

DEĞİŞİK KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA* TÜRLERİNDE FOSFOLİPAZ AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF PHOSPHOLIPASE ACTIVITY OF *CANDIDA* SPECIES ISOLATED FROM DIFFERENT CLINICAL SAMPLES

*Asuman BİRİNCİ**, *Çiğdem ÇEKİÇ CİHAN**, *Kemal BİLGİN**
*Çağatay ACUNER**, *Belma DURUPINAR**

ÖZET: Bu çalışmada *Candida* enfeksiyonlarının patogeneğinde önem taşıdığı öne sürülen fosfolipaz aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Çeşitli klinik örneklerden (kan, beyin omurilik sıvısı, parasentez mayi, katater, bronkoalveoler lavaj, trakeal aspirat, karaciğer absesi) izole edilen 80 *Candida albicans*, 10 *Candida tropicalis*, 6 *Candida glabrata*, 6 *Candida guilliermondii*, 4 *Candida parapsilosis*, 2 *Candida krusei*, 1 *Candida kefyr* olmak üzere toplam 109 *Candida* suşu kullanılmış ve suşların fosfolipaz aktivitesi modifiye plak yöntemi ile incelenmiştir. Fosfolipaz aktivitesi (Pz), koloni çapını koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, *C.albicans* izolatlarının %61.3'ünde (49/80) fosfolipaz aktivitesi saptanırken, albicans dışı *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesi izlenmemiştir. Fosfolipaz salgılayan suşların ortalama Pz katsayısı 0.805 ± 0.08 olarak saptanmıştır. Fosfolipaz pozitifliği açısından suşların izole edildiği bölgelere göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir ($X^2 = 5.5$; $p = 0.137$).

Anahtar sözcükler: *Candida* türleri, fosfolipaz aktivitesi.

ABSTRACT: In this study, the phospholipase activity that was suggested to be important in the pathogenesis of *Candida* infections, has been investigated. A total of 109 *Candida* strains (80 *Candida albicans*, 10 *C.tropicalis*, 6 *C.glabrata*, 6 *C.guilliermondii*, 4 *C.parapsilosis*, 2 *C.krusei*, 1 *C.kefyr*) which were isolated from various clinical specimens (blood, cerebrospinal fluid, parasyntesis specimens, catheter samples, bronchoalveolar lavage fluid, tracheal aspirate, liver abscess) have been included in the study. Phospholipase activities were evaluated by modified plate method. Phospholipase activity (Pz) was determined as the ratio of colony diameter to the diameter of precipitation zone with the colony. While 61.3% (49/80) of *C.albicans* strains were found to be positive for phospholipase activity, none of the non-albicans *Candida* isolates exhibited phospholipase activity. The mean Pz coefficient value of phospholipase secreting isolates was

* Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.

calculated as 0.805 ± 0.08 . There was no statistically significant difference between the phospholipase activity of the isolates according to their isolation sites ($X^2 = 5.5$; $p = 0.137$).

Key words: Candida species, phospholipase activity.

G İ R İ Ş

İnsan vücudunda deri ve mukozanın normal florası içinde yer alabilen kandidalar hazırlayıcı faktörlerin yardımı ile hafiften ağır sistemik enfeksiyonlara kadar çeşitli klinik tablolara yol açabilirler¹. Enfeksiyonun gelişiminde, konağın doğal savunma yapılarının ve immün cevabının bozulması yanında kandidanın virülans faktörleri de rol oynamaktadır. Konak hasarını, kandidaların virülans faktörleri ve mantara karşı savunma mekanizmaları aracılığıyla verilen konak immün cevabı belirler². Biyofilm üretimi, germ tüp oluşumu, proteazlar, fosfolipazlar, adezinler, maya-hif dimorfizmi patogeneizde önemli virülans faktörleridir³⁻⁵. Epitel hücrelerine girerek derin dokulara doğru ilerleyebilmede rol oynayan fosfolipaz, sıklıkla hücre membranının yapı ve fonksiyonlarında major rol oynayan fosfolipidleri parçalayan bir hücre dışı enzimdir. İlk kez 1968'de *Candida albicans*'da Costa tarafından tespit edilmiş olup Price ve Cowson 1977'de fosfolipaz A ve B aktivitesini göstermişlerdir⁶. Daha sonra A, B, C, D, lisofosfolipaz ve lisofosfolipaz-transaçılaz olmak üzere tümü *Candida albicans*'da tanımlanmış beş tipi tespit edilmiştir⁷⁻¹¹. Yapılan çalışmalarda fosfolipidlerin yıkımının hücre harabiyetine neden olduğu ve virülanssta asıl önemli enzimin fosfolipaz B olduğu saptanmıştır^{12,13}.

