

# Çeşitli *Candida* Türlerinde Virülansın Değerlendirilmesi: İn Vitro ve İn Vivo Çalışma

## Evaluation of Virulence in Various *Candida* Species: In Vitro and In Vivo Study

Dr. Şaban GÜRCAN,<sup>a</sup>  
Dr. Oktay ALVER,<sup>a</sup>  
İlker ERCAN,<sup>b</sup>  
Dr. Beyza ENER<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,  
<sup>b</sup>Biyoistatistik AD,  
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Edirne

Geliş Tarihi/Received: 31.12.2009  
Kabul Tarihi/Accepted: 04.08.2010

Çalışma "3rd Balkan Conference of Microbiology (Sep 4-6, 2003, Istanbul, Turkey)"de sunulmuştur.

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Şaban GÜRCAN  
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD,  
Edirne,  
TÜRKİYE/TURKEY  
sabangurcan@trakya.edu.tr

**ÖZET Amaç:** Bu çalışmada nötropenik olmayan 85 hastanın kan örneklerinden izole edilen *Candida* kökenlerinin in vitro virülans özelliklerine ve in vivo (farelerde) doku invazyonlarına bakıldı. **Gereç ve Yöntemler:** Virülans testleri hastaların tek kökenlerinde (85 izolat) denendi. Yüzey hidrofobisite, epitel hücrelerine bağlanma, fosfolipaz ve proteinaz enzim aktivitesi in vitro ölçülen virülans faktörleriydi. Farelere (Swiss albino) fosfat tamlı tuzlu su içinde sulandırılan kökenler kuyruk veninden verildi. **Bulgular:** Sebat eden üremelerden elde edilen kökenlerin in vitro ölçülen virülansları, bir kez üreme olanlardan daha yüksek bulunmadı. Fosfolipaz aktivitesi sadece *C.albicans* kökenlerinde tespit edildi ve *C.albicans* kökenlerinin %87.5'i in vivo doku invazyonu yaptı. Doku invazyonu yapmayan tek köken ise in vitro enzim aktivitesi göstermeyen kökendi. Fosfolipaz oluşturmeyen diğer türlerin in vitro virülansları *C.albicans*'tan daha düşüktü. Virülansı en düşük tür ise *C.krusei* olarak belirlendi. Genel olarak doku invazyonu ile enzim (fosfolipaz ve/veya proteinaz) salgılanması arasında anlamlı ilişki bulunması, enzim salınımının invazyonda adeziv özellikten daha ön planda olduğunu düşündürdü. Ancak proteinaz salınımı yüksek olan *C. parapsilosis* kökenlerinde invazyonun olmaması ilginç bir bulguydu. **Sonuç:** *Candida* türleri farklı in vivo ve in vitro virülans faktörlerine sahip olduğundan dolayı, klinik izolatların tür düzeyinde isimlendirilmesinin gerçekten önemli olduğu bu çalışmayla vurgulanmış oldu.

**Anahtar Kelimeler:** Fungemi; virülans faktörleri; hücre yapışması; lizofosfolipaz

**ABSTRACT Objective:** In vitro virulence features of *Candida* strains isolated from blood specimens of 85 non-neutropenic patients, and in vivo (murine) tissue invasions were assessed in this study. **Material and Methods:** Virulence tests were examined at a single strain (85 isolates) of the patients. Surface hydrophobicity, attachment to epithelial cells, phospholipase and proteinase enzyme activity were examined in vitro virulence factors. Strains diluted with PBS were inoculated through the tail veins of the mice (Swiss albino). **Results:** In vitro virulence of the persisting strains was not higher than the ones which were isolated only once. Phospholipase activity was only detected in *C.albicans* strains and 87.5% of the *C.albicans* strains showed tissue invasion. The only strain that did not demonstrate tissue invasion was the one which showed no in vitro enzyme activity. In vitro virulence of the other species which do not produce phospholipase were lower than *C.albicans*. The species with the lowest virulence was found to be *C.krusei*. Significant correlation between tissue invasion and enzyme secretion (phospholipase and/or proteinase) suggests that enzyme secretion was more important than adhesive property for invasion. However, the absence of invasion in *C.parapsilosis* strains with high proteinase secretion was an interesting finding. **Conclusion:** It was highlighted in this study that the identification of the clinical isolates at the species level is really important as *Candida* species had different in vivo and in vitro virulence factors.

**Key Words:** Fungemia; virulence factors; cell adhesion; lysophospholipase

**C**andida türleri her ne kadar düşük virülanslı mikroorganizmalar olarak değerlendirilirse de modern tıptaki gelişmelere paralel olarak özellikle büyük eğitim veren hastanelerde (>500 yatak) patojen olarak izolasyonları hızla artmaktadır.<sup>1</sup> *Candida* türlerinin hastalık yapmalarında, “hücre duvarı ve zarı” ile “hücre dışına salınan enzimler” en önemli rolü oynar. Hücre duvarı ve zarının virülans ile ilgili en önemli işlevi adezyonda oynadığı roldür. Adezyonun önemi son yıllarda daha iyi anlaşılmış olup bu konuda giderek artan sayıda çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların amacı moleküler düzeyde adezyon mekanizmasını anlamak ve in vivo adezyonu engelleyerek enfeksiyonları önlemektir.<sup>2,3</sup>

Önceki yıllarda tavuk embriyosu koriyoallentoid zarını enfekte eden *C. albicans* blastospor ve hiflerinde, diğer araştırmacılar gibi hücre zarına yakın lokalizasyonda fosfolipaz A ve lizofosfolipaz enzimleri tespit edilmiş ve bu enzimlerin çevreye salınmasıyla maya hücrelerinin kendilerine yol açarak invazyon yaptıkları gösterilmiştir. Daha sonraki yıllarda ise yüksek fosfolipaz aktivitesine sahip *C. albicans* izolatlarının yanak epitel hücrelerine daha iyi bağlandığı ve farelerde daha patojen olduğunun gösterilmesi, enzimin virülansla ilişkisini pekiştirmiştir.<sup>4</sup>

