

**CANDIDA TÜRLERİNDE BİYOFİLM VE FOSFOLİPAZ AKTİVİTESİNİN SAPTANMASI**Çiğdem KUZUCU<sup>1</sup>Zeynep ÇİZMECİ<sup>1</sup>Bengül DURMAZ<sup>1</sup>**ÖZET**

Biyofilmler ve fosfolipaz enzimi *Candida* suşlarına bağlı infeksiyonların gelişmesinde önemli virulans faktörleridir. Bu çalışmada *Candida* türlerinde biyofilm ve fosfolipaz üretimi araştırılmıştır. Toplam 200 *Candida* izolatında biyofilm pozitifliği %52 bulunmuştur. *C. albicans* suşlarında biyofilm üretiminin diğerlerine göre daha yüksek olduğu görülmüştür (%63). Toplam 123 *C. albicans* izolatında fosfolipaz pozitifliği %57 olarak bulunmuştur. Her iki faktörde virulansda önemli olduğu düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** *Candida*, biyofilm, fosfolipaz

**DETECTION OF BIOFILM AND PHOSPHOLIPASE ACTIVITY IN CANDIDA SPECIES****SUMMARY**

Biofilms and phospholipase enzyme are important virulans factors for the infections of *Candida* species. In this study slime and phospholipase production was examined in *Candida* species. Biofilm positivity 52% was found in 200 *Candida* species. In *C. albicans* isolates biofilm positivity is higher than the others (63%). In 123 *C. albicans* isolates phospholipase positivity was found 57%. We thought both factors also are important in virulans.

**Key words:** *Candida*, biofilm, phospholipase

**GİRİŞ**

*Candida* türleri hem yüzeysel hem de sistemik hastalığa neden olabilirler ve hastanede kazanılmış infeksiyonların başlıca ajanları olarak tanımlanmaktadırlar. Modern tıbbi yöntemlerle, immun sistemi baskılayıcı, sitotoksik ilaçların ve güçlü antibiyotiklerin kullanımıyla ve çeşitli araçların implantasyonu ile ilgili spesifik risk faktörleriyle ilişkili olarak hastane infeksiyonu etkeni olmaktadır (1).

*Candida* türlerinin başlıca virulans faktörleri; jermantasyon, konak hücrelerine yapışma özelliği, ekstrasellüler proteinazlar ve fosfolipazlardır (2). *Candida* infeksiyonlarının çoğu biyolojik veya cansız yüzeylerde *Candida* biyofilmlerinin

oluşmasıyla bağlantılıdır. Biyofilm yapımı sonucu antimikrobiyal tedaviye direnç artmaktadır (3).

Bu çalışmada infeksiyon etkeni olarak saptanan *Candida* türlerinde biyofilm ve fosfolipaz üretimi araştırılmıştır.

**GEREÇ ve YÖNTEM**

Çalışmaya vajinal akıntıdan (66) suş, idrardan (47) suş, kandan (34) suş, balgamdan (30) suş, trakeal aspirasyondan (10) suş ve diğer örneklerden 13 suş (aspirasyondan (beş), yaradan (üç), drenajdan (üç), bronkoalveolar lavajdan (iki)) olmak üzere toplam 200 *Candida* suşu alındı. Suşların 123'ü *C. albicans*, 77'si *C. albicans*

\*Bu araştırma KLİMİK XI. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresinde (30 Mart-31 Nisan 2003, İstanbul) poster olarak sunulmuştur.

<sup>1</sup>İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Malatya

Geliş tarihi: 17.04.2003 Kabul edilmiş tarihi: 28.08.2003

Yazışma Adresi: Dr. Çiğdem KUZUCU, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Malatya.

Tel: 0-422-3410660/ 4808

e-mail: ckuzucu@inonu.edu.tr

dışı *Candida* türleri olarak saptandı.

