

13. Hafta

Patojenik Mayalar

Patojenik Mayalar

1. *Candida albicans*
2. *Cryptococcus neoformans*
3. *Malassezia pachydermatis*
4. *Geotrichium candidum*
5. *Nadiren patojenik olan diğ er maya türleri*
 - *Torulopsis glabrata*
 - *Trichosporon beigelli*

1. *Candida albicans*

- 150'den fazla *Candida* türü bulunmakla birlikte hayvanlarda sadece ***C. albicans*** hastalığa yol açmaktadır.
- *C. albicans* hayvan dokularında ve agar kültürlerinde oval,, 3.5-6.0-6.0-10.0 μm büyüklüğünde tomurcuklanma yoluyla üreyen bir maya hücresidir.
- Ayrılamayan maya hücrelerinde, hücrelerin tek tek uzaması sonucu hayvan dokularında pseudohifalar da şekillenebilmektedir. Bunlar bazen mantarların septumlu hifaları ile karıştırılabilmektedir.
- Bazı besiyerlerinde **chlamydospor** olarak bilinen, kalın duvarlı hücresel dinlenme formları da görülmektedir.
- *C. albicans* besiyerlerinde değişken pH ve sıcaklıklarda üremektedir.
- *C. albicans*, hem 25°C'de ve hem de 37°C'de 24-48 saatlik inkubasyonda beyaz, parlak, konveks koloniler oluşturur.

Buldukları yerler

- *C. albicans* insanlarda ve birçok hayvan türünde, özellikle **intestinal ve genital kanal başta olmak üzere muko-kutanöz bölgelerin bir komensalidir.**
- Çoğu infeksiyonlar **endojenöz orijinli** olup, **immunsupresyon, uzun süren antibiyotik tedavisi, hatalı beslenme** gibi predispoze edici nedenler bu infeksiyonları başlatmaktadır.
- Sığırlarda mayalar memeye **meme-içi antibiyotik tüpleriyle** bulaştırılmaktadır.
- *C. albicans* dünya çapında yaygındır.

Patogenez

- Etken virulensinde neuraminidaz ve proteaz enzimleri rol oynamakta ve hücre duvarı glikoproteinlerinin endotoksin benzeri aktivitesi bulunmaktadır.
- *C. albicans* infeksiyonları **daha çok müköz membranlarda** şekillenmektedir.
- Yangısal yanıtlar daha çok nötrofilik olup, granülomatöz lezyonlar nadiren görülmektedir.

Patogenez

- Tavukların taşlığında şekillenen infeksiyonlar gibi şiddetli kronik infeksiyonlarda, taşlık duvarı kalınlaşmakta, sarımsı-gri nekrotik materyalden oluşan kırıxık havlu görünümünde bir pseudomembranla kaplanmaktadır.
- *C. albicans* infeksiyonları moniliasis, candidosis ve candidiasis gibi farklı isimler almaktadır.
- Sığırlarda *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* ve *C. rugosa* gibi diğer *Candida* türlerinin neden olduğu mastitis olguları rapor edilmiştir.

C. albicans'ın hayvan türlerinde neden olduğu hastalıklar

Konakçı Türleri	Hastalıklar
Tavuklar, hindiler, güvercinler ve diğer kanatlılar	Ağız, özefagus ve taşlıkta pamukçuk. Genç kanatlılarda yüksek mortalite ile seyreden gelişme geriliğine neden olur.
Taylar	Midede ülseratif lezyonlardan izole edilmiştir
Kısrak ve aygırlar	Genital infeksiyonlar
Buzağular	Pnömonik, enterik ve generalize kandidiazis. Hayvanlarda uzun süren antibiyotik tedavilerinin ardından görülür.
Sığırlar	Mastitis: hafif ve kendini sınırlayıcı formu. Bir hafta içerisinde kendiliğinden iyileşir.
Kedi ve köpek yavruları	Mikotik stomatit
Kedi yavruları	Enteritis
Dişi köpekler	Genital kanal infeksiyonları
Köpekler	Kaslar, kemikler ve deride (nadir) lezyonlarla karakterize generalize infeksiyonlar
Kediler	Piyotoraks
Primatlar ve deniz memelileri	Mukokutanöz kandidiazis
İnsanlar	Yeni doğanlar ve bebeklerde mikotik stomatit, erişkinlerde tırnak infeksiyonları, genital kanal, deri, AC ve diğer organlarda infeksiyonlar

Laboratuvar Teşhisi

Materyaller

- Lezyon kazıntıları, santrifuje edilmiş süt örnekleri, histopatoloji için % 10 formalin içerisine alınan biyopsi ve doku örnekleri

Direkt mikroskopi

- *C. albicans* Gram-boyalı sürme preparatlarda, % 10 KOH ile hazırlanan preparatlarda mikroskopik ya da PAS-haematoxylin veya methenamine silver ile boyanan dokularda histopatolojik olarak incelenir.
- *C. albicans* suşları **Gram-boyamada mavimsi-mor renkte** boyanmaktadır.
- Doku kesitlerinde ince-duvarlı, oval, tomurcuklanan hücreler ya da pseudohifalar şeklinde görülmektedir.

İzolasyon

- *C. albicans* inhibitör içeren ve içermeyen **kanlı agar** ve **Sabouraud dextrose agar'** da çok iyi üremektedir.
- Ancak, bazı diğer *Candida* türleri cycloheximide ile inhibe olabilmektedir.
- Pleytler aynı bakterilerde olduğu şekilde küçük bir inokulum hacmiyle ekilir.
- Kültürler **37°C'de aerobik olarak 5 güne** kadar inkube edilmektedir.

İdentifikasyon

Koloni görünümü

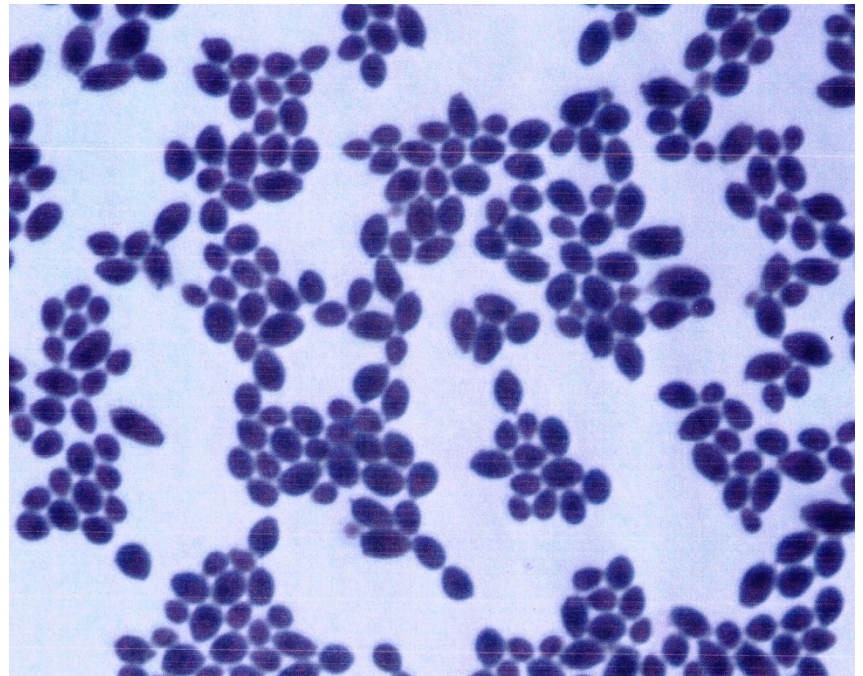
- *C. albicans* kolonileri çoğunlukla 1-3 günde ürerler.
- Bunlar, **beyaz ya da krem renginde, parlak, yüksek-konveksite gösteren, meyvemsi tatlı bir kokuya sahip**, 4-5 mm çapında koloniler oluştururlar.

Mikroskopik görünümleri

- Tek bir koloniden alınan küçük bir parça **laktofenol pamuk mavisinde** hazırlanabilir ya da önceden fikse edilen koloniler **Gram boyama** veya **metilen mavisi** ile boyanabilir.
- *C. albicans* kanlı agarda ve Sabouraud dextrose agarda ince duvarlı, tomurcuklanan hücreler oluşturur.

Germ tüplerinin demonstrasyonu

- Üreyen kolonilerden hazırlanan küçük bir inokulum 0.5 ml koyun, sığır, tavşan veya insan serumuna inokule edilerek 2-3 saat 37°C'de inkube edilir.
- Hazırlanan karışımdan bir damla faz kontrast mikroskopunda, ya da ışık mikroskopunda incelenir. Bazı **maya hücrelerinden dışarı fırlayan küçük tüplerin** görülmesi *C. albicans*'ın karakteristik özelliğidir.



Chlamyospore üretimi

- Bunun için cornmeal-tween 80 veya chlamyospore agar isimli besiyerleri, besiyeri yüzeyinde 1 cm'lik aralıklarla 3 paralel kesik oluşturularak inokule edilir. Kesitler daha sonra gerçekleştirilecek mikroskopik incelemeyi kolaylaştırmak için yüzeyle 45°'lik açı oluşturacak şekilde yapılır.
- İnokulasyon yüzeyin altına yapılmaktadır. Bunun nedeni, chlamyospore üretiminin azaltılmış oksijen baskısında artmasıdır.
- İnokule edilen pleytler 30°C'de 2-4 gün inkube edilirler.
- Agarın yüzeyine ince bir lamel eklenir ve pseudohifaların uçlarında şekillenen kalın duvarlı chlamyospore'lar lameller ışık mikroskopunda incelenerek belirlenir.
- Daha küçük blastospor kümeleri de yapılan mikroskopik incelemelerde görülebilmektedir.

Biyokimyasal testler

- *C. albicans*'ın ön teşhisi için germ tüplerinin ve chlamyospore üretimi yeterli olmaktadır.
- *C. albicans*'ın ve diğer bazı kandida türlerinin kesin teşhisi için ise ya konvansiyonel biyokimyasal testler ya da API 20C, API-yeast-Ident ve Uni-Yeast-Tek gibi ticari sistemlere ihtiyaç vardır.

BiGGY agar (Oxoid)

- **Bismuth-sulphite-glucose-glycine-yeast agar** isimli besiyeri kandida türlerinin izolasyonu ve/veya ön teşhisi için kullanılabilir.
- Bakteriyel kontaminantların çoğu bizmut sülfid tarafından inhibe edilmektedir.
- Bu besiyerinde *C. albicans* S tipli, yuvarlak, kahverenkli koloniler oluşturmaktadır.
- *C. tropicalis*'in kolonileri de *C. albicans* kolonilerine benzemekte ancak 72 saatin sonunda besiyerinde yaygın siyahlaşma görülmektedir.

2. *Cryptococcus neoformans*

- 19 *Cryptococcus* türü içerisinde yalnızca ***Cryptococcus neoformans*** insan ve hayvanlar için patojeniktir.
- Sferikten ovale değişen, ince-duvarlı tomurcuklanan maya olup çapı 2.5-20 µm arasında değişkenlik gösterir.
- Hücreleri kalınlığı değişen, **mukoid yapıda bir polisakkarid kapsül** ile çevrili olup, hayvan dokularında ise bu kapsül daha büyüktür.
- Yavru hücreler tek olup anne hücreden ince bir boyun ile tomurcuklanır.
- *Cryptococcus neoformans* **Fungi Imperfecti** sınıfının bir üyesidir.
- Cryptococcosis (European blastomycosis, torulosis) merkezi sinir sistemini, solunum sistemini ve gözü içeren subakut veya kronik bir enfeksiyondur.

Buldukları yerler

- *C. neoformans* tozda mevcut olup, sağlıklı hayvan kuşların deri, müköz membranlar ve intestinal kanalından izole edilmiştir.
- **Güvercin dışkısının** yüksek oranda kreatinin içermesinden dolayı dışkıda fazla miktarda bulunur.
- Kreatinin diğer birçok mikroorganizmayı inhibe etmekle birlikte *C. neoformans* tarafından kullanılabilir.
- *C. neoformans* **güvercin dışkısında 1 yıldan uzun süre canlı kalabilmektedir.**
- *C. neoformans* tüm dünyada yaygındır.

Patogenez

- Etken virulensinde **antifagositik ve immunosupresif kapsül** rol oynamaktadır.
- Kriptokokkal lezyonlar makroskopik olarak miksomatöz neoplazmları andırmaktadır. Bunlar, kapsüller slime, maya hücreleri, bazı yangı hücrelerini, histiositleri, epiteloid ve dev hücrelerini içermektedir.
- Histiositler ve dev hücreleri çoğunlukla *C. neoformans* içermektedir.

Patogenez

- Hastalıkta infeksiyonun bulaşması genellikle solunum yoluyla olmakta, öncelikle **burun boşluğu** veya **paranasal sinuslarda** lokalizasyon daha sonra ise **beyin ve beyin zarlarına** bulaşma görülmektedir.
- Beyin zarlarının infeksiyonu tüberküler menenjit andırabilmektedir.
- Hastalıkta bazen subkutanöz granulomlar oluşmakta, bunlar çoğunlukla servikal veya pedal bölgelerde olmaktadır.
- *C. neoformans* herhangi bir memeli hayvanı etkileyebilmekte ancak cryptococcosis daha yaygın olarak kediler, köpekler, sığırlar, atlar ve insanlarda görülmektedir.

***Cryptococcus neoformans*'in hayvan türlerinde neden olduğu hastalıklar**

Konakçı türleri	Hastalıklar
Köpek ve kediler	Subkutanöz ve nazal granulomlar, merkezi sinir sistemi lezyonları ve körlük
Atlar	Nazal-pasaj granulomları ve nazal akıntı, Daha az sıklıkta akciğerler ve deride lezyonlar
Sığırlar	Meme bezlerinin şiddetli şişmesi ve sertliğinin görüldüğü mastitisler. Süt verimi düşer ve süt mukoid bir yapıdadır. Çok nadir olarak akciğerlere metastaz görülür.
Diğer hayvanlar	Diğer hayvanlarda çok nadir görülür.
İnsanlar	Cryptococcosis ya immunodepresyon veya fazla miktarda etkene maruz kalma sonucu görülür. İnfeksiyonlar çoğunlukla akciğerler ve merkezi sinir sisteminde (cryptococcal meningitis) görülür.

Laboratuvar Teşhisi

- *Cryptococcus neoformans* içerdiği düşünölen materyaller ile çalışılırken çok dikkatli çalışılmalıdır (ideal olarak biyogüvenlik kabininde), çünkü etken isanlarda ciddi hastalıklara neden olabilmektedir.

Materyaller

- **Serebrospinal sıvı, lezyon veya eksudatlar, mastitisli hayvandan alınan süt, biyopsi örnekleri ve dokular**

Direkt mikroskopi

- Serebrospinal sıvı veya temiz eksudatlardan preparat hazırlanıp India ink veya nigrosin boyama ile incelenebilir. Bu boyalar ile kapsül karakteristik olarak gösterilebilir.
- Lezyonlardan alınan doku biyopsilerinde histolojik kesitler PAS-hematoksilen boyası ile boyanabilir. Bu boyama ile kapsül yerine maya hücresi boyanacaktır. Kapsül hücrenin çevresinde boş kısım olarak gözlenecektir.
- Mayer'in mucicarmine boyasında maya duvarı ve kapsül kırmızıya boyanır ki bu *C. neoformans* için belirleyicidir.

İzolasyon

- *C. neoformans* kanlı agar ve sikloheksimid içermeyen **Sabouraud dextrose agar**'da çok iyi üremektedir.
- Kùltürler **37°C'de aerobik olarak 2 haftaya** kadar inkube edilmektedir.
- **Kapsüler üreme çikolata agarda %5'lik CO₂'li ortamda 37°C'lik** inkubasyonla artırılabilir.
- Saprofitik kriptomok türleri 37°C'de üreyemezken, *C. neoformans* 40°C'ye kadarki inkubasyonsıcaklıklarında kolaylıkla üremektedir.

İdentifikasyon

Koloni görünümü

- Koloni üremesi yaklaşık 2 haftalık inkubasyona kadar görülmemektedir.
- Koloniler, S tipli, nemli, parlak ve yaşlandıkça mukoidleşme eğilimindedir. Başlangıçta beyaz olup, sonraları sarımsı bir gölge oluştururlar. 25°C ve 37°C'de mukoid maya kolonileri oluşmakta bu üreme şekli ile dimorfik mantarlardan ayrılmaktadırlar.

Mikroskopik görünümleri

- LPCB veya nigrosin boyama ile sferikal, kapsül ile çevrili tomurcuklanan hücreler görüntülenir.
- Besiyerinde şekillenen kapsüller hayvan dokusunda görülenlerden daha küçüktür.

37°C'de üreme

- Bu özelliği *C. neoformans*'ı diğer bütün kriptokok türlerinden ayırmaktadır.

Biyokimyasal testler

- a) Üreaz üretimi: *Cryptococcus* spp. yoğun ekilmiş Christensen'in yatık üre agar besiyerinde üreaz oluşturacaktır.

Biyokimyasal testler

- b) Niger veya birdseed agarda melanin üretimi: *C. neoformans* difenolik ve polifenolik bileşikler içeren besiyerlerinde kreatinini kullanan ve melanin pigmentli (kahverengi) koloni oluşturan az sayıda *Cryptococcus* türlerinden biridir. Besiyerleri yoğun olarak ekilir ve 37°C'de aerobik olarak en az 1 hafta boyunca inkube edilir. Koyu kahverengi pigment önce üreyen koloninin çevresinde ve sonra da besiyerinin tamamında oluşur.
- c) Biyokimyasal profil: Kesin teşhis için izolatın API 20C ve Uni-Yeast-Tek ticari sistemlerinde biyokimyasal profili belirlenir.

Fare inokulasyonu

- Fareler intraperitoneal olarak inokule edilirler. Eğer kendiliklerinden ölmezlerse 2 hafta sonra ötenazi uygulanır ve abdominal boşluklarında ve akciğerlerde jelatinöz lezyonlara rastlanır.
- ***C. neoformans* fareler için patojenik olan tek *Cryptococcus* türüdür.**

İmmunolojik testler

- Serum ve serobrospinal sıvıdaki antijenin belirlenmesinde lam lateks aglutinasyon test kitleri geliştirilmiştir.
- Antikor saptanması için ise indirekt FA testleri kullanılmaktadır. Antikorlar sirküle olan antijen ile kombine olabildiğinden her zaman görüntülenemeyebilir.

C. neoformans'ın Ön Teşhisinde Yapılanların Özeti

- Büyük bir kapsüle sahip tomurcuklanan maya hücresinin gösterilmesi
- 37°C'de üreme. Zamanla mukoid hal alan Smooth (S tipli), parlak kolonilerin görülmesi.
- Birdseed agarda kahverengi pigmentin üretimi.
- Üreaz üretiminin gösterilmesi.