

Bazı Dezenfektanların *Candida albicans* Üzerine Antifungal Aktivitelerinin İncelenmesi

Investigation of Antifungal Activities of Some Disinfectants on *Candida albicans*

Ali ÖZTÜRK¹, Ayşe KALKANCI²

¹ Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Niğde.

¹ Niğde Ömer Halisdemir University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Niğde, Turkey.

² Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma doktora tez çalışması olarak gerçekleştirilmiş olup, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) 1001 başlığı altında, SBAG 1135383 kodlu proje kapsamında desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 03.04.2018 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 10.09.2018

ÖZ

Dezenfektanlar mantar hücresinde fungisidal veya fungistatik etki gösterebilir. Dezenfektanların fungal hücre üzerindeki etki mekanizmasının bakterilerde görülen antibakteriyel etkiye benzer olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada bazı dezenfektanların *Candida albicans*'a karşı etkinliklerinin gösterilmesi ve virülans ile direnç arasında bir ilişki olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada, çeşitli klinik örneklerden elde edilen 417 *C.albicans* ile bir referans izolatının dezenfektanlara karşı duyarlılıkları saptanmıştır. Dezenfektanların minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve minimum fungisidal konsantrasyonu (MFK) değerleri buyyon mikrodilüsyon (BMD) yöntemiyle elde edilmiştir. MİK ve MFK değerleri kullanılarak epidemiyolojik sınır değerleri (ECV) belirlenmiştir. Dezenfektan duyarlı ve dirençli izolatlarda membran geçirgenliğinin incelenmesi için kristal viyole deneyi yapılmıştır. Seçilen izolatlarda atım pompalarının sayıca artışını göstermek için rhodamin 6G (R6G) floresans boyası kullanılmıştır. Virülans ile dezenfektan direnci arasında ilişki olup olmadığı in vitro ve in vivo olarak araştırılmıştır. Salgisal asit proteinaz (SAP), fosfolipaz, esteraz, hemolitik aktivite ve slime faktör üretimi gibi virülans faktörleri in vitro olarak incelenmiştir. İn vivo virülans deneyi ise *Galleria mellonella* larvalarında enfeksiyon modeli oluşturularak gerçekleştirilmiştir. Virülans faktörleri ile dezenfektan direnci arasındaki ilişki *G.mellonella* larva modelinin mortalite oranlarına göre değerlendirilmiştir. Benzalkonyum klorür (BZK) ve klorheksidin diglukonat (CHX) için MİK değerleri 0.25-8 mg/L arasında, triklosan (TRC) için MİK değerleri 0.06-4 mg/L ve sodyum hipoklorit (SHC) için MİK değerleri 256-16.384 mg/L arasında bulunmuştur. ECV sınır değerleri BZK, CHX, TRC ve SHC için sırasıyla 4 mg/L, 2 mg/L, 1 mg/L ve 4096 mg/L olarak belirlenmiştir. Kristal viyole atım yüzdesi, duyarlı izolatla %26.5-57.6 arasında, dirençli izolatlarla ise %33-79.2 arasında bulunmuştur. Dezenfektan direncinin atım pompalarıyla ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. İn vitro virülans deneyinde kullanılan izolat sayısının az olması nedeniyle dezenfektan direnci ile virülans faktörleri arasındaki

İletişim (Correspondence): Dr. Öğr. Üyesi Ali Öztürk, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 51240, Niğde, Türkiye.

Tel (Phone): +90 534 323 86 43, E-posta (E-mail): ozturkali@ohu.edu.tr

ilişki kesin kanıtlar eşliğinde değerlendirilememiştir. Dezenfektan dirençli izolatlarla oluşan enfeksiyonların mortalitesi, dezenfektan duyarlı izolatları farklı bulunmamıştır. Bu çalışmanın sonucunda, 417 izolat içinde BZK, CHX, SHC ve TRC'ye dirençli izolatlar olduğu belirlenmiştir. Dezenfektanların giriş ve çıkışının *C.albicans*'ın hücre membranındaki atım pompalarıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Candida albicans*; dezenfektan; direnç; virülans; *Galleria mellonella*.

ABSTRACT

Disinfectants may have fungicidal or fungistatic effects against fungal cells. The mechanism of action of disinfectants on fungal cells believed to be similar to the antibacterial activity. The aim of this study was to demonstrate the efficacy of some disinfectants against *Candida albicans* and to investigate the relationship between virulence and disinfectant resistance. In this study, the susceptibility of 417 clinical *C.albicans* and reference isolates against disinfectants were determined. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) values of disinfectants were obtained by using broth microdilution (BMD) assay. Epidemiological cut-off values (ECVs) were determined by using the MIC and MFC values. Crystal violet assay was carried out to investigate membrane permeability in disinfectant resistant and susceptible isolates. Rhodamine 6G (R6G) fluorescence stain was used to show the increase in the number of efflux pumps among selected isolates. The relationship between virulence and disinfectant resistance was determined by in vitro and in vivo investigations. Virulence factors secretory acid proteinase (SAP), phospholipase, esterase, hemolytic activity and slime factor production were examined in vitro. In vivo virulence assay was performed by infecting *Galleria mellonella* larvae. The relationship between virulence factors and disinfectant resistance was evaluated according to the mortality rates of *G.mellonella* larvae. The range of MIC values for benzalkonium chloride (BZC) and chlorhexidine digluconate (CHX), triclosan (TRC) and sodium hypochlorite (SHC) were 0.25-8 mg/L, 0.06-4 mg/L and 256-16.384 mg/L, respectively. ECV values for BZC, CHX, TRC and SHC were determined as 4, 2, 1 and 4096 mg/L, respectively. The rate of crystal violet uptake was found between 26.5-57.6% for disinfectant susceptible isolates, and between 33-79.2% for resistant isolates. It is concluded that the disinfectant resistance was related with efflux pumps. Due to the lack of number of isolates that were used in this assay, the relationship between disinfectant resistance and virulence factors could not be assessed. There was no difference in the mortality of larvae infections caused by disinfectant resistant and susceptible isolates. As a result, in this study, resistant isolates against BZC, CHX, SHC and TRC were found among 417 isolates. Input and output of disinfectants were found to be associated with the cell membrane efflux pumps of *C.albicans*.

Keywords: *Candida albicans*; disinfectant; resistance; virulence; *Galleria mellonella*.