Bu çalışmada değişik klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarında fosfolipaz aktivitesinin in-vitro olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Candida Suşları: Çalışmada Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikoloji Laboratuvarı'na gelen çeşitli klinik örneklerden (kan, beyin omurilik sıvısı, parasentez, katater, bronkoalveoler lavaj (BAL), trakeal aspirat, karaciğer absesi) izole edilen 109 *Candida* suşu kullanıldı. Suşların tür tayini germ tüp oluşumu, Tween 80'li piringç agardaki mikromorfolojileri, CHROMagardaki renk değişimleri ve API ID 32C (bio Mérieux, France) ile yapıldı.

Fosfolipaz Aktivitesinin Araştırılması: Fosfolipaz aktivitesinin belirlenmesi için Samaranayeke ve arkadaşları¹⁴ tarafından modifiye edilen Price ve arkadaşlarının yumurta sarılı agar (YSA) plak yöntemi uygulandı¹³. Besiyeri olarak 1 M sodyum klorür, 0.005 M kalsiyum klorür ve %8 steril yumurta sarısı eklenmiş Sabouraud dekstroz agar (SDA) kullanıldı. Yumurta sarısı 1000g'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatana steril distile su eklenerek ilk hacmine getirildi ve 50°C'ye soğutulmuş steril SDA'a eklendi. Besiyerinin pH'sı eşit miktarda sitrik asit ve disodyum hidrojen fosfat tamponu ile 4.3'e ayarlandı.

SDA besiyerine pasajlanan *Candida* suşları 35°C'de 48 saat inkübe edildi. Üreyen kolonilerden serum fizyolojik ile Mc Farland 1'e uygun bulanıklıkta süspansiyonlar hazırlandı. Dört eşit parçaya bölünen plaklara bu süspansiyondan

10 µl alınarak ekim yapıldı. Plaklar 30°C'de nemli ortamda dört gün inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda plaklar incelenerek koloni etrafında presipitasyon zonunun görülmesi, fosfolipaz aktivitesi yönünden pozitif kabul edildi ve aktiviteleri ölçüldü¹⁵. Fosfolipaz aktivitesinin ölçülmesinde ve hesaplanmasında, koloninin etrafında oluşan belirgin halka şeklindeki presipitasyon zonu (Pz) dikkate alındı. Fosfolipaz aktivitesi (=Pz); koloni çapını koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı olarak hesaplandı. Bu değerlendirmeye göre Pz değeri küçüldükçe fosfolipaz aktivitesi artmakta, Pz=1.00 değeri negatif fosfolipaz aktivitesini göstermektedir. Bu durumda 0.9-1.00 değerine sahip olanlar fosfolipaz aktivitesi çok düşük grubu; <0.69 olanlar fosfolipaz aktivitesi çok yüksek grubu oluşturmaktadır¹⁶. Bulunan Pz katsayılarına göre Pz aktiviteleri dört grupta değerlendirildi; 0.9-1 (+) çok yüksek Pz grubu, 0.89-0.80 (++) yüksek Pz grubu, 0.79-0.70 (+++) düşük Pz grubu ve <0.69 (++++) çok düşük Pz grubu olarak kabul edildi.

B U L G U L A R

Çalışmamızda; 62 kan, 9 BOS, 6 periton mayi, 2 kateter ve bir bronkoalveolar lavaj (BAL) örneğinden izole edilen toplam 80 *C.albicans* suşunun 49'unda (%61.3) fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. Albicans dışı *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesi izlenmemiştir. Fosfolipaz aktivitesi pozitif bulunan izolatlarda ortalama Pz değerinin 0.805 ± 0.08 olduğu belirlenmiştir (Tablo I).

Tablo I: *Candida* İzolatlarının Fosfolipaz Aktiviteleri

İzolat (Sayı)	Fosfolipaz Pozitif İzolat Sayısı (%)	Ortalama Pz Değeri
<i>C. albicans</i> (80)	49 (61.3)	0.805 ± 0.08
<i>C.tropicalis</i> (10)	–	1.00 ± 0.00
<i>C.glabrata</i> (6)	–	1.00 ± 0.00
<i>C.guilliermondii</i> (6)	–	1.00 ± 0.00
<i>C.parapsilosis</i> (4)	–	1.00 ± 0.00
<i>C.krusei</i> (2)	–	1.00 ± 0.00
<i>C.kefyr</i> (1)	–	1.00 ± 0.00
Toplam (109)	49 (44.9)	

Fosfolipaz aktivitesi saptanan izolatların klinik örneklerle göre dağılımı Tablo II'de görülmektedir. *C.albicans* suşlarındaki fosfolipaz pozitiflik oranları ile izolasyon bölgeleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($X^2 = 5.5$; $p = 0.137$).

