

Kan ve Oral Kavite Örneklerinden Soyutlanan *Candida albicans* Suşlarının Fosfolipaz Aktivitelerinin Araştırılması[§]

Investigation of Phospholipase Activity in *Candida albicans* Strains Isolated From Blood and Oral Cavity Specimens

Buşe Tunç[®], Ebru Demiray Gürbüz[®], Mine Doluca Dereli[®]

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Atf/Cite as: Tunç B, Demiray Gürbüz E, Doluca Dereli M. Kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *Candida albicans* suşlarının fosfolipaz aktivitelerinin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(1):50-60.

Öz

Amaç: Bu çalışmada, kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *Candida albicans* suşlarında, konak hücre membranlarındaki fosfolipitleri parçalayan fosfolipaz B1, B2, C1 ve D1 aktivitesinin incelenmesi ve grup farklılıklarının araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Suşların fosfolipaz aktivitesi, plak yöntemi ve ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) ile araştırıldı.

Bulgular: Plak yöntemi ile kan ve oral kavite suşlarının sırasıyla 26 (%86.7) ve 24'ünde (%80.0) fosfolipaz aktivitesi belirlendi. Grupların fosfolipaz olumluluk oranları karşılaştırıldığında, anlamlı bir fark gözlenmedi ($\chi^2=0.48$; $p=0.49$) ancak Pz ortalamaları (0.6138 ± 0.9823 , 0.6988 ± 0.9910) arasında anlamlı bir fark saptandı ($p=0.007$). RT-PZT ile kan ve oral izolatların tümünde (%100) PLB1, sırasıyla 29 (%96.7) ve 30 (%100.0)'unda PLB2, 27 (%90.0)'si ve 22 (%73.3)'sinde PLC1, 27 (%90.0) ve 21 (%70.0)'inde ise PLD1 ekspresyonu belirlendi. PLB1 ekspresyonu açısından iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmazken ($t=-0.307$; $p=0.760$), PLB2 ekspresyonu kan izolatlarında anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0.043$). PLC1 ekspresyon düzeyi oral suşlarda anlamlı derecede yüksek ($p<0.001$) saptanırken, PLD1 ekspresyonu açısından iki grup arasında istatistiksel fark izlenmedi ($p=0.732$). PLB1, PLB2, PLC1 ve PLD1 ekspresyonunun fenotipik yöntemle sırasıyla %100, %81.7, %71.6 ve %76.7 oranlarında; tüm genlerin ekspresyonu dikkate alındığında da %83.3 uyumlu olduğu görüldü. Pz değerleri ile fosfolipaz genlerinin ekspresyon düzeyleri arasında bir korelasyon saptanmadı (sırasıyla $p=0.602$; $p=0.555$; $p=0.241$; $p=0.096$).

Sonuç: Çalışmamıza alınan *C. albicans* izolatlarında yüksek oranlarda fosfolipaz aktivitesinin belirlenmesi, bu enzimlerin üretiminin virulans açısından önemli bir rol oynadığını desteklemekte olup, bulgularımız doğrultusunda PLB2 ve PLC1 enzimlerinin sırasıyla invaziv ve oral enfeksiyonlarda daha etkin olduğu söylenebilir, ancak bu konuda daha geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim söz konusudur.

Anahtar kelimeler: *Candida albicans*, fosfolipaz, RT-PZT

ABSTRACT

Objective: The aim of the present study was to investigate and compare the phospholipase B1, B2, C1 and D1 activities in *C. albicans* strains isolated from blood cultures and oral cavity specimens.

Method: Phospholipase activity of the strains was examined by plate method and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PZT).

Results: Twenty-six (86.7%) strains isolated from blood and 24 (80.0%) from oral cavities revealed phospholipase activity by plate method. No statistically significant difference ($\chi^2=0.48$; $p=0.49$) was observed between the groups. However statistical difference was determined between the mean Pz values (0.6138 ± 0.9823 ; 0.6988 ± 0.9910) ($p=0.007$). PLB1 expression was detected in all (100%), PLB2 in 29 (96.7%) and 30 (100.0%), PLC1 in 27 (90%) and 22 (73.3%), PLD1 in 27 (90.0%) and 21 (70.0%) of blood and oral strains, respectively. While no significant difference was detected between PLB1 expression values of the groups ($t=-0.307$; $p=0.760$), PLB2 and PLC1 expressions were found to be significantly higher in blood ($p=0.043$) and oral cavity isolates ($p<0.001$), respectively. No difference was observed between PLD1 expressions ($p=0.732$). PLB1, PLB2, PLC1 and PLD1 expressions were 100%, 81.7%, 71.6% and 76.7% in agreement with the plate method. The agreement was 83.3% when all the phospholipase genes were considered. No correlation was detected between the Pz values and phospholipase expressions ($p=0.602$; $p=0.555$; $p=0.241$; $p=0.096$, respectively).

Conclusion: The high rates of phospholipase activity of the *C. albicans* isolates in our study, support the important roles of these enzymes in virulence. Our results may indicate that phospholipase enzymes encoded by PLB2 and PLC1 genes play more important roles for invasive and oral cavity infections, respectively; however large scale studies are needed on this issue.

Keywords: *Candida albicans*, phospholipase, RT-PCR

Alındığı tarih / Received:

23.05.2020 / 23.May.2020

Kabul tarihi / Accepted:

09.11.2020 / 09.November.2020

Yayın tarihi / Publication date:

31.03.2021 / 31.March.2021

ORCID Kayıtları

B. Tunç 0000-0003-4134-4814

E. Demiray Gürbüz 0000-0003-2849-9029

M. Doluca Dereli 0000-0003-1656-8381

✉ ebru.demiray@deu.edu.tr

§ Bu çalışma, Uluslararası

XXXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde

(4-8 Kasım 2018, Starlight Hotel &

Convention Center, Antalya, Türkiye) iki

sözlü bildiri (SS-014 ve SS-015) olarak

sunulmuştur.

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır.

Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing.

Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY)

GİRİŞ

Candida türleri insanlarda önemli fırsatçı enfeksiyonlara yol açmakta olup, son yıllarda *Candida* kaynaklı enfeksiyonlarda ciddi bir artış izlenmiştir. Yoğun bakım ünitelerinde yüksek ölüm oranlarının görüldüğü hastane kökenli kan dolaşımı enfeksiyonlarının %15'inin *Candida* türlerinden kaynaklandığı rapor edilmiş ve en sık izole edilen tür *C. albicans* olarak bildirilmiştir⁽¹⁾. Deri/mukoza bütünlüğünün bozulması sonucu *Candida* hücreleri, kana epitel hücrelerinden penetrasyon ile girebilir ya da kateter, sonda gibi tıbbi aletlerin üzerinde oluşan biyofilmden yayılabilir. Kan yoluyla ise bütün organların enfekte olabileceği bilinmektedir⁽²⁾. Bu tabloların oluşumunda, konak savunması ve zemin hazırlayan durumlar yanında *Candida* türlerinin virulans faktörleri de önemli rol oynamaktadır. *C. albicans* için tanımlanan virulans faktörleri; adherans, biyofilm üretimi, fenotipik değişim, hücre yüzey fobisitesi, hücre duvar yapısı, sideroforları kullanma yeteneği, yalancı hif-hif-çimlenme borusu oluşumu, moleküler benzeme, fosfolipaz ve proteinaz gibi ekstrasellüler hidrolitik enzimlerin üretimi olarak sıralanabilir⁽³⁾. *C. albicans*'ta fosfolipaz A (PLA), B (PLB), C (PLC), D (PLD), lisofosfolipaz ve lisofosfolipaz transaçilaz olmak üzere altı farklı fosfolipaz enzimi tanımlanmıştır⁽⁴⁾. Fosfolipaz enzimi, hücre membran yapısında bulunan gliserofosfolipitlerin ester bağlarını hidrolize ederek, hücreleri lizise uğratar, doku invazyonuna neden olur. Bunun yanında, hücrenin yüzey özelliklerini değiştirerek enfeksiyonun başlangıcı olan adheransa olanak sağlar⁽¹⁾. Fosfolipaz B'nin hidrolaz ve transaçilaz aktivitesi bulunmakta olup, hidrolaz aktivitesi enzimin yağ asitlerini hem fosfolipitlerden hem de lizofosfolipitlerden ayırmasına neden olurken, transaçilaz aktivitesi enzimin serbest bir yağ asidini bir lizofosfolipite aktararak fosfolipit üretmesine yol açmaktadır⁽⁵⁾. Fosfolipaz C, fosfatidilkolini ve özgün grup olan fosfoinosititi parçalar. Bu tepkime, ökaryot hücrelerin plazma membranındaki reseptörlerle ilişkili sinyal iletiminde önemlidir. Bu aktivasyon, hücre fonksiyonları için önemli olan Ca⁺² iyonlarının bağırsaktan serbest bırakılmasına ve protein kinaz C'nin aktivasyonu

nunu sağlayan 1.2-diaçilgliseritin açığa çıkmasına yol açar ki bu salgılama, hücre büyümesi ve üreme gibi hücresel aktiviteler için zorunlu bir eylemdir⁽⁴⁾. Fosfolipaz D, fosfatidik asit ve kolin üretimini sağlar. PLD geni hem memeli hem de funguslar tarafından kodlanmakta olup, bu enzimin funguslarda mayozun gerçekleşebilmesi için zorunlu olduğu bildirilmiştir⁽⁵⁾.

Ekstrasellüler fosfolipazın *C. albicans*'ın neden olduğu hematogen enfeksiyonların patogenezinde önemli olduğu, yüksek fosfolipaz aktivitesi gösteren izolatların düşük aktivitelilere göre 5.6 kat daha öldürücü olduğu saptanmıştır⁽⁶⁾. Farelerde yapılan başka bir çalışmada, yüksek ekstrasellüler fosfolipaz aktivitesine sahip *C. albicans* hücrelerinin, düşük aktivite gösterenlere göre oral epitel hücrelerine adheransta ve fareleri öldürme yeteneğinde daha etkili olduğu belirlenmiştir⁽⁷⁾.

Çalışmamızda, kan kültüründen ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* izolatlarının standart plak yöntemi ile fosfolipaz aktivitesinin incelenmesi, her iki grup izolatta en sık üretilen fosfolipaz enzimleri olan fosfolipaz B1, B2, C ve D'nin ekspresyon düzeylerinin ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi (RT-PZT) yöntemi ile araştırılması ve gruplar için elde edilen sonuçların karşılaştırılması hedeflenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 10.09.2015 tarih ve 2242-GOA protokol numaralı 2015/21-24 karar numarası ile onaylanmıştır.

Candida suşları: 01.10.2014-01.12.2015 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Mikoloji laboratuvarında kan kültürü (n=30) ve oral kavite örneklerinden (n=30) soyutlanan toplam 60 adet *C. albicans* izolatu çalışmaya alındı. Plak ve RT-PZT yöntemlerinde pozitif kontrol olarak *C. albicans* ATCC 90028, plak yönteminde negatif kontrol olarak ise önceki çalışmalarımızda fosfolipaz aktivitesi nega-

tif olarak saptanan bir *C. albicans* izolatı (1519 No.lu izolat) kullanıldı.

Candida albicans izolatları çimlenme borusu deneyi, mısır unu tween 80 agar ve CHROMagar™ *Candida* (CHROMagar) besiyerlerindeki görünüm ve morfolojileri ile API 20C AUX (BioMérieux SA) kullanılarak tanımlanıp, soyutlanan izolatlar %50 gliserollü beyin kalp infüzyon sıvı besiyerinde stoklanarak -80°C'de saklandı. Daha sonra tüm izolatlar aynı anda açılıp, Sabouraud dekstroz agara (SDA) pasajlanarak canlandırıldı ve fosfolipaz aktivitesi araştırıldı.

Fosfolipaz Aktivitesinin Yumurta Sarılı Besiyerinde Plak Yöntemi ile Araştırılması: Bu amaçla Samaranayake ve ark.⁽⁸⁾ tarafından modifiye edilen Price ve ark.⁽⁹⁾'nın plak yöntemi uygulandı. Besiyeri olarak 0.005 M kalsiyum klorür, 1 M sodyum klorür ve %8 steril yumurta sarısı eklenmiş SDA kullanıldı. SDA besiyerinde üreyen 24 saatlik *Candida* kolonilerinden Mc Farland 1'e uygun bulanıklıkta süspansiyonlar hazırlandı ve 10'ar µl inoküle edildi. Plaklar 30°C'de nemli ortamda dört gün bekletildi ve koloni çevresinde oluşan presipitasyon zonları kör olarak iki kişi tarafından ölçülerek presipitasyon aktivitesini gösteren Pz değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$Pz \text{ değeri} = \text{Koloni çapı} / \text{Presipitasyon zonu çapı}$

Pz değeri 1.00'a eşit ise izolat fosfolipaz negatif, 1.00'dan küçük ise pozitif olarak kabul edildi.