GİRİŞ

Dezenfektanlar, hastane ortamında yüzeylerin veya ürünlerin kontaminasyondan korunmasında kullanılan antimikrobiyal etkili kimyasallardır. Dezenfektanlar mantar hücrelerinde fungisidal veya fungistatik etki gösterebilmektedir. Antifungal etkinin mekanizması ile bakterilerde görülen antibakteriyel etki arasında benzerlikler bulunduğu düşünülmektedir. Mikroorganizmaların hücre yapısında dezenfektanların etkisini gösterdiği birden fazla hedef bulunmaktadır. Bu nedenle dezenfektanlara karşı bakteriyel direnç, hedef bölgede ya da metabolik aktivitelerinde bir modifikasyon sonucu ortaya çıkmakta ve intrensek ya da kazanılmış direnç olarak gelişmektedir¹.

Mantar hücresinde dezenfektanların hedefi hücre membranı, ribozomlar, proteinler ve nükleik asitler gibi yapılardır. Örneğin, gluteraldehidin hücre duvarına, kuarterner amonyum bileşiklerinin hücre membranına, alkilleyici ajanların proteinlere, ağır metallerin fungal enzimlere etki ettikleri belirtilmiştir².

Candida albicans, çeşitli virülans faktörlerine sahip olup, bunları konak savunma sistemleri tarafından yok edilmelerini önlemek için kullanmaktadır. Virülans faktörleri yardımıyla *C.albicans* mikrobiyal flora ile rekabet ederek konağın farklı bölgelerinde enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Patojenite kriterleri denilen bu faktörler *C.albicans* ve diğer *Candida* türlerinin virülansını belirlemektedir. Virülans faktörlerinin önemi en fazla *C.albicans* türünde gösterilmiştir³.

Mikroorganizmaların patojenite ve virülansının araştırılması için daha çok memeli hayvan modelleri kullanılmaktadır. Memeli hayvanlar ile yapılan çalışmaların sonucunda elde edilen bilgiler, enfeksiyonların tanı ve tedavisi için önem kazanmıştır. Ancak son yıllarda deneysel hayvan modellerinin kullanımı ile ilgili çeşitli kısıtlamalar ve zorluklar yaşanmaktadır. Deney hayvanları ile çalışma yapılabilmesi için sertifika zorunluluğunun getirilmiş olması, etik kuralların gittikçe ağırlaştırılması gibi nedenlerin yanı sıra bu tür deneylerin zaman alıcı ve zor olması günümüzde hayvan modeli olarak omurgasız hayvanların kullanımını gündeme getirmiştir⁴.

Omurgasız canlılar arasında yer alan ve bal mumu güvesi olarak bilinen *Galleria mellonella*, mikroorganizmaların virülansının ve konak yanıtının araştırılmasında kullanılmaktadır. Bu canlılar diğer memeli modeller ile karşılaştırıldığında ekonomik olmaları, etik kurul onayı gerektirmemeleri ve kolay uygulamaları nedeniyle son yıllarda ilgi çekmeye başlamıştır. *G.mellonella* virülans çalışmaları için iyi bir fizyolojik model oluşturmakta ve laboratuvar şartlarında kolayca yetiştirilmektedir⁴.

Bu çalışmada, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan *C.albicans* izolatları üzerinde, bazı dezenfektanların etkilerinin gösterilmesi, dezenfektan direncinin varlığının araştırılması ve vahşi izolatların oluşturacağı enfeksiyonlar ile dezenfektanlara dirençli izolatların oluşturacağı enfeksiyonların *G.mellonella* larvası modeli kullanılarak karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Candida albicans İzolatları

Çalışmaya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarında 2010-2015 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 417 *C.albicans* izolatı ve bir ATCC standart izolat (*C.albicans* 10231) dahil edildi. İzolatlar saklama tüplerine (mikrobank) konularak çalışmanın yapılacağı güne kadar -80°C'de muhafaza edildi. Saklanan izolatlar Sabouraud Dekstroza Agar (SDA)'da üretildi.

Dezenfektanlar

Çalışmada, benzalkonyum klorür (BZK; Sigma, B6295), klorheksidin diglukonat (CHX; Sigma, C9394), sodyum hipoklorit (SHC; Sigma, 425044) ve triklosan (TRC; Irgasan; Sigma, 72779) kullanıldı. BZK bir kuarterner amonyum bileşiği olup geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ilaçtır⁵. CHX kuarterner amonyum yapılı, bis-biguanid bileşiğidir. Anti-septik amaçlı en yaygın kullanılan dezenfektanlardan biridir⁶. SHC, en yaygın kullanılan

klor içeren dezenfektandır⁷. TRC ise sentetik, iyonize olmayan, geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ilaştır⁸.

Dezenfektanların konsantrasyonları ön çalışma yapılarak belirlendi. Dezenfektanların kullanılan dilüsyonlarından elde edilen MİK değerleri 5-6. kuyucuğa gelecek şekilde dilüsyonları tespit edildi. MİK değerleri ortanca dilüsyonlarda olacak şekilde dezenfektan konsantrasyonu belirlendi. BZK'nin en yüksek konsantrasyonu 256 mg/L, CHX'in 64 mg/L, SHC'nin 32.768 mg/L ve TRC'nin 16 mg/L olarak saptandı.

Dezenfektanların MİK Değerlerinin Belirlenmesi

İn vitro duyarlılık testi "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" M27-A3 rehberinde önerilen buyyon mikrodilüsyon (BMD) yöntemine göre yapıldı⁹. Her dezenfektan için yukarıda belirtilen en yüksek konsantrasyondan başlayarak 10 kez seri sulandırım yapıldı. Maya süspansiyonu final konsantrasyonu 0.5×10^3 hücre/ml içerecek şekilde hazırlanarak farklı dezenfektan konsantrasyonları içeren mikropalak kuyucuklarına aktarıldı. Mikropalaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Gözle üreme saptanmayan en düşük dezenfektan konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi. MİK değeri belirlendikten sonra minimum fungisidal konsantrasyonu (MFK) değerleri saptandı. Bu değerler grafik üzerinde yerleştirilerek izolatların çoğunluğunun toplandığı epidemiyolojik sınır değeri (ECV) belirlendi. Böylece her bir dezenfektan için CLSI BMD yöntemiyle bir ECV değeri elde edildi. MİK değerinin elde edildiği izolat sayısı x eksenine, MİK değeri y eksenine yazıldı. En fazla izolatın toplandığı MİK değerinin (modal MİK) tepe noktası alınarak çizilen grafikte, ECV olarak kabul edildi. Dezenfektanlara duyarlılık-direnç için sınır değerler bulunmadığından, her bir dezenfektan için elde edilen ECV değerine göre izolatlar dezenfektan duyarlı (MİK $\leq$ ECV) ve dezenfektan dirençli (MİK $>$ ECV) olarak gruplandı¹⁰.

Membran Geçirgenlik Deneyi

Fenotipik olarak gruplanan duyarlı ve dirençli izolatların membran geçirgenliğinin araştırılması için kristal viyole deneyi yapıldı. Sabouraud dekstrozu buyyon (SDB) besiyesinde üretilen *C.albicans* kültüründen 10^6 hücre/ml içerecek şekilde süspansiyonlar hazırlandı. Her dezenfektan için toplam beş ayrı dilüsyon (MİK, -2 MİK ve +2 MİK değerleri) test edildi. Dezenfektan ve mayanın serum fizyolojik içindeki karışımı (2 ml) bir gece 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında süspansiyon içeren tüpler santrifüj edildi. Oluşan çökelti üzerine 100 µl (10 µg/ml) kristal viyole eklendi. Boyalı karışım 37°C'de 10 dakika inkübasyondan sonra tekrar santrifüj edildi. Üst sıvı düz tabanlı, 96 kuyucuklu mikropalaklara aktarılıp optik dansite (OD) değerleri 590 nm dalga boyunda okundu. Sadece kristal viyole içeren kuyucuk %100 olarak kabul edilerek [Alım yüzdesi = (Örneğe ait OD değeri/kristal viyole OD değeri) x 100] formülüne göre her bir örnek için kristal viyole alım yüzdesi hesaplandı. Dezenfektan içermeyen maya süspansiyonları negatif kontrol olarak, nistatin (4 mg/L) ve amfoterisin B (16 mg/L) eklenmiş maya süspansiyonları da pozitif kontrol olarak kullanıldı¹¹.

Atım Pompa Deneyi

Mantar hücrelerinde kimyasalların ve ilaçların hücre dışına atımından sorumlu iki tip atım pompası tanımlanmıştır. Bunlar *C.albicans* ilaç direnç proteini (Cdr1p ve Cdr2p) ve *C.albicans* çoklu ilaç direnç proteini (Mdr1p) pompalarıdır. Rodamin 6G (R6G) floresans boya olup sadece *CDR1* ve *CDR2* genlerinin artmış ekspresyonu gösterilebilmektedir. Atım pompalarının dezenfektan metabolizmasında rolünün anlaşılması için R6G floresans boyası geri alım çalışması yapıldı. Bu yöntem için, bir gecelik inkübasyon ile sıvı besiyerinde üretilmiş olan dezenfektan dirençli ve duyarlı *C.albicans* kültüründen alınan hücreler sayılarak (10^6 hücre/ml) 10 ml SDB besiyerine aktarıldı. Hücreler 5 saat inkübasyondan sonra santrifüj edildi. Çökelti fosfat tamponlu solüsyon (PBS) ile iki kere yıkandı. Hücreler 10 ml PBS içinde tekrar süspanse edilerek 1 saat 37°C'de çalkalanarak inkübe edildi. Hücrelerin üzerine 10 µl R6G solüsyonundan (0.5 M) eklendi. Karışım 37°C'de 30 dakika süre ile inkübe edildi. Karışımından 1 ml santrifüj tüpüne aktarıldı. Kalan 9 ml hücre süspansiyonu iki ayrı 15 ml'lik santrifüj tüpüne paylaştırıldı. Kontrol tüpü olacak bir tane sine 500 µl PBS, deney tüpü olacak diğerine 500 µl glukoz solüsyonu (10 mM) pompaları uyaran bir faktör olarak eklendi. Karışımlar 37°C'de 30 dakika süre ile inkübe edildi. Her 15 ml'lik tüpten 1 ml olarak mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Mikrosantrifüj tüpleri 10.000 x g devirde 1 dakika süre ile santrifüj edildi. Üst sıvılar hemen temiz mikropiplara aktarıldı. Kuyucuk içindeki sıvılar OD 527 nm'de okundu. R6G'nin 0-5 molar arasındaki konsantrasyonlarının OD değerleri ölçülerek bir standart eğri oluşturuldu. Bilinmeyen R6G miktarı bu standart eğriye göre hesaplandı. Glukoz eklenmeden önceki R6G tutulumu ile eklendikten sonraki tutulum karşılaştırıldı¹². Glukozun eklendiği koşulda elde edilen sonuçlar karşılaştırma amacıyla istatistiksel analiz için kullanıldı.

İn Vitro Virülans Deneyleri

Dezenfektan duyarlı ve dirençli olarak ayrılan izolatların in vitro hemolitik aktivite, salgısal asit proteinaz (SAP), fosfolipaz, esteraz, slime faktör oluşturma özellikleri araştırıldı. Çok sayıda virülans faktörü incelendiği için, dirençli izolat sayısının az olmasına (3 izolat) rağmen sonuçlar sunuldu.

SAP deneyi için, sığır serum albumin agar (SSAA) kullanıldı. İzolatların 0.5 McFarland süspansiyonlarından 10 µl alınarak SSAA besiyerine ekildi ve 37°C'de 10 gün bekletildi. İnkübasyondan sonra, besiyerinin üzerini örtecek şekilde %20 triklorasetik asit (TCA) eklendi ve 20 dakika bekletildikten sonra döküldü. Plaklar PBS ile yıkanarak %0.06 amidosiyahi boyası ile 10 dakika boyandı. Plaklar boya çözücüsü (metanol, asetik asit, distile su, 45:10:45) ile yıkandı. Plaklar PBS ile tekrar yıkanarak, kurumaya bırakıldı. Koloni etrafında şeffaf zonu olmayanlar negatif, şeffaf zon olan koloniler ise pozitif olarak değerlendirildi¹³.

Fosfolipaz deneyi için, yumurta sarılı agar (YSA) besiyeri kullanıldı. İzolatların 0.5 McFarland süspansiyonlarından 10 µl'si YSA plaklarına ekildi ve 37°C'de 4 gün inkübe edildi. Kolonilerin etrafında oluşan presipitasyon zonu ölçüldü¹⁴.

Esteraz üretiminin gözlenmesi için tween 80 agar kullanıldı. Taze kültürlerden steril eküvyon çubuğu ile alınarak 1 cm çapında ekim yapıldı. Besiyerleri 37°C'de 10 gün inkübe edildi, koloni etrafında opak kristallerin oluşumu pozitif esteraz aktivitesi olarak değerlendirildi¹⁵.

Hemolitik aktivitenin gösterilmesi için, %5 koyun kanlı SDA besiyeri kullanıldı. İzolatların 0.5 McFarland süspansiyonlarından 10 µl, 5 mm çapında ekim yapıldı. Plaklar 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde 48 saat inkübe edildi. Kolonilerin etrafında oluşan saydam halkalar hemoliz zonu olarak değerlendirildi¹⁶.

