

CANDIDA TÜRLERİNDE HEMOLİTİK AKTİVİTE ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF HEMOLYTIC ACTIVITY IN CANDIDA SPECIES

Nimet YİĞİT¹ ve A. Esin AKTAŞ²

Atatürk Üniversitesi, Erzurum

¹ Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Bölümü

² Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Anahtar Sözcükler: *Candida* türleri, hemolitik aktivite

Keywords: *Candida* species, hemolytic activity

Geliş: 02 Haziran 2008

Kabul: 01 Temmuz 2008

ÖZET

Hemolizinerler, *Candida* türlerinin patojenitesinden sorumlu virulans faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmanın amacı, klinik *Candida* türlerinde hemolitik aktivitenin belirlenmesidir. Sekiz *Candida* türüne ait toplam 104 klinik kökenin *in-vitro* hemolitik aktivitesi %3 glikoz ilaveli koyun kanlı Sabouraud-dekstroza-agar besiyerinde araştırılmıştır. *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. kefyr* ve *C. krusei* türleri ekimden 48 saat sonra beta hemoliz oluşturmuş, üç *C. guilliermondii* ve üç *Geotrichum candidum* kökeni alfa hemoliz yapmış ve dört *C. parapsilosis* kökeni ekimden 48 saat sonra ve daha uzun sürede hemoliz oluşturmamıştır. Klinik *Candida* kökenlerinde hemolitik aktivite belirlenmesi *Candida* kaynaklı hematogen infeksiyonlarda klinisyenler için yol gösterici olabilir.

SUMMARY

Hemolysins are known to be putative virulence factors contributing to pathogenicity in *Candida* species. The purpose of this study was to determine the presence of hemolytic activity in clinical *Candida* isolates. A total of 104 *Candida* isolates representing eight species was evaluated for their *in-vitro* hemolytic activity on 3%-enriched sheep blood Sabouraud-dextrose agar. *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. kefyr* and *C. krusei* species demonstrated beta-hemolysis at 48 h postinoculation. Alpha hemolysis was detectable in 3 *C. guilliermondii* and 3 *Geotrichum candidum* isolates. Four *C. parapsilosis* isolates failed to demonstrate any hemolytic activity after incubation for 48 h or longer. The detection of hemolytic activity among clinical *Candida* isolates may warn the clinician for a possible *Candida*-related hematogenous infection.

GİRİŞ

Son yıllarda *Candida* türlerinin neden olduğu infeksiyonlarda dramatik bir artış gözlenmektedir. *Candida* lar insanlarda yüzeysel infeksiyonlardan hayatı tehdit eden invaziv infeksiyonlara kadar bir çok tabloda yer almaktadır. *Candida albicans* *Candida* türleri içinde en sık izole edilen tür olmakla beraber *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* gibi diğer türlerde de artış dikkat çekmektedir (1-4).

Fungal patogenezin mekanizması bakteriyel patogeneze göre daha az anlaşılmıştır. Tüm araştırmalar yüzeysel

infeksiyonlardan yaygın kandidoza kadar değişen infeksiyonlarda tek bir virulans faktörün etken olmadığını göstermiştir. Özellikle, konakçı epitelyum ve endotel hücrelerine adhezyon, germ tüp oluşturma ve proteinaz enziminin üretimi major virulans faktörlerdir. Ayrıca fosfolipaz, lipaz, sekrete aspartil proteinaz, esteraz ve fosfotaz gibi enzimlerin üretimi, toksinler, fenotipik değişim, hücre duvarı ve yüzey değişimi ile hidrofobisite gibi faktörler de virulans ve patogeneze rol oynamaktadır (5-9). Proteinaz, lipaz, fosfolipaz gibi hidrolitik enzimler

üzerinde fazla sayıda ve ayrıntılı çalışmalar olmasına karşın hemolitik aktivite ile ilgili çalışmalar az sayıdadır (6).

Bu çalışmada değişik klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin %3 glikoz ilaveli koyun kanlı Sabouraud-dextrose -agarda hemolitik aktiviteleri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Candida suşları. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na değişik klinik ve polikliniklerden gönderilen 35'i kan, 25'i idrar, 20'si yara, 17'si boğaz, yedisi vagina kültürlerinden izole edilen ve infeksiyon etkeni olan toplam 104 *Candida* suşu incelenmiştir. Bu suşlar laboratuvarımızda germ tüp oluşturma, tween 80'li mısırunu agarda mikromorfoloji incelenmesi, kromojenik besiyerinde koloni renk ve morfolojilerinin değerlendirilmesi ve APİ 20C AUX (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, Fransa) sistemi ile tür düzeyinde tanımlanmıştır. Çalışmamızda standart suş olarak *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* 10231, *C. tropicalis* ATCC 750 ve *C. glabrata* ATCC 90030 kullanılmıştır.