Biyofilm üretimi için son konsantrasyonda %8 glukoz içeren glukozlu beyin kalp infüzyon sıvısı (GBKIS) kullanıldı. Çalışılacak *Candida* türleri önce glukozlu Sabouraud agarda saf kültür olarak üretildi. Bu kolonilerden alınarak beşer ml GBKIS içeren tüplere ekildi, 35°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası sıvı içerikleri dökülerek iki kere distile su ile yıkandı ve her tüpün içerisine %0.25'lik safranin konularak çalkalandı. Tüpler boşaltılıp, kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kuruması beklendi. Tüp çeperinde pembe kırmızı renkli tabaka pozitif olarak değerlendirildi (4).

Fosfolipaz aktivitesinin saptanması için yumurta sarısı ilave edilmiş glukozlu Sabouraud besiyeri (SDA) kullanıldı. *Candida* kolonileri serum fizyolojik içinde 0.5 Mc Farland standardında hazırlanmış ve bundan 10l yumurta sarılı SDA besiyerine ekilmiştir. Plaklar kuruduktan sonra 37°C'de 48 saat inkübe edilmiş ve koloni çapı ve koloni etrafındaki presipitasyon zonunun oluşturduğu toplam çap ölçülmüştür. Fosfolipaz aktivitesinin değeri (Pz)= Koloni çapı / Presipitasyon zon çapı olarak saptanmıştır (2). Sadece *C.albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesine bakılmıştır.

**Tablo 1:** Klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarında biyofilm oluşumu

Örnekler (n)	<i>C.albicans</i>		<i>Candida spp.</i>		<i>C.albicans</i>		<i>Candida spp.</i>	
	Sayı	Sayı	Biyofilm		Biyofilm		Biyofilm	
			(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Vajinal akıntı (66)	33	33	17	16(48)	28	5		
İdrar (47)	32	15	9	23(72)	7	8		
Kan (34)	19	15	7	12(63)	7	8		
Balgam (30)	23	7	9	14(61)	4	3		
Trak.asp.(10)	8	2	1	7	2	(-)		
Aspirasyon(5)	3	2	1	2	1	1		
Yara sürüntüsü (3)	2	1	(-)	2	(-)	1		
Dren yeri (3)	2	1	1	1	(-)	1		
BAL (2)	1	1	1	(-)	1	(-)		
Toplam (200)	123	77	46	77(63)	50	27(35)		

## BULGULAR

Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinde biyofilm oluşumu tablo 1'de gösterilmiştir. Toplam 104 *Candida* suşunun (%52) biyofilm ürettiği saptanmıştır. *C.albicans*'da bu oranın (%63) diğer *C.albicans* dışı türlere göre (%35) daha fazla olduğu saptanmıştır.

*C.albicans*'ların %57'sinde fosfolipaz pozitif bulunmuştur. *C.albicans* suşlarında biyofilm ve fosfolipaz varlığı Tablo 2 ve 3'de, fosfolipaz aktivitesi saptanan suşların fosfolipaz değerleri (Pz) Tablo 4'de verilmiştir. Suşların yarısında Pz değeri 0.71-0.90 arasında bulunmuştur.

**Tablo 2:** Klinik örneklerden izole edilen 123 *C.albicans* izolatında biyofilm oluşumu ve fosfolipaz aktivitesi oranı

<i>C.albicans</i> izole edilen örnekler	Biyofilm (+)	Biyofilm (-)	Fosfolipaz (+)	Fosfolipaz (-)
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
Vajinal akıntı (33)	16 (48)	17 (52)	24 (73)	9
İdrar (32)	23 (72)	9	16 (50)	16 (50)
Balgam ( 23)	14 (61)	9	9	14 (61)
Kan (19)	12 (63)	7	9	10 (53)
Trakeal Asp.(8)	7	1	6	2
Aspirasyon (3)	2	1	3	(-)
Yara sürüntüsü (2)	2	(-)	2	(-)
Dren yeri(2)	1	1	1	1
BAL (1)	(-)	1	(-)	1
Toplam (123)	77 (63)	46 (37)	70 (57)	53 (43)

**Tablo 3:** Klinik örneklerden izole edilen *C.albicans* suşlarında biyofilm ve fosfolipaz birlikte üretimi

<i>C.albicans</i> (123)	Fosfolipaz (-)	Fosfolipaz (+)	Toplam
	Sayı	Sayı (%)	Sayı
biyofilm (-)	29	17(37)	46
biyofilm (+)	24	53(69)	77
Toplam	53	70(57)	123