Slime faktör üretimini saptamak için tüp aderens yöntemi kullanıldı. Taze kültürde üremesi olan mayadan bir öze dolusu alınarak içinde %8 glukoz bulunan SDB besiyerine aktarıldı. Etüvde 37°C'de 48 saat çalkalayarak inkübasyondan sonra tüp içerikleri boşaltıldı ve distile su ile yıkandıktan sonra %1'lik safranin ile boyandı. Tüplerde kırmızı pembe renkli film tabakası oluşması slime pozitif, herhangi bir film tabakası oluşmaması negatif olarak değerlendirildi¹⁷. Deneyde, tüpün tamamında boya toplanması slime pozitifliği olarak kabul edildi. Literatürde belirtildiği üzere, sıvı besiyerinin tüp içinde bittiği seviyede halka şeklindeki boya toplanması slime faktör negatif olarak değerlendirildi.

***Galleria mellonella* Larvalarının İnokülasyonu**

G.mellonella larvaları laboratuvarımızda yetiştirildi. Larvaların üretilmesi için sentetik besiyeri kullanıldı. Larvaların 3-4 haftalık, 0.33 g ağırlığında, kremi renkte ve 2-3 cm uzunluğunda olanları çalışmaya dahil edildi. Her larvanın sol arka bacak içine Hamilton iğnesi kullanılarak 10 µl maya süspansiyonu (10⁶ hücre/ml) enjekte edildi. Her grupta 10 larva olmak üzere; i) ellenmemiş sağlıklı kontrol grubu, ii) serum fizyolojik (SF) ile muamele edilmiş kontrol grubu, iii) dirençli *C.albicans* ile enfekte edilmiş grup, iv) duyarlı *C.albicans* ile enfekte edilmiş grup olmak üzere toplam dört gruba ayrıldı. Enfekte edilen larvalar 30°C'de inkübe edilerek her gün ölen larva (hareketsiz ve kahve renkli) sayısı belirlendi. Bütün deney en az iki kez tekrar edilerek günlere göre canlı larva sayıları ile Kaplan-Meier eğrileri elde edildi^{18,19}.

BULGULAR

Toplam 417 *C.albicans* izolatının MİK ve MFK değerleri saptanmıştır. BZK için MİK değerleri izolatlardan birinde 0.25 mg/L, dördünde 0.5 mg/L, 20'sinde 1 mg/L, 170'inde 2 mg/L, 205'inde 4 mg/L ve 17'sinde 8 mg/L olarak belirlenmiştir. BZK için ECV değeri 4 mg/L olarak bulunmuştur.

CHX için MİK değerleri 417 izolatın üçünde 0.25 mg/L, 13'ünde 0.5 mg/L, 79'unda 1 mg/L, 239'unda 2 mg/L, 72'sinde 4 mg/L ve 11'inde 8 mg/L olarak saptanmıştır. CHX için ECV değeri 2 mg/L olarak bulunmuştur.

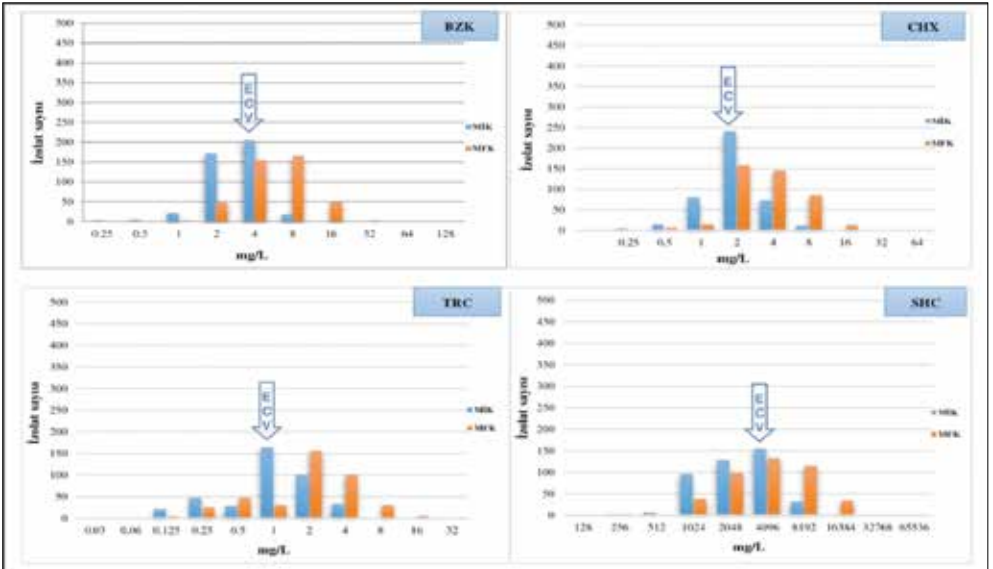
TRC için MİK değerleri 417 izolatın birinde 0.06 mg/L, 21'inde 0.125 mg/L, 47'sinde 0.25 mg/L, 28'inde 0.5 mg/L, 163'ünde 1 mg/L, 99'unda 2 mg/L ve 33'ünde 4 mg/L olarak saptanmıştır. TRC için ECV değeri 1 mg/L olarak bulunmuştur.

SHC için MİK değerleri 417 izolattan ikisinde 256 mg/L, beşinde 512 mg/L, 96'sında 1024 mg/L, 127'sinde 2048 mg/L, 155'inde 4096 mg/L, 31'inde 8192 mg/L ve birinde 16.384 mg/L olarak tespit edilmiştir. SHC için ECV değeri 4096 mg/L olarak bulunmuştur. Tüm dezenfektanlar için MİK/MFK ve ECV değerleri Şekil 1'de gösterilmiştir.

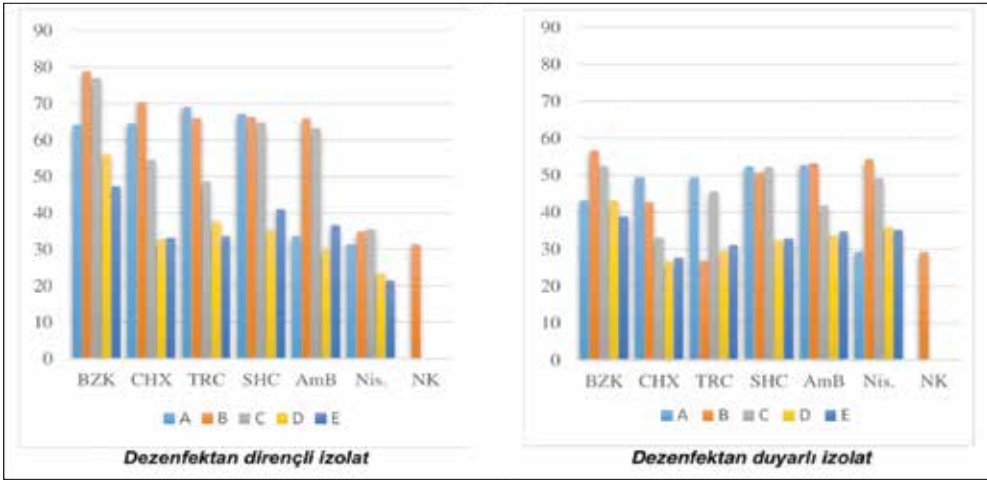
Deneyde seçilen isolatların toplam beş farklı dezenfektan konsantrasyonu için kristal viyole alım (up take) yüzdeleri belirlenmiştir. Deneyin sonucunda dezenfektanlara duyarlı izolatta kristal viyole alım düzeyleri %26.5-57.6 arasında bulunurken, dirençli izolatlarda %79.2'ye kadar yükselmiştir. Dezenfektan miktarı MİK düzeyinin üzerine çıktıkça, kristal viyole alım yüzdeleri artmıştır (Şekil 2). Bu deney bize, dezenfektanların membrandan hücre içine alındığını ve alımın dezenfektan miktarı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Dezenfektan duyarlı ve dirençli isolatlar arasında, membranın geçirgenliği açısından fark bulunmuştur. Dirençli izolatlarda membranın daha geçirgen olduğu ve alım yüzdelерinin arttığı tespit edilmiştir.

Atım pompalarının sayıca artışı göstermek için floresan boya olan R6G kullanılmıştır. Bu çalışma için dezenfektanlara duyarlı ve dirençli birer adet izolat seçilerek R6G'nin geri alımı belirlenmiştir. Deneyin sonucunda, R6G'nin konsantrasyonu arttıkça OD değerinde yükseldiği saptanmıştır. Dezenfektan dirençli izolatin R6G geri alım değerinin, duyarlı izolattan yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo I). Glukoz eklenen koşullarda dezenfektan dirençli izolatin R6G geri alım değeri, duyarlı izolattan yüksek bulunmuştur (Şekil 3).

Virülans deneyleri için tüm dezenfektanlara duyarlı bir ve dirençli üç izolat olmak üzere toplam dört izolat seçilmiştir. Seçilen isolatlarda; üç dirençli izolatin ikisinde SAP ve fos-



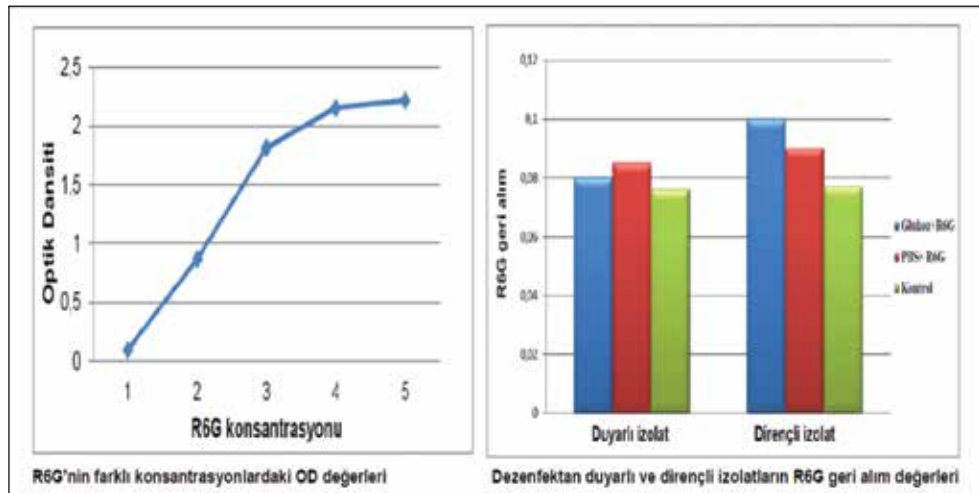
Şekil 1. *C.albicans* izolatlarının dezenfektanlara karşı duyarlılıkları, MİK ve MFK değerlerinin dağılımı.
* Oklar her dezenfektan için ECV değerini göstermektedir.



Şekil 2. Dezenfektan dirençli ve duyarlı izolatların kristal viyole geri alım yüzdeleri (A: MİK değerinin iki kat üstü, B: MİK değerinin bir kat üstü, C: MİK, D: MİK değerinin bir kat altı, E: MİK değerinin iki kat altı, AmB: Amfoterisin B, Nis: Nistatin, NK: Negatif kontrol).

Tablo 1. Dezenfektan Duyarlı ve Dirençli İzolatların R6G Geri Alım Değerleri

	PBS + R6G	Glukoz + R6G	Kontrol
Duyarlı izolat	0.085	0.08	0.076
Dirençli izolat	0.09	0.1	0.077

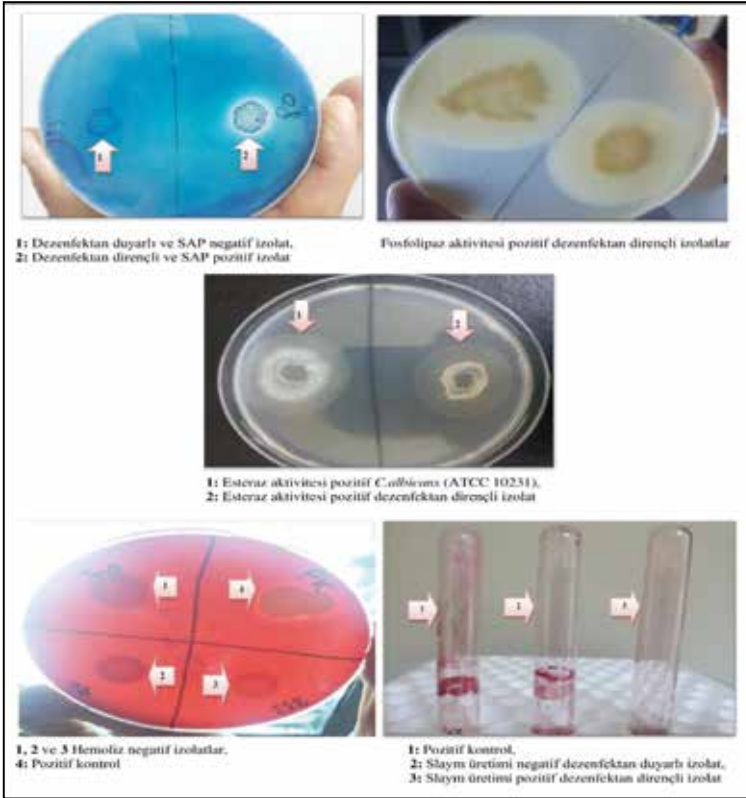


Şekil 3. R6G'nin OD ve test edilen izolatlarda geri alım değerleri.

folipaz enzimine rastlanırken, duyarlı izolatta SAP ve fosfolipaz enzimi saptanmamıştır. Dezenfektanlara dirençli izolatların sadece birinde esteraz enzimi ürettiği saptanmamıştır. İzolatların hiçbirinde hemolitik aktivite gözlenmemiştir. Dezenfektan dirençli üç izolatın ikisinde slime faktör üretimi gösterilmiştir. Dezenfektan duyarlı izolat ve dirençli diğer izolatta ise slime faktör üretimi negatif bulunmuştur (Tablo II, Resim 1). Çalışmamızın sonucunda in vitro virülans faktörlerinden bazılarının direnç ile arttığı, bazılarının ise hiç değişmediği gösterilmiştir.