Tablo II: *C.albicans* İzolatlarının Klinik Örneklerle Göre Dağılımı

Klinik Örnek (İzolat sayısı)	Fosfolipaz Aktivitesi Saptanan İzolat Sayısı (%)	Ortalama Pz Peğeri
Kan (62)	42 (67.7)	0.805
BOS (9)	4 (44.5)	0.805
Periton mayi (6)	2 (33.3)	0.810
Kateter (2)	1 (33.3)	0.610
BAL (1)	–	–
Toplam (80)	49 (61.3)	0.805

TARTIŞMA

Fungal hastalıklar, hastanelerde ve toplumda risk altında bulunan hasta sayısının artışı nedeniyle son 20 yıldan fazla süredir önemli sağlık sorunu haline gelmiştir¹⁷⁻²⁰. Patogenezi açıklamak için pek çok test geliştirilmiş olup hayvan modellerinde de enfeksiyon oluşturularak konak savunma sistemi ve *Candida*'ya ait virülans faktörlerinin önemi ortaya konmuştur. Konak dokuya yayılmada etkili hücre dışı bir enzim olan fosfolipaz, *C.albicans*, *Cryptococcus neoformans* ve *Aspergillus fumigatus* gibi patojenik mantarlarda önemli virülans faktörleri arasında yer almaktadır^{12,21}.

Fosfolipaz enzim aktivitesinin modifiye Price plak yöntemi kullanılarak saptandığı çalışmamızda 80 *C.albicans* suşunun 49'unda (%61.3) fosfolipaz enzim aktivitesi saptanmıştır. Bu konu ile ilgili olarak aynı yöntem ile Yücesoy ve Yuluğ²² 175 *C.albicans* suşunun 120'sinde (%68.6), Arıkan ve arkadaşları²³ 258 *C.albicans* suşunun 203'ünde (%78.7), Yücel ve Kantarcıoğlu¹⁶ 54 *C.albicans* suşunun 51'inde (%94.4), Ener ve arkadaşları²⁴ 92 *C. albicans* suşunun 67'sinde (%72.8), Rezusta ve arkadaşları²⁵ 441 suşun 353'ünde (%80) fosfolipaz aktivitesi tespit etmişlerdir. Çalışmamızda saptanan oran kısmen düşük olmakla birlikte paralel doğrultudadır. Çalışmalardaki oranların farklı olmaları, çalışılan klinik örneklerin ve izolat sayılarının farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda *albicans* dışı *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesi saptanmamıştır. Yücesoy ve Yuluğ²² 23 *C.tropicalis*, 15 *C.parapsilosis*, 7 *C.guilliermondii*, 5 *C.glabrata*, 5 *C.krusei* ve 4 *C.kefyr* suşuyla yaptıkları çalışmada, bu suşların hiçbirisinde fosfolipaz aktivitesi gözlemediklerini bildirmişlerdir. Benzer olarak, Samaranayeke ve arkadaşları¹⁴, Rezusta ve arkadaşları²⁵ ve Ener ve arkadaşları²⁴ da çalışmalarında *albicans* dışı *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesi saptamamışlardır.

Çalışmamızda kan örneklerinden izole edilen suşların diğer örneklerden izole edilenlere göre daha yüksek fosfolipaz aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. İbrahim ve arkadaşları²⁶ fosfolipazın virülansdaki rolünü belirlemek için kan izolatları ile sağlıklı bireylerin ağızlarından izole edilen *C.albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesini incelemiş ve kan izolatlarında daha yüksek fosfolipaz aktivitesi saptamışlardır. Bu araştırmacılar ayrıca yüksek fosfolipaz aktivitesi bulunan suşlarla enfekte farelerde relatif ölüm riskinin daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir²⁶. Barrett-Bee ve arkadaşları⁶ da, fosfolipaz aktivitesinin mukoza invazyonu ile korelasyonu olduğunu ve daha fazla fosfolipaz üreten *C.albicans* suşlarının farelerde yüksek oranda mortaliteye neden olduğunu bildirmişlerdir.