Virülansla önemli olduğu düşünülen bir diğer ekstrasellüler enzim proteinaz, ilk kez 1964 yılında tanımlanmıştır. *C. albicans* ve diğer bazı *Candida* türlerinin bu enzimi salgıladıkları belirlenmiştir.<sup>5</sup> <sup>11</sup> In vitro çalışmalarda proteinaz enziminin, fizyolojik önemi olan albümin, immungloblin, laktoferrin, laktoperoksidaz, müsin gibi substratları sindirdikleri saptanmıştır.<sup>5</sup> Diğer bazı çalışmalarda ise epidermin üst tabakasında yer alan, ekzojen patojenlere karşı savunma işlevi gören ve sistatin A olarak isimlendirilen epidermal sistein proteinaz inhibitörünün, *Candida* proteinazı tarafından yıkıldığı tesbit edilmiştir. Bu çalışmalar proteinaz enzimi salan *Candida* türlerinin, vücutta bulunan pek çok koruyucu proteini parçalayarak daha kolay invazyon yapabildiğini göstermektedir.<sup>12,13</sup>

*Candida* türlerine ait çeşitli virülans faktörleri ayrı ayrı deneyerek birçok in vitro ve in vivo çalışmalarda ölçülebilmektedir. Ancak son yıllarda

kandidozların patogenezi incelendiği zaman hiçbir faktörün tek başına her türlü enfeksiyonda tetikleyici olmayacağı fikri de öne çıkmaktadır. Bu çalışmanın amacı kandidemi etkeni çeşitli *Candida* türlerinin virülans faktörlerinin toplu olarak in vitro ve in vivo olarak değerlendirilmesi ve kandidemi patogenezinin anlaşılmasına katkıda bulunmaktır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### KÖKENLER

Çalışmada Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin değişik kliniklerinde yatan 85 hastanın Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na gönderilen kan örneklerinde üreyen *Candida* kökenleri kullanıldı. Kökenlerin tür ve biyotip ayrımlarında germ tüp testi, klamidospore oluşumu, koloni tipi, asimilasyon paternleri (API 20 C AUX, France) ve çeşitli fizyolojik özelliklerinden (sıvı besiyerinde zar oluşturarak üreme gibi) yararlanıldı.<sup>14</sup> Biyotipi aynı olmak koşuluyla her hastanın bir izolatu virülans testlerinde kullanıldı.

### IN VİTRO VİRÜLANS TESTLERİ

Kökenlerin adeziv özellikleri “yüzey hidrofobisite” ve “epitel hücrelerine bağlanma” yetenekleriyle ölçüldü. Ekstrasellüler enzimlerden ise “fosfolipaz” ve “proteinaz” aktivitelerine bakıldı. Ayrıca L.J. Douglas'dan alınmış adeziv özellikleri iyi bilinen *C. albicans* GDH 2346 kökeni (Glasgow, UK) ve R. Ruchel'den elde edilmiş enzim aktiviteleri iyi bilinen *C. albicans* CBS 2730 kökeni (Almanya) kontrol kökenler olarak kullanıldı.

### YÜZEY HİDROFOBİSİTE TESTİ

Bu deneyler için polistiren mikroküre yöntemi kullanıldı.<sup>15</sup> Stoklarda bulunan izolatlar Sabouraud dekstroz agarda (SDA) üretildi ve daha sonra 250 ml'lik Erlenmayer içinde bulunan 500 mM galaktoz içeren 50 ml Yeast Nitrogen Base (YNB) besiyerine aktarıldı. Kırksekiz saat aralarla 37°C'da birinci ve ikinci pasajlar yapıldı. İkinci pasajdan sonra elde edilen maya süspansiyonu 2500 devirde, beş dakika, 4°C'de çevrilerek buzlu suda tutulan soğuk 0.05 M sodyum fosfat tampon çözeltisiyle (pH 7.2) üç kez yıkandı. Elde edilen çökelti Thoma

lamında sayılarak  $2 \times 10^6$  maya hücresi/ml olacak şekilde sulandırıldı.

Hidrofobisiteyi değerlendirebilmek için hidrofobik ilişkiye uygun,  $0.801 \pm 0.001$  mm çapında, negatif yüklü polistiren lateks boncuklar kullanıldı. Stok boncukların dokuz ml'si yine soğuk 0.05 M sodyum fosfat tampon çözeltisiyle (2 ml) sulandırıldı ve böylece kabaca  $9.02 \times 10^8$  boncuk/ml'lik süspansiyon hidrofobisite deneyleri için hazırlandı.

Hazırlanan soğuk maya süspansiyonundan 0.1 ml, soğuk boncuk süspansiyonundan 0.1 ml alınarak elde edilen karışım hızla oda ısısına getirildi, vorteks karıştırıcıda yüksek devirde 30 sn işlem yapıldı, karışımdan bir damla lam üzerine alınarak lamelle kapatılıp  $100 \times$ 'lık büyütmeyle incelendi. Sayılan maya hücrelerinden, üç veya daha fazla boncuk bağlanmış olanların yüzdesi, hidrofobik özellik olarak değerlendirildi.

#### EPİTEL HÜCRELERİNE BAĞLANMA (ADEZYON) TESTİ

Kökenlerin adezyon yeteneklerini ölçmek için yanak mukoza hücrelerinden yararlanıldı. Epitel hücreleri, hep aynı kişiden ve yaklaşık olarak günün aynı zamanında olmak üzere yanağın iç kısmına steril eküvyon sürülerek toplandı. Steril 0.1 M fosfat tamponlu tuzlu su (PBS, pH 7.2) çözeltisiyle üç kez yıkanan epitel hücreleri, Thoma lamında sayılarak  $1 \times 10^5$  epitel hücresi/ml olacak şekilde sulandırıldı.

Stok kökenler, SDA'da  $37^\circ\text{C}$ 'de üretildikten sonra, oluşan kolonilerinden beşi, 250 ml'lik Erlenmayer kaplarda bulunan, 500 mM galaktoz içeren 50 ml YNB (yeast nitrogen base) besiyerine ekildi. Çalkalayıcı ortamda  $37^\circ\text{C}$ 'de 24 saatlik enkübasyondan sonra 2500 devirde beş dakika çevrilerek kökenler çöktürüldü ve üç kez 0.1 M PBS ile yıkandı. Daha sonra yine Thoma lamında sayılarak  $1 \times 10^7$  maya hücresi/ml olacak şekilde 0.1 M PBS'de sulandırım yapıldı.

Sulandırılmış ve yoğunlukları ayarlanmış maya hücreleriyle epitel hücrelerinden 0.1'er ml alınarak karıştırıldı ve elde edilen karışım 45 dakika  $37^\circ\text{C}$ 'de çalkalayıcı etüvde enkübe edildi. Enkübasyon sonrası karışım, por çapları 12 mm olan şeffaf polikarbonat filtrelerden (Millipore, UK) sü-

züldü ve 60 ml 0.1 M PBS ile yıkandı. Böylece epitel hücreleri ve epitel hücrelerine bağlı mayalar filtre üzerinde tutulurken, bağlanamayanların porlardan süzülmesi sağlandı. Daha sonra şeffaf filtre oda ısısında kurumaya bırakıldı ve bir hacim aseton, bir hacim metanol karışımıyla 15 dakika tesbit edildi. Gram yöntemiyle boyandıktan sonra, üzeri lamelle kapatılarak  $40 \times$ 'lık objektifle incelendi. Her filtrede 100 epitel hücresi ve bunlara bağlanan maya hücreleri sayıldı.

#### FOSFOLİPAZ ENZİM AKTİVİTESİ TESTİ

Ekstrasellüler enzimlerden fosfolipaz aktivitesinin tayini için Samaranyake tarafından modifiye edilmiş, Price ve ark.nın yöntemi kullanıldı.<sup>16,17</sup> Stoktan alınıp SDA'da  $37^\circ\text{C}$ 'de 18-24 saatte canlandırılan kökenlerin enzim aktivitelere, %8 yumurta sarısı ve sitrik asit-disodyum fosfat tampon (pH 4.2) içeren besiyerinde bakıldı. Canlandırma işleminden sonra kökenler steril serum fizyolojik içinde Mc Farland 0.5'e göre ayarlanarak süspansiyon haline getirildi ve %8 yumurta sarısı içeren besiyerine ölçülü özeyle (0.01 ml) yüzeyine degecek şekilde ekim yapıldı. Nemli ortamda,  $37^\circ\text{C}$ 'de dört gün enkübe edildikten sonra fosfolipaz aktivitesi tayin edildi. Fosfolipaz aktivitesi (Pz değeri) koloni çapının, koloni çapıyla presipite olmuş zon toplamına oranı olarak hesaplandı. Pz değeri 1 olanlar fosfolipaz aktivitesi olumsuz, <1 olanlar olumlu olarak değerlendirildi.

#### PROTEİNAZ ENZİM AKTİVİTESİ TESTİ

*Candida*'ların proteinaz aktivitesini ölçmede tek azot kaynağı olarak %1'lik sığır serum albümini içeren katı besiyeri kullanıldı. Stoktan alınıp SDA'da üretilen maya kolonilerinden yeast ekstrakt pepton dekstroza (YEPD) sıvı besiyerinde  $30^\circ\text{C}$ 'de, dört saat sonra yaklaşık Mc Farland 0.5 yoğunluğunda süspansiyon elde edildi. Daha sonra bu süspansiyondan 10 ml alındı ve %1 sığır serum albümini içeren katı besiyerinde dizili bulunan 6 mm çapındaki steril kağıt diskler (Whatmann No 2) üzerine damlatıldı. Yedi gün  $30^\circ\text{C}$ 'de enkübasyona bırakıldı. Yedi günün sonunda kültürler amido black içeren protein boyasıyla boyandı. Yıkayarak renk giderme işleminden sonra, proteinin

parçalandığı lizis zonlarından boya geri verildiği için zon oluşturanlar “proteolitik aktivitesi olanlar” olarak değerlendirildi.

### IN VIVO DENEYLER

In vitro deneylerde düşük ve yüksek virülanslı olarak karşımıza çıkan değişik türlere ait 22 köken farelere damar yolu ile verilerek karaciğer ve dalak dokuları invazyon açısından değerlendirildi. Yaklaşık 40 gram ağırlığında erkek farelere (Swiss albino)  $10^7$  maya/ml olacak şekilde 0.1 M PBS içinde sulandırılan kökenler kuyruk veninden 0.2 ml verildi.<sup>18</sup> Birinci günden sonra 10 gün içinde ölen farelerin karaciğer ve dalak dokuları alındı. Daha sonra 10 ml 0.1 M PBS ile ezilerek 0.01 ml kanlı agara ekildi. 10 güne kadar ölmeyen fareler 10. günün sonunda öldürülerek dokuları aynı şekilde işleme alındı. Fareler üzerinde yapılan deneyler “Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu” ([www.nap.edu/catalog/5140.html](http://www.nap.edu/catalog/5140.html)) prensipleri doğrultusunda yapıldı. Çalışma için yerel etik komiteden onay alındı.

### İstatistiksel yöntem

Kümelerin belirlenmesi için çok değişkenli istatistiksel analizlerden hiyerarşik kümeleme analizi kullanıldı. Bireyler arasındaki benzerlik için karışık veri seti olmasından dolayı Gower benzerlik katsayısı hesaplandı. Hiyerarşik kümeleme yöntemi ile yapılan kümeleme analizinde tam bağlantı yöntemi kullanıldı.

Kümelerin oluşmasında etkili olan değişkenlerin belirlenmesi için Kruskal Wallis testi, Mann Whitney U testi, ki-kare testi ve Fisher’in Kesin Ki-kare testi kullanıldı.

Verilerin analizinde Clustan Graphics 8.0 ve SPSS 13.0 programları kullanıldı.

## BULGULAR

Çalışmamızda Haziran-1995 / Aralık-1997 tarihleri arasında hastanemiz çeşitli kliniklerinde takip edilen ve nötropenik olmayan 85 hastanın kan örneklerinde üreyen *Candida* kökenleri kullanıldı. Üremelerin yaklaşık 2/3’ünün *C. albicans* dışı türlerden (%63.5) oluştuğu dikkati çekmekteydi. En fazla izole edilen tür *C. parapsilosis* olarak belirlendi.

Tablo 1’de virülans faktörlerinin türler arasındaki toplam dağılımı görülmektedir. *C. albicans* kökenleri dışında hiçbir köken fosfolipaz oluşturmuyordu. Tüm türlerin kökenleri arasında proteinaz salgılanmaktaydı. Ancak, bu özellik *C. albicans* ve *C. parapsilosis* kökenleri arasında belirgin, *C. tropicalis* ve *C. krusei* kökenlerinin çoğu negatif olarak bulundu. *C. albicans* ve *C. tropicalis*’in adezyon ortalamaları diğer iki türden daha yüksekti. En hidrofobik olarak *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* bulundu. *C. krusei*’de ise hiçbir virülans faktörü belirgin olarak öne çıkmadı.

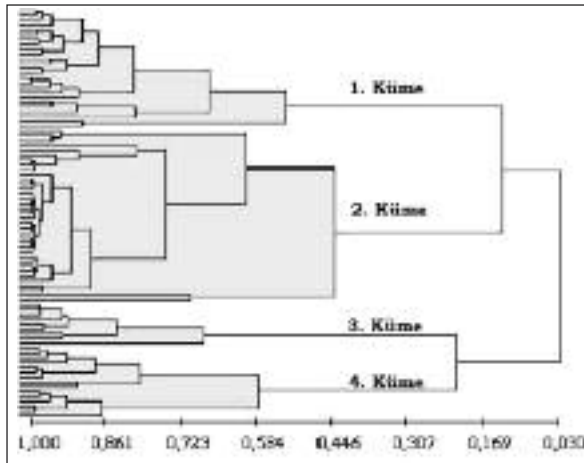
Kan kültüründen sadece bir izolasyon olan kandidemili olgu izolatları ile birden fazla izolasyon olanlarda in vitro virülans faktörleri karşılaştırıldı. Fosfolipazı sadece *C. albicans* salgılıyordu ve pozitif olanların tek üremeliler ve birden fazla üremesi olanlardaki dağılımı arasında anlamlı bir fark bulunamadı ( $p > 0.05$ ) (Tablo 2). Aynı anlamsız bulgunun, proteinaz enzim salınımına baktığımızda, *C. albicans* ve *C. parapsilosis* için de geçerli olduğu saptandı ( $p > 0.05$ ). *C. tropicalis* ve *C. krusei* kökenleri arasında proteinaz oluşturanların sayısı zaten azdı. Ancak, enzim salgılayanların birden fazla üremeliler arasında olması dikkat çekiyordu. Yüksek adeziv ve hidrofobik özellikteki kökenler yine bir-

**TABLO 1:** Virülans faktörlerinin türler arasındaki toplam dağılımı.

Türler (n)	<i>C. parapsilosis</i> (33)	<i>C. albicans</i> (31)	<i>C. tropicalis</i> (11)	<i>C. krusei</i> (10)
Fosfolipaz oluşturanlar	-	26 (% 84)	-	-
Proteinaz oluşturanlar	28 (%85)	28 (%90)	2 (%18)	1 (%10)
Adezyon (ort ± SD)	94.6 ± 96.7	453 ± 393.1	375 ± 467.9	31.7 ± 30.3
Hidrofobisite (ort ± SD)	88.2 ± 23.6	27 ± 25.1	86.5 ± 25.3	52.8 ± 28.3

**TABLO 2:** Virülans faktörlerinin tek üremeli ve birden fazla üremeli kökenler arasındaki dağılımı.

Virülans faktörleri / Kökenlerin üreme sayısı (n)	Bir kez üremeli kökenler	Birden fazla üremeli kökenler
Fosfolipaz (n)	11	15
Proteinaz (n)	Ortalama	200.28
	Ortanca	116.00
	Standart sapma	223.02
	Minimum	4.00
	Maksimum	921.00
Adhezyon	Ortalama	66.18
	Ortanca	81.00
	Standart sapma	36.42
Hidrofobisite	Minimum	2.00
	Maksimum	100.00

**ŞEKİL 1:** Kümeleme analizi sonucu oluşan dört kümenin dendrogramda gösterilmesi.

den fazla üremelilerin olduğu grupta toplanmıyordu ( $p > 0.05$ ). Sonuçta virülans faktörleri tek tek irdelendiğinde kanında üremeleri sebat eden hastaların kökenleri daha virülan bulunmadı.

Virülans faktörlerinin tek tek irdelenmesi dışında, toplu olarak değerlendirildiğinde kökenleri ayırma gücünü anlamak için “kümeleme analizi (cluster analysis)” uygulandı (Şekil 1).<sup>19,20</sup> Kümeleme analizi sonucu ortaya çıkan dendrogram (ağaç grafiği) Şekil 1’de gösterilmektedir. Tablo 3’te özel-

likleri belirtilen kümeler, Şekil 1’deki dendrogramda gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde kökenlerin dört kümede toplandığı saptandı. Kümelemede kökenlerin tamamı kullanıldı ve 0.446 benzerlik düzeyinde dört küme inceleme için değerlendirmeye alındı.

Tablo 3’te, oluşturulan kümelerdeki kökenlerin virülans özellikleri görülmektedir. Fosfolipaz oluşturanların hepsi birinci kümede toplandı ve iki köken hariç tümünün proteinazları da pozitif. Adhezyon ortalamaları diğer kümelerden yüksek olup, bu yükseklik üçüncü kümeden anlamlı olarak farklı değilken, iki ve dördüncü kümelerden anlamlı olarak farklıydı. Hidrofobik özellikleri ise diğer kümelerden anlamlı olarak düşüktü. Birinci kümeyi oluşturan 25 köken tek tek incelendiğinde hemen hemen tümünde çalışmada incelenen tüm virülans faktörlerinin bulunduğu ve hepsinin *C. albicans* olduğu görüldü. Proteinaz (+) fosfolipaz (-) kökenlerden oluşan ikinci küme, üçüncü küme ile benzer adeziv ve hidrofobik özellikteyken dördüncü kümeden anlamlı olarak daha adeziv ve hidrofobik özellikte olan bir gruptu. Proteinaz ve adhezyon olmak üzere en az iki virülans faktörüne sahip kökenlerden oluştuğu düşünüldü ve kümeyi oluşturan türler heterojendi. Üçüncü küme ise fosfolipaz ve proteinaz negatifliğinin yanısıra yüksek hidrofobik özellik göstermekteydi ve 9 kökenden 6 tanesi *C. tropicalis*’ti. Bu küme enzim negatifliği olan dördüncü kümeden çok daha yüksek adhezyon ve hidrofobisite virülans özelliklerine sahip olmasıyla in vitro virülans testlerine göre sıralamada üçüncü sıraya yerleşti. Düşük virülanslı son küme ise *C. albicans* dışındaki üç türü de kapsayan heterojenite göstermekteydi ve 15 kökenin dokuzu *C. krusei* idi. Bu kümeyi oluşturan kökenlerde hiçbir enzim salgılamıyordu. Virülans en yüksek kökenlerin birinci kümede, orta düzeyde olanların iki ve üçüncü kümelerde, en düşük olanların ise son kümede toplandığı izlenimi oluştu.

Çeşitli *Candida* türlerinden seçilen 22 kökenin farelerde invazyon yeteneklerini değerlendirmek için yapılan in vivo deney sonuçları ve kökenlerin özellikleri, Tablo 4’te belirtilmiştir. Fare deneylerinde kullanılan *C. albicans* kökenlerinden 7/8’si (% 87.5) invazyon yaptı. Birinci ve



TABLO 3: Kümelerin oluşmasında etkili olan değişkenler .

Virülans faktörleri/Küme	1. küme	2. küme	3. küme	4. küme	Genel						
	n= 25	n= 36	n= 9	n= 15	p	1 -2. küme	1 -3. küme	1 -4. küme	2 -3. küme	2 -4. küme	3 -4. küme
Fosfolipaz (+) n (%)	25 (100)	1(2.8)	0(0)	0(0)	-	<0.001	<0.001	<0.001	1.000	1.000	-
Proteinaz (+) n (%)	23 (92.0)	36 (100)	0(0)	0(0)	-	0.163	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	-
Adhezyon	438.00	204.33	334.00	38.33	<0.001	<0.001	<0.355	0.000	0.146	0.001	0.000
Ortalama	438.00	204.33	334.00	38.33							
Ortanca	288.00	96.00	165.00	17.00							
Standart sapma	412.42	289.00	379.70	51.88							
Minimum	15.00	114.00	33.00	3.00							
Maksimum	4898.00	1314.00	1218.00	201.00							
Hidrofbisite	21.96	84.36	98.44	50.93	<0.001	0.000	0.000	0.006	0.686	0.000	0.000
Ortanca	20.00	100.00	99.00	59.00							
Standart sapma	15.7	27.43	2.29	31.49							
Minimum	2.00	7.00	93.00	8.00							
Maksimum	61.00	100.00	100.00	89.00							

ikinci kümede bulunan ve en az bir enzim salgılayan yedi kökenden dördünün adezyonu ortalama adezyon değerlerinden yüksek, üçünün ise düşüktü; ancak hepsi invazyon yaptı. Oysa enzim salgılamayan ve ikinci kümede kalan bir köken yüksek hidrofobisite gösterse de invazyon yapmadı. Fareye inokule edilen altı *C. tropicalis*'ten üçü (%50) invazyon yaptı. Bunların ikisi proteinaz pozitif. Diğer invaziv köken ise nispeten daha az virülanslı gruptaydı (üçüncü küme). Proteinaz enzim salınımı, adezyon, hidrofobisite açısından farklı olan ve üçüncü ve dördüncü kümelerde yer alan *C. parapsilosis* kökenlerinin hiçbiri invazyon yapmadı. Fareye verilen dört *C. krusei*'den sadece bir köken (%25) invazyon yaptı. Bu kökenin düşük virülanslı dördüncü kümede yer alması ve izole edildiği hastanın 26 kan örneğinde tespit edilmesi düşündürücüdür.

In vivo fare deneyleri sonunda invazyonla enzim salınımı (fosfolipaz ve/veya proteinaz) arasında bağlantı olduğu görüldü ve Tablo 5'te bu bağlantının anlamlılığı gösterildi. Tablo 5'te de görüldüğü gibi invazyonla enzim oluşu arasında anlamlı bir ilişki bulunmaktaydı ( $p < 0.05$ ).