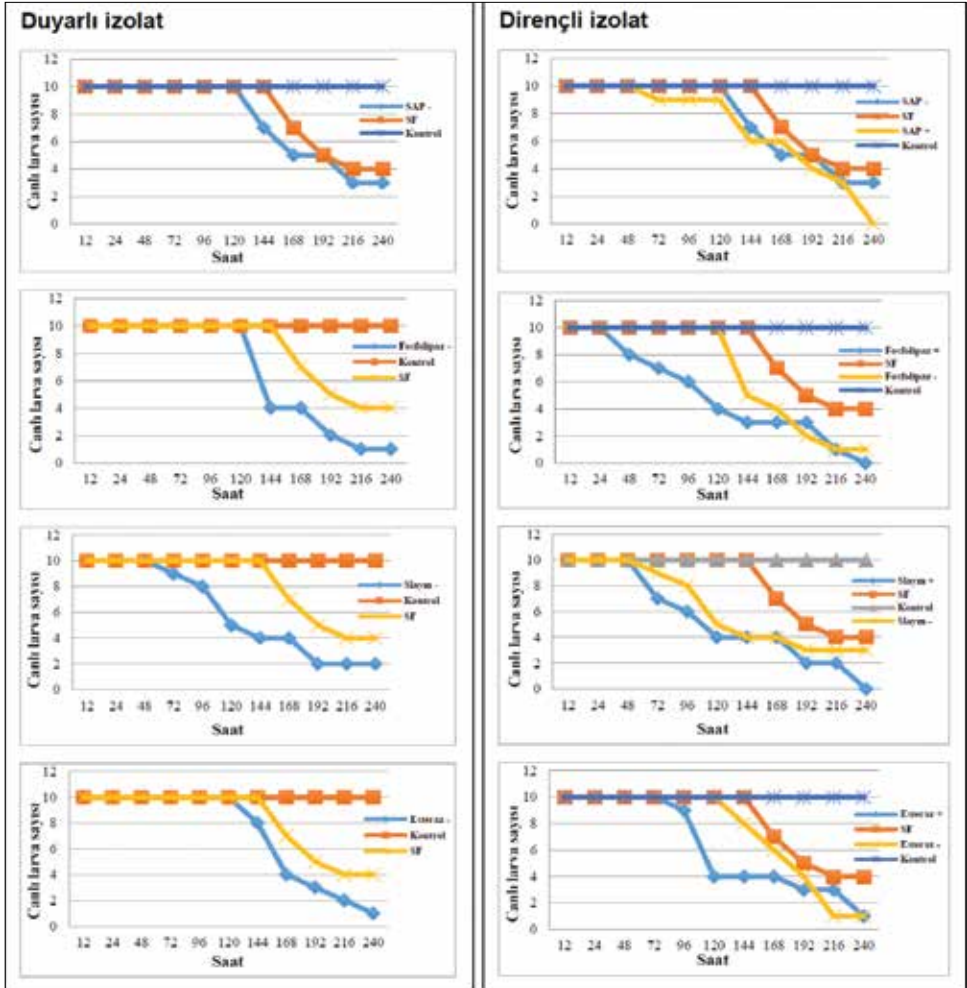
Tablo II. İn Vitro Virülans Deneylerinin Sonuçları

İzolat	Pozitif izolat sayısı/Negatif izolat sayısı				
	SAP	Fosfolipaz	Esteraz	Hemoliz	Slime faktör
Dezenfektan dirençli	2/1	2/1	1/2	0/3	2/1
Dezenfektan duyarlı	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1



Resim 1. İn vitro virülans deneylerinin sonuçları.

Duyarlı ve dirençli izolatlar ile *G.mellonella* larvalarında oluşturulan enfeksiyon modeli sonucunda, ölümler 48. saatten itibaren başlamış ve 240. saatte (10. gün) en yüksek düzeye ulaşmıştır. Çalışmada ilk ölümler dezenfektana dirençli ve fosfolipaz pozitif grupta 48. saatte başlamıştır. Doksan altıncı saatte fosfolipaz pozitif ve slime pozitif gruplarda canlı larva sayısı altıya kadar düşmüştür. Bu sonuçlara göre larvalarda fosfolipaz, esterase, SAP ve slime üretiminin mortaliteyi artırdığı söylenebilir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında larvaların 240. saatteki mortalite oranı fosfolipaz ve esterase negatif gruplarında yüksek (%90) bulunmuştur (Şekil 4). Hemolitik aktivite hem dezenfektanlara duyarlı hem de dirençli izolatlarda saptanmadığından *G.mellonella* larva deneyine dahil edilmemiştir.



Şekil 4. Dezenfektan duyarlı ve dirençli izolatlar ile *G.mellonella* larvalarında oluşturulan enfeksiyon modeli sonuçları. SAP: Salgısal asit proteinaz, +: Pozitif, -: Negatif, SF: Serum fizyolojik.

Larva çalışması ve in vitro virülans sonuçları birleştirildiğinde, SAP, fosfolipaz ve slime üretimi pozitif dirençli izolat ile oluşturulan enfeksiyon modelinde 240. saatte elde edilen mortalite oranları %100 olarak saptanırken; SAP, fosfolipaz ve slime üretimi negatif dirençli ve duyarlı izolatlarda mortalite oranları %70-90 arasında bulunmuştur. Esteraz pozitif izolatın 240. saatte larvalardaki mortalite oranı %90, esteraz negatif duyarlı izolatın ise %10 olarak bulunmuştur.

Virülans sonuçları topluca değerlendirildiğinde, virülans yüksek izolatlar ile mortalitesi yüksek enfeksiyonlar oluşmuştur. Dezenfektan direncinin virülans faktörlerinden bağımsız olduğu tespit edilmiştir. Dezenfektan direnci ile virülans arasındaki ilişki mortalite oranlarına göre değerlendirilmiştir. Dezenfektan dirençli izolatlar ile oluşan enfeksiyonların mortalitesinin, dezenfektan duyarlı izolatlarla oluşan enfeksiyonların mortalitesinden farklı olmadığı bulunmuştur.