Hemolitik aktivite belirlenmesi. Hemolitik aktivite belirlenmesinde %3 glikoz ilaveli %7 koyun kanlı Sabouraud-dextrose-agar (SDA) besiyeri kullanılmıştır. Bu besiyerinde 48 saatlik kültürleri hazırlanan maya suşlarının steril tuzlu suda 10^8 hücre/ml süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan $10 \mu\text{l}$ 'lik miktarda alınarak besiyerine 5 mm çap oluşturacak şekilde ekim yapılarak plaklar 37^0C 'de 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Koloniler etrafında oluşan ışığı geçiren saydam halkalar hemoliz zonu olarak belirlenmiştir. Oluşan hemoliz zonlarını tanımlayabilmek amacıyla α hemoliz için *Streptococcus pneumoniae*, β hemoliz için de *S. pyogenes* aynı koşullarda ekilerek ve α hemoliz açık ye-

şil-koyu yeşil renkte tam olmayan hemolizi, β hemoliz ise şeffaf tam hemolizi gösterecek şekilde klasik mikrobiyolojik yöntemler ile tanımlanmıştır (6, 10-12).

Hemolitik indeksin hesaplanması. Oluşan hemoliz halkasının çapı koloni çapına bölünerek hemolitik indeks belirlenmiştir. Hemolitik indeks sadece beta-hemoliz zonları için hesaplanmıştır (7).

İstatistiksel analiz. Verilerin analizi için SPSS 12.0 hazır istatistik programı kullanılarak, varyans analizi ile F değeri önemli bulunanlar arasında çoklu karşılaştırma Duncan testi ile yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışmada değişik klinik örneklerden izole edilen 104 *Candida* suşu *C. albicans* (n=45), *C. tropicalis* (n=23), *C. glabrata* (n=17), *C. kefyri* (n=5), *C. parapsilosis* (n=4), *C. krusei* (n=4), *Geotrichum candidum* (n=3) and *C. guilliermondii* (n=3) olarak tiplendirilmiştir.

Çalışmada 24 saatlik inkübasyondan sonra tüm suşlarda alfa hemoliz, 48 saatlik inkübasyon sonucunda *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. kefyri* ve *C. krusei* suşlarında beta hemoliz; *C. guilliermondii* ve *G. candidum* suşlarında alfa-hemoliz saptanmıştır. Hemoliz zonları Şekil 1'de gösterilmiştir. *Candida parapsilosis* suşlarında aktivite gözlenmemiştir. *Candida* türlerinin hemolitik aktiviteleri ve beta-hemoliz oluşturan türlerin hemolitik indeksi Tablo 1'de verilmiştir.

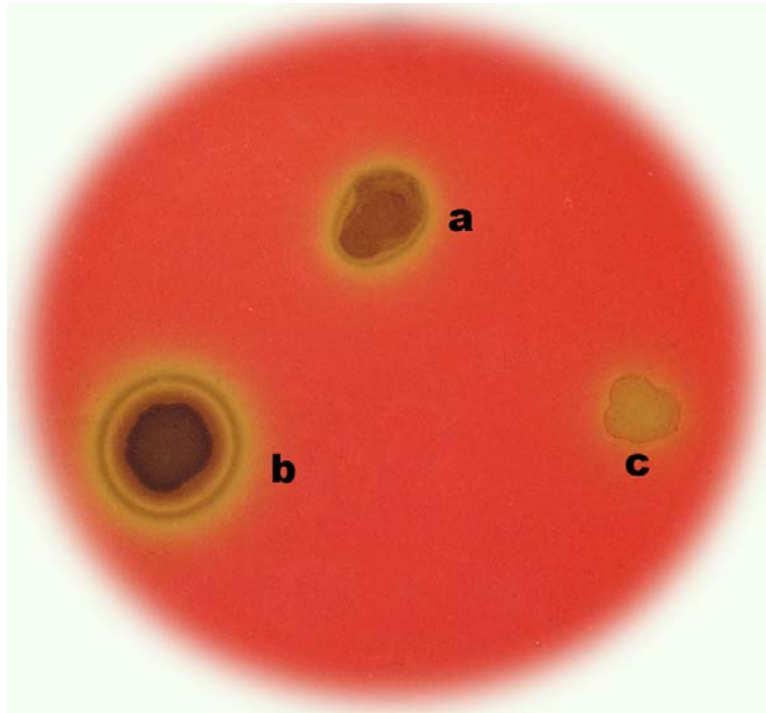
Bulgular varyans analizi ile değerlendirildiğinde $F=5.79$, $P<0.05$ olup türler arasında ortalama hemolitik aktivite indeksi farkı anlamlı bulunmuştur (Şekil 2).