## TARTIŞMA

Kandidemi, hematojen yaygın enfeksiyonun bir bulgusu olarak karşımıza çıkan bir tanıdır. Genel olarak *Candida* türleri virülanslı düşük mikroorganizmalardır ve ancak uygun konakta (nötropenik hastalar gibi) ciddi tablolar oluşturur. *Staphylococcus epidemidis* enfeksiyonlarına benzer tarzda, nötropenik olmayan hastalarda kontaminasyon ya da "benign= geçici" kandidemi kavramları söz konusudur.<sup>21</sup> Bu nedenle kandidemilerin anlamlılığı tartışılırken birtakım klinik ya da diğer laboratuvar bulguları kan kültür pozitifliğine eklenmelidir. Tanıda yaşanan bu problemin boyutları, hastadan alınan kan örneklerinden sadece bir tanesinde üreme olduğu durumlarda daha da büyür. Nötropenik olmayan hasta grubumuzun hemen hemen yarısında (%44.7) tek kan örneğinde üreme saptandı. Ayrıca, *C. tropicalis* hariç türler arasında da belirgin dağılım farkı bulunamadı. Tek kan örneğinde üreyen kökenlerin düşük virülanslı olma olasılığını anlamak için 85 hastadan elde edilen

**TABLO 4:** Farelerde invazyon yetenekleri denenen kökenlerin özellikleri.

	Türler	Fosfolipaz	Proteinaz	Adezyon	Hidrofobisite (%)	İnvazyon	Yer aldığı küme
1	<i>C. albicans</i>	+	+	1020	6	+	1
2	<i>C. albicans</i>	+	+	235	48	+	1
3	<i>C. albicans</i>	+	+	15	6	+	1
4	<i>C. albicans</i>	+	+	1033	95	+	2
5	<i>C. albicans</i>	+	-	225	10	+	1
6	<i>C. albicans</i>	+	-	652	16	+	1
7	<i>C. albicans</i>	-	+	650	68	+	2
8	<i>C. albicans</i>	-	-	71	99	-	2
9	<i>C. tropicalis</i>	-	+	245	100	+	2
10	<i>C. tropicalis</i>	-	+	1314	98	+	2
11	<i>C. tropicalis</i>	-	-	165	100	+	3
12	<i>C. tropicalis</i>	-	-	440	100	-	3
13	<i>C. tropicalis</i>	-	-	91	98	-	3
14	<i>C. tropicalis</i>	-	-	6	19	-	4
15	<i>C. parapsilosis</i>	-	+	388	97	-	2
16	<i>C. parapsilosis</i>	-	+	71	99	-	2
17	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	261	100	-	3
18	<i>C. parapsilosis</i>	-	-	3	8	-	4
19	<i>C. krusei</i>	-	+	15	43	-	2
20	<i>C. krusei</i>	-	-	65	9	+	4
21	<i>C. krusei</i>	-	-	7	66	-	4
22	<i>C. krusei</i>	-	-	5	79	-	4

izolatların birer tanesi virülans testlerine alındı. Ancak Tablo 2'de görüldüğü gibi tek kan örneğinde üreyen kökenler ile birden fazla örnekte üreyen kökenlerin virülans faktörleri açısından anlamlı farkları yoktu ( $p>0.05$ ). Üremelerin sebat etmesi olasılıkla olumsuz konak faktörlerinin devam etmesi ile ilişkili olabilir. Ancak bu çalışma konak faktörlerinin rolüne odaklanmadığı için bu konu tartışma dışı bırakıldı.

Virülans faktörlerinden fosfolipaz sadece *C. albicans* tarafından oluşturuldu (Tablo 2 ve 3) ve benzer bulguya literatürde de rastlanmaktadır.<sup>4,22</sup> Çalışmamızda deney hayvanlarına verilen *C. albicans* kökenlerinin %87.5'inin invazyon yaptığı ve invazyon oluşturmayan bir kökenin ise fosfolipaz negatif olduğu görüldü. Dolayısıyla yaklaşık son iki dekatta virülans faktörleri arasında ilginin biraz azaldığı, fosfolipaz enzimine tekrar dönülmesi gerektiği düşünülmelidir. Böyle bir dönüş bir grup araştırmacı tarafından da zaten başlatıldı.<sup>22</sup> Nitekim Dolan ve

**TABLO 5:** Enzim salgılama ve invazyon ilişkisi.

	İnvazyon yapanlar	İnvazyon yapmayanlar	Toplam
Enzim salgılayanlar	9	3	12
Enzim salgılamayanlar	2	8	10
Toplam	11	11	22

ark. fosfolipaz D1 (PLD1) salgılayan *C. albicans* kökenleriyle kıyaslandığında fare modellerinde PLD1 mutantlarının intravenöz uygulanması sonrası iç organlarda canlılığın sürdürülemediğini saptadılar.<sup>23</sup> Dağdeviren ve ark. da kan dolaşımı enfeksiyonuna neden olan *C. parapsilosis* kökenlerinde fosfolipaz üretiminin önemli bir virülans faktörü olabileceğini belirlediler.<sup>24</sup> Yücesoy ve ark. da kandidozlu olgulardan izole ettikleri *Candida* türlerinin, sağlıklı kişilerden elde edilenlere göre daha yüksek oranda fosfolipaz ürettiklerini belirlemiştir.<sup>25</sup>