TARTIŞMA

Dezenfektan maddeler mikroorganizmalar üzerine mikrobisidal veya mikrobiyostatik etki yaparak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde dezenfeksiyonun etkin şekilde uygulanması ayrı bir öneme sahiptir. Ancak patojen mikroorganizmalarda görülebilen dezenfektan direnci, dezenfeksiyon uygulamalarında karşılaşılan sorunların en önemli kısmını oluşturmaktadır. Bu yüzden dezenfektan maddelere olan direncin kaynağının belirlenmesi önemlidir. Bu amaçla çalışmamızda dezenfektan olarak kullanılan SHC, BZK, TRC ve CHX maddeleri kullanılmıştır.

Dezenfektanların bakteri ve mantar hücreleri üzerine benzer etki gösterdikleri düşünülmektedir. Bakteri konusunda çok sayıda çalışma bulunmakla birlikte, mantarlarla yapılan çalışmaların sayısı kısıtlıdır. Bu nedenle, mantarlarda dezenfektana duyarlı-dirençli ayırımı yapılması zordur. ECV değeri, MİK dağılımından elde edilen bir değerdir. Test edilen izolat grubuna özgül olarak, bir duyarlılık yoklamasını göstermektedir. Elde edilen ECV değeri direnç sınırı değeri olarak kullanılabilir. Çalışmamızda 417 *C. albicans* izolatının seçilen dezenfektanlar için ECV değerleri BZK için 4 mg/L, CHX için 2 mg/L, TRC için 1 mg/L ve SHC için 4096 mg/L olarak belirlenmiştir. Morrissey ve arkadaşları²⁰ 2014 yılında yaptıkları öncü çalışmada, 3319 izolat için dezenfektanların MİK, MFK/MBK değerlerini belirlemişlerdir. Bu örnekler içinde yer alan 200 *C. albicans* izolatı için BZK, CHX, TRC ve SHC ECV değerleri sırasıyla 16 mg/L, 16 mg/L, 16 mg/L ve 8292 mg/L olarak belirlenmiştir. Dezenfektanların *Candida* izolatları için ECV değerlerinin belirlenmesine yönelik başka çalışma bulunmadığından, sonuçlarımız bu öncü çalışma ile karşılaştırılabilir. Çalışmamızda elde edilen ECV değerleri, Morrissey ve arkadaşlarının sonuçlarından düşük bulunmuştur. Morrissey ve arkadaşlarının çalışmasında 200 izolat, bizim çalışmamızda ise 417 izolat kullanılması nedeniyle, ECV değerlerimizin geniş bir izolat sayısı kullanılarak elde edildiği ve daha kesin sonuçlar ortaya çıkardığı düşünülmüştür.

ECV değerlerinin belirlenmediği ancak *C. albicans*'ların dezenfektanlara duyarlılığının araştırıldığı başka çalışmalar bulunmaktadır. Gupta ve arkadaşlarının²¹ 2015 yılında yap-

tıkları bir çalışmada dişlerin kanal tedavisinde kullanılan CHX ve kalsiyum hidroksitin *C.albicans* ve enterokoklar üzerine etkili olduğu saptanmıştır. Ancak bu çalışmada etki sınır değeri belirlenmemiştir.

Literatür araştırmasında, dezenfektanların mantarlara karşı etkinliği sınırlı sayıda çalışmada değerlendirilmiştir. Fungisidal veya fungistatik etki mekanizmaları ise tam olarak bilinmemektedir²². Kalkancı ve arkadaşlarının²³ 2015 yılında yayınlanan makalelerinde gıda ve çevre kaynaklı veya klinik izolat olarak izole edilmiş 77 adet küf mantarının SHC, CHX, BZK ve TRC duyarlılıkları incelenmiştir. Klinik izolatlar ile gıda-çevre kaynaklı izolatların duyarlılıklarının farklı olduğu bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda, izolatların %75'i CHX'e (MİK ≤ 1 mg/L), %90'ı BZK'ye (MİK ≤ 2 mg/L) ve %89'u TRC'ye karşı duyarlı olarak belirlenmiştir. SHC için tüm izolatların geniş bir MİK dağılımı (MİK 2048-16.384 mg/L) gösterdiği belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada ise aynı dezenfektanlar kullanılarak *C.albicans* izolatları üzerine etkinlikleri araştırılmıştır.

Literatürde, dezenfektan duyarlı ve dirençli izolatlarda atım pompaları ayrıntılı olarak incelenmemiştir. Çalışmamızda atım pompalarının incelenmesinde floresan boya olan R6G kullanılmıştır. Dirençli ve duyarlı izolatların R6G geri alımı incelenmiştir. Dezenfektan dirençli izolatta R6G geri alım değeri yüksek bulunmuştur. Elde edilen sonuçlardan yola çıkarak, dezenfektan direnci ile CDR tipindeki atım pompaları arasında ilişki olduğu düşünülmüştür. Yan Liu ve arkadaşları²⁴ tarafından 2015 yılında yapılan bir çalışmada, 30 klinik *C.albicans* izolatında azollere direnç mekanizmaları R6G kullanılarak atım pompaları gösterilmiştir. Çalışmada azol dirençli 12 izolatta R6G'nin geri alımı dirençli izolatlarda, duyarlı izolatlardan yüksek bulunmuştur. R6G geri alımının glukoz varlığında da arttığı gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda da dezenfektan direnci ile atım pompalarının artışı arasında ilişki olduğunu düşündürecek benzer sonuçlar elde edilmiştir. Dezenfektan direncinin *C.albicans* atım pompaları ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmamız literatürde özgün bir değere sahip olacaktır.

Çalışmamızda, dezenfektanlara dirençli olduğu tespit edilen izolatların virülans faktörleri incelenmiştir. SAP aktivitesi dirençli izolatlarda belirgin olarak bulunurken, esteraz ve hemoliz özellikleri bakımından fark gösterilememiştir. Slime üretimi ve fosfolipaz üretimi ise kısmen farklı bulunmuştur. Dezenfektan dirençli *C.albicans* izolatlarında in vitro virülansın kısmen değiştiği görülmüştür. Ancak kullanılan dezenfektan dirençli izolat sayısının az olmasıyla direnç ve virülans faktörleri arasındaki ilişki kesin kanıtlar eşliğinde değerlendirilememiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, in vitro virülans faktörlerinin, dezenfektanlara duyarlı ve dirençli izolatlarda pozitif veya negatif olabildiğini gösteren öncü sonuçlardır.

Çalışmada memeli hayvanlar yerine, etik kurallar ve maliyet gözetilerek mini modellerden *G.mellonella* larvaları tercih edilmiştir. *G.mellonella* larvaları son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır²⁵. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde dezenfektan dirençli izolatlar içerisinde virülans faktörleri pozitif olanlar ile *G.mellonella* larvalarında oluşturulan enfeksiyonların mortalite düzeyinin, dezenfektan duyarlı ve virülans faktörleri negatif izolatlardan yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Literatür incelendiğinde bakterilerde de-

zenfektan direnci ve virülans ilişkisini araştıran çok sayıda çalışma olduğu gözlenmiştir, ancak elde edilen sonuçlar farklılık göstermektedir. Bazı çalışmalarda virülans açısından duyarlı ve dirençli mutant izolatların arasında fark olmadığı belirtilirken, bazı çalışmalarda ise dezenfektan direncinin virülansı azalttığı bildirilmiştir²⁶⁻²⁸.