Fosfolipaz Aktivitesinin Multipleks Polimeraz Zincir Tepkimesi (PZT) ve Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PZT) ile Belirlenmesi: *Candida* izolatları YPD besiyerinde 16 saat 37°C ve 150 rpm'de inkübe edildi. Kültür 500 g'de santrifüj edildikten sonra oluşan pelletten RNA izolasyon kiti (YeaStar™ RNA Kit R1002- Zymo Research) kullanılarak, üretici firmanın önerileri doğrultusunda total RNA ekstraksiyonu yapıldı. Standardizasyon aşamasında ekstrakte edilen total RNA miktarları Nanadrop 2000 Thermo Scientific G118 cihazı ile ölçüldü. Elde edilen RNA'lerden cDNA sentez kiti (RevertAid First Strand

cDNA Synthesis Kit-Thermo Scientific) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda cDNA sentezi yapıldı. Çalışmaya alınan *C. albicans* izolatlarında dört fosfolipaz geni olan *PLB1*, *PLB2*, *PLC1*, *PLD1*'in ekspresyon düzeylerinin araştırılması amacıyla korunmuş bölgelere özgün sentezlenmiş öncüller^(10,11), iç mRNA kontrolü olarak ise *C. albicans*'ın bir "house keeping" geni olan *ACT1* kullanıldı⁽¹²⁾. Her örnek için *PLB1*, *PLC1* ve *ACT1* öncülleri ile önce multipleks PZT, daha sonra ayrı ayrı RT-PZT *PLB2* ve *PLD1* öncülleri ile ise ayrı RT-PZT uygulandı^(10,11).

PLB1 ve *PLC1* multipleks PZT amplifikasyonu için 50 µl toplam hacim içerisinde 5 µl cDNA olacak şekilde karışım oranları; 5 µl 5xTuneup™ Solution (HelixAmp™), 0.25 µl HelixAmp™ Taq polimeraz, 2 µl dNTP "mix" (herbiri 10mM), ikişer µl (10 pmol) *PLB1*, *ACT1* ve *PLC1* öncülleri (MacroGen) ve 5 µl 10X Taq tampon olacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon koşulları 94°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, 95°C 40 saniye, 55°C 60 saniye, 72°C 1 dakika olmak üzere 35 döngü ve son uzama basamağı için 72°C 7 dakika şeklinde düzenlenerek gerçekleştirildi. Ayrı ayrı *PLB1* ve *PLC1* RT-PZT amplifikasyonu için 50 µl toplam hacim içerisinde 8 µl cDNA olacak şekilde karışım oranları; 1 µl 5xTuneup™ Solution (HelixAmp™) ve diğeri aynı multipleks PZT'de kullanıldığı miktarlarda olacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon koşulları da yine multipleks PZT için uygulandığı gibi kullanıldı.

PLB2 ve *PLD1* RT-PZT amplifikasyon için aynı *PLB1* ve *PLC1* RT-PZT miktarlarındaki gibi yalnızca 1 µl dNTP "mix" (her biri 10mM) ve aynı miktarda *PLB2*, *ACT1* ve *PLD1* öncülleri (MacroGen) olacak şekilde hazırlandı. Amplifikasyon koşulları *PLB2*, *ACT1* RT-PZT için 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, 95°C 50 saniye, 56°C 40 saniye, 72°C 1 dakika olmak üzere 25 döngü ve son uzama basamağı için 72°C 5 dakika şeklinde; *PLD1* RT-PZT için ise 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonu, 95°C 40 saniye, 55°C 40 saniye, 72°C 1 dakika olmak üzere 35 döngü ve son uzama basamağı için 72°C 7 dakika şeklinde gerçekleştirildi.

RT-PZT ürünleri, “Gel Red Nucleic Acid” veya “Safeview” gel boyası eklenmiş %1.5 agaroz jelde yürütülerek Vielber Noulmant görüntüleme cihazında görüntülendi. Her suş için elde edilen jel görüntüleri incelendi ve görüntülerin kantitasyonu “Quatity One Software” (Biorad) kullanılarak yapıldı. Daha sonra dört fosfolipaz geni için elde edilen bant kalınlıklarının, iç kontrol olarak kullanılan *ACT1* geni ile karşılaştırılarak normalizasyonu ve *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırılması yapıldı.

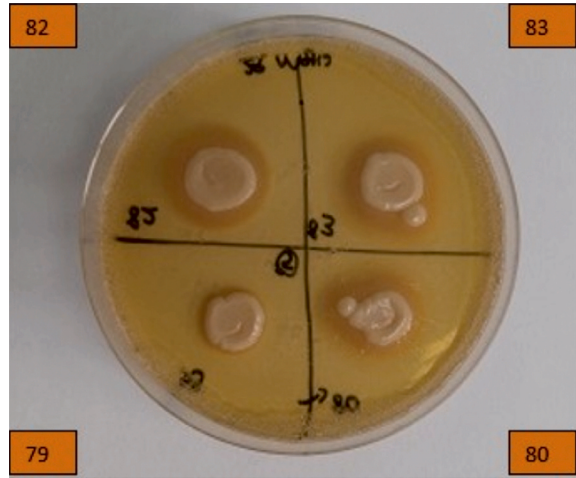
İstatiksel Analiz: Kan kültürü ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* izolatları için plak yöntemi ile belirlenen fosfolipaz olumluluk oranları χ^2 , her iki grubun ortalama Pz değerleri ise Mann Whitney U (SPSS versiyon 22.0) testi; Pz değerleri ile RT-PZT sonucunda elde edilen *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1* ekspresyon düzeyleri Mann Whitney U ve t test yöntemleri kullanılarak karşılaştırıldı. Bunun yanında, genlerin ekspresyonu ile fenotipik plak yöntemi ile saptanan fosfolipaz pozitifliği arasında % uyum ve Pz değerleri ile fosfolipaz genlerinin ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyon, Spearman korelasyon testi ile incelendi (SPSS versiyon 22.0).

BULGULAR

Plak Yönteminin Bulguları: Araştırmamıza alınan tüm *C. albicans* izolatlarının 50 tanesi (%83.3) fosfolipaz olumlu olarak belirlendi. Fosfolipaz aktivitesi saptanan ve saptanmayan *C. albicans* izolatlarının yumurta sarılı SDA’da oluşturdukları koloni ve etrafındaki presipitasyon zonlarının görünümü Şekil 1’de gösterilmiştir.

Plak yöntemi ile kan kültürlerinden soyutlanan izolatların 26’sında (%86.7), oral kavite örneklerinden elde edilen izolatların 24’ünde (%80.0) fosfolipaz aktivitesi saptandı (Tablo 1). Gruplar arasında fosfolipaz olumluluk oranları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmedi ($\chi^2=0.48$; $p=0.49$).

Her iki grupta yer alan fosfolipaz pozitif izolatların plak yöntemi ile belirlenen en küçük, en büyük, ortalama ve ortanca Pz değerleri Tablo 2’de gösterildi.



Şekil 1. Çalışılan üç fosfolipaz olumlu, bir olumsuz (sol üst) *Candida albicans* izolatının yumurta sarılı agarda koloni ve presipitasyon zonlarının görünümü.

Tablo 1. Çalışmaya alınan kan ve oral kavite *Candida albicans* izolatlarının fosfolipaz sonuçları.