İnvazyonla çok yakından ilişkili olduğu düşünülen diğer bir ekstrasellüler enzim proteinazın, ilk araştırılmaya başlandığında aynen fosfolipaz gibi *C. albicans*'a özgü olarak salgılandığı düşünüldü.<sup>7,9</sup> Zamanla kullanılan yöntemlerle ilişkili olarak başka türlerin de düşük düzeyde bu enzimi oluşturabildiği fark edildi.<sup>10,11</sup> Bununla beraber Tablo 1'de görüldüğü gibi bizim çalışmamızda bütün türlerin kökenleri arasında proteinaz salgılayanların bulunduğu ancak bunun *C. albicans* ve *C. parapsilosis* kökenleri arasında yoğun olduğu anlaşıldı. Dağdeviren ve ark. 33 *C. parapsilosis* kökeninin %42'sinin proteinaz oluşturduğunu saptamışlardı.<sup>24</sup> Gülen ve ark.<sup>26</sup> çeşitli *Candida* türlerinin yarıdan fazlasının proteinaz enzimi salgıladıklarını belirlemişlerdi. Sunulan çalışmada ise *C. parapsilosis* kökenlerinde neredeyse *C. albicans* kökenleri kadar yüksek oranda (%85) proteinaz üretimi saptandı. Ülkemizde yapılmış başka bir çalışmada<sup>27</sup> saptanan *C. albicans* kökenlerinin proteinaz üretimi bizim çalışmamızdakine benzer oranlarda yüksek iken bizim kökenlerde ayrıca fosfolipaz üretiminin daha fazla olması, *C. albicans* kökenlerimizin in vitro olarak daha virulan olduğunu göstermektedir.

Hidrofobisite genellikle adezyonu başlatan bir virülans faktörü olarak görülmektedir.<sup>3,28,29</sup> Hidrofobik olan mikroorganizmaların özellikle dakron, teflon, akrilik gibi yüzeylere adezyonunun daha iyi olacağı düşünülmektedir.<sup>3,28</sup> Çalışmamızda hidrofobisitesi en yüksek kökenlerin *C. parapsilosis*'ler arasında olması (Tablo 2, 3), bu türün damar içi kateterlerle ilişkisini destekleyen diğer bir veridir. Epitel ya da endotel hücrelerine bağlanmada *C. albicans* kökenlerinde görüldüğü gibi böyle bir pozitif destekleme söz konusu değilken, *C. tropicalis*'te belirgindir (Pearson korelasyon,  $p < 0.05$ ).

Gerek Tablo 1 gerekse kümeleme analizi sonucu oluşturulan Şekil 1 ve Tablo 3'te, literatürde de virulan olarak tanıdığımız *C. albicans*'ın diğerlerinden farklı olduğu, bildiğimiz kadarıyla, istatistiksel olarak ilk kez bu çalışmada irdelendi. Kümeleme analizinin diğer bir bulgusu da *C. albicans*'tan sonra ikinci sırada virulan olarak tanıdığımız *C. tropicalis* kökenlerinin çoğunun orta

düzeyde virulan kümelerde toplanmasıydı. On *C. krusei* kökeninin dokuzunun en düşük virülanslı grupta yer alması, literatürde en az virulan türlerden biri olarak bilinen bu türlerin istatistiksel kümeleme analiziyle de doğrulandığını düşündürdü. Hayvan modelinde yapılan invazyon deneylerinde ise, kullanılan altı *C. tropicalis* kökeninin üçü invazyon yaptı ve gerçekten in vivo modelde %50 invazyonla *C. albicans*'tan sonra ikinci sıraya oturdu. Ancak invazyon yapan üç köken incelendiğinde bunların ikisinin proteinaz salgıladığı ve daha virulan gruplarda yer aldığı, sadece bir tanesinin enzim negatif olduğu ve üçüncü kümede bulunduğu anlaşıldı. Bu kökenin izole edilen hastada da mortaliteye sebep olması, yukarıda da bahsedildiği gibi metodla ilgili enzimi tesbit edememe veya denediğimiz faktörlerden farklı virülansa sahip olma olasılığını düşündürdü. Daha sonra farklı çalışmalarla (özellikle in vivo) bu bulgunun değerlendirilmesi düşünüldü. Son kümede yer alan ve invazyon yapan *C. krusei* kökeni için de, izole edildiği hastanın 26 kan örneğinde sebat etmesi aynı düşünceyi doğuran ve farklı tür için elde edilen bir bulguydu.

Hem kümeleme analizi hem de in vivo fare modelinin verileri, virülans en belirleyici faktörlerin enzimler olduğu sonucunu çıkardı (Tablo 5). Tablo 5'te invazyonla enzim salınımı arasında anlamlı bir ilişkinin olduğu görüldü. Fakat *C. parapsilosis* kökenlerinin %85'i proteinaz oluştururken (Tablo 1) enzim salgılayan ve invazyon yapmayan kökenlerin ikisinin *C. parapsilosis* arasından olması dikkati çekti. Ancak *C. parapsilosis* ile yapılan in vivo deneylerin sayıca kısıtlı olması bu sonucun yorumlanmasını zorlaştırır. Ayrıca ileride yapılacak in vivo invazyon deneylerinde bu bulgunun doğrulanması ve invazyonda çok önemli olan *C. albicans* proteinazı ile *C. parapsilosis* proteinazının genotipik olarak farklı olmasının durumu açıklanabileceği düşünüldü.

Bu çalışma, nötropenik olmayan hastalardan izole edilen dört türde, 85 *Candida* kökeninin virülans özelliklerini irdeleyen geniş kapsamlı bir çalışmadır. Çok sayıda in vitro virülans testinin in vivo deneylerle uyumunu araştıran bu kapsamdaki çalışmalara literatürde çok az raslanmaktadır. Su-



nulan çalışmanın sonucundan, yukarıda da bahsedildiği gibi, birçok yorum çıkarmak mümkündür. Elbette *Candida* türleri ile oluşan enfeksiyonlarda konak faktörleri çok önemlidir. Ancak bu faktörlerin irdelendiği çok sayıda çalışma mevcuttur ve

multivaryant analizlerle çoğu netleşmiştir.<sup>30-34</sup> Oysa türlerin virülansları, az bilinen ve detaylanması gereken açıklardır ve bu nedenle böyle çalışmaların daha fazla yapılmasının gerekli olduğuna inanılmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Beck-Sagué C, Jarvis WR. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. J Infect Dis 1993;167(5): 1247-51.
2. Douglas LJ. Adhesion of *Candida* species to epithelial surfaces. Crit Rev Microbiol 1987;15 (1):27-43.
3. Douglas JL. Adhesion to surface. In: Rose AH, Harrison JS, eds. The Yeast. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press; 1987. p.239-45.
4. Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. J Gen Microbiol 1985;131(5): 1217-21.
5. Borg M, Rüchel R. Expression of extracellular acid proteinase by proteolytic *Candida* species during experimental infection of oral mucosa. Infect Immun 1998;56(3): 626-31.
6. Ross IK, Bernardis F, Emerson GW, Cassone A, Sullivan P. The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: physiology of a proteinase deficient mutant. J Gen Microbiol 1991;136(4):163-8.
7. Farley PC, Shepherd MG, Sullivan PA. The purification and properties of yeast proteinase B from *Candida albicans*. Biochem J 1986; 236(1):177-84.
8. Odds FC. *Candida albicans* proteinase as a virulence factor in the pathogenesis of *Candida* infections. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A 1985;260(4):539-42.
9. Remold H, Fasold H, Staib F. Purification and characterization of a proteolytic enzyme from *Candida albicans*. Biochim Biophys Acta 1968;167(2):399-406.
10. Macdonald F. Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species. Sabouraudia 1984;22(1):79-82.
11. 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 1986;53(2):411-9.
12. Tsushima H, Mine H, Kawahami Y, Hyodok F, Ueki A. *Candida albicans* aspartic proteinase cleaves and inactivates human epidermal cysteine proteinase inhibitor, cystatin A. Microbiology 1994;140(Pt1):167-71.
13. Louie A, Dixon DM, el-Magrabi EA, Burnet JW, Baltch AL, Smith RP. Relationship between *Candida albicans* epidermolytic proteinase activity and virulence in mice. J Med Vet Mycol 1994;32(1):59-64.
14. McGinnis MR, Tilton RC. Yeast. In: Howard BJ, Keiser JK, Weissfeld AS, Smith T, Tilton RC, eds. Clinical and Pathogenic Microbiology. 2<sup>nd</sup> ed. St Louis Baltimore Boston: Mosby; 1994. p.615-25.
15. Ener B, Douglas LJ. Correlation between cell-surface hydrophobicity of *Candida albicans* and adhesion to buccal epithelial cells. FEMS Microbiol Lett 1992;78(1): 37-42.
16. Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. J Med Vet Mycol 1984;22(3):201-7.
17. Ener B, Babacan F, Johansson CB. In vitro detection of phospholipase activity in *Candida* species. Med Bull İstanbul 1991;24(1):55-60.
18. Özgüneş İ, Usluer G, Gürer F, Çolak H. Efficacy of prophylactic and early fluconazole treatment on systemic candidiasis in experimentally neutropenic rabbit. Chemotherapy 1993;39(3):189-96.
19. Aldenderfer MS, Blashfield RK. A review of clustering methods. Cluster Analysis. 1<sup>st</sup> ed. London: Sage Publication Inc; 1984. p.33-61.
20. Ercan İ, Tanrıtanır A, Hacımustafaoğlu M, Ediz B. [Evaluation of clinical data of the patients internalized with diagnosis as acute diarrhea via cluster analysis]. Ege Journal of Medicine 1998;37(1-2):25-30.
21. Sugar MA. Problems in diagnosis of invasive candidiasis in the immunocompromised patients. In: Rex JH, Meunier F, eds. Serious *Candida* Infections: Risk Factors, Treatment and Prevention. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Medical Information Press, Pfizer, Inc; 1995. p.27-33.
22. Ghannoum MA. Extracellular phospholipases as universal virulence factor in pathogenic fungi. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi 1998;39(2): 55-9.
23. Dolan JW, Bell AC, Hube B, Schaller M, Warner TF, Balish E. *Candida albicans* PLD I activity is required for full virulence. Med Mycol 2004;42(5):439-47.
24. Dagdeviren M, Cerikcioglu N, Karavus M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. Mycoses 2005;48(5):321-6.
25. Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ N. Sağlıklı ve [*Candida albicans* strains isolated from both healthy individuals and *Candida* infected patients]. Turkish J Infect 2000;14(3): 405-8.
26. Gülenç S, Karadenizli A, Kolaylı F, Bingöl R. [Investigation of slime factor and proteinase activity in yeast species isolated from various clinical specimens]. J Turkish Microbiol Soc 2002;32(3-4):235-8.
27. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. Mycopathologia 2007;164(6): 265-9.
28. Odds FC. *Candida* species and virulence. ASM News 1994;60(6):313-8.

29. Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JM. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62(1):130-80.
30. Kırdar S, Kaynak S, Duran A, Doğan Y, Bahar İH. [The effect of silicone oil on in vitro growth and some virulence factors of *Candida albicans*]. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009;29(5): 1247-52.
31. Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Risk factors for hospital-acquired candidemia: a matched case-control study. *Arch Inter Med* 1989;149(10): 2349-53.
32. Fraser VJ, Jones M, Dunkel J, Storf S, Medoff G, Dunagan WC. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors and predictors of mortality. *Clin Infect Dis* 1992;15(3):414-21.
33. Schwartz RS, Mackintosh FR, Schrier SL, Greenberg PL. Multivariate analysis of factors associated with invasive fungal disease during remission induction therapy for acute myelogenous leukemia. *Cancer* 1984;53(3): 411-9.
34. Bross J, Talbot GH, Maislin G, Hurwitz S, Strom BL. Risk factors for nosocomial candidemia: a case control study in adults without leukemia. *Am J Med* 1989;87(6):614-9.