TARTIŞMA

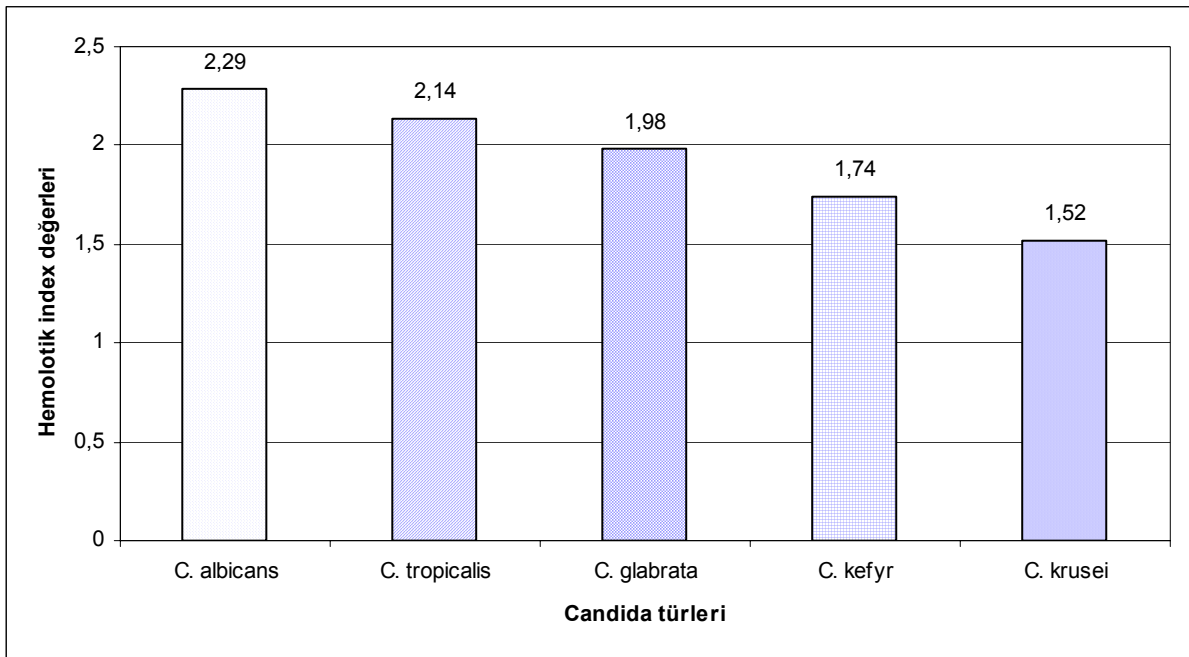
Hemolitik aktivite, patojenik mikro-organizmaların demir kaynağı olarak demir bağlı proteinleri kullanarak konak

Tablo1. *Candida* türlerinin hemolitik aktivite sonuçları

<i>Candida</i> türleri	Hemoliz tipleri ve sayıları (hemolitik indeks \pm S.D)		
	Alfa hemoliz	Beta hemoliz	Non hemolitik
<i>C. albicans</i> (n=45)		45 (2,2939 \pm 0,64a)	
<i>C. tropicalis</i> (n=23)		23 (2.1444 \pm 0,53 ab)	
<i>C. glabrata</i> (n=17)		17 (1,9871 \pm 0,67b)	
<i>C. kefyri</i> (n=5)		5 (1,7400 \pm 0,67b)	
<i>C. krusei</i> (n=4)		4 (1,5200 \pm 0,90bc)	
<i>Geotrichum candidum</i> (n=3)	3		
<i>C. guilliermondii</i> (n=3)	3		
<i>C. parapsilosis</i> (n=4)			4



Şekil 1. *Candida* türlerinde hemoliz a=alfa-hemoliz, b=beta-hemoliz, c=non hemoliz yok



Şekil 2. Histogram *Candida* türlerinin hemolitik aktivitesini göstermektedir. *C. albicans*, *C. tropicalis* türlerinin hemolitik aktivitesi *C. glabrata*, *C. kefyr* ve *C. krusei* suşlarından yüksek bulunmuştur ($P<0.05$)

içinde yaşamalarını sağlayan önemli bir faktördür. Hemoglobun bu mikro-organizmalar için önemli bir demir kaynağıdır. Hemolizinerler ise patojen mikro-organizmaların elementer demiri kullanmak için hemi parçalamalarını sağlayan enzimlerdendir ve özellikle streptokok ve stafilokokların oluşturduğu infeksiyonların patogeneğinde rol alan önemli virulans faktörleri olarak bilinirler. *Streptococcus gordonii*'deki alfa-hemolitik faktör olan hidrojen peroksitin *C. albicans*'ta varlığı gösterilmiştir. Bununla birlikte *Candida*'larda hemolizinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir (13-15).