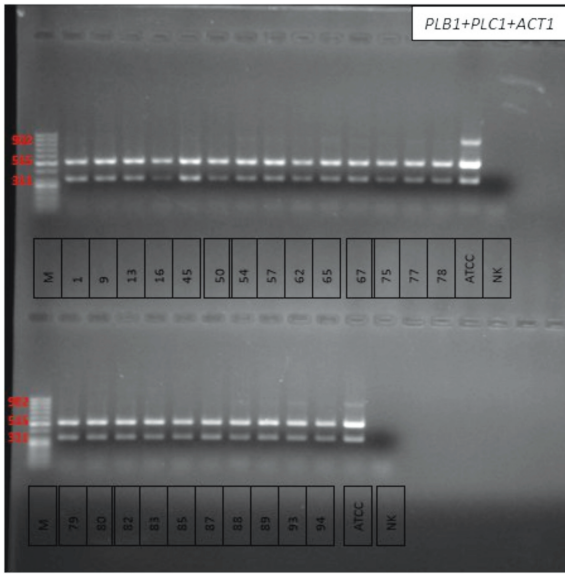
<i>Candida albicans</i>	Toplam (n)	Pozitif izolat sayısı (n) ve oranı (%)	Negatif izolat sayısı (n) ve oranı (%)
Kan	30	26 (86.7)	4 (13.4)
Oral kavite	30	24 (80.0)	6 (20.0)

Tablo 2. Kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan fosfolipaz pozitif *Candida albicans* izolatlarının plak yöntemi ile belirlenen en küçük, en büyük, ortalama ve ortanca Pz değerleri.

	Kan izolatları Pz değerleri	Oral kavite izolatları Pz değerleri
En küçük	0.42	0.51
Ortanca	0.64	0.70
Ortalama	0.67±0.159	0.76±0.149
En büyük	0.80	0.89

Oral kaviteden soyutlanan *C. albicans* izolatlarının ortalama Pz değeri 0.6988 ± 0.9910 iken; kan kültüründen soyutlanan izolatlarda bu değer 0.6138 ± 0.9823 olarak bulundu. Kan ve oral kavite izolatlarının Pz ortalamaları arasında anlamlı bir fark saptandı (Mann Whitney U=173.500; $p=0.007$).

RT-PZT Bulguları: Multipleks PZT yöntemi ile çalışılan kan ve oral izolatların tümünde (%100) *PLB1* ve sırasıyla 14 (%23.3) ve 9’unda (%15.0) *PLC1* ekspresyonu belirlendi (Şekil 2). Bu yöntemin görüntülerinde *PLC1* bantlarındaki netlik sorunu nedeni ile daha net bant-



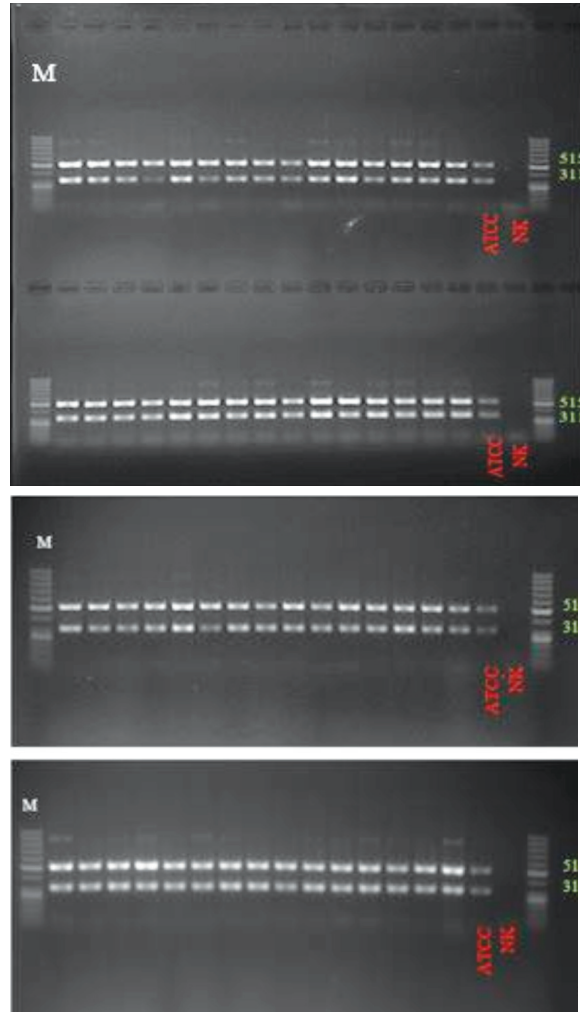
Şekil 2. Kan örneklerinden soyutlanan izolatların *PLB1*, *PLC1* ve *ACT1* gen öncülleri kullanılarak uygulanan multipleks PZT ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

M: Marker (Fermentas SM0371-Generuler 50 bazçiftlik "DNA Ladder"), 515: *ACT1* öncülü, 311: *PLB1* öncülü 902: *PLC1* öncülü, ATCC: Pozitif kontrol; "American Type Culture Collection" (ATCC) 90028 suşu, NK: Negatif kontrol.

lar elde edildiği izlenen ayrı RT-PZT testleri standardize edilerek, çalışıldı.

Çalışılan kan ve oral izolatların tümünde (%100) *PLB1*, sırasıyla 29 (%96.7) ve 30 (%100.0)'unda *PLB2*; yine sırasıyla grupların 27'si (%90.0) ve 22'sinde (%73.3) *PLC1*, 27 (%90.0) ve 21 (%70.0)'inde ise *PLD1* ekspresyonu belirlendi (Şekil 3, 4, 5).

Kan ve oral kavite izolatlarının *PLB1* ekspresyon düzeyi ortalamaları sırasıyla 0.7643 ± 0.10753 ve 0.7733 ± 0.11906 olarak saptanmış olup, bu gen ekspresyonu açısından her iki grup izolat arasında anlamlı bir fark izlenmedi ($t = -0.307$; $p = 0.760$). *PLB2* ekspresyonlarının ortalamaları ise sırasıyla 0.8024 ± 0.14304 ve 0.7250 ± 0.16950 olarak belirlendi ve bu gen düzeyleri kan izolatlarında oral kavite izolatlarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Mann Whitney U=301.500; $p = 0.043$). *PLC1* geni için elde edilen ortalamalar yine bu iki grup açısından sırasıyla 0.3015 ± 0.04495 ve 0.3691 ± 0.06858 olarak izlenmiş olup, *PLC1* ekspresyon düzeyi oral kavite izolatlarında, kan izolatlarına göre anlamlı derecede