**Tablo 4** : Klinik örneklerden izole edilen 70 *C.albicans* izolatında saptanan fosfolipaz aktivitesinin (Pz) dağılımı

Pz Değerleri	Sayı (70)	%
0.50-0.60	1	
0.61-0.70	18	26
0.71-0.80	28	40
0.81-0.90	22	31
0.91 ve üstü	1	

### TARTIŞMA

Geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, HIV insidansının artması, modern tedavi yöntemlerinin kullanımı, organ transplantasyonu ve protez cihaz kullanımının artması, kanser kemoterapisi, yoğun bakım ünitesinde kalış gibi faktörler *Candida* enfeksiyonlarının insidansında önemli artışlara neden olmuştur (5,6). *Candida* türleri nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonları, nozokomiyal pnömoni ve üriner sistem enfeksiyonlarından da sıklıkla izole edilen ajanlardır. Bu enfeksiyonlarda intravasküler, üriner kateter veya endotrakeal tüp kullanımı vardır ve bu araçların yüzeyinde biyofilm oluşumu saptanabilir (1,7). Kateterlerde kullanılan materyallerin biyofilm oluşumunu etkilediği görülmüştür. Lateks veya silikon elastomerler üzerinde polivinylchlorid (PVC) ile karşılaştırıldığında biyofilm oluşumunda daha az artış görülürken, polyurethane veya %100 silikon üzerinde belirgin azalma görülmüştür (1). Alet ile bağlantılı olmayan enfeksiyonlarda da biyofilm üretimi görülebilir. Örneğin *Candida* vajinitinde mukoza yüzeyindeki bazı fungal hücreler bakteriyel flora üyelerini de içeren karma bir biyofilm içinde olabilirler (1). *Candida* türlerinde biyofilm pozitifliği değişik oranlarda bulunmuştur. Hilmioğlu ve ark. (4) *Candida* türlerinde üç farklı yöntemle biyofilm üretimini araştırmışlar ve glikozlu sıvı sabouraud ve glikozlu beyin kalp infüzyon sıvısı ile biyofilm üretimini %48.4, kongo kırmızılı glikozlu beyin kalp infüzyon agar ile %53 bulmuşlardır. Çalışmamızda benzer şekilde *Candida* türlerinin %52'sinin biyofilm pozitif olduğu bulunmuştur. Kalkancı ve ark. (8) 100 *Candida* örneğinin sekizinde zayıf ve orta dere-

cede biyofilm pozitifliği, dördünde güçlü biyofilm pozitifliği saptamışlardır. Orhon ve ark. (9) *C.albicans* türlerinde biyofilm üretimini düşük oranlarda (%12.1) bulmuşlardır.

*C.parapsilosis*, *C.pseudotropicalis* ve *C.glabrata*'nın, patojen *C.albicans*'tan daha az biyofilm ürettiği rapor edilmektedir (1,10). Çalışmamızda da *C.albicans* suşlarında biyofilm üretimi (%63) diğer *C.albicans* dışı türlerden daha fazla (%35) bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda önceleri sadece *C.albicans*'ın ekstrasellüler fosfolipaz ürettiği bulunmuş, daha sonraları *C.albicans* dışı *Candida* türlerinin de fosfolipaz ürettiği fakat bunun daha az miktarda olduğu bildirilmiştir. *C.albicans* suşlarının doku invazyonunda ekstrasellüler fosfolipazların önemli olduğu gösterilmiştir (2,11,12). İbrahim ve ark. (2) *Candida* virülansında fosfolipazların rolünü saptamak için kandan izole edilen *C.albicans* ile sağlıklı kişilerin ağız izolatlarını karşılaştırmışlar ve kan izolatlarında fosfolipaz üretimini anlamlı derecede yüksek bulmuşlar ve çalışılan virülans faktörlerinden sadece ekstrasellüler fosfolipaz aktivitesini mortaliteyle ilişkili bulmuşlardır. Arıkan ve ark. (13) toplam 258 *C.albicans* suşunun %78.7'sinde fosfolipaz aktivitesini pozitif bulmuşlardır. Ener ve ark. (14) 92 klinik *C.albicans* izolatının %72.8'inde, Yücesoy ve ark. (15) 175 *C.albicans* suşunun %68.6'sında enzim aktivitesi göstermişlerdir. Çalışmamızda *C.albicans* izolatlarının %57'sinde fosfolipaz aktivitesi pozitif bulunmuştur. Fosfolipaz üretimiyle ilgili farklılıkların yumurta sarılı agar plaklarının hazırlanmasındaki farklılıklardan veya türler arasındaki değişikliklerden olabileceği belirtilmektedir (12). Fosfolipaz aktivitesi bulunan suşların Pz değerleri Arıkan ve ark.'nın (13) çalışmasında 0.31-0.94 arasında, Yücesoy ve ark.'nın (15) çalışmasında ortalama 0.70 arasında bulunmuştur. Çalışmamızda bu oran suşların yarısında 0.71 ve 0.90 arasında bulunmuştur. Çalışmamızda *C.albicans* suşlarının 53'ünde (%69) biyofilm ve fosfolipaz aktivitesi pozitifliği birlikte görüldü.