Bilindiği gibi *C.albicans*, *Candida* enfeksiyonlarından en sık sorumlu olan ve tıbbi açıdan en önemli türdür²¹. Yapılan diğer çalışmaların ve sunduğumuz bu çalışmanın verileri göz önüne alındığında, fosfolipaz aktivitesinin *albicans* dışı *Candida* türlerinde görülmemesi, bu enzimin *C.albicans*'ın enfeksiyonlarda daha fazla rol oynamasını açıklayan faktörlerden birisi olarak düşünülmesine olanak tanımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Erbakan N: Derinin mantar hastalıkları, s: 173-215. 1989, Türkiye Klinikleri Yayınevi, Ankara.
2. İnci R: *Candida* enfeksiyonlarının patogenezinde konağın rolü. *Candida* Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Sempozyumu. 2002, Eskişehir. Tutanaklar, s: 71-83.

3. Edwards JE: *Candida* species, p: 2656-2674. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2000, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
4. Calderone RA, Fonzi VA: Virulence factors of *Candida albicans*. Trends Microbiol 2001, 9: 327-335.
5. Yücesoy M: Virulence factors and their role in the pathogenesis. 3rd Balkan Conference of Microbiology. 2003, Istanbul. Proceedings and Abstract Book, p: 77-85.
6. 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: 1217-1221.
7. Banno Y, Yamada T, Nozawa Y: Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*. Separation of three enzymes and some biological properties. Sabouradia 1985, 25: 47-54.
8. Kanoh H, Kitajima Y, Ghannoum MA, Nozawa Y: Molecular cloning of a second phospholipase B gene, caPBL2 from *Candida albicans*. Med Mycol 1999, 37: 61-67.
9. Bennett DE, McCreary CE, Coleman DC: Genetic characterization of phospholipase C gene from *Candida albicans*: Presence of homologous sequences in *Candida* species other than *Candida albicans*. Microbiology 1998, 144 (Pt 1): 55-72.
10. Hugh D, Cawson RA: The cytochemical localization of phospholipase A and lyso phospholipase in *Candida albicans*. Sabouradia 1975, 13: 110-113.
11. Kanoh H, Nakashimo S, Zhao Y, Sugiyama Y, Kitajima Y, Nozawa Y: Molecular cloning of a gene encoding phospholipase D from the pathogenic and dimorphic fungus, *Candida albicans*. Biochem Biophys Acta 1998, 1398: 359-364.
12. Ghannoum MA: Potential role of phospholipase in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev 2000, 13: 122-143.
13. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO: Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouradia 1982, 20: 7-14.
14. Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW: Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. Sabouradia 1984, 22: 201-207.
15. Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ N: Sağlıklı ve *Candida* infeksiyonlu bireylerden soyutlanan *Candida albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. İnfeks Derg 2000, 14: 405-408.
16. Yücel A, Kantarcioğlu AS: *Candida albicans* kökenlerinde bazı virülans faktörlerinin (fosfolipaz, proteaz, çimlenme borusu ve aderens) ve aralarındaki korelasyonun belirlenmesi. İnfeks Derg 2001, 15: 517-525.
17. Singh N: Changing spectrum of invasive candidiasis and its therapeutic implications. Clin Microbiol Infect 2001, 7 (Suppl 2): 1-7.
18. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK: Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: A three-year analysis. Clin Infect Dis 1999, 29: 239-244.
19. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O: The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. Clin Infect Dis 1997, 24: 1122-1128.
20. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR: Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. Clin Infect Dis 2002, 35: 627-630.
21. Yücel A, Kantarcioğlu AS: *Candida*'ların patojenik belirtgenleri. Cerrahpaşa J Med 2000, 31: 172-186.
22. Yücesoy M, Yuluğ N: *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. İnfeks Derg 1999, 4: 569-574.
23. Arıkan S, Sancak B, Haşçelik G, Günalp A: *Candida albicans* izolatlarında fosfolipaz aktivitesinin saptanması. Flora 1998, 3: 240-243.
24. Ener B, Babacan F, Bozok Johansson C: In vitro detection of phospholipase activity in *Candida* species. Med Bull Istanbul 1991, 24: 55-60.
25. Rezusta A, Alejandre MC, Gill J, Rubio MC, Salvo MS: Phospholipase activity in *Candida albicans*, *Candida spp.* and other yeasts, p: 149-153. In: Tümbay E, Seelinger HPR, Ang Ö (eds), *Candida* and Candidamycolosis. 1991, Plenum Press, New York.
26. İbrahim AS, Mirbod F, Filler SG, et al: Evidence implicating phospholipases a virulence factor of *Candida albicans*. Infect Immun 1995, 63: 1993-1998.