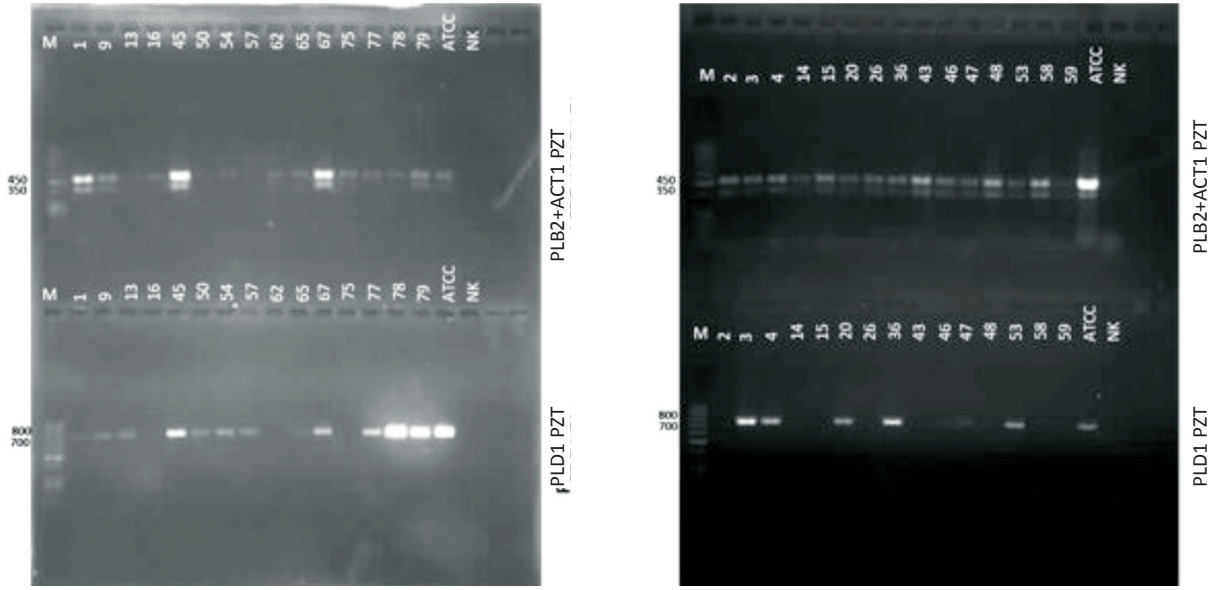


Şekil 3. Kan (üstten birinci) ve oral kavite (üstten ikinci ve üçüncü) izolatlarına *PLB1* ve *ACT1* genleri için uygulanan RT-PZT sonrası elde edilen agaroz jel görüntüsü.

M: Marker (Fermentas SM0371-Generuler 50 bazçiftlik "DNA Ladder"), 515: *ACT1* öncülü, 311: *PLB1* öncülü, ATCC: Pozitif kontrol; ATCC 90028 suşu, NK: Negatif kontrol.

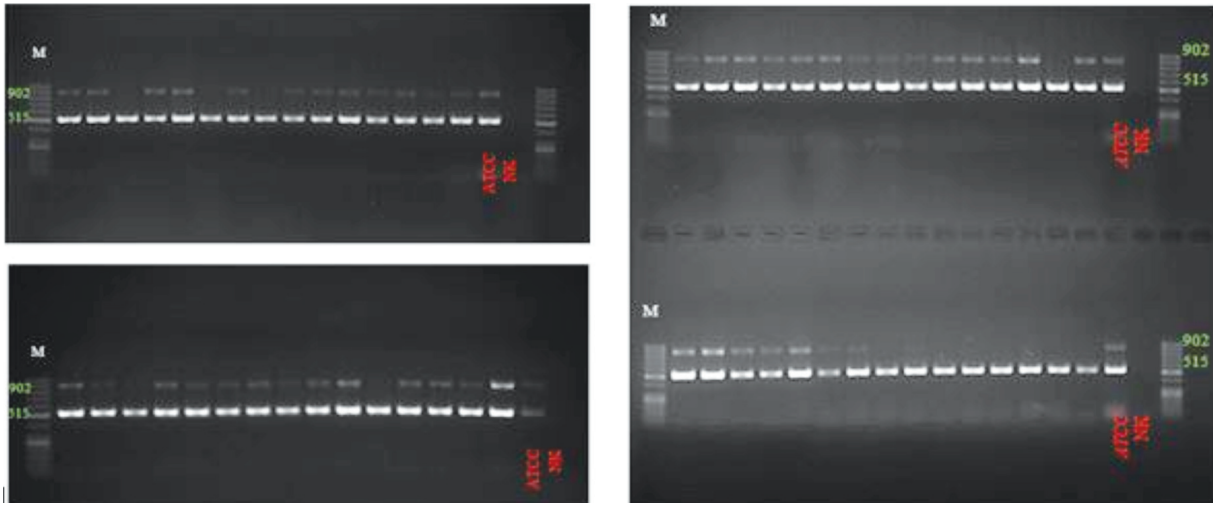
yüksek olarak gözlemlendi (Mann Whitney U=103.500; $p < 0.001$). *PLD1* ekspresyonu ortalaması ise gruplar için sırasıyla 1.1522 ± 0.50434 ve 1.0838 ± 0.43783 olarak belirlendi. *PLD1* ekspresyonu açısından her iki grup izolat arasında istatistiksel bir fark saptanmadı (Mann Whitney U=267.000; $p = 0.732$).

Araştırmaya alınan suşların *PLB1*, *PLB2*, *PLC1*, *PLD1* genleri için kantitasyonların yapılması sonucunda belirlenen sayısal verilerin *ACT1*'e oranlanarak elde edilen normalizasyon değerleri *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1* ve kan izolatları için sırasıyla 0.51-1.01; 0.62-



Şekil 4. Kan (soldaki) ve oral kavite (sağdaki) izolatlarının *PLB2* ve *PLD1* ile *ACT1* RT-PZT ürünlerinin agaroz jelde yürütüldükten sonra elde edilen görüntüleri.

M: Marker (*Fermentas SM0371-Generuler 50 baz çiftlik "DNA Ladder"*), 515: *ACT1* öncülü, 401: *PLB2*, 752: *PLD1* öncülü, ATCC: Pozitif kontrol; ATCC 90028 suşu, NK: Negatif kontrol



Şekil 5. Kan (soldaki) ve oral kavite (sağdaki) izolatlarının (üstteki ve alttaki) *PLC1* ve *ACT1* RT-PZT ürünlerinin jel görüntüleri.

M: Marker (*Fermentas SM0371-Generuler 50 baz çiftlik "DNA Ladder"*), 515: *ACT1* öncülü, 902: *PLC1* öncülü, ATCC: Pozitif kontrol; ATCC 90028 suşu, NK: Negatif kontrol.

1.12; 0.24-0.45 ve 0.32-2.12; oral kavite suşları için ise sırasıyla 0.53-1.02; 0.5-1.13; 0.25-0.52 ve 0.36-1.91 arasında saptandı. Suşların fosfolipaz gen ekspresyon düzeylerinin *C. albicans* ATCC 90028 ile karşılaştırması sonucu bulunan değerlerin ortalama ve standart sapmaları Tablo 3'te gösterildi.

Araştırılan izolatlarda *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1*

ekspresyonunun fenotipik yöntemle sırasıyla %100, %81.7, %71.6, %76.7 oranlarında uyumlu olduğu görüldü. Pz değerleri ile fosfolipaz genlerinin ekspresyon düzeyleri arasında bir korelasyon saptanmadı (sırasıyla $p=0.602$; $p=0.555$; $p=0.241$; $p=0.096$). Plak yöntemi ile tüm fosfolipaz genlerinin ekspresyonu arasındaki uyum ise %83.3 olarak belirlendi.