*Candida* türlerinin biyofilmlerinin antifungal ajanlara yüksek oranda dirençli olduğu saptanmıştır (10,16-18). Biyofilm ilişkili enfeksiyonları

normal tedavi rejimleriyle tedavi ve tamamen eradike etmek zordur (3). Antifungal tedavi, kür için tek başına yeterli olmadığından, genellikle etkilenen aletlerin çıkarılması gerekmektedir (16).

Sonuç olarak fosfolipaz enzimi ve biyofilm üretimi *C.albicans* türünde yüksek oranlarda

saptanan önemli virülans faktörleridir. Saptanan virülans faktörleri ile *Candida* infeksiyonlarının mortalite ve morbidite ilişkisini ortaya koyacak klinik çalışmalar, özellikle hastanede alet kullanımıyla ilgili gelişen infeksiyonlardan korunmak için aydınlatıcı olacaktır.

### KAYNAKLAR

1. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. Trends Microbiol 2003; 11:30-6.
2. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. Infect Immun 1995; 63: 1993-98.
3. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2475-79.
4. Hilmioğlu S, İlikt M, Çavuşoğlu C, Aydemir Ş, Tümbay E. *Candida* kökenlerinde slaym (slime) üretiminin üç ayrı yöntemle gösterilmesi ve slaym üretiminin kristal viyole reaksiyonu ile ilişkisi. İnfeksi Derg 1999; 13: 183-6.
5. Edwards JE. *Candida* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia:Churchill Livingstone, 2000: 2656-69.
6. Baillie GS, Douglas LJ. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1900-905.
7. 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.
8. Kalkancı A, Yalınay Çırak M, Mansuroğlu H, Kuştimur S. *Candida* türlerinde slaym faktör belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1999; 29: 183-85.
9. Orhon H, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S, Tünger Ö, Sivrel Arısoy A. İnfeksiyon etkeni olan *Candida albicans* suşlarında slime üretimi ve antifungal ajanlara duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 1998; 28: 103-6.
10. Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, Lopez Ribot JL. Biofilm formation by *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol 2001; 39: 3234-40.
11. McLain N, Dolan JW. Phospholipase D activity is required for dimorphic transition in *Candida albicans*. Microbiology 1997; 143: 3521-26.
12. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 122-43.
13. Arıkan S, Sancak B, Haşçelik G, Günalp A. *Candida albicans* izolatlarında fosfolipaz aktivitesinin saptanması. Flora 1998; 3: 240-43.
14. Ener B, Babacan F, Bozok Johansson C. In vitro detection of phospholipase activity in *Candida* species. Med Bull İstanbul 1991; 24:55-60.
15. Yücesoy M, Yuluğ N. *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. Infect Derg 1999; 13: 569-74.
16. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1773-80.
17. Hawser SP, Douglas J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2128-31.
18. Kumamoto CA. *Candida* biofilms. Current Opinion Microbiol 2002; 5: 608-11.