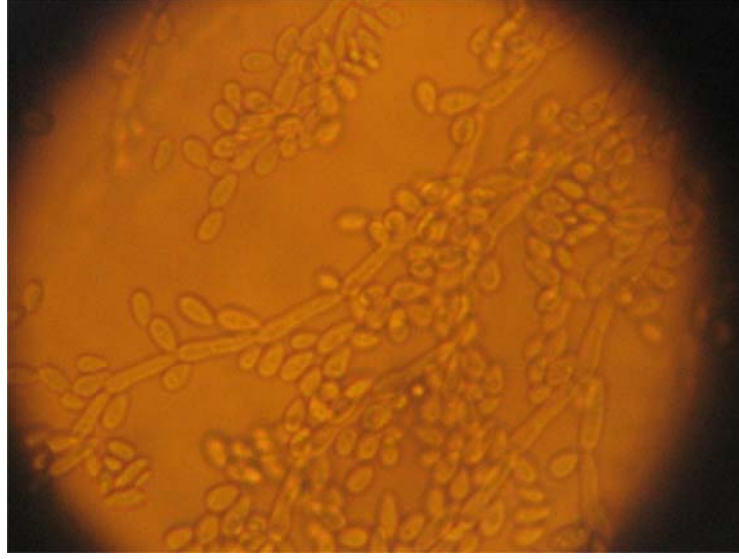
3.2.1.1. Besiyerinin hazırlanması

- Mısır unu agar 17 gr
- Tween 80 10 ml
- Distile su 1000 ml

Karışım otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edildi. Su banyosuna konularak sıcaklığı 50°C' ye getirildi. 70 mm' lik petri kaplarına 10' ar ml olacak şekilde döküldü.

3.2.1.2. Deneyin yapılışı

Kökenlerin her biri SDA' ya ekilerek 37°C' de 18 saat inkübe edildi. Üreyen kolonilerden iğne öze ile alınıp mısır unlu Tween 80 agar üzerine üç paralel çizgi şeklinde ekim yapılarak ekim çizgilerinin üzeri lamelle kapatıldı. 25°C' de 72 saat inkübe edilen plaklar, klamidospore oluşumu bakımından ve türler arasında farklı morfolojik yapılanmalar açısından incelendi (Resim 1).



Resim 1. Mısır unlu-Tween 80' li besiyerinde *C. lusitaniae*' ye ait yalancı hiflerin görüntüsü (çalışmamızdan)

3.2.2. Eskülin hidrolizi:

C. inconspicua ile *C. norvegensis* türlerinin ayrımı amacıyla kullanılmıştır.

3.2.2.1. Besiyerinin hazırlanması

- Sığır eti özütü 0,3 gr
- Pepton 0,5 gr
- Agar 1,5 gr
- Sığır safrası 4 gr
- Ferrik sitrat 0.05 gr
- Distile su 90 ml

Karışım otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edildi. Su banyosuna konularak sıcaklığı 50°C' ye getirildi.

- Eskülin 0,1 gr
- Distile su 10 ml

50°C' ye soğutulan besiyerine hazırlanan eskülin süspansiyonu eklendi. Petrilere döküldü.

3.2.2.2. Deneyin yapılışı

SDA' ya ekilen kökenlerin kolonilerinden 37°C' de 24 saat inkübasyonun ardından iğne özeyle alınarak eskülinli besiyerine çizgi şeklinde ekildi. 35°C' de 48 saat inkübe edilen plaklarda siyah renkli kolonilerin oluşması pozitif reaksiyon olarak tanımlandı.

C. norvegensis eskülini hidroliz ederek pozitif sonuç verir.

Çalışmamızda önceden ID 32C ile *C. inconspicua/ norvegensis* olarak tanımlanmış olan 2 kökenin eskülin hidrolizi deneyi sonucu *C. inconspicua* olduğu tespit edildi.

3.2.3. Asit proteinaz deneyi:

Seyrek rastlanan *albicans* dışı kandida kökenlerinin salgısal asit proteinaz aktivitelerinin saptanması amacıyla %1' lik sığır serum albümini içeren, pH: 5,0 olan katı besiyeri kullanıldı.

3.2.3.1. Besiyerinin hazırlanması

a) YEPD buyyon

Maya özütü	1 gr
Pepton	2 gr
Dekstroz	2 gr
Distile su	100 ml

Karışım otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edildi ve steril tüplere 5' er ml şeklinde bölüştürüldü.

b) Temel besiyeri

Dekstroz	2 gr
KH ₂ PO ₄	0,1 gr

MgSO ₄ 7H ₂ O	0,05 gr
Agar	2 gr
Distile su	100 ml

Karışım otoklavda 110°C’ de 15 dakika steril edilerek, sitrik asit tampon çözeltisiyle pH 5.0’ a ayarlandı ve 50°C’ lik su banyosuna konuldu.

Temel besiyerine eklenen protein çözeltisi

Sığır serum albümini (Fraksiyon V)	1 gr
Distile su	100 ml

Karışım manyetik karıştırıcıda çözüldükten sonra 0.2µm’ lik membran filtreden geçirilerek steril edildi. Hazırlanan protein çözeltisinden 50°C’ ye soğutulmuş temel besiyerine %20 oranında eklendi ve 70 mm çapındaki petrilere 10’ ar ml şeklinde döküldü (27).

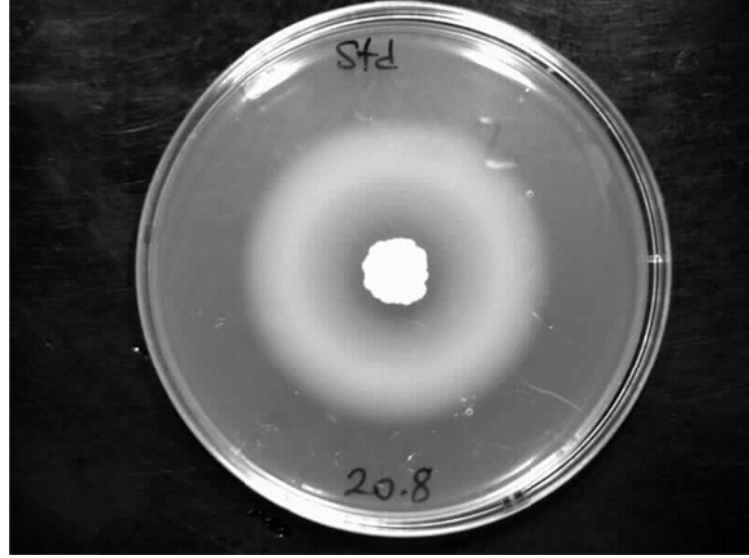
3.2.3.2. Deneyin yapılışı

Kökenler SDA’ ya ekilerek 37°C’ de 24-48 saat inkübe edildi. Üreyen kolonilerden alınıp YEPD sıvı besiyerine pasajları yapıldı. 30°C’ de 4 saat inkübe edildikten sonra maya süspansiyonlarının bulanıklıkları 0,5 McFarland standardına (1-5x10⁶ KOB/ml) ayarlandı. Sığır serum albumini içeren temel besiyeri yüzeyine yerleştirilmiş 6 mm çapındaki steril kağıt diskler üzerine 10’ ar µl olarak damlatıldı (21, 27).

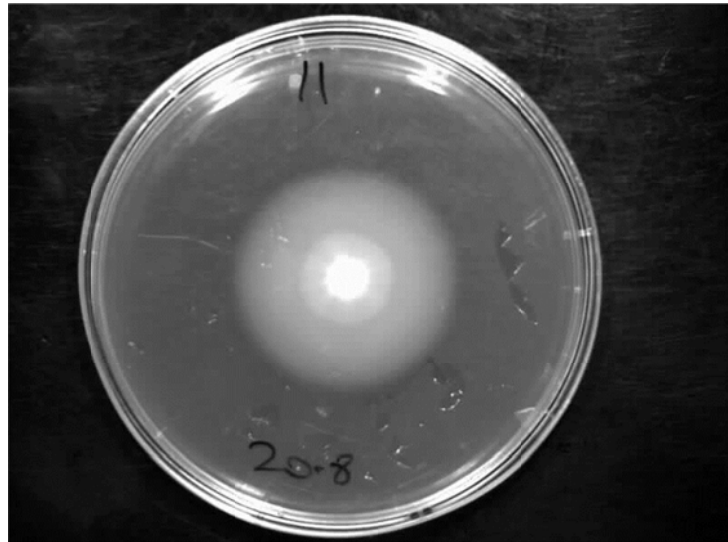
Plaklar 30°C’ de 6 gün boyunca inkübe edildi ve her gün incelendi. İnkübasyon öncesinde besiyeri pH: 5,0’ da hafif opaktır. Üremeye beraber disk çevresindeki artan opaklaşmayı takiben şeffaflaşma şeklinde zon oluşur. Oluşan şeffaf lizis zonları, üreyen maya hücrelerinin asit proteinaz aktivitelerine bağlı olarak ortamdaki albuminin parçalandığını göstermektedir. Altıncı günde lizis zonlarının mm olarak genişlikleri ölçülerek proteolitik aktivitenin düzeyi belirlendi (21, 27).

Lizis zonu olmayan (-), lizis zonu en fazla diskin 1-2 mm dışındaki alana yayılmış reaksiyon ılımlı (+), lizis zonu diskin 3-5 mm dışındaki alana yayılmış reaksiyon ise kuvvetli (++) olarak değerlendirildi (27, 28).

Pozitif kontrol olarak salgısal asit proteinaz üreten standart CBS 2730 kökeni kullanıldı.



Resim 2. Sığır serum albüminli besiyerinde asit proteinaz pozitif (*C.albicans*, CBS 2730) kökenin görüntüsü (çalışmamızdan)



Resim 3. Sığır serum albüminli besiyerinde asit proteinaz negatif kökenin görüntüsü (çalışmamızdan)

3.2.4. Fosfolipaz deneyi:

3.2.4.1. Besiyerinin hazırlanması

Ana Besiyeri:

Pepton	1.25 gr
Glukoz	2,5 gr
Agar	2,5 gr
NaCl	7,3 gr
CaCl ₂ 6H ₂ O	0.14 gr
Distile su	115 ml

Karışım otoklavda 121°C’ de 15 dakika steril edilerek 50°C’ lik su banyosuna konuldu.

3.2.4.2. Yumurta sarısının hazırlanması:

Öncelikle yumurtalar % 10 sulandırılmış çamaşır suyunda 1 dakika bekletildi. Steril gazlı bezle kurulanen yumurtalar steril koşullarda kırılarak sarısı steril bir mezura aktarıldı. Üzerine eşit hacimde steril serum fizyolojik eklenerek, steril cam boncuklar bulunan bir balonda iyice karıştırıldı. 24 saat buzdolabında bekletildikten sonra steril tüplere alınarak 2000 rpm’ de 30 dakika santrifüj edildi (27, 29).

Santrifüjün ardından yumurtalı süspansiyonun üst kısmından alınan 10 ml sıvı ile 125 ml sitrik asit disodyum fosfat tamponu 50°’ deki ana besiyerine eklendi ve 70 mm çaplı petrilere 10’ ar ml şeklinde döküldü (27, 30).

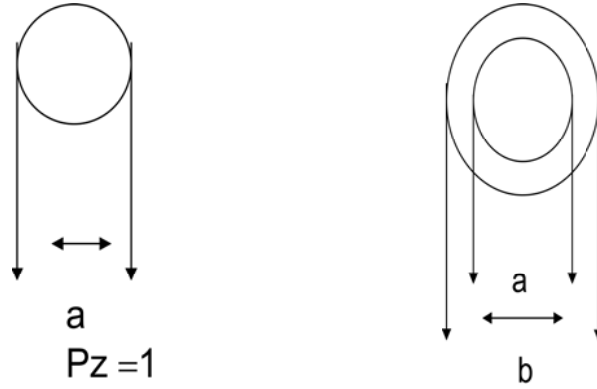
3.2.4.3. Deneyin yapılışı

Kökenlerin SDA’ da 18-24 saatlik inkübasyon sonucu üreyen kolonilerinden steril serum fizyolojik içinde McFarland 0.5’e göre maya süspansiyonu hazırlandı. Her bir petriye ölçülü özeyle (0.01 ml) besiyeri yüzeyine değdirmek suretiyle maya süspansiyonlarından ekim yapıldı. 37°C’ de 4 gün inkübe edildi (27, 30). Pozitif kontrol olarak *C. albicans* SC 5314 kökeni kullanıldı.

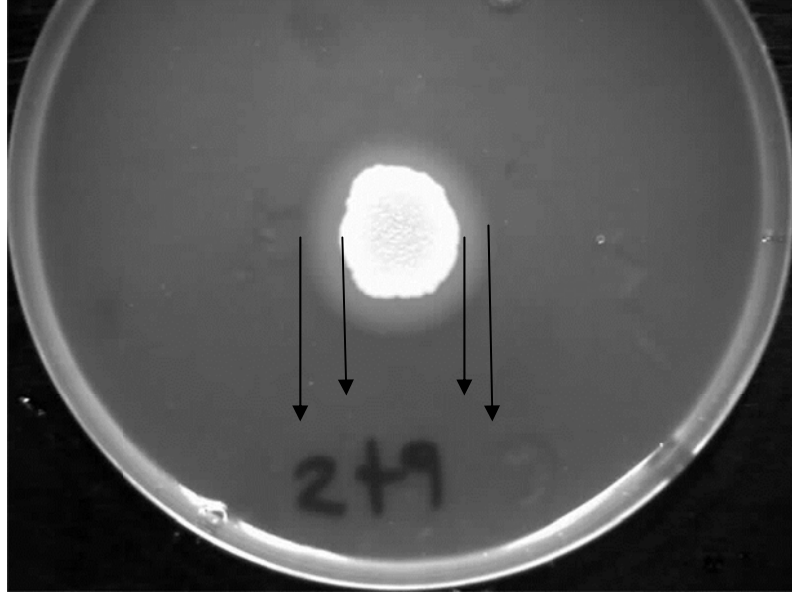
Fosfolipaz aktivitesinin ölçülmesinde ve hesaplanmasında koloni etrafında oluşan belirgin halka şeklindeki presipitasyon zonu (Pz) dikkate alındı.

Fosfolipaz aktivitesi koloni çapının koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı olarak hesaplandı. Bu sistemde Pz değeri küçüldükçe fosfolipaz aktivitesi artmaktadır. Pz = 1.00 değeri kökenin fosfolipaz aktivitesinin negatif olduğunu göstermektedir. Bu durumda Pz değeri 0,9-1,00 olanlar (+), 0,89-0,80 olanlar (++), 0,79-0,70 olanlar (+++), <0.69 olanlar ise (++++) grubunu oluşturmaktadır (31).

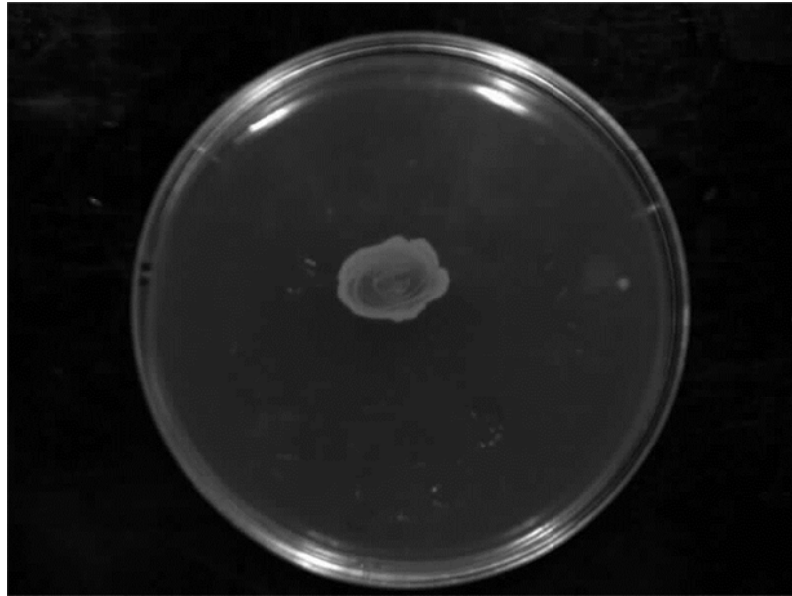
Şekil 1. Fosfolipaz Aktivitesi İçin Pz Değerinin Hesaplanması



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



Resim 4. Yumurta sarılı besiyerinde fosfolipaz pozitif (*C. albicans* SC 5314) kökenin görüntüsü (çalışmamızdan)



Resim 5. Yumurta sarılı besiyerinde fosfolipaz negatif kökenin görüntüsü (çalışmamızdan)

3.2.5. Esteraz deneyi:

3.2.5.1. Besiyerinin hazırlanması

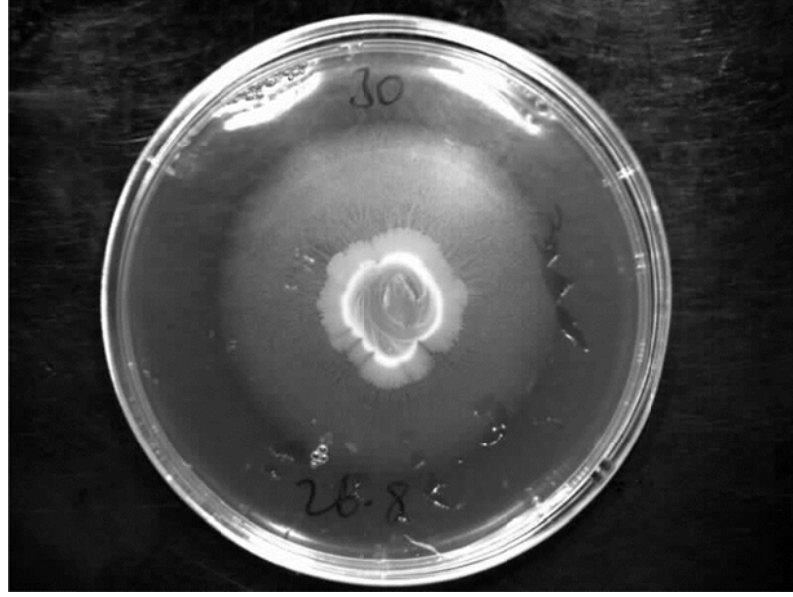
Tween 80 Agar Besiyeri:

Pepton	10 gr
NaCl	5 gr
CaCl ₂	0,1 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml

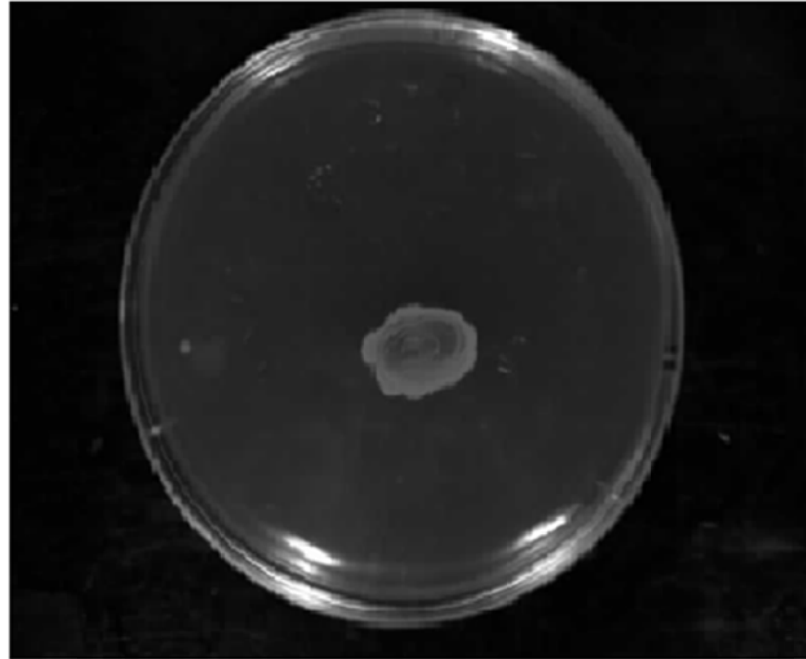
Karışım otoklavda 121°C’ de 15 dakika steril edilerek 50°C’ lik su banyosuna konuldu. Daha sonra besiyeri içerisine 5 ml steril Tween 80 eklenerek sitrik asit disodyum hidrojen fosfat tamponu ile pH 6.8’e ayarlandı (17, 32, 33, 18).

3.2.5.2. Deneyin yapılışı

SDA’ da 24 saatlik inkübasyon sonucu üretilen kökenlerin kolonileri steril pamuklu çubuk dokundurmak suretiyle alındı ve Tween 80 agara daire şeklinde (~ 10 mm çapında) ekim yapıldı. 30°C’ de 10 gün inkübe edilen plaklar her gün arkadan ışık verilerek incelendi. İnokülasyon bölgesinin etrafında Tween 80’ in hidrolizi sonucunda açığa çıkan yağ asidinin kalsiyum ile birleşerek opak kristaller halinde çökmesi pozitif esteraz aktivitesi olarak değerlendirildi (18, 33, 34).



Resim 6. Tween 80' li besiyerinde esterase pozitif kökenin görüntüsü
(çalışmamızdan)



Resim 7. Tween 80' li besiyerinde esterase negatif kökenin görüntüsü
(çalışmamızdan)

3.2.6. Sıvı sıkı örtü üretiminin araştırılması

Sıvı sıkı örtü üretimi modifiye tüp aderens yöntemi kullanılarak araştırıldı (35, 36, 37). Sabouraud Dekstroz Agar' daki 24-48 saatlik kolonilerden bir öze dolusu

alınarak son konsantrasyonu %8 olacak şekilde glukoz içeren 10 ml Sabouraud buyyon bulunan 10 ml polistiren falkon tüplere inoküle edildi.

Tüpler 35°C’ de 48 saat inkübasyonun ardından içerikleri dikkatlice boşaltılarak iki kez distile su ile yıkandı; %1’ lik safranin-O ile boyandı. Havada kurutulan tüplerin iç çeperinde renkli, gözle görünür bir film tabakası varlığı sıvışık örtü üretimi açısından olumlu olarak değerlendirildi. Oluşan tabakanın kalınlığına göre sonuçlar, zayıf (+), orta (++), kuvvetli (+++) olarak yorumlandı. Besiyeri ile havanın kesiştiği yerlerdeki boya tutulmaları ise olumsuz olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *Pseudomonas aeruginosa* PAO- 1 kökeni kullanıldı.

3.2.6.1. %8 glukozlu Sabouraud dekstrozu buyyon (BD)

Sabouraud Dekstrozu Buyyon 3 gr

Glukoz 8 gr

Distile su 100 ml



Resim 8. Modifiye tüp aderans yöntemi ile sıvışık örtü pozitif (en sağda +++) ve sıvışık örtü negatif (en solda) kökenlerin gösterilmesi (çalışmamızdan).

3.2.7. Flukonazol için minimal inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi

Seçilen kökenlerin flukonazol’ e karşı MİK değerlerinin belirlenmesi amacıyla, referans metot olarak CLSI M27- A dokümanından yararlanıldı (38). SDA’ da 35°

C' de 24 saatlik kültürde üremiş kolonilerden çalışıldı. MOPS tampon ve RPMI-1640 (L glutaminli, sodyum bikarbonatsız) ile hazırlanan besiyeri, pH: 7,0 olacak şekilde NaOH ile ayarlandı ve por çapı 0.22 µm olan membran filtrelerden geçirilerek steril edildi.

3.2.7.1. Antifungal duyarlılık besiyerinin hazırlanması

- RPMI-1640 0,36 gr
- MOPS 1,2 gr

Bir miktar distile su ile çözündürülür ve NaOH ile besiyeri pH' sı 7,0' a ayarlanır ve son hacim distile su ile 35 ml' ye tamamlanır.

3.2.7.2. Antifungal stok solüsyonunun hazırlanması

Antifungal olarak; flukonazol (Sigma), etken maddesi kullanıldı. Çözücü olarak distile su kullanıldı.

Stok solüsyonu hazırlanırken, antifungal ilaç miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{Hacim (mL)} = \frac{\text{Ağırlık (mg)} \times \text{Potens (µg/mg)}}{\text{Konsantrasyon (µg/mL)}}$$

Stok solüsyonu 2560 µg/mL oranında hazırlandı.

Hazırlanan antifungal stok solüsyonu 0,22 µm membran filtreden geçirilerek 1mL'lik hacimlere bölünüp steril eppendorf tüplerine kondu ve kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.2.7.3. Deneyin yapılışı

Antifungal duyarlılık testi flukonazol dilüsyonları 0.125-256 µg/mL hazırlandı ve 100 µl olacak şekilde tüplere konuldu üzerlerine de final konsantrasyonu 0,5-2,5x10³ kob/ml' ye ayarlanan maya süspansiyonu 900' er µl olarak eklendi.

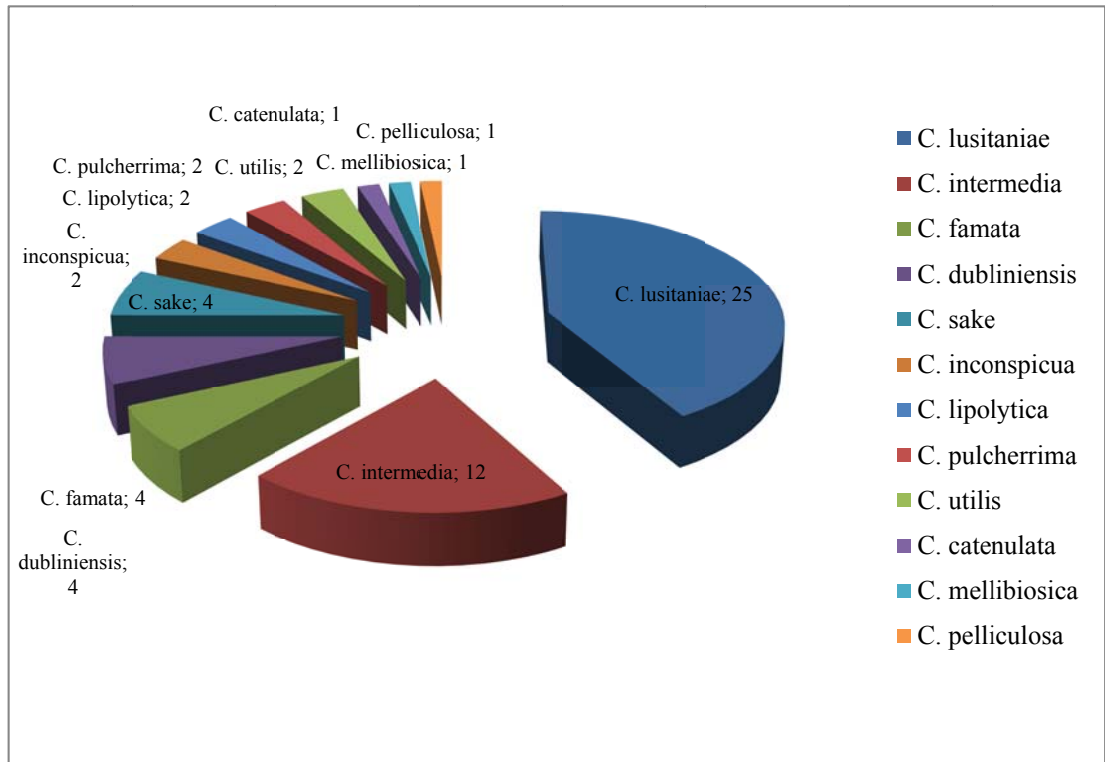
3.2.8 İstatistiksel analiz

Sonuçların istatistiksel analizinde Pearson Ki- Kare yöntemi uygulanmıştır. Virölans faktörlerinin ve Flukonazol MİK değerlerinin klinik materyallere göre kıyaslanmasında en fazla kökenin izole edildiği idrar ve idrar dışı diğer klinik materyallere ait izolatlar olmak üzere iki grup karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi' nde 2002-2009 yılları arasında Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen materyallerden izole edilen nadir rastlanan *albicans* dışı 60 kandida kökeni çalışmaya alınmıştır.