Tablo 3. Çalışmaya alınan izolatların *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1* ekspresyon düzeylerinin *C. albicans* ATCC 90028 izolatı ile karşılaştırıldığında elde edilen kat değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.

Soyutlanan Yer	<i>PLB1</i> ekspresyon değerleri	<i>PLB1</i> EKO±SS	<i>PLB2</i> ekspresyon değerleri	<i>PLB2</i> EKO±SS	<i>PLC1</i> ekspresyon değerleri	<i>PLC1</i> EKO±SS	<i>PLD1</i> ekspresyon değerleri	<i>PLD1</i> EKO±SS
Kan (30)	0.52-1.05	0.79±0.11	0.64-1.65	1.06±0.33	0.35-1.04	0.59±0.31	0.23-2.03	0.85±0.53
Oral kavite (30)	0.70-1.33	0.93±0.15	0.01-1.93	1.16±0.35	0.75-1.33	0.77±0.49	0.33-4.44	1.38±1.12

EKO: Ekspresyon kat oranı, SS: Standart sapma

TARTIŞMA

Candida türleri, hastane kaynaklı fungal enfeksiyonların yaklaşık %80'inden sorumlu olup, neden olduğu sistemik hastalıklardaki ölüm oranları %36-52 olarak bildirilmiştir^(13,14).

Kandidoz, konak ve maya ile ilişkili faktörlerin etkileşimi sonucu oluşmakta olup, *Candida* türlerinin, başta ekzoenzimler olmak üzere birçok virulans faktörü ile konak savunmasından kaçarak enfeksiyonu başlatabilme özellikleri söz konusudur⁽¹⁵⁾. *C. albicans*'ın diğer türlerden daha fazla olan adhezyon özelliğinin, yüksek oranda fosfolipaz enzimini üreterek, dokulara ve hücrelere invazyonunu artırması nedeni ile olduğu düşünülmektedir⁽¹⁶⁾.

Çalışmamızda kan ve oral kavite örneklerinden soyutlanan *C. albicans* izolatlarının fosfolipaz aktivitesi yumurta sarılı agarın kullanıldığı plak yöntemi ile incelenmiş, ayrıca moleküler olarak RT-PZT ile fosfolipaz enzimini kodlayan gen bölgeleri araştırılmıştır.

Araştırmamıza alınan 30 kan kökenli *C. albicans* izolatının 26'sında (%86.7) plak yöntemi ile fosfolipaz aktivitesi saptanmış olup, ortalama Pz değeri 0.6138±0.9823 olarak belirlenmiştir. Çalışmamız ile aynı plak yöntemini kullanarak *C. albicans* izolatlarında fosfolipaz aktivitesini belirleyen birçok araştırma söz konusudur. Bunlardan birinde, Mattei ve ark.⁽¹⁷⁾ 120 kan kökenli *C. albicans* izolatının %78'inde, Atalay ve ark.⁽¹⁸⁾ *C. albicans* izolatlarının %88.2'sinde fosfolipaz aktivitesi saptamıştır. Mohan ve ark.⁽¹⁹⁾ 37 izolatın %32.45'inin fosfolipaz aktivitesi gösterdiğini

ve ortalama Pz değerinin 0.66±0.34 olduğunu bildirilmiştir. Gökçe ve ark.⁽²⁰⁾'nin çalışmasında ise, kan dan soyutlanan 68 *C. albicans* izolatının 41 (%60.3)'inde, De Luca ve ark.⁽²¹⁾'nin araştırmasında yine kan kökenli izolatların tümünde (%100) fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. Price ve ark.⁽⁹⁾; aynı grup kökenlerde plak yöntemi ile %55 oranında fosfolipaz aktivitesi bulmuştur. Çalışmamızda, kan kökenli izolatlar için belirlediğimiz fosfolipaz olumluluk oranı, bazı çalışmalardan yüksek^(17,19,20), bazılarında ise düşüktür^(9,21). Verilerimizin bu çalışmalardaki oranlara göre farklı bulunmasının nedeni kateter gibi predispozan faktörlerin varlığına bakılarak hasta gruplarının oluşturulması, özellikle yoğun bakım üniteleri, yenidoğan üniteleri ve acil serviste yatan hasta örneklerinin çalışmaya dâhil edilmesi ve gruplardaki hastaların klinik tabloları olabilir.

Çalışmamızda 30 oral kavite kökenli *C. albicans* izolatının 24 (%80)'ünde fosfolipaz aktivitesi saptanmış, ortalama Pz değeri 0.6988±0.9910 olarak bulunmuştur. Kumar ve ark.⁽²²⁾ HIV pozitif ve kanserli hastaların oral mukozalarından izole ettikleri izolatlarda %100 oranında fosfolipaz aktivitesi saptamıştır. Sanita ve ark.⁽²³⁾ oral kandidoz enfeksiyonu olan diyabetik, diyabetik olmayan hastalar ve sağlıklı bireylerin oral kavite izolatlarında sırası ile %59.4, %82.8 ve %67.3 oranlarında fosfolipaz aktivitesi belirlemiş olup, ortalama Pz değerleri 0.8632±0.093, 0.8385±0.088 ve 0.9236±0.065 şeklindedir. Kandidemide olduğu gibi oral kandidoz enfeksiyonuna zemin hazırlayan faktörlerin bulunması fırsatçı *C. albicans*'ın patojen duruma geçişini hızlandırmakta ve fosfolipaz aktivasyonunu arttırmaktadır. Koga ve ark.⁽²⁴⁾ HIV'li olguların oral kavite izolatlarında HIV ile enfekte olma duru-

munun fosfolipaz üretimini arttırdığını vurgulamıştır. Bizim oral kavite suşları için bulduğumuz fosfolipaz olumluluk oranı Kumar ve ark.⁽²²⁾'nin çalışmasından düşük olup, bunun nedeni izolatların soyutlandığı olgularda HIV ile enfekte olma durumunun izolatlardaki fosfolipaz üretimini arttırması olabilir.