Çalışmamızda direnç ile virülans kavramlarının birbirlerinden farklı olduğu gözlenmiştir. Dezenfektan dirençli *C.albicans* izolatlarının virülansı ile duyarlı izolatların virülansı arasında fark olmadığı çalışmamızda ilk kez gösterilmiştir.

Çalışmamızın sonucunda 417 izolat içinde dirençli izolatlar olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre dezenfektan dirençli *C.albicans* izolatlarına karşı gerekli önlemlerin alınmasının önemi ortaya çıkarılmıştır. Dezenfektanların giriş ve çıkışının hücre membranındaki atım pompaları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna göre, antifungal ilaçlara direnci olan izolatlarda dezenfektan direncinin de olabileceğinin akılda tutulması gerektiği kanıtlanmıştır. İn vitro virülans faktörlerinden bazılarının direnç ile arttığı, bazılarının ise hiç değişmediği gösterilmiştir. İn vivo virülans çalışmasında ise virülansı yüksek olan izolatlar; dezenfektan direncinden bağımsız olarak *G.mellonella* larva modelinde mortalitesi yüksek enfeksiyonlar oluşturmuştur. Mortaliteyi belirleyen temel faktörün virülans olduğu fakat çalışmamızda direnç varlığının virülansı etkilemediği gösterilmiştir. Bu sonuca göre, direnç ve virülansın birbirinden farklı kavramlar olduğunun akılda tutulması doğru bir yaklaşım olacaktır.

KAYNAKLAR

1. SCENIHR. 2009. Effects of biocides on antibiotic resistance. http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf.
2. Russell AD, Furr JR. Biocides: mechanisms of antifungal action and fungal resistance. *Sci Prog* 1996; 79(1): 27-48.
3. Çerikçioğlu N. Mantarlarda virulans faktörleri. *ANKEM Derg* 2012; 26(2): 261-269.
4. Kavanagh K, Fakkon PJ. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biol Rev* 2010; 24(1-2): 79-83.
5. Marple B, Roland P, Benninger M. Safety review of benzalkonium chloride used as a preservative in intranasal solutions: an overview of conflicting data and opinions. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130(1): 131-41.
6. Dinç G. Kavite dezenfektanlarının antibakteriyel özellikleri, bağlanma dayanımı ve mikrosızıntı üzerine etkileri. *Atatürk Üniv. Dış Hek. Fak. Derg* 2012; 6: 66-75.
7. Dvorak G. Disinfection 101. *Center for Food Security and Public Health* 2008; 1-20.
8. Cao C, Sha Y, Meng H, et al. A four-day study to evaluate the anti-plaque efficacy of an experimental triclosan-containing dentifrice. *J Clin Dent* 2001; 12(4): 87-91.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition. CLSI document (M27-A3), 2008. CLSI, Wayne, PA.
10. Lockhart SR, Ghannoum MA, Alexander BD. Establishment and use of epidemiological cut-off values for molds and yeasts by use of the Clinical and Laboratory Standards Institute M57 Standard. *J Clin Microbiol* 2017; 55(5): 1262-68.
11. Li N, Luo M, Fu YJ, et al. Effect of corilagin on membrane permeability of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Phytother Res* 2013; 27(10): 1517-23.

12. Morgan G, Pinjon E, Coleman DC, et al. Analysis of drug resistance in pathogenic fungi, pp:93-113. In: Kavanagh, K. (ed.), Medical mycology: cellular and molecular techniques. First edition. Wiley 2007.
13. Ozkan S, Kaynak F, Kalkancı A, et al. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. Mem Ins Oswaldo Cruz 2005; 100(3):319-24.
14. Yıldırım M, Mumcuoğlu İ, Kurşun Ş, et al. İnfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Candida albicans* ve non-*albicans* *Candida* suşlarındaki bazı virülans faktörlerinin karşılaştırılması. Türk Mikrobiyo Cem Derg 2009; 39(34): 62-8.
15. Fatahinia M, Poormohamadi F, Mahmoudabadi AZ. Comparative study of esterase and hemolytic activities in clinically important *Candida* Species, isolated from oral cavity of diabetic and non-diabetic individuals. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(3): e20893.
16. Demir F, Kuştımur S. *Trichosporon* spp. suşlarında bazı virülans faktörlerin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2014; 48(4): 628-38.
17. Satılmış ÖK, Akkaya Y, Ergin Ç, et al. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* spp. kökenlerinde slime faktör üretimi. Pam Tıp Derg 2011; 4(1): 25-29.
18. Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, et al. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. Microbes Infect 2010; 12(6): 488-96.
19. Kalkancı A, Fouad AA, Erdoğan M, et al. Bazı bakteri ve mantarların virülansının araştırılmasında *Galleria mellonella*'nın in vivo model olarak kullanılması. Mikrobiyol Bul 2015; 49(3): 366-76.
20. Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, et al. Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. PLoS One 2014; 9 (1): e86669.
21. Gupta PS, Bhati M, Jhaharia K, et al. Evaluation of antimicrobial and antifungal efficacy of inter appointment intracanal medicaments against *Enterococcus* and *Candida albicans*: an in vitro study. J Int Oral Health 2015; 7(6): 97-102.
22. McDonnell G, Russell, AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. Clin Microbiol Rev 1999; 12(1): 147-79.
23. Kalkancı A, Elli M, Fouad AA, et al. Assessment of susceptibility of mould isolates towards biocides. J Mycol Med 2015; 25(4): 1-7.
24. Liu JY, Shi C, Wang Y, et al. Mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from Shanghai, China. Res Microbiol 2015; 166 (3): 153-61.
25. Maurer E, Browne N, Surlis C, et al. *Galleria mellonella* as a host model to study *Aspergillus terreus* virulence and amphotericin B resistance. Virulence 2015; 6(6): 591-8.
26. Oggioni MR, Ciusa ML, Furi L, et al. Lack of evidence for reduced fitness of clinical *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to triclosan. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(11): 6068-9.
27. Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, et al. Retention of virulence following adaptation to colistin in *Acinetobacter baumannii* reflects the mechanism of resistance. J Antimicrob Chemother 2015; 70(8): 2209-16.
28. Latimer J, Forbes S, McBain AJ. Attenuated virulence and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* following sublethal xposure to triclosan. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(6): 3092-100.