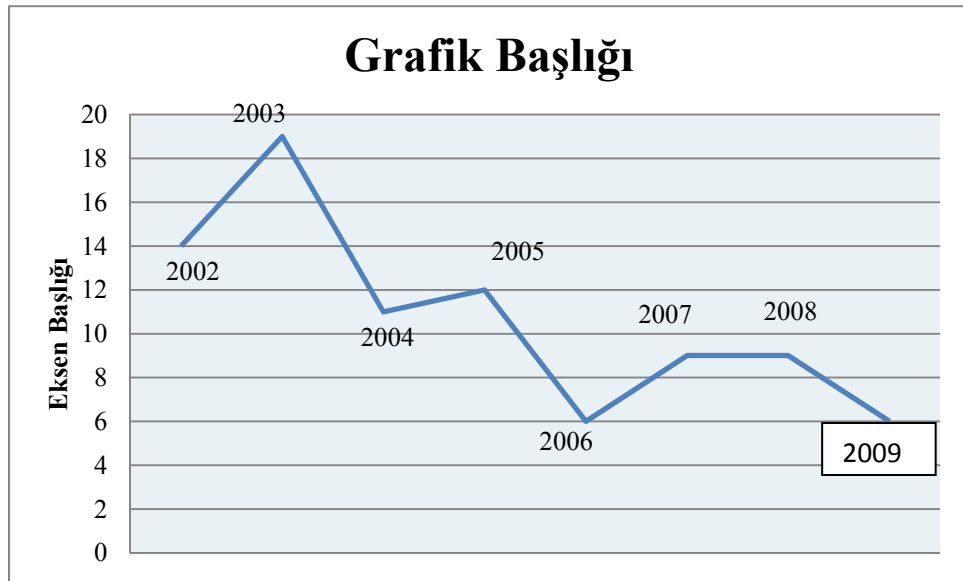
Kökenlerin 25' i (%41.6) *C. lusitaniae*, 12' si (%20) *C. intermedia*, 4' er tanesi (%6.6) *C. famata*, *C. dubliniensis*, *C. sake*, 2' şer tanesi (%3.3) *C. inconspicua*, *C. lipolytica*, *C. pulcherrima*, *C. utilis*, 1' er tanesi (%1.66) *C. catenulata*, *C. mellibiosica* ve *C. pelliculosa*' dır (Şekil 1). En fazla izole edilen iki köken olan *C. lusitaniae* ve *C. intermedia*' nin toplamı 37 olup tüm kökenlerin %61,6' sını oluşturmaktadır ve bunlar sıklık sırasına göre idrar, kan ve balgam örneklerinden soyutlanmıştır (Tablo 1)



Şekil 1. 60 *albicans* dışı kandida kökeninin türlerine göre dağılımı.

Tablo 1. Kökenlerin İzole Edildikleri Klinik Materyale Göre Dağılımı

	İdrar	Kan	Balgam	DTA	Doku	Yara	Tırnak	BAL	Cutdown	ETA	Özefagus Sür.	PEG Sür.	Periton	TOPLAM
<i>C. lusitaniae</i>	14	2	5	2	1	1	-	-	-	-	-	-	-	25
<i>C. intermedia</i>	6	2	-	2	-	-	-	1	-	-	-	1	-	12
<i>C. famata</i>	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	4
<i>C. pulcherrima</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>C. pelliculosa</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. catenulata</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. inconspicua</i>	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>C. dubliniensis</i>	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>C. lipolytica</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	2
<i>C. sake</i>	1	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	4
<i>C. mellibiosica</i>	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>C. utilis</i>	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
TOPLAM	30	8	8	4	2	1	1	1	1	1	1	1	1	60



Şekil 2. 60 albicans dışı *Candida* kökeninin izolasyon yıllarına göre dağılımı.

4.1. *Albicans* dışı kandida kökenlerinde virülans faktörlerinin değerlendirilmesi:

4.1.1. Salgısal asit proteinaz (SAP) aktivitesinin değerlendirilmesi:

Çalışmaya alınan 60 *albicans* dışı kandida kökeninin 16' sında (%26,6) proteinaz aktivitesi saptanmadı. Diğer 44 kökenin 40' ında SAP düzeyi (%66,6) (+) iken, 4' ünde (%6,25) (++) olarak bulundu (Tablo 2).

Tablo 2. *Candida* türlerinin SAP aktivitesi oranları

Tür adı	N	Salgısal Asit Proteinaz Üretim Düzeyi			
		-	+	++	+++
<i>C. lusitaniae</i>	25	5	19	1	-
<i>C. intermedia</i>	12	7	4	1	-
<i>C. famata</i>	4	-	4	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	4	1	3	-	-
<i>C. sake</i>	4	-	3	1	-
<i>C. inconspicua</i>	2	-	2	-	-
<i>C. lipolytica</i>	2	1	1	-	-
<i>C. pulcherrima</i>	2	1	-	1	-
<i>C. utilis</i>	2	1	1	-	-
<i>C. catenulata</i>	1	-	1	-	-
<i>C. mellibiosica</i>	1	-	1	-	-
<i>C. pelliculosa</i>	1	-	1	-	-
TOPLAM	60	16	40	4	-

Kökenlerin, izole edildikleri klinik materyalin cinsine göre SAP üretim düzeyleri kıyaslandığında;

İdrar izolatlarının 23' ünde (%76,6) ve idrar dışı diğer izolatların 21' inde (%70) SAP pozitif bulunmuştur. Bu kıyaslamalı sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$)

Kökenlerimiz arasında en sık izole edilen *C. lusitainae*' nin proteinaz aktivitesi diğer kökenlerin proteinaz aktivitesiyle karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmamıştır. ($p>0.05$)

4.1.2. Kökenlerin fosfolipaz aktivitesinin değerlendirilmesi:

Çalışmaya alınan 60 *albicans* dışı *candida* kökeninin 2' sinde (% 3.125) (*C. dubliniensis*, *C. utilis*) (+++), 1 tanesinde (%1.56) (*C. utilis*) ise (++) enzim aktivitesi saptandı. Diğer kökenlerde fosfolipaz aktivitesine rastlanmadı (Tablo 3).

Tablo 3. *Candida* türlerinin fosfolipaz aktivitesi oranları

Tür adı	N	Fosfolipaz Üretim Düzeyi			
		-	+	++	+++
<i>C. lusitaniae</i>	25	25	-	-	-
<i>C. intermedia</i>	12	12	-	-	-
<i>C. famata</i>	4	4	-	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	4	3	-	-	1
<i>C. sake</i>	4	4	-	-	-
<i>C. inconspicua</i>	2	2	-	-	-
<i>C. lipolytica</i>	2	2	-	-	-
<i>C. pulcherrima</i>	2	2	-	-	-
<i>C. utilis</i>	2	2	-	1	1
<i>C. catenulata</i>	1	1	-	-	-
<i>C. mellibiosica</i>	1	1	-	-	-
<i>C. pelliculosa</i>	1	1	-	-	-
TOPLAM	60	57	-	1	2

Kökenlerin, izole edildikleri klinik materyalin cinsine göre fosfolipaz üretim düzeyleri kıyaslandığında;

İdrar izolatlarının hiçbirinde fosfolipaz aktivitesi saptanmazken idrar dışı diğer izolatların 3' ünde (%10) pozitif bulunmuştur. İzolatlar arasında klinik materyale göre fosfolipaz aktivitesi yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. ($p>0.05$)

Kökenlerimiz arasında en sık izole edilen *C. lusitaniae* ile diğer türler karşılaştırıldığında fosfolipaz aktivitesi açısından anlamlı farklılık saptanmamıştır. ($p>0.05$)

4.1.3. Kökenlerin esteraz aktivitesinin değerlendirilmesi:

Çalışmaya alınan 60 *albicans* dışı kandida kökeninden 9' u (%15) esteraz üretimi açısından pozitif olarak bulundu (Tablo 4).

Tablo 4. *Candida* türlerinin esteraz aktivitesi oranları

Tür adı	N	Esteraz Aktivites Düzeyi	
		-	+
<i>C. lusitaniae</i>	25	25	-
<i>C. intermedia</i>	12	9	3
<i>C. famata</i>	4	4	-
<i>C. dubliniensis</i>	4	2	2
<i>C. sake</i>	4	3	1
<i>C. inconspicua</i>	2	2	-
<i>C. lipolytica</i>	2	1	1
<i>C. pulcherrima</i>	2	2	-
<i>C. utilis</i>	2	1	1
<i>C. catenulata</i>	1	-	1
<i>C. mellibiosica</i>	1	1	-
<i>C. pelliculosa</i>	1	1	-
TOPLAM	60	51	9

Kökenlerin, izole edildikleri klinik materyalin cinsine göre esteraz üretim düzeyleri kıyaslandığında;

İdrar izolatlarının 5' i (%16,7) ve diğer idrar dışı izolatların 4' ünde (%13,3) esteraz aktivitesi pozitif bulunmuştur. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0.05$)

Kökenlerimiz arasında en sık izole edilen 25 *C. lusitainae*' nin esteraz aktivitesi görülmezken diğer türlere ait 35 kökenin 9' unda (%25,7) esteraz aktivitesi gözlenmiştir. Bu durum istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.006$).

4.1.4. Sıvı sık örtü üretiminin değ erlendirilmesi:

Çalışmaya alınan 60 *albicans* dış ı kandida kökeni biofilm üretimi açısından değ erlendirildiğinde 31' i (% 51,6) negatif, 19' u (% 31,6) (+), 7' si (% 10.93) (++) ve 3' ü (% 5) (+++) bulundu (Tablo 5).

Tablo 5. *Candida* türlerinin sıvı sık örtü aktivitesi oranları

Tür adı	N	Sıvı sık Örtü Üretim Düzeyi			
		-	+	++	+++
<i>C. lusitaniae</i>	25	11	7	5	2
<i>C. intermedia</i>	12	8	2	1	1
<i>C. famata</i>	4	2	2	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	4	2	2	-	-
<i>C. sake</i>	4	3	1	-	-
<i>C. inconspicua</i>	2	1	1	-	-
<i>C. lipolytica</i>	2	1	1	-	-
<i>C. pulcherrima</i>	2	-	1	1	-
<i>C. utilis</i>	2	1	1	-	-
<i>C. catenulata</i>	1	-	1	-	-
<i>C. mellibiosica</i>	1	1	-	-	-
<i>C. pelliculosa</i>	1	1	-	-	-
TOPLAM	60	31	19	7	3

Kökenlerin, izole edildikleri klinik materyalin cinsine göre sıvı sık örtü üretim düzeyleri kıyaslandığında;

İdrar izolatlarının 19' unda (%63,3), idrar dış ı diğer izolatların 10' unda (%3,3) pozitif bulunmuştur. Bu sonuçlar karşılaştırılan iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığı yansıtmaktadır ($p<0.02$).

Kökenlerimiz arasında en sık izole edilen *C. lusitaniae*' nin biyofilm üretimi diğer kökenlerin biyofilm üretimi ile karşılaştırıldığında ise anlamlı farklılık saptanmamıştır. ($p>0.05$)

4.1.5. Kökenlerin flukonazole karşı duyarlılıklarının belirlenmesi:

Çalışmaya alınan toplam 2 *C. inconspicua* kökeninin ikisi de flukonazole dirençli bulunmuştur (MİK:64 µg/ml). Bunun yanı sıra 2 *C. lipolytica* kökeninin 1' i ve 4 *C. dubliniensis* kökeninin 1' i (16 µg/ml), 2 *C. utilis* kökeninin 1' i ve de 12 *C. intermedia* kökeninin 1' i (32 µg/ml) doza bağlı duyarlı (DBD) olarak belirlenmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Kökenlerin Flukonazole Karşı Duyarlılıkları

	Duyarlı (n)	Duyarlı(%)	DBD (n)	DBD (%)	Dirençli (n)	Dirençli (%)
	(≤8)		(16-32)		(≥64)	
<i>C. lusitaniae</i>	25	100				
<i>C. intermedia</i>	11	91.66	1	%8.33		
<i>C. famata</i>	4*					
<i>C. dubliniensis</i>	4*					
<i>C. sake</i>	4*					
<i>C. inconspicua</i>					2*	
<i>C. lipoytica</i>	1*		1*			
<i>C. pulcherrima</i>	2*					
<i>C. utilis</i>	1*		1*			
<i>C. catenulata</i>	1*					
<i>C. mellibiosica</i>	1*					
<i>C. pelliculosa</i>	1*					

*: Kökenlerin az sayıda olması nedeniyle % değeri bildirilmemiştir.

Kökenlerin, izole edildikleri klinik materyalin cinsine göre flukonazol MİK düzeyleri kıyaslandığında;

İdrar ve idrar dışı kökenlerin MİK değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Kökenlerimiz arasında en sık izole edilen 25 *C. lusitaniae* izolatının tamamında (%100), diğer 35 izolatın 30' unda (%85,7) MİK değeri $\leq 8\mu\text{g/ml}$ (duyarlı) bulunmuştur. Bu kıyaslamalı sonuçlar arasında istatistiksel açıdan fark, anlamlılık sınırında olarak değerlendirilmiştir ($p=0.048$) (Tablo 7).

En fazla izolata sahip *C.lusitaniae* türünün 25 kökeninin flukonazol için MİK 50 değeri 0,25 µg/ml ve MİK 90 değeri ise 1,0 µg/ml olarak belirlenmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. *albicans* dışı kandida kökenlerinin virülans faktör üretim düzeyleri ve flukonazol MİK değerleri

Tür Adı (n*)	İzolatin Kaynağı (n)	İzolatin Numarası	Asit Proteinaz Aktivitesi	Fosfolipaz Aktivitesi	Esteraz Aktivitesi	Sıvışik Örtü	Flukonazol MİK (µg/ml)
<i>C. lusitaniae</i> (25)	İdrar (14)	1					
		2	-	-	-	++	1
		3	+	-	-	-	1
		4	+	-	-	-	0,25
		5	+	-	-	++	0,5
		6	-	-	-	-	2
		7	-	-	-	++	0,25
		8	+	-	-	+	0,5
		9	+	-	-	-	0,25
		10	+	-	-	-	0,5
		11	+	-	-	+	0,25
		12	+	-	-	-	0,25
		13	+	-	-	+	0,25
		14	+	-	-	+	0,125
			-	-	-	+++	0,5
	Balgam (5)	15	+	-	-	-	0,5
		16	+	-	-	++	0,25
		17	-	-	-	+++	0,5
		18	+	-	-	+	0,25
		19	+	-	-	++	0,25
	Kan (2)	20	++	-	-	+	1
		21	+	-	-	-	0,25
	DTA (2)	22	+	-	-	+	0,25
		23	+	-	-	-	0,5
	Yara Sürüntüsü (1)	24	+	-	-	-	0,25
	Doku (1)	25	+	-	-	-	1

<i>C. intermedia</i> (12)	İdrar (6)	26	+	-	-	+	1
		27	+	-	-	-	1
		28	+	-	-	-	0,25
		29	+	-	-	++	2
		30	-	-	+	-	1
		31	-	-	+	+	0,25
	Kan (2)	32	-	-	-	-	8
		33	-	-	-	-	0,25
	DTA (2)	34	++	-	-	+++	0,5
		35	-	-	-	-	1
	BAL (1)	36	-	-	-	-	32
	PEG Sür. (1)	37	-	-	+	-	2
<i>C. famata</i> (4)	İdrar (3)	38	+	-	-	+	0,25
		39	+	-	-	-	0,25
		40	+	-	-	-	0,5
	Özefagus Sür. (1)	41	+	-	-	+	0,5
<i>C. dubliniensis</i> (4)	İdrar (2)	42	+	-	+	+	1
		43	+	-	+	+	0,5
	Kan (1)	44	-	-	-	-	8
		45	+	+++	-	-	0,25
<i>C. sake</i> (4)	İdrar (1)	46	+	-	-	+	0,25
	Doku (1)	47	+	-	+	-	2
	Tırnak (1)	48	++	-	-	-	0,5
	Kateter Ucu (1)	49	+	-	-	-	0,5
<i>C. inconspicua</i> (2)	İdrar (1)	50	+	-	-	+	64
	Balgam (1)	51	+	-	-	-	64
<i>C. lipolytica</i> (2)	Kan (1)	52	+	-	+	-	1
	ETA 1	53	-	-	-	+	16
<i>C. pulcherrima</i> (2)	İdrar (2)	54	++	-	-	+	0,5
		55	-	-	-	++	0,5
<i>C. utilis</i> (2)	Kan (1)	56	+	+++	+	+	2

	Balgam (1)	57	-	++	-	-	32
<i>C. catenulata</i> (1)	İdrar (1)	58	+	-	+	+	2
<i>C. mellibiosica</i> (1)	Balgam (1)	59	+	-	-	-	0,5
<i>C. pelliculosa</i> (1)	Kan (1)	60	+	-	-	-	1

n*: İzolat sayısı

Tablo 7’ de de görüldüğü gibi yüksek MİK düzeylerine sahip 2 *C. inconspicua*, 1 *C. lipolytica*, 1 *C. utilis*’ in virülans faktörlerine baktığımızda yüksek MİK değerleriyle virülans faktörleri arasında bir bağlantı gözlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

Kandidemi prevalansı ve etken türlerin dağılımları çeşitli araştırmalarla belirlenmeye çalışılmaktadır. Bunun nedeni son 20 yıl içinde kandidemilerde ve diğer invazif kandidemi enfeksiyonlarının sıklığındaki artıştır. Örneğin; ABD’ de 180 hastanenin dahil olduğu National Nosocomial Infections Surveillance Sistemi (NNIS) toplam kandidemi oranını 1980 yılında %5,4, 1990’ da ise %9,9 olarak belirlemiştir (39). Ulusal Tayvan Üniversitesi Hastanesi ise kandidemi oranının 1981 yılından 2000 yılına kadar tam 36 kat arttığını saptamıştır (3).

İmmün sistemi baskılanmış hasta sayısının yıllar içinde giderek artması nedeniyle fırsatçı enfeksiyonlara yol açan yeni ya da yeniden güncelleşen fungal türlerin ortaya çıkmasıyla *albicans* dışı nadir rastlanan *Candida* türlerinin tanımlanması da giderek daha fazla önem kazanmıştır.

Örneğin; Arslan ve arkadaşlarının 22.426 kan kültürü örneğinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımını saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada, 136 kandida kökeninin 70’ i *C. albicans* (%51,5) 17’ si *C. sake* (% 12,5) 12’ si *C. inconspicua/norvegensis* (%8,8), 9’ u *C. tropicalis* (%6,6), 7’ si *C. parapsilosis* (%5,1), 4’ ü *C. dubliniensis* (%2,9) 17’ si diğer (%12,5) (3’ ü *C. lusitaniae*, 2’ si *C. famata*, 1’ i *C. utilis*) olarak saptamış olup buna göre *albicans* dışı kandida oranını %48,5 olarak belirlemişlerdir. Aynı çalışmada *C. sake* ve *C. inconspicua/norvegensis*’ e bağlı kandidemi oranları diğer *albicans* dışı kandidalardan daha yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar bunun nedenini 2004 yılı içerisinde yeni doğan servisindeki *C. inconspicua/norvegensis*’ in etken olduğu total parenteral nutrisyon (TPN)’ a bağlı bir hastane enfeksiyonu salgını meydana gelmesi ile açıklamışlardır. Araştırmacılar aynı yıl içinde karşılaştıkları kandidemili olgu sayısının çalışma kapsamındaki diğer yıllara göre yüksek olmasının da sonuçlarda etkili olabileceğini belirtmişlerdir (3).

Çalışmamızda ise yıllar içinde *albicans* dışı nadir *Candida* türlerinin izolasyon oranları incelendiğinde sürekli artış gözlenmemiştir. Ancak, izolasyonun 2003 ve 2005 yıllarında pik yaptığı fakat ilerleyen yıllarda düştüğü görülmüştür (ŞEKİL 2).

Bu da bizim olası artış beklentimizin tersine bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır. Bununla beraber bulgularımızdaki pik yılları ile Arslan ve arkadaşlarının belirlediği pik yılı (2004) yılı arasında bir paralellik olduğu da aşıkardır. Her iki çalışmadaki bu durum Türkiye için dönemsel bir önemi yansıtabilir.

Albicans dışı nadir *Candida* türlerinin sayısal dağılımına bakıldığında bu konuda literatürde sınırlı sayıda çalışma olduğu gözlenmiştir. Örneğin; Barchiesi ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada 98 *Candida* izolatu kullanılmıştır. Bunların 16' sı *C. kefyr*, 15' er tanesi *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa*, 13' ü *C. guilliermondii* ve 9' u da *C. lipolytica* olarak tanımlanmıştır (40). Süzük ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 19 klinik maya izolatu ile yaptıkları çalışmada nadir görülen *albicans* dışı nadir kandidaların 1' i *C. utilis*, 1' i *C. sake* ve 1' i de *C. inconspicua* olarak tanımlanmıştır (41). Yang ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 6 aylık sürede 737 materyalden (kan, solunum, vajinal akıntı örneği ve diğer) izole edilen 775 kandida izolatinın 20' si (% 2,7) *C. dubliniensis*, 8' i (%1) *C. famata* olarak tanımlanmıştır (42). Coleman ve arkadaşlarının çalışmasında oral kandidiyazlı AIDS hastalarının %32' sinden ve yine oral kandidiyazlı HIV (+) bireylerin %27' sinden *C. dubliniensis* izole edilmiştir; buna karşılık HIV ile enfekte ancak herhangi bir oral lezyonu olmayan hastaların %19' undan ve yine oral kandidiyaz semptomları olmayan AIDS' li hastaların % 25' inden izole edilmiştir. HIV (-) ve sağlıklı kişilerde bu oran % 3' tür (43). Hamal ve arkadaşlarının 646 izolatuyla yaptıkları çalışmada 386 *albicans* dışı kandida kökeninin 14' ü *C. lusitaniae*, 8' i *C. pelliculosa* olarak tanımlanmıştır (44). Kantarcıoğlu ve arkadaşlarının invazif mantar enfeksiyonu olan hastalardan izole ettikleri 146 maya izolatinın 1' inin *C. catenulata* olduğu belirlenmiştir (45).

Çalışmamızda ise 7 yıllık izlemde laboratuvarımıza gönderilen örneklerden izole ettiğimiz 60 izolatin 25' i (%41.6) *C. lusitaniae*, 12' si(%20) *C. intermedia*, 4er tanesi (%6.6) *C. famata*, *C. dubliniensis*, *C. sake*, 2şer tanesi (%3.3) *C. inconspicua*, *C. lipolytica*, *C. pulcherrima*, *C. utilis*, 1er tanesi (%1.66) *C. catenulata*, *C. mellibiosica* ve *C. pelliculosa'* dır. Bu nadir türler açısından ilgi çekici bir durum olarak literatürde, kendi çalışmamız dışında *C. mellibiosica'* nın 2 olguda kan kültüründen etken olarak izole edildiğini bildiren sadece tek bir yayına ulaşabildik

(46). Sonuçlarımıza göre, hastanemizde yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak *C. lusitaniae* %41,6 oranı ile en sık izole edilen nadir *albicans* dışı *Candida* türü olarak belirlenmiştir. Toplam 60 izolatin 30' u (%50) idrar, 8'i (%13,3) balgam, 8' i (%13,3) kan, 4' ü (%6,6) DTA, 2' si (%3,3) doku, 1'er tanesi de (%1,6) yara, tırnak, BAL, kateter ucu, ETA, özefagus sürüntüsü, PEG sürüntüsü ve periton materyalinden izole edilmiştir. İdrar izolatlarının çokluğu (%50) sistemik enfeksiyonlarda idrar kültürlerinin tanıdaki önemini ortaya koymaktadır.

Albicans dışı nadir *Candida* türlerine bağlı enfeksiyonlarda artış görülmekle birlikte konak faktörlerinin yanı sıra bu türlerin sahip olduğu virülans faktörlerinin patogenezdaki rollerini irdeleyen geniş kapsamlı çalışmalar da yoktur. Bu çalışmalardan biri olan Pinto ve arkadaşlarının araştırmasında, 232 klinik maya izolatinin içinde yer alan 3 *C. pulcherrima* ve 1 *C. famata* kökenlerinin hiçbirinde asit proteinaz aktivitesi saptanmamıştır (47). Arsenijevic ve arkadaşlarının tamamı onikomikozlu olan 28 hastadan izole ettikleri 7 *C. famata* kökeninin hepsinde asit proteinaz aktivitesi saptanmıştır (48). Rodriguez ve arkadaşları HIV (+) hastaların oral kavitesinden ve yoğun bakım ünitesindeki hastaların kateter ve kan örneklerinden izole edilmiş 112 *Candida* kökeninin 53' ünün *albicans* dışı *Candida* olduğunu bunların da 37' sinin (%69,8) proteinaz aktivitesinin pozitif olduğunu bulmuşlardır, bu kökenler arasında kateterden izole edilen nadir türler olarak *C. famata* (1) ve *C. lusitaniae*' nin (5) hepsinde proteinaz aktivitesi saptanmıştır (49). Kantarcıoğlu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada invazif enfeksiyonlu hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 4 *C. lipolytica*' nin 3' ünde proteinaz aktivitesine rastlanırken, 1 *C. lusitaniae*' nin proteinaz aktivitesi göstermediği ortaya konmuştur (50). Benzer biçimde Öksüz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da tümü immün sistemi baskılanmamış, antifungal terapi görmemiş sağlıklı kişilerden izole edilen 4 *C. famata*' nin (1' i ürogenital bölgeden, 1' i fekal, 2' si ise solunum örneğinden) 2' sinde ve *C. lusitaniae*' nin (1' i oral kavite, diğeri deriden) 2 kökenin ikisinde de proteinaz aktivitesi saptanmıştır (51). Bizim çalışmamızda ise 60 adet *albicans* dışı nadir türlerde yer alan *Candida* kökeninden 16 tanesinde (% 26,6) proteinaz aktivitesi negatif saptanmıştır. SAP aktivitesi saptanan 44 kökenimizin etkinlik düzeyleri ise, 40 tanesinde (%66,6) (+) iken, 4 tanesinde (%26,6) (++) olarak bulunmuştur. Çalışmamızda en sık izole edilen 25 *C. lusitaniae* kökeninin %80' inin

Costa ve Öksüz' ün sonuçlarını destekler şekilde yüksek oranda proteinaz aktivitesi gösterdiği saptanmıştır. *C. famata* için yaptığımız analizde daha önceki çalışmalara benzer şekilde tüm izolatlarda proteinaz aktivitesi pozitif bulunmuştur. *C. lipolytica*'nın proteinaz aktivitesini incelediğimizde 2 izolatın 1' inin proteinaz aktivitesi gösterdiğini belirledik. (Tablo 2). Kantarcıoğlu ve arkadaşlarıun çalışması da bizim bu yöndeki bulgumuzla uyumludur.

Çalışmamızda nadir *albicans* dışı *Candida* türlerinin en sık üretildiği materyal olan idrar izolatlarında %76,6 oranında SAP etkinliği saptanırken, diğer klinik materyallerden üretilen izolatlarda bu oran %70 olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamsızdır ($p>0,005$), bu veri, nadir türlerin patojenitesinde SAP üretiminin etkili olabileceğini ancak farklı vücut bölgelerine göre bu etkinliğin düzeyinin değişmeyeceğini göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda nadir *albicans* dışı *Candida* türü olarak en fazla izole edilen 25 adet *C. lusitaniae* kökeninin 20' sinde ve diğer türler kapsamına giren 35 kökenin 24' ünde belirlenen SAP etkinliği istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermemiştir ($p>0.05$). Bu da nadir *albicans* dışı *candida* türlerine ait kökenlerin herhangi birinin diğerlerinden SAP üretimine bağlı virülans bakımından farklı olamayacağını işaret etmektedir.

Virülans faktörlerinden bir diğeri olan fosfolipaz aktivitesinin araştırıldığı çalışmalardan biri olarak Pinto ve arkadaşlarının araştırmasında, 232 klinik maya izolatının içinde yer alan 3 *C. pulcherrima* ve 1 *C. famata* kökenlerinin hiçbirinde fosfolipaz aktivitesi saptanmamıştır (47). Costa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kan ve kateterden izole edilen 54 kandida kökeni oral kaviteden elde edilen 58 izolattan daha düşük fosfolipaz aktivitesi göstermiştir (49). Aynı çalışmada 5 *C. famata* kökeninin 2' sinde fosfolipaz aktivitesi görülürken 1 *C. lusitaniae* izolatında aktiviteye rastlanmamıştır; fosfolipaz pozitif bulunan 2 köken kateter izolatıdır. Kantarcıoğlu ve arkadaşları 35 *albicans* dışı *candida* izolatında fosfolipaz aktivite düzeyini araştırmışlar 4 *C. lipolytica* ve 1 *C. lusitaniae*' de aktivite saptamamışlardır (50). Benzer şekilde bizim çalışmamızda 25 *C. lusitaniae* ve 2 *C. lipolytica*'nın hiçbirinde fosfolipaz aktivitesi gözlenmemiştir. Bir diğer çalışmada ise 4 *C. famata*'nın 2' sinde fosfolipaz aktivitesi bulunurken 2 adet *C. lusitaniae*'nin hiçbirinde rastlanmamıştır (51). Scheid ve arkadaşlarının (2010) 48 adet *C. albicans* ve 24 adet

C. dubliniensis ile yaptıkları çalışma sonucunda bu kökenlerin hiç birinde fosfolipaz üretimine rastlanmamıştır (52). Benzer olarak bizim çalışmamızda da 4 *C. dubliniensis* kökeninin 3' ünde fosfolipaz aktivitesine rastlanmamıştır; ancak 1' inde (++++) düzeyde fosfolipaz etkinliği saptanmıştır; bu sonuç türün kendi kökenleri arasında değişkenlik olabileceğini ifade etmektedir.

Çalışmamızda 2 *C. utilis* kökeninin 1' i (++) diğeri ise (++++) düzeyinde fosfolipaz pozitif bulunmuştur; bu da bu nadir türün fosfolipaz üretimi ile ilintili virülans potansiyelinin yüksekliğine dikkat çekmektedir (Tablo 3).

Çalışmamızda en fazla sayıda yer alan 30 idrar izolatının hiçbirinde fosfolipaz aktivitesi saptanmazken, idrar dışı kökenlerin 3' ünde (%10) enzim etkinliği saptanmıştır ancak; aradaki fark istatistiksel açıdan anlamsızdır. Buna göre çalışmamızda vücut bölgelerine göre nadir türlerin fosfolipaz aktivitelerinin etkilenmediği ortaya konmuştur. Ayrıca en fazla izole edilen 25 adet *C. lusitaniae* kökeninin hiçbirinde fosfolipaz üretimi saptanmamıştır. Buna karşın diğer türler grubunda yer alan 35 kökenin sadece 3' ünde bu etkinlik gözlenmiştir. Ancak aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Bu sonuç nadir *Candida* türlerine bağlı enfeksiyonların patogeneğinde fosfolipaz aktivitesinin önemli olmadığına bir göstergesi olabilir.

İncelenen bir diğer enzim aktivitesi esterazdır. Bununla ilgili ulaşabildiğimiz geniş kapsamlı bir çalışmada aralarında *C. sake* ve *C. famata*'nın da bulunduğu çeşitli klinik materyallerden izole edilen *albicans* dışı *candida* türlerine ait 40 kökenin %73' ünde fosfolipaz aktivitesi gözlenirken, kökenlerin esteraz enzimi üretimine bakıldığında ise 40 kökenin sadece (%35)' i pozitif olarak bulunmuştur. Ancak, bu kökenlerin arasında yukarıdaki nadir türlerin yer alıp almadığı belirtilmemiştir (53).

Bizim çalışmamızdaki 12 *C. intermedia* kökeninin 3' ünde, 4 *C. dubliniensis* kökeninin 2' sinde, 4 *C. sake* kökeninin 1' inde, 2 *C. lipolytica*'nın 1' inde, 2 *C. utilis*' in 1' inde ve 1 *C. catenulata* kökeninde esteraz pozitif bulunmuştur. Toplamda 60 kökenin 9 (%15) unda esteraz aktivitesi görülmüştür.

Diğer virülans faktörleriyle benzer bir irdeleme olarak, 30 idrar izolatının 5' inde (%16,7) ve idrar dışı izolatların 4' ünde (%13,3) saptanan esteraz etkinliği istatistiksel açıdan kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). En fazla sayıdaki izolat olan 25 *C. lusitaniae* kökeninin hiçbirinde esteraz üretimi görülmezken diğer türler grubuna ait 35 kökenin 9' unda esteraz aktivitesi gözlenmiştir ve iki grup arası farklılık istatistiksel açıdan anlamlıdır (Tablo 4).

Sonuçlarımıza göre *albicans* dışı nadir türlerin vücut bölgesine bağımlı olmaksızın fakat türle bağlantılı olarak farklı düzeyde esteraz enzimi üretebileceklerini ileri sürebiliriz.

Ancak, esteraz enzimi üretiminin virülansla ilişkisi halen tartışmalıdır. *Candida albicans* başta olmak üzere pek çok çalışmada klinik izolatların bu etkinliği araştırılmakta olup, elde edilen verilerin esteraz aktivitesinin olası bir virülans faktörü olup olmadığına dair bir fikir birliği oluşturacağını düşünmekteyiz.

Mikroorganizmaların enfeksiyon patogeneğinde en önemli faktörlerden biri olarak tanımlanan sıvışık örtü üretimi açısından literatürü araştırdığımızda nadir türlerin de çalışıldığı tek kaynak olarak Mumcuoğlu ve arkadaşlarının yayınına ulaşabildik. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmada *albicans* dışı 40 kökenin 13 tanesinde sıvışık örtü üretimi bildirilmiştir fakat, çalışmada yer alan *C. sake* ve *C. famata* kökenlerinin etkinlik durumu ayrıca belirtilmemiştir (53).

Çalışmamızda 60 kökenin 19' u (+), 7' si (++), 3' ü (+++) düzeyinde sıvışık örtü üretimi bakımından pozitiflik gösterirken 31 tanesi (-) bulunmuştur (Tablo 5).

Bu önemli virülans faktörünün farklı vücut bölgelerine göre üretimini irdelediğimizde 30 idrar izolatımızın %63,3' ünde ve idrar dışı kökenlerimizin %3,3' ünde sıvışık örtü üretimi saptadık. Bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlıdır ($p<0,02$). Bu sonuca göre idrar yolu enfeksiyonlarında nadir türlerin dahi sıvışık örtü üretimine bağlı yüksek patojeniteye sahip olabileceği özellikle mesane kateteri bulunduran hastalar açısından göz önünde bulundurulmalıdır.

Flukonazol en sık başvuru alan bir antifungal ilaç olarak etkinlik düzeyi en çok araştırılan ajandır. Bu nedenle biz de nadir türlere ait kökenlerimizin bu ilaca karşı

duyarlılık durumlarını incelemeyi gerekli gördük. Literatürde bu değerlendirmeye yönelik olarak diğer parametrelere oranla oldukça fazla çalışmaya eriştik.

Sebti ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 974 germ tüp pozitif mayanın 22' sini *C. dubliniensis* olarak tanımlanmışlar ve bu kökenlerin flukonazol MİK değerlerine bakıldığında hepsinin flukonazole duyarlı olduğunu bulmuşlardır (54).

Asmundsdottir ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 9' u *C. dubliniensis* olmak üzere 12 kandida kökeninin flukonazol duyarlılıklarına bakmışlar ve 9 kökenin de duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir (55).

Süzük ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 228 izolat ile çalışılmış ve bunların 19' u *Candida* cinsi olarak belirlenmiştir. Bu 19 kökenin 11' i *C. albicans*, 3' ü *C. tropicalis*, 2' si *C. glabrata*, 1' i *C. utilis*, 1' i *C. sake* ve 1' i de *C. inconspicua* olarak tanımlanmıştır. Tüm bu kandida kökenlerinin flukonazol MİK değeri saptandığında hepsi bu antifungale duyarlı bulunmuştur (41).

Becerra ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 29 kan dolaşımı enfeksiyonu olgusundan izole edilmiş olan 12 (%41) kandida kökeninin 1' i *C. lipolytica* olup, flukonazole duyarlı bulunmuştur (56).

Bedini ve ark yaptıkları çalışmada kandan izole edilen toplam 94 kandida izolatının 2' si *C. lusitaniae*, 1' i de *C. pelliculosa* olarak belirlenmiş ve hepsi flukonazole duyarlı bulunmuştur (57).

Sneha ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, HIV ile enfekte hastaların oral lezyonlarından izole edilen 132 kandida izolatının 22 tanesini *C. dubliniensis* olarak belirlemişlerdir. Tüm *C. dubliniensis* kökenlerinin flukonazole karşı duyarlılığı incelendiğinde 12 duyarlı, 5 doza bağlı duyarlı, 5 dirençli köken tespit etmişlerdir (58).

Badiee ve arkadaşları yaptıkları çalışmada HIV ile enfekte hastaların orofarenks ve vajinal örneklerinden izole ettikleri toplam 359 kökenin 31' ini *C. dubliniensis* olarak tanımlanmış ve 31 kökenin de 2 tanesini flukonazole karşı dirençli bulmuşlardır (59).

Torres ve arkadaşları yaptıkları çalışmada immün sistemi baskılanmış hastalardan izole ettikleri 90 kandida kökeninin 2' sini *C. lusitaniae* olarak tanımlamışlardır. Bu 2 kökenin 1' i flukonazole karşı duyarlı bulunurken 1' i de doza bağlı duyarlı (DBD) olarak tespit edilmiştir (60).

Kalkancı ve arkadaşları 4 yeni doğan hastadan izole ettikleri 4 *C. pelliculosa* kökeninde flukonazol MİK değerlerine bakmışlar ve 4 kökenin de DBD olduğunu tespit etmişlerdir (61).

Barchiesi ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada 98 klinik kandida izolatının 16' sını *C. kefir*, 15' er tanesini *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. lusitaniae*, *C. pelliculosa*, 13' ünü *C. guilliermondii* ve 9'unu da *C. lipolytica* olarak tanımlamışlardır. Kökenlere uygulanan flukonazol duyarlılık testi sonucu; *C. kefir* kökeninin %7' si, *C. famata* kökeninin %40' ı, *C. inconspicua* kökeninin %87' si, *C. pelliculosa* kökeninin %53' ü, *C. guilliermondii* kökeninin %23' ü ve *C. lipolytica* kökeninin % 56' sı 8 µg/ml' nin üzerinde MİK değerleri verirken, *C. lusitaniae*' nin tüm kökenleri bu değerin altında tespit edilmiştir (40).

Kantarcıoğlu ve arkadaşlarının invazif mantar enfeksiyonu olan hastalardan izole ettikleri 146 maya ile yaptıkları çalışmada kökenlerin 97' sinin (%66,4) *C. albicans*, 49' unun ise (%33,6) *albicans* dışı *candida* olduğu belirlenmiştir. *Albicans* dışı kandida kökenlerinin 6' sı (%4,1) *C. glabrata*, 4' ü (%2,7) *C. kefir*, 6' sı (%4,1) *C. krusei*, 3' ü (%2) *C. lipolytica*, 1er tanesi (%0,7) *C. lusitaniae* ve *C. catenulata* (%0,7), 8' i (%5,5) *C. parapsilosis*, 2' si (%1,4) *C. rugosa*, 12' si ise (%8,2) *C. tropicalis* olarak tanımlanmıştır. Bu kökenlerin flukonazol MİK değerlerine bakıldığında 1 *C. catenulata* ve 1 *C. lusitaniae* kökeninin flukonazole dirençli; 3 *C. lipolytica* kökeninin hepsinin flukonazole duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Toplamda 21 *C. albicans* (%21,6) ve 19 *albicans* dışı kandida (%38,8) kökeni flukonazole dirençli bulunmuştur (45).

D'antonio ve arkadaşları hematolojik malignansisi olan ve fungal hepatitli 3 hastadan izole ettikleri 3 *C. inconspicua* kökeninin tamamını flukonazole dirençli olarak tespit etmişlerdir (62).

Mevcut literatür verilerine göre özellikle zemininde ciddi sistemik hastalıkları bulunan hasta gruplarında nadir *Candida* türlerinde flukonazole karşı MİK değerlerinde yükseklik ve hatta direnç gelişimi göze çarpmaktadır. Bu durum izolasyon sıklıkları az da olsa yeni güncellenen nadir türlerin de kritik hasta gruplarında flukonazole karşı primer ya da sekonder direnç geliştirebileceğini ortaya koymaktadır. Çalışmada en fazla izolatu içeren *C.lusitaniae* (n=25) kökenlerimizin bu ilaç için MİK 50 değeri 0,25 ve MİK 90 değeri 1,0 µ/ml olarak belirlenmiştir. Bu veriler, yeni güncellenen bir tür olarak *C.lusitaniae* izolatlarında flukonazol direnci açısından yakın bir tehditle karşı karşıya olmadığımızı göstermektedir (Tablo 7).

Çalışmamızda kökenlerimizin flukonazole karşı duyarlılıklarını incelediğimizde 60 *albicans* dışı kandida kökeni arasındaki 2 *C. inconspicua* kökeninin 2' sinin de flukonazole dirençli olduğu sonucunu aldık. D' antonio ve arkadaşlarının çalışması da bizim bulgularımızı destekler yöndedir. Yine kendi çalışmamızın bir sonucu olarak 12 *C. intermedia*' nin 1' i, 2 *C. utilis*' in 1' i ve 2 *C. lipolytica*' nin 1' i doza bağlı duyarlı olarak bulunmuştur. Barchiesi ve arkadaşlarının çalışmasında da *C. lipolytica* kökenlerinin %56' sında 8 µg/ml' nin üzerinde MİK saptanmıştır. Çalışma sayısı az olmakla birlikte *C. lipolytica* kökeni için bu sonuçlara göre MİK değerlerinin artışında bir eğilim göze çarpmaktadır. Dolayısıyla kritik hastalarda bu türün izole edilmesi durumunda flukonazole karşı duyarlılığının belirlenmesi gerektiğini söyleyebiliriz.

Çalışmamızdaki 30 idrar izolatının 1' i ve 30 idrar dışı izolatın 4' ü flukonazole karşı DBD ya da dirençli olarak nitelendirilen yüksek MİK düzeyleri vermişlerdir. Ancak, iki grup arasındaki bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0.05$). Ayrıca 25 *C. lusitaniae* kökeni flukonazole karşı ≤ 8 µg/ml MİK değeri verirken diğer türler altında toplanan 35 kökenin 30' unda aynı değer saptanmıştır. İki grup arasındaki fark, *C. lusitaniae* dışı türlerdeki yüksek MİK düzeyine sahip kökenlerin sayısına bağlı olarak istatistiksel açıdan sınırda anlamlı olarak belirlenmiştir ($p=0.048$), (Tablo 7). Bu istatistiksel veriler nadir türlerin vücut bölgelerine göre flukonazole karşı duyarlılıklarının değişkenlik göstermeyebileceğini fakat, *C. lusitaniae* dışındaki nadir türlerde bu ilaca karşı MİK düzeyinin $\geq 8\mu\text{g/ ml}$

olabileceğini ve özellikle durumu kritik hastaların izolatları için duyarlılık testi yapılmasının önemini vurgulamaktadır.

Çalışmamızdaki bir *C. lipolytica* kökeni için flukonazol duyarlılığı çalışmasının tüm tekrarlarında bulanıklık izinin sürmesi (trailing end point) durumu gözlenmiştir. Bu veri ışığında *C. lipolytica* kökenlerinde karşılaşılabilecek ve “yanlış dirençli” yorumuna yol açabilecek bu soruna dikkat edilmelidir.

Sonuç olarak çalışmamızın tümü irdelendiğinde klinik açıdan en dikkat çekici noktalar;

- i. Yeni güncellenen nadir *albicans* dışı türler arasında en sık izole edilen *C. lusitaniae* olmuştur.
- ii. Nadir ve yeni güncellenen *albicans* dışı türlerin en fazla idrar örneklerinden izole edilmiş olması ve mikroorganizmaların en önemli virülans faktörlerinin başında gelen biyofilm üretiminin de yine idrar izolatlarında saptanmasıdır. Bu veriler, sistemik mantar enfeksiyonlarına kaynak oluşturabilmede idrar örneklerindeki üremelerin önemini bir kez daha ortaya koymuştur.

Nadir ve yeni güncellenen kandidalara bağlı enfeksiyonların sıklığında günümüz koşullarında giderek artış olacağı öngörüsüne dayanarak, mikoloji laboratuvarlarında tanıya yönelik işlemlerin yanı sıra, izolatların virülans faktörlerinin ve antifungal duyarlılıklarının da araştırılarak, sonuçlarının klinik ile birlikte değerlendirilmesinin tedaviyi yönlendirmeye katkısı olacağı görüşündeyiz.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Övgü	Soyadı	ÇELİK
Doğum Yeri	Üsküdar	Doğum Tarihi	16.01.1988
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	29914712892
E-mail	ovgu_celik1@hotmail.com	Tel	0534 463 46 83

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi - Sağlık Bilimleri Enstitüsü -Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	
Lisans	Balıkesir Üniversitesi – Fen-Edebiyat Fakültesi – Biyoloji	2008
Lise	Suadiye Hacı Mustafa Tarman Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Mikrobiyoloji Ürün Yöneticisi	CDK Tıbbi Malzeme Tic. Ltd. Şti.	2011-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
64	67.5							

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı		81	
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifika/Ödülleri/Diğer



Özge Gelik
Tıp

MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ARAŞTIRMA ETİK KURULU

SAYI: B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/ 544
İLGİ:

25.06.2009

Sayın : Doç.Dr. Nilgün ÇERİKÇİOĞLU

MAR-YÇ-2009-0285 protokol nolu “ Klink örneklerden izole edilen yeni güncelleşen albicans dışı Candida kökenlerinin virülans faktörlerinin ve flukonazole karşı duyarlılıklarının belirlenmesi” isimli projeniz Fakültemiz Araştırma Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hacer DİRESKENELİ
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Araştırma Etik Kurul Başkanı