Bizimle benzer şekilde kan ve oral kavite izolatlarını kapsayan araştırmalarda Costa ve ark.⁽¹⁶⁾ toplam 59 *C. albicans* izolatının 52'sinin (%88.1), oral kavite, kan ve kateter suşlarının sırasıyla %77.4, %46.6 ve %15.4'ünün fosfolipaz aktivitesi gösterdiğini saptamıştır. Bu çalışmada, oral izolatların fosfolipaz olumluluk oranı kan/kateterden soyutlanan izolatlara göre anlamlı derecede yüksektir ($p=0.003$). Aynı çalışmada, *C. albicans* izolatlarının soyutlandıkları yer ile fosfolipaz olumlulukları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Çalışmamızda, her iki grup izolattaki fosfolipaz olumluluk oranları arasında anlamlı bir fark belirlenmemiş olup, Costa ve ark.⁽¹⁶⁾ araştırmasına benzer şekilde izolatların soyutlandıkları yer ile fosfolipaz olumlulukları arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir ($\chi^2=0.48$, $p=0.49$). Öksüz ve ark.⁽²⁵⁾ çeşitli *C. albicans* izolatlarının %53.08'inde fosfolipaz aktivitesi saptamış ve en fazla fosfolipaz aktivitesi gösteren grubun oral kavite (%59) olduğunu bildirmişlerdir. Mandelblat ve ark.⁽²⁶⁾ sistemik izolatların %100'ünde fosfolipaz pozitifliği elde etmiş olup, ortalama Pz değerini 0.548 ± 0.1478 olarak belirlerken, mukozal izolatların %90'ında pozitiflik saptamış ve ortalama Pz değerini 0.629 ± 0.1468 olarak bulmuştur. Aynı çalışmada, sistemik izolatlarda anlamlı olarak yüksek bir olumluluk belirlenmiştir ($p=0.039$). İbrahim ve ark.⁽⁶⁾ *C. albicans* kan izolatlarının komensal oral kavite izolatlarına göre daha fazla ekstrasellüler fosfolipaz aktivitesi gösterdiğini rapor etmişlerdir. Kan izolatlarımızın fosfolipaz olumluluk oranı, oral izolatlara göre istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen daha yüksektir. Bulgularımız, İbrahim ve ark.⁽⁶⁾ ile Mandelblat ve ark.⁽²⁶⁾ bulguları ile paralel doğrultuda olup, Costa ve ark.⁽¹⁶⁾ ile Öksüz ve ark.⁽²⁵⁾ çalışmaları ile farklılık göstermektedir. Bu durum, seçilen izolat sayısından veya izolatların soyutlandıkları hastaların özelliklerinden kaynaklanabilir.

Örneğin, HIV ile enfekte bireylerin oral kavite izolatlarının daha fazla fosfolipaz ürettiği ve epitel hücrelerine daha fazla adhere olduğu bildirilmiştir^(16,26).

Günümüzde, mantarlarda fosfolipaz aktivitesinin saptanması için yalnızca plak yöntemi yeterli olmakta, bu yöntem ile düşük oranda fosfolipaz üreten izolatlar gözden kaçabilmektedir. Plak yönteminde kullanılan yumurta sarılı agar besiyerinin fosfolipaz pozitif izolatları iyi üretirken, negatif izolatların burada zayıf ürettiği bildirilmiştir. Bu dezavantaj nedeni ile fosfolipaz pozitif ve negatif kökenlerin mRNA seviyelerinin doğrudan karşılaştırılmasının plak yönteminden daha iyi olduğu rapor edilmiştir⁽¹¹⁾. Bu açıdan fosfolipaz varlığının, plak yöntemine göre daha duyarlı olan moleküler teknikler ile araştırılması uygun bir yaklaşım olacaktır. Çalışmamızda, *C. albicans* izolatlarında plak yönteminin yanı sıra fosfolipaz enzimlerini kodlayan *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1* genleri RT-PZT ile incelenmiş olup, araştırmamız bu konuda ulaşılabilen Türkiye'de yapılan ilk çalışma olması nedeni ile önemlidir.

Araştırmamızda, öncelikle *PLB1*, *PLC1* ve *ACT1* öncülleri ile multipleks PZT yapılmış, PZT ürünlerinin jel görüntülerinde özellikle *PLC1* bantlarındaki netlik ve standardizasyon sorunu ve bu durumun kantitasyonu etkilemesi nedeni ile yöntemde değişiklik yapılarak, *PLB1* ve *PLC1* ile *ACT1* öncüllerinin kullanıldığı iki ayrı RT-PZT standardize edilerek çalışılmıştır. Bu çalışmada, incelenen 60 *C. albicans* izolatının tümünde (%100) *PLB1*, 59 (%98.3)'ünde *PLB2*, 23 (%38.3)'ünde *PLC1* ve 48 (%80.0)'ünde *PLD1* ekspresyonu gösterilmiştir. *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1* ekspresyonunun fenotipik yöntemle sırasıyla %100, %81.7, %71.6, %76.7 oranlarında uyumlu olduğu görülmüştür. Samaranayake ve ark.⁽¹⁰⁾, plak yöntemi ile fosfolipaz pozitif altı *C. albicans* izolatlarında *PLB1*, *PLB2*, *PLC1* ve *PLD1* varlığını gösterirken, fosfolipaz negatif altı izolatta yalnızca *PLB2* ve *PLD1* genlerinin ekspresyonunu izlemiştir. Çalışmamızda, plak yöntemi ile fosfolipaz negatif dört kan izolatının birinde, altı oral izolatın üçünde *PLD1* ekspresyonu gösterilmemiştir. Bu *PLD1* ekspresyonu izlenmeyen üç izolatın ikisinde

aynı zamanda *PLC1* ekspresyonu da görülmemiş, diğer izolatlarda ise tüm genlerin ekspresyonu saptanmıştır. Naglik ve ark.⁽²⁷⁾ 137 oral ve vajinal kandidozlu hastanın *C. albicans* izolatlarında *PLB1* ve *PLB2* ekspresyonunu araştırmış ve *PLB1* ekspresyonunun oral hastalıkla paralel olduğu belirlemişlerdir. İbrahim ve ark.⁽⁶⁾'nın çalışmasında, oral enfeksiyonlu hastaların izolatlarında saptanan *PLB1* ekspresyonunun, oral taşıyıcı bireylerden soyutlanana göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Araştırmamızda, Naglik ve ark.⁽²⁷⁾ ile İbrahim ve ark.⁽⁶⁾'nın çalışmasından farklı olarak *PLB1* ekspresyonunun oral enfeksiyon ile ilişkisi izlenmemiş, ancak verilerimiz doğrultusunda *PLB2* ekspresyonunun invaziv enfeksiyonlarda ve her iki çalışmada araştırılmayan *PLC1* geninin oral enfeksiyonlarda önemli olabileceği düşünülmüştür.

Samaranayake ve ark.⁽¹⁰⁾, altı fosfolipaz pozitif izolatta her genin ekspresyonunu göstermişlerdir. Araştırmamızda, kan ve oral kökenlerin hepsinde, farklı olarak tüm genler yerine yalnızca *PLB1* gen ekspresyonu saptanmıştır. Bu durum, çalışmalara alınan izolat sayısındaki farklılık nedeni ile ortaya çıkmış olabilir. Ayrıca çalışmamızda, Samaranayake ve ark.⁽¹⁰⁾'nın sonuçlarına benzer şekilde, 13 oral ve 21 kan izolatının tümünde araştırılan genlerin ekspresyonu gösterilmiştir. Samaranayake ve ark.⁽¹¹⁾, fosfolipaz pozitif gruptaki *C. albicans* izolatlarının yüksek Pz değerine sahip olduğunu, Pz değerleri ile *PLB1* gen ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon bulunduğunu bildirmişlerdir. Bizim araştırmamızda ise Pz değerleri ile fosfolipaz genlerinin ekspresyon düzeyleri arasında bir korelasyon saptanmamıştır. Araştırma sonuçlarındaki farklılık çalışılan izolat sayısındaki farktan kaynaklanabilir. Korelasyon bulunmasının nedeni uyguladığımız RT-PZT yönteminin daha duyarlı olması ve plak yönteminde kullanılan besiyerinin fosfolipaz negatif izolatları daha zayıf üretmesi nedeni ile fosfolipaz olumluluğunun net izlenememiş olması olabilir.