Candida albicans'ın indüklediği komplemana bağlı hemoliz ilk olarak 1994 yılında Manns ve ark. (10) tarafından glikozla zenginleştirilmiş kanlı agar besiyerinde basit plak analiz yöntemi ile gösterilmiştir. Luo ve ark. (6) 2001 yılında bu metodu çeşitli klinik örneklerden elde edilen farklı *Candida* türlerinin hemolitik aktivitelerini değerlendirmek ve hemolizinin üretiminde türlerin spesifik farklılıklarını karşılaştırmak amacıyla modifiye etmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmalarında, *Candida* türlerinde 24 saatlik sürede alfa hemoliz olduğu 48 saat sonra ise *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. tropicalis* ve *C. krusei* suşlarında beta hemoliz olduğunu gözlemişlerdir. Aynı çalışmada hemolitik indeks hesaplandığında türler arasında anlamlı bir farklılık izlenmiş, *C. albicans* ve *C. dubliniensis*'te hemolitik aktivite yüksek bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda değişik klinik örneklerden izole edilen *C. albicans*, *C. tropicalis* türlerinde hemolitik aktivite *C. glabrata*, *C. kefyr* ve *C. krusei* türlerinden yüksek bulunmuş ve türler arasında hemolitik indeks farkı istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır ($P < 0.05$) (Tablo 1 ve Şekil 2). *Candida*'ların hemolitik aktivitesi glikozdan zengin kanlı agarda üremesi sırasında gözlenmektedir. Bu aktivite sağlam mikro-organizmalar tarafından gösterilir ve kültür ortamına salınan hemoliziner aracılığı ile ortaya çıkar. Ayrıca hifa formlarının diğer mantar formlarına göre daha yüksek hemolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (6, 10, 16).

Luo ve ark. (6) plak ekimlerinde *Candida*'ların yaptığı *Streptococcus sanguis*'un alfa-hemolizine benzer hemoliz rengini gri-siyah olarak tanımlamışlar, 24 saatte sadece alfa-hemoliz izlemişler, 48. saatte hemoliz zonunun genişlediğini ve çift zonlu bir görünüm kazandığını, iç kısımda beta-hemoliz zonu, bunun etrafında da alfa-hemoliz zonunun oluştuğunu bildirmişlerdir.

Plak ekimlerinde hemoliz zonu değerlendirilmesinin dikkatli yapılması gerekmektedir. Bazı suşlarda iç içe geçmiş α - β ya da β - α gibi görünümün oluşması yorumlamada zorluklar ortaya çıkmaktadır. Metin ve ark. (11) değişik *Candida* suşları üzerinde yaptıkları çalışmada; katı besiyerinde oluşan zonlar içerisinde eritrosit miktarlarını mikroskopik olarak da incelemişler, glikozlu insan kanlı besiyerinden yapılan preparatlarda koloni çevresi ve uzağında eritrosit sayısının 24 saatte besiyerindeki renk değişikliğine bağlı olmadan az olduğunu belirlemişler ve *Candida*'larda besiyerindeki renk değişikliklerinin yorumlanmasının bakterilerdeki kadar rahat olmadığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda *C. glabrata*, *C. kefyr* ve *C. krusei* izolatlarında 48 saatte β -hemoliz varlığı gözlenmiş ve hemolitik indeksleri *C. albicans*'tan düşük bulunmuştur. Luo ve ark. (6) *C. kefyr*'de *C. glabrata* ve *C. krusei*'den daha yüksek hemoliz indeksi belirlemişlerdir.

Watanabe ve ark. (17) *Candida*'ların sadece hifal formlarının hemolitik aktivite gösterdiğini bildirmelerine karşın, Luo ve ark. (6) hifal form olmayan *C. glabrata* da hemolitik aktivite belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da *C. glabrata* suşlarında hemolitik aktivite belirlenmiştir.

Çalışmamızda *C. parapsilosis* suşları 48 saat sonunda hemolitik aktivite göstermemiştir. Luo ve ark. (6) çalışmasında yine *C. parapsilosis* suşları hemolitik aktivite göstermezken, Metin ve ark. (11)'nin çalışmasında 48 saat sonunda yedi *C. parapsilosis* suşundan beşinde hemolitik aktivite gözlenmiştir. *Candida guilliermondii* ve *G. candidum* suşları ise sadece α -hemoliz meydana getirmiştir. *C. guilliermondii* suşlarının 48 saat sonra oluşturduğu α -hemoliz Luo ve ark. (6) çalışmasında da belirlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız standart suşların α -hemoliz oluşturduğu belirlenmiştir.

Candida'ların hemolitik aktivitesinin varlığı sepsislerdeki yüksek mortalite oranını (%38-75) açıklamaya yardımