

Kan Kültürlerinden ve Diğer Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida parapsilosis* Kompleks Suşlarının Salgısal Asit Proteinaz, Fosfolipaz Aktivitesi ve Slime Üretiminin Karşılaştırılması

Nejla CEBECİ GÜLER*, İlknur TOSUN**

*Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Giresun

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon

ÖZ

Amaç: Yüksek mortalite ve morbidite nedeni olan hastane kaynaklı kan akımı enfeksiyonlarında *Candida* türleri en sık dört etkenden biridir. *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*'tan daha az virülan olarak kabul edilmesine rağmen, son yirmi yılda insidansında en fazla artış görülen *Candida* türü olmuştur. Çalışmamızda kan ve diğer klinik örneklerden izole edilen *C. parapsilosis* suşlarının salgısal asit proteinaz (Sap), fosfolipaz enzim aktivitelerinin ve slime üretiminin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: On sekiz aylık süreçte kan kültürleri ve diğer klinik örneklerden izole edilen 28 *C. parapsilosis* suşunun asit proteinaz aktivitesi süt tozu agaroz yöntemiyle, fosfolipaz aktivitesi yumurta sarılı agar yöntemiyle, slime üretimi ise glukozlu sıvı sabouraud besiyeri ve glukozlu triptik soy broth kullanılarak tüp adezyon yöntemi ile belirlendi.

Bulgular: Çalışma izolatlarının tümünde Sap aktivitesi belirlenemedi. Ancak kan ve kan dışı klinik izolatların Sap aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. İzolatların hiçbirinde fosfolipaz aktivitesi belirlenemedi. İzolatların 23'ünde her iki besiyeriyle de slime üretimi görüldü. Yalnızca bir izolat her iki besiyeri ile de slime negatifti. Dört izolatta ise iki farklı besiyeri ile slime üretimi açısından farklı sonuçlar elde edildi. Kan izolatları ile diğer klinik izolatların slime üretimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

Sonuç: *C. parapsilosis* izolatlarında Sap aktivitesi ve slime üretimi virülans faktörü olarak öne çıkmaktadır. Fosfolipaz aktivitesinin belirlenmesinde başka yöntemlerin kullanılmasının yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Fosfolipaz, *Candida parapsilosis*, salgısal asit proteinaz, Slime

ABSTRACT

Comparison of Secretory Acid Proteinase, Phospholipase Activity, and Slime Production in *Candida parapsilosis* Complex Strains Isolated from Blood Cultures and Other Clinical Samples

Objective: *Candida* species comprise one of the four most common agents in hospital-acquired bloodstream infections with high mortality and morbidity. Although *C. parapsilosis* is accepted as less virulent than *C. albicans*, it has been the *Candida* species with the highest increase in incidence within the last two decades. In our study, a comparison is made between the secretory acid proteinase (Sap), phospholipase enzyme activity and the slime production of *C. parapsilosis* strains isolated from blood with those isolated from other clinical samples.

Material and Methods: Sap activity was determined by the milk powder agarose method, phospholipase activity by the egg-yolk agar method and slime production by the tube adhesion method using a liquid Sabouraud medium with glucose and tryptic soy broth with glucose of 28 *C. parapsilosis* strains isolated from blood cultures and other clinical samples during a period of eighteen months.

Results: Sap activity was detected in all the study isolates; however, there was no statistically significant difference in Sap activity between the blood and non-blood clinical isolates. Phospholipase activity was not detected in any of the isolates. In 23 of the isolates, slime production was observed in both media, while only one isolate was slime negative in both culture media. In the remaining four isolates slime production results were different for the two different media. There was no statistically significant difference in slime production between the blood and other clinical isolates.

Conclusion: Sap activity and slime production are important virulence factors in the *C. parapsilosis* isolates. It is considered that methods other than egg-yolk agar may be useful in determining phospholipase activity in *C. parapsilosis* isolates.

Keywords: Phospholipase, *Candida parapsilosis*, secretory acid proteinase, Slime

Alındığı tarih: 21.04.2017

Kabul tarihi: 16.06.2017

Yazışma adresi: Nejla Cebeci Güler, Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, B Blok, K:2, Gazipaşa Yerleşkesi, Debbay Mevkii, 28100 Giresun

e-posta: nejlacebeci52@hotmail.com

GİRİŞ

Yüksek mortalite ve morbidite nedeni olan hastane kaynaklı kan akımı enfeksiyonlarında *Candida* türleri en sık görülen dört etkenden biri olarak karşımıza çıkmaktadır⁽¹⁾. *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*'tan daha az virülan olarak kabul edilmesine rağmen, 1990'lardan günümüze kadar insidansında en fazla artış görülen *Candida* türü olmuştur. Çok sayıda çalışmada kan kültürlerinden en sık izole edilen ikinci *Candida* türü olduğu rapor edilmiştir. Hatta günümüzde bazı Avrupa, Asya ve Kuzey-Güney Amerika hastanelerinde *C. albicans*'ın önüne geçtiği bildirilmiştir⁽²⁾. Ülkemizde de kan kültürlerinden ikinci sıklıkta⁽³⁾ izole edilen *Candida* türü olduğu bildirilmekle birlikte, ilk sırada⁽⁴⁾ yer aldığı da rapor edilmiştir.

Salgısal hidrolitik enzimler *C. albicans*'ın adhe-ransını, doku penetrasyonunu ve dolayısıyla konak invazyonunu kolaylaştıran önemli virülans faktörleridir. Salgısal asit proteinaz (Sap) ve fosfolipaz, karakterize edilmiş bu enzimler arasında en önemlileridir⁽⁵⁻⁷⁾. Ancak non-albicans *Candida* türlerinde bu patojenite belirleyicilerinin varlığı büyük oranda belirsizdir.

Araştırmacılar *C. parapsilosis* fungemilerinin artışını, bu organizmanın özellikle kateterlere ve benzeri plastik yüzeylere tutunma eğiliminin yüksek olmasıyla açıklamaktadırlar⁽⁸⁾. Yüzeylere tutunma kapasitesi slime oluşumuyla bağlantılıdır ve slime oluşumu *Candida*'larda böyle enfeksiyonlara yol açan temel faktördür. İzole edilen suşlarda slime oluşumunun gösterilmesi, bir slime odağının olası varlığının ve antimikotik tedavi sırasındaki olası farklılıkların belirleyicisidir^(9,10).

Candida'ların virülans faktörlerinin belirlenmesi enfeksiyon etiolojisindeki rolleri açısından önemlidir. Bu nedenle çalışmamızda kan ve kan dışı klinik örneklerden izole edilen

C. parapsilosis kompleks suşlarının salgısal asit proteinaz ve fosfolipaz enzim aktivitesi ve slime üretimi özelliklerinin değerlendirilmesi, kan ve diğer klinik izolatlardan bu virülans faktörleri açısından karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar ve kültür besiyerleri. Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'nda on sekiz aylık süreçte kan ve kan dışı klinik örneklerden izole edilen 28 *C. parapsilosis* kompleks suşu dâhil edildi. Yirmi sekiz suşun 15'i kan kültürlerinden, 13'ü diğer klinik örneklerden izole edildi. Kan dışı izolatlardan 6 idrar, 2 yara, 1 idrar sondası, 1 yanık, 1 ağız içi lezyon, 1 kulak sürüntüsü ve 1 tırnak izolatından oluşmaktaydı. Çalışma izolatlarda germ tüp testi ile *C. albicans* ve *C. dubliniensis* diğer *Candida*'lardan ayrıldı. Bu türler dışındaki *Candida* türleri API 20C AUX (BioMérieux, Fransa) ticari kiti kullanılarak tür düzeyinde tanımlandı. Suşlar Mısır unu-tween 80 agardaki (Corn Meal Agar, Himedia, Hindistan) mikroskopik görünüşleri ve kromojenik agardaki (CHROMagar, BD, ABD) koloni renkleriyle de tanımlandı. *C. parapsilosis* kompleks olarak tanımlanan suşlar gliserollü YEPD sıvı besiyeri (maya özütü %1, pepton %2, dektroz %2, gliserol %20 w/v) içerisinde -80°C'de saklandı.

Proteinaz aktivitesi. Proteinaz aktivitesi Banerjee ve ark.'nın⁽¹¹⁾ önerdiği şekilde süt tozu agaroz yöntemiyle belirlendi. Sığır serum albumini (BSA) içeren sıvı besiyeri %0.17 yeast nitrogen base (YNB) w/o aa ve as, %2 glukoz, %0.2 BSA olacak şekilde distile suda hazırlanıp, pH 4.0'a ayarlandıktan sonra 0.45 µm'lik filtre ile steril edilerek steril tüplere 2'şer ml dağıtıldı. Test edilecek suşlardan 107 hücre, BSA sıvı besiyeri içerisine ekim yapıldı ve 30 °C'de çalkalayıcı su banyosunda 200 rpm'de 3 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda

elde edilen kültür süpernatantları -20 °C'de saklandı. Süt tozu ilaveli agaroz, %1 yağsız süt tozu (Pınar, Türkiye), %1 agaroz ve 0.114 M sodyum asetat (pH 5.2) tamponu ile hazırlandı ve 1 mm kalınlığında cam plaka üzerine dökülüp katılması beklendi. Kültür süpernatantları agaroz üzerine damlatıldı ve oda ısısında 24 saat inkübe edildi. Süt tozu içerisindeki kazeinin parçalanması ile oluşan beyaz zonların çapları ölçülerek, suşların Sap aktiviteleri değerlendirildi. Hiç presipitasyon zonu görülmeyenler suşlar Sap aktivitesi negatif, presipitasyon zonu ≤ 0.5 cm ise (+), 0.6-0.9 cm ise (++) , 1-1.4 cm ise (+++) , ≥ 1.5 cm ise (++++) olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak *C. albicans* CBS 2730 (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Hollanda) suşu kullanıldı.

Fosfolipaz aktivitesi. Suşların fosfolipaz aktivitesi yumurta sarılı agar kullanılarak belirlendi⁽¹²⁾. Yumurta sarılı agar besiyeri 1.25 g pepton, 2.75 g glukoz monohidrat, 2.5 g agar, 7.3 g sodyum klorit, 0.07 g kalsiyum klorür heksahidrat 115 ml distile su içinde çözülerek hazırlandı ve otoklavlanarak steril edildi. Yumurta sarısını hazırlamak için yumurtalar steril koşullarda kırılarak sarısı ayrıldı, üzerine eşit hacimde serum fizyolojik eklendi ve manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 2000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatantı ayrıldı. On ml süpernatant ile 125 ml sitrik asit disodyum fosfat tamponu (pH: 4.4) ilk hazırlanan besiyerine eklendi ve bu besiyeri petrilere 4 mm kalınlığında döküldü. McFarland standart bulanıklığı 0.5 olan maya süspansiyonlarından 5 μ l, yumurta sarılı besiyeri üzerine değdirilmek suretiyle ekim yapıldı ve 37°C'de 8 gün inkübe edildi. Fosfolipaz aktivitesinin ölçülmesinde ve hesaplanmasında, koloninin etrafında oluşan halka şeklindeki presipitasyon zonu (Pz) dikkate alındı. Fosfalipaz aktivitesi, koloni çapının koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı olarak hesaplandı. Bu sistemde Pz değeri küçüldükçe fosfalipaz aktivitesi artmakta, Pz=1.00 değeri,

test edilen suşun fosfalipaz aktivitesinin negatif olduğunu göstermektedir. Suşlar Pz değeri 0.9-1.00 ise (+), 0.89-0.8 ise (++) , 0.79-0.7 ise (+++) , <0.69 ise (++++) olarak değerlendirildi. *C. albicans* ATCC 10231 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, ABD) pozitif kontrol olarak kullanıldı.

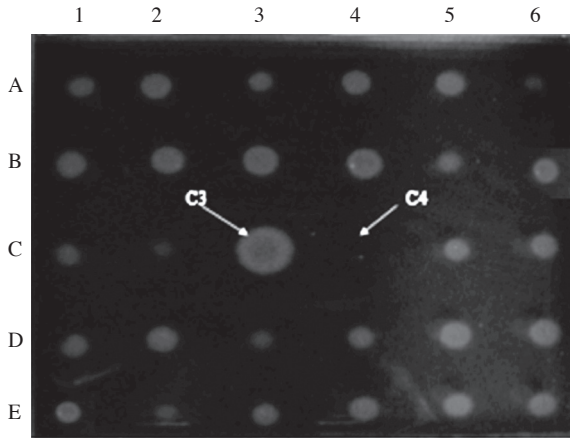
Slime üretimi. Koagülaz negatif stafilokoklarda slime üretiminin belirlenmesi için tanımlanan yöntem esas alındı^(13,14). Glikozlu sıvı Sabouraud besiyeri (GSSB) için 10 g pepton ve 80 g glukoz 1000 ml distile su içinde çözülerek tüplere 5'er ml dağıtıldı. Glikozlu triptik soy broth besiyeri (GTSB) için 17 g kazein pepton, 3 g soya peptonu, 5 g sodyum klorit, 2.5 g dipotasyum hidrojen fosfat ve 80 g glukoz 1000 ml distile su içinde çözülüp tüplere 5'er ml dağıtıldı. SDA'daki maya kolonilerinden birer öze dolusu alınarak Falkon tüplerdeki Sabouraud sıvı besiyeri ve triptik soy broth içerisine inoküle edildi. Tüpler 35°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra sıvı besiyeri tüplerden uzaklaştırıldı ve tüplerin kenarları %0.25'lik safranin ile boyandı. Ayrıca GSSB ve GTSB içeren tüpler hazırlandı; maya inokülasyonu yapılmayan bu tüpler negatif kontrol olarak kullanıldı. Tüp duvarında herhangi bir slime tabakası olmaması veya tüpte yalnızca hava-sıvı seviyesinin olduğu yerde halka şeklinde boya tutulumu olması negatif olarak değerlendirildi. Tüpün çeperlerindeki slime oluşumu var ya da yok şeklinde çıplak göz ile belirlendi.

Bütün deneyler iki kez gerçekleştirildi ve iki gözlemci tarafından ayrı ayrı değerlendirildi.

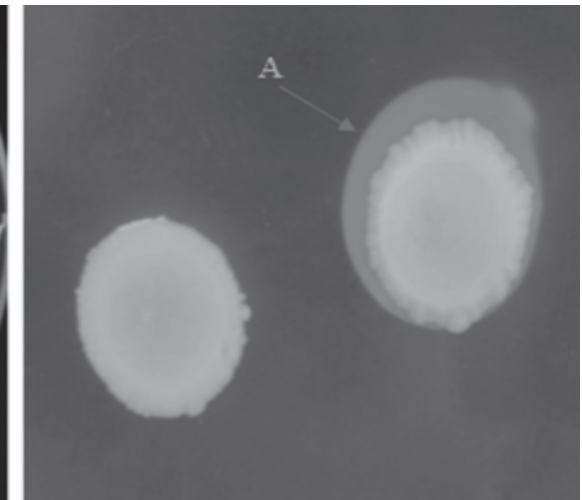
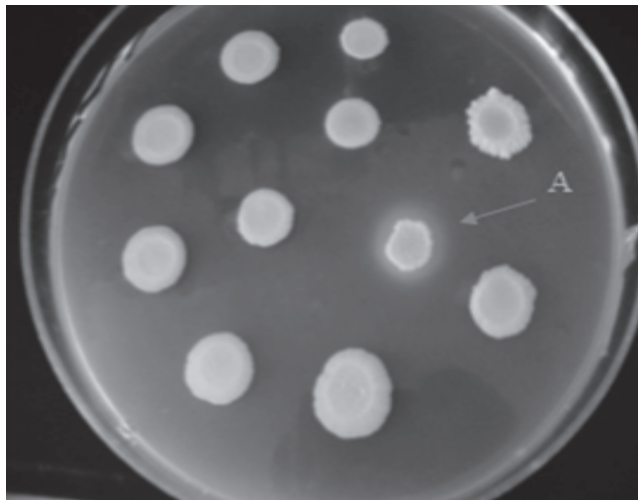
İstatistiksel analiz: Kan kültürlerinden ve diğer klinik örneklerden izole edilen suşların proteinaz, fosfolipaz aktiviteleri ve slime üretimleri arasındaki fark ki-kare (χ^2) testi ile değerlendirildi, $p < 0.05$ değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Proteinaz. Kan izolatlarının 12'si (++) , 3'ü (+); idrar izolatlarının 5'i (++) , 1'i (+); 2 yara izolatu (++) ; idrar sondası izolatu (++) , yanık izolatu (++) , ağız içi lezyon izolatu (++) , kulak izolatu (++) ve tırnak izolatu (+) proteinaz aktivitesi belirlendi. Resim 1'de çalışma izolatlarımızın süt tozu agaroz üzerindeki Sap aktivitesi zonları görülmektedir. Çalışmamızda, Sap aktivitesi açısından kan izolatları ile diğer klinik izolatlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Sap aktivitesi için $p=1.00$, χ^2 test, $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.).



Resim 1. Süt tozu agaroz üzerinde Sap aktivitesi zonları. D3: +, B3: ++ görünümü temsil eder. C3: *C. albicans* CBS 2730 (+++), C4: negatif kontrol (BSA sıvı besiyeri)



Resim 2. Yumurta sarılı agarda pozitif kontrol suşunun (A) koloni etrafında oluşturduğu presipitasyon zonu (Pz: 0.79) ve fosfolipaz negatif çalışma suşlarının koloni görünümüleri.

Sap aktivitesi (+) bulunanlar klinik izolatlar, kan (n:3), idrar (n:1) ve tırnak (n:1) izolatlarıydı.

Fosfolipaz. Çalışma izolatlarımızın (n:28) hiçbirinde fosfolipaz aktivitesini gösteren presipitasyon zonu (opak zon) görülmedi. Resim 2'de yumurta sarılı agarda, pozitif kontrol suşunun kolonisi etrafında oluşturduğu presipitasyon zonu (Pz:0.79) ve fosfolipaz negatif çalışma suşlarının kolonileri görülmektedir.

Slime üretimi. GSSB ve GTSB ile yapılan tüp tutunma deneylerinde kan ve diğer klinik izolatların slime üretimi sonuçları Tablo 1'de görülmektedir. Toplam 23 suşta her iki besiyeriyle de slime oluşumu görüldü. Yalnızca bir kan izolatu iki besiyeri ile de slime negatif bulundu. Diğer dört suşta ise iki besiyeriyle farklı sonuçlar elde edildi. Üç suş GSSB ile slime üretimi pozitif, GTSB ile negatif bulunurken; 1 suş GTSB ile slime üretimi pozitif, GSSB ile negatif bulundu. Slime pozitif ve negatif suşların tüp görünümleeri Resim 3'te görülmektedir. Çalışmamızda, kan izolatları ile diğer klinik izolatların slime üretimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. (GSSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde $p=0.484$, GTSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde $p=1.00$, χ^2 test, $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi).

Tablo 1. *Candida parapsilosis* suşlarının GSSB ve GTSB ile slime üretimi sonuçları.

		Kan		Kan dışı örnekler		Toplam	
		Pozitif n (%)	Negatif n (%)	Pozitif n (%)	Negatif n (%)	Pozitif n (%)	Negatif n (%)
Besiyeri	GSSB	13 (86.7)	2 (13.3)	13 (100)	0 (0)	26 (92.8)	2 (7.2)
	GTBS	12 (80)	3 (20)	10 (76.9)	3 (23.1)	22 (78.5)	6 (21.5)

GSSB: Glukozlu sıvı sabouraud besiyeri, GTSB: Glukozlu triptik soy broth besiyeri



Resim 3. Slime üretimi pozitif (sol) ve negatif (sağ) suşların tüp görünüşleri.

TARTIŞMA

Candida enfeksiyonlarının patogeneğinde virülans faktörlerinin önemi büyüktür. Hücre dışı Sap ve fosfolipaz hidrolitik enzimlerinin bu virülans faktörlerinden olduğu gösterilmiştir⁽⁵⁾. *Candida*'larda asit proteinaz varlığı ilk defa 1965 yılında Staib tarafından saptanmış ve 3 yıl sonra Remold ve Fasold proteinaz enzimini saflaştırarak özelliklerini belirlemişlerdir^(6,15). Fosfolipaz aktivitesi ilk kez 1968 yılında Costa ve ark.⁽⁷⁾ tarafından gösterilmiş ve fosfolipaz B 1995 yılında saflaştırılmıştır. Bu hidrolitik enzimler konak dokuya invazyon yoluyla patojenitede etkili olurlar⁽⁵⁾. Slime faktör üretimi özellikle koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonlarında ayrıntılı biçimde incelenmiş ve mik-

roorganizmanın virülansını artırdığı saptanmıştır⁽¹⁶⁾. Slime üretimi *Candida*'lar için de patojenite faktörü olarak kabul edilmektedir. Slime faktör varlığında *Candida*'ların konak hücrelerine, protez ve kateter yüzeylerine tutunup daha kolay kolonizasyon ve enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmektedir. Araştırmacılar *C. parapsilosis* fungemilerinin artışı, bu organizmanın slime oluşturma yeteneği ile açıklamaktadırlar⁽⁸⁾.

Dağdeviren ve ark.⁽¹⁷⁾, toplam 33 *C. parapsilosis* suşu ile BSA agar yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmalarında, *C. parapsilosis* suşlarının 14'ünün (%42.42) asit proteinaz ürettiğini ve bu izolatların 11'inin (%79) güçlü (++) Sap aktivitesi gösterdiğini belirlemişlerdir. On dokuz kan izolatinin 5'i (%26.31) ve diğer klinik izolatların 9'u (%64.29) proteolitik aktivite göstermiştir. Bu iki grup arasında fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Kan dışı klinik izolatların tümü asit proteinaz aktivitesine sahip iken, bu gruptaki 5 idrar izolatu en yüksek düzey (++) Sap aktivitesi göstermiştir. França ve ark.'nın⁽¹⁸⁾ çalışmasında, 34 *C. parapsilosis* izolatinin 31'i (%91.2) proteaz aktivitesi göstermiştir. Bu izolatların %38.2'si güçlü proteinaz aktivitesine (+++) sahiptir. Kan kültüründen izole edilen 7 *C. parapsilosis* suşunun tamamının diğer klinik örneklerden (trakeal sekresyon, cilt ve tırnak) izole edilen suşlardan düşük olmakla birlikte, proteinaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. *C. parapsilosis*'in hem vulvovajinal hem de deri izolatlarının kan izolatlarına göre daha yüksek in vitro Sap aktivitesi sergilemesi bakımından Sap üretimi ve izolasyon yeri arasında ilişki belirlenmiştir. Bu nedenle,

Saps, lokalize invaziv hastalara (özellikle vajinal enfeksiyonlarda) kıyasla kan dolaşımı enfeksiyonlarının patogenezi için daha az önemli görünmektedir⁽²⁾. İlginç bir veri olarak, Brezilya, Sao Paulo'da kandidürüli hastalardan izole edilen *C. parapsilosis* suşlarının (n=4) hepsi proteolitik aktivite sergilemiştir⁽¹⁹⁾. Mohan ve Ballal'ın⁽²⁰⁾ çalışmalarında da, kan kültürlerinden izole edilen 5 *C. parapsilosis* izolatının tümünde proteinaz aktivitesi belirlenmiştir. Gürcan ve ark.⁽²¹⁾ kan kültürlerinden izole edilen farklı *Candida* türlerinde yaptıkları çalışmada, 33 *C. parapsilosis* suşunun hiçbirinin fosfolipaz aktivitesi göstermediğini belirlerken, BSA içeren katı besiyeri kullandıkları deneylerinde suşların %85'inde proteolitik aktivite belirlemişlerdir. Çalışmamızda, hem kan hem de kan dışı klinik izolatların tümünde Sap aktivitesi saptanırken hiçbir izolatta fosfolipaz aktivitesi belirlenmemiştir. Hem asit proteinaz hem de fosfolipaz aktivitesi açısından kan izolatları ile diğer izolatlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Sap aktivitesi için $p=1.00$, χ^2 test). Çalışmamızda yalnızca bir hastanın hem kan hem idrar sondası izolatu bulunmaktadır, diğer tüm izolatlar farklı hastalardan izole edilmiştir. Bu hastanın aynı tarihte laboratuvara gönderilen kan izolatında (+), idrar sondası izolatında (++) Sap aktivitesi belirlenirken, slime üretimi iki farklı besiyerinin ikisinde de pozitif bulunmuştur. Literatürdeki tutarsız sonuçlar, çalışmalarda inokulum miktarı, inkübasyon süresi, substrat ve özellikle zon çapına atfedilen pozitiflik derecesinin farklılık göstermesinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca literatürdeki *C. parapsilosis* kompleks Sap aktivitesi çalışmaları genellikle az sayıda suşla yapılmıştır ve kan dışı klinik örnek tipleri değişkenlik göstermektedir. Suş sayısının artırıldığı çalışmalar, bu türün Sap aktivitesini daha iyi açıklayacaktır.

Çalışmamızda suşların fosfolipaz aktivitesini ölçmek için yumurta sarılı besiyeri kullanılmıştır. Yumurta sarılı agara fosfolipit kaynağı olarak

yumurta sarısı eklenmiştir. Yumurta sarılı besiyeri esasen fosfalipaz B aktivitesini ortaya çıkarmaktadır. İbrahim ve ark.⁽²²⁾ yaptıkları bir çalışmada, hangi tip fosfolipazın tüm aktiviteye katkı sağladığını değerlendirmişler ve izolatların fosfolipaz B aktivitesi ile toplam hücre dışı fosfalipaz aktiviteilerinin iyi korelasyon gösterdiğini saptamışlardır.

Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin fosfolipaz aktivitesi yönünden büyük değişiklikler gösterdiği saptanmıştır. Uzun bir dönem *Candida* türleri arasında, fosfolipaz üretiminin *C. albicans*'a özgü olduğu gibi bir izlenim edinilmiştir. Samaranayake ve ark.⁽¹²⁾, 41 *Candida* izolatının fosfolipaz üretimini yumurta sarılı agar yöntemi ile taramış ve test edilen *C. albicans* suşlarının %79'unun hücre dışı fosfalipaz ürettiğini, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* ve *C. tropicalis* suşlarının ise bu aktiviteyi göstermediğini saptamışlardır. Shimizu⁽²³⁾ ve Kantarcıoğlu⁽²⁴⁾, yumurta sarılı besiyeri kullanarak yaptıkları çalışmalarında, *C. parapsilosis* suşlarında fosfolipaz aktivitesi saptamadıklarını belirtmişlerdir. Çalışmamızda da, *C. parapsilosis* kompleks suşlarında fosfolipaz aktivitesi saptanmamıştır. Buna karşın, Barrett-Bee ve ark.⁽²⁵⁾ ise, RIA yöntemiyle *C. parapsilosis* suşlarının düşük oranda fosfalipaz aktivitesi gösterdiğini saptamışlardır. Ghannoum ve ark.⁽⁷⁾, 51 izolatın test edildiği çalışmalarında, hem yumurta sarılı besiyeri hem de kolorimetrik yöntemler kullanılarak *albicans* dışı *Candida* türlerinin de hücre dışı fosfalipaz ürettiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada, *C. glabrata* suşlarının %41'inin, *C. parapsilosis* suşlarının %51'inin, *C. tropicalis* suşlarının %70'inin, *C. lusitanae* suşlarının %80'inin ve *C. krusei* suşlarının %100'ünün saptanabilir düzeyde fosfalipaz ürettikleri gösterilmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar, *albicans* dışı *Candida* türlerinde saptanan fosfolipaz aktivitesinin *C. albicans*'a göre daha düşük düzeyde olduğunu vurgulamışlardır. *C. parapsilosis* patogeneğinde fosfolipazların rolü daha az açıklana-

bilmiştir. Bazı araştırmacılar, *C. parapsilosis* suşlarının %51'inde fosfolipaz aktivitesi bildirirken ve bazıları fosfolipaz aktivitesi belirlememişlerdir⁽²⁾. Ayrıca, bazı araştırmacılar sistemik ve yüzeysel izolatları karşılaştırırken yalnızca kan dolaşımı izolatlarında fosfolipaz aktivitesini tanımlarken⁽¹⁷⁾, diğerleri yüzeysel *C. parapsilosis* izolatlarında sistemik izolatlardan çok daha yüksek aktiviteler açıklamaktadır⁽²⁶⁾. Brezilya'nın Sao Paulo kentinde kandidi'ye neden olan dört *C. parapsilosis* suşundan yalnızca bir tanesi fosfolipaz aktivitesi sergilemiştir⁽¹⁹⁾. Dolayısıyla bu aktivite bulguları çelişkilidir. Verilerdeki bu tür tutarsızlıklar, test edilen suşlar arasındaki biyolojik farklılıkların yanı sıra düşük suş sayılarının sonucu olabilir.

İlk defa 1982'de Christensen tarafından *Staphylococcus epidermidis* için tanımlanan slime faktör; protein, hekzoaminler, nötral şekerler, fosforlu bileşikler gibi birçok maddenin oluşturduğu karışık bir yapıdır⁽¹³⁾. *Candida*'larda yapılan slime aktivitesi çalışmaları daha çok *C. parapsilosis* üzerine yoğunlaşmıştır. Farklı *C. parapsilosis* izolatlarının çeşitli dokularda hastalığa neden olma kapasiteleri, slime oluşturma yeteneklerinden etkilenebilir. Brancini ve ark.⁽⁹⁾, kan ve kataterden izole edilen 30 *C. parapsilosis* izolatının 24'ünde (%80) slime üretimi belirlemişlerdir. İzolatların çoğu (%67) orta (2+, 3+ pozitif) ya da güçlü (4+) slime üretimi gösterirken, dört izolat (%13) zayıf (1+) pozitif bulunmuştur. Altı izolatta ise (%20) slime üretimi belirlenmemiştir. Bu çalışmada, slime testinin yinelenebilirliği >%95 olarak bildirilmiştir. Özkan ve ark.⁽²⁷⁾, kan kültürlerinden izole edilen 19 *C. parapsilosis* suşunun tüp tutunma yöntemi ile %89.4'ünün slime pozitif olduğunu bildirmişlerdir. Kandan izole edilen *Candida* suşlarında slime aktivitesinin araştırıldığı başka bir çalışmada tüp tutunma yöntemi kullanılarak 4 *C. parapsilosis* suşunun 2'si slime pozitif bulunmuştur⁽²⁸⁾. Yücesoy ve Karaman⁽²⁹⁾, tüp tutunma deneyi ile slime pozitifliğini 12

C. parapsilosis izolatında %17 olarak belirlemişlerdir. Pfaller ve ark.⁽³⁰⁾ 60 *C. parapsilosis* izolatının 39'unda (%65) slime üretimi belirlemişlerdir. İzolatların 22'si (%37) orta veya güçlü slime pozitif, 17'si (%28) zayıf slime pozitifken; 21 izolat (%35) slime üretimi negatif belirlenmiştir. Testin yinelenebilirliğini %100 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada, kan ve katater izolatlarının slime üretme yeteneği diğer izolatlarından yüksek bulunmuştur. Aynı yöntemle yapılan başka bir çalışmada, kan kültürlerinden izole edilen 35 *C. parapsilosis* suşunun %86'sı slime pozitif bulunurken, diğer örneklerden izole edilen 17 *C. parapsilosis* suşunun %47'si slime pozitif bulunmuş, kan izolatları ile diğer izolatların slime üretimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmiştir⁽³¹⁾. İkinci bir çalışmada kan dolaşımı izolatlarının %59'unun ve deri izolatlarının %39'unun slime ürettiği belirlenmiştir⁽³²⁾. Buna karşın, başka bir araştırma, kan izolatlarının yalnızca %21.8'inin slime oluşturabilecek özellikte olduğunu bulmuştur⁽³³⁾. Sonuçlardaki farklılık, slime üretimini değerlendirmek için kullanılan koşullara ve çalışmadan önce suşun depolanma uzunluğuna ve yöntemine bağlı olabilir. Slime üretimi *C. parapsilosis* suşlarında yüksek oranlarda saptanmıştır. Çalışmamızda, GSSB kullandığımız tüp tutunma deneyinde tüm izolatların %92.8'inde, GTSB kullandığımız tüp tutunma deneyinde ise tüm izolatların %78.5'inde slime oluşumu görülmüştür. Çalışmamızda, GSSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde, kan izolatlarının %86.7'si pozitif, diğer izolatların ise %100'ü pozitif belirlenmiştir. GTSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde, kan izolatlarının %80'i pozitif, diğer izolatların ise %76.9'u slime pozitif bulunmuştur. Çalışmamızda, kan izolatları ile diğer izolatların slime oluşturma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (GSSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde p=0.484, GTSB ile yapılan tüp tutunma deneyinde p=1.00, χ^2 test, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.). Ancak dört suşta iki besiyeri ile farklı sonuçlar elde edil-

miştir. Üç suş GSSB ile slime üretimi pozitif, GTSB ile negatif bulunurken, 1 suş GTSB ile slime üretimi pozitif, GSSB ile negatif bulunmuştur. Slime üretiminin tesbitinde GSSB'nin daha iyi bir tercih olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, *Candida parapsilosis* kompleks izolatlarında Sap aktivitesi ve slime üretimi virülans faktörü olarak öne çıkmaktadır. Çalışmamızda kan ve kan dışı klinik izolatlar, Sap aktivitesi ve slime üretimi bakımından farklılık göstermemiştir. Fosfolipaz aktivitesinin tesbiti için yumurta sarılı agarın hazırlanmasında değişiklikler yapılmasının yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Med* 1991; 16:91(3B):S86-9.
2. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21:606-25. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-08>
3. Gültekin B, Eyigör M, Telli M, Aksoy M, Aydın N. Yedi yıllık dönemde kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin retrospektif olarak incelenmesi. *Ankem Derg* 2010; 24:202-8.
4. Etiz P, Kibar F, Ekenoğlu Y, Yaman A. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* türlerinin dağılımının ve antifungal duyarlılıklarının retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Ankem Derg* 2015; 29:105-13.
5. Schaller M, Borelli C, Kortling HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005; 48:365-77. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x>
6. Naglik RJ, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67:400-28. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003>
7. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:122-43. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.1.122-143.2000>
8. Weems JJ Jr. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis* 1992; 14:756-66. <https://doi.org/10.1093/clinids/14.3.756>
9. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol* 1994; 32:452-6.
10. Růžicka F, Holá V, Votava M, Tejkalová R. Detection and significance of biofilm formation in yeasts isolated from hemocultures. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:150-5.
11. Banerjee A, Ganesan K, Datta A. Induction of secretory acid proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1991; 137:2455-61. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-10-2455>
12. Samaranyake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia* 1984; 22:201-7. <https://doi.org/10.1080/00362178485380331>
13. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surface. *Infect Immun* 1982; 37:318-26.
14. Cevahir N, Demir M, Mete E, Kaleli İ. *Candida* suşlarında farklı yöntemlerle slime üretiminin araştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2003; 17:67-70.
15. Staib F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* 1965; 4:187-93. <https://doi.org/10.1080/00362176685190421>
16. O'Gara JP, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol* 2001; 50:582-7. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-7-582>
17. Dağdeviren M, Çerikçiöglü N, Karavuş M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* on strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. *Mycoses* 2005; 48:321-6. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01145.x>
18. França EJG, Furlaneto-Maia L, Quedas RMB, Favero D, Oliveira MT, Furlaneto MC. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. *Mycoses* 2011; 54:e44-51. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01825.x>
19. da Silva EH, Ruiz L da S, Matsumoto FE, et al. Candiduria in a public hospital of São Paulo (1999-2004): characteristics of the yeast isolates. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007; 49:349-53. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652007000600003>
20. Mohan das V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25:208-10.
21. Gürcan Ş, Alver A, Ercan İ, Ener B. Çeşitli *Candida* türlerinde virülansın değerlendirilmesi: İn vitro ve in vivo çalışma. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30:1493-502. <https://doi.org/10.5336/medsci.2009-16724>
22. İbrahim AS, Mirbod F, Filler SG, et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995; 63:1993-8.
23. Shimizu MT, Almeida NQ, Fantinato V, Unterkircher CS. Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. *Mycoses* 1996; 39:161-7. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1996.tb00120.x>
24. Kantarcioğlu AS. Detection of phospholipase and proteinase production in clinical isolates of *Candida* species. 9th European Congress of Clinical Microbiology

- and Infectious Diseases, Abstracts, Berlin, Almanya; 1999:340.
25. **Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryles JF.** A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol* 1995; 131:1217-21.
26. **Fernanado PH, Panagoda GJ, Samaranayake LP.** The relationship between the acid and alkaline phosphatase activity and the adherence of clinical isolates of *Candida parapsilosis* to human buccal epithelial cells. *APMIS* 1999; 107:1034-42. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1999.tb01507.x>
27. **Özkan S, Kaynak F, Kalkancı A, Abbasoğlu U, Kuştimur S.** 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 Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:319-23. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000300019>
28. **Vinitha M, Ballal M.** Biofilm as virulence marker in *Candida* isolated from blood. *World J Med Sci* 2007; 2:46-8.
29. **Yücesoy M, Karaman M.** *Candida* türlerinin biyofilm üretimi ve antifungal duyarlılık paternleri. *Mikrobiyol Bul* 2004; 38:91-8.
30. **Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ.** Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995; 21:9-14. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(94\)00114-C](https://doi.org/10.1016/0732-8893(94)00114-C)
31. **Shin JH, Kee SJ, Shin MG, et al.** Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1244-8. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1244-1248.2002>
32. **Růzicka F, Holá V, Votava M, Tejkalová R.** Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. *Folia Microbiol (Praha)* 2007; 52:209-14. <https://doi.org/10.1007/BF02931300>
33. **Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, et al.** Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol* 2007; 45:1843-50. <https://doi.org/10.1128/JCM.00131-07>