Çalışmamızda, oral kavite ve kan örneklerinden soyutlanan *C. albicans* izolatlarında yüksek oranlarda fosfolipaz aktivitesinin belirlenmesi, bu enzimlerin

üretiminin virulans açısından önemli bir rol oynadığını desteklemekte olup, bulgularımız doğrultusunda *PLB2* ve *PLC1* enzimlerinin sırasıyla invaziv ve oral enfeksiyonlarda daha etkin olduğu söylenebilir, ancak bu konuda kesin bir sonuca varmak için daha geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim söz konusudur.

Teşekkür

Bu araştırma TÜBİTAK Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (1002) tarafından 116S136 numaralı proje ile desteklenmiştir. Teşekkürlerimizi sunarız.

Etik Kurul Onayı: Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 10.09.2015 tarih ve 2242-GOA protokol numaralı 2015/21-24 karar numarası ile onaylanmıştır.

Çıkar Çatışması: Herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek: TÜBİTAK 1002/116S136

Ethics Committee Approval: It was approved by the Non-Interventional Research Ethics Committee of Dokuz Eylül University with the decision number of 2242-GOA dated 10.09.2015 and the decision number of 2015 / 21-24.

Conflict of Interest: There is no conflict of interest.

Funding: TUBITAK 1002/116S136

KAYNAKLAR

1. Ying S, Chunyang L. Correlation between phospholipase of *Candida albicans* and resistance to fluconazole. *Mycoses*. 2012;55(1):50-5. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02024.x>
2. Mavor AL, Thewes S, Hube B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: Epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr Drug Targets*. 2005;6(8):863-74. <https://doi.org/10.2174/138945005774912735>
3. Martinez JP, Gil ML, Lopez-Ribot JL, Chaffin WL. Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(1):121-41.
4. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2001;44:361-7. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00685.x>

5. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(1):122-43.
<https://doi.org/10.1128/cmr.13.1.122-143.2000>
6. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun.* 1995;63(5):1993-8.
<https://doi.org/10.1128/IAI.63.5.1993-1998.1995>.
7. Ellepola ANB, Joseph BK, Khan ZU. The postantifungal effect and phospholipase production of oral *Candida albicans* from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to subtherapeutic concentrations of chlorhexidine gluconate. *Mycoses.* 2014;57(9):553-9.
<https://doi.org/10.1111/myc.12194>.
8. Samaranyake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity in *Candida* species in vitro. *Sabouraudia.* 1984;22(3):201-7.
9. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1982;20(1):7-14.
<https://doi.org/10.1080/00362178285380031>
10. Samaranyake YH, Dassanayake RS, Cheung BPK et al. Differential phospholipase gene expression by *Candida albicans* in artificial media and cultured human oral epithelium. *APMIS.* 2006;114(12):857-66.
https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2006.apm_479.x
11. Samaranyake YH, Dassanayake RS, Jayatilake JA et al. Phospholipase B enzyme expression is not associated with other virulence attributes in *Candida albicans* isolates from patients with human immunodeficiency virus infection. *J Med Microbiol.* 2005; 54:583-93.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.45762-0>
12. Henry KW, Nickels JT, Edlind TD. Upregulation of *ERG* genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2000;44(10):2693-700.
<https://doi.org/10.1128/aac.44.10.2693-2700.2000>
13. Sriphanam C, Nuanmuang N, Saengsawang K, Amornthipayawong D, Kummasook A. Anti-fungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. isolated from blood cultures. *J Mycol Med.* 2019;29(4):325-30.
<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.08.001>
14. Jaeger M, Matzaraki V, Aguirre-Gamboa R et al. A genome-wide functional genomics approach identifies susceptibility pathways to fungal bloodstream infection in humans. *J Infect Dis.* 2019;220(5):862-72.
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiz206>
15. Menezes RP, Riceto EBM, Borges AS, Brito Röder DVD, Pedrosa RS. Evaluation of virulence factors of *Candida albicans* isolated from HIV-positive individuals using HAART. *Arch Oral Biol.* 2016; 66:61-5.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.02.004>
16. Costa CR, Passos XS, Souza LKH, Lucena PA, Fernandes OFL, Silva MRR. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheher, blood and oral cavity. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2010;52(3):139-43.
<https://doi.org/10.1590/s0036-46652010000300005>
17. Mattei AS, Alves SH, Severo CB, Guazzelli LS, Oliveira FM, Severo LC. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46(3):340-2.
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0045-2013>
18. Atalay MA, Koc AN, Demir G, Sav H. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated from blood culture. *Niger J Clin Pract.* 2015;18(1):52-5.
<https://doi.org/10.4103/1119-3077.146979>
19. Mohan das V, Ballal M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25(4):208-10.
[https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(08\)70050-0](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70050-0)
20. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia.* 2007;164(6):265-9.
<https://doi.org/10.1007/s11046-007-9053-4>
21. De Luca C, Guglielminetti M, Ferrario A, Clabro M, Casari E. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiol.* 2012;35(4):459-68.
22. Kumar CPG, Kumar SSS, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia.* 2006;161(4):213-8.
<https://doi.org/10.1007/s11046-005-0157-4>
23. Sanita PV, Zago CE, Pavarina AC, Jorge JH, Machado AL, Vergani CE. Enzymatic activity profile of a Brazilian culture collection of *Candida albicans* isolated from diabetics and non-diabetics with oral candidiasis. *Mycoses.* 2014;57(6):351-7.
<https://doi.org/10.1111/myc.12162>
24. Koga-Ito CY, Lyon JP, Vidotto V, Resende MA. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia.* 2006;161(4):219-23.
<https://doi.org/10.1007/s11046-005-0001-x>
25. Oksuz S, Sahin I, Yildirim M, Gulcan A, et al. Phospholipase and proteinase activities in different

- Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. Jpn J Infect Dis. 2007;60(5): 280-3.
26. Mandelblat M, Frenkel M, Abbey D, Ami RB, Berman J, Segal E. Phenotypic and genotypic characteristics of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal infections. Mycoses. 2017;60(8):534-45.
- <https://doi.org/10.1111/myc.12623>
27. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ et al. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. J Infect Dis. 2003;188(3):469-79. <https://doi.org/10.1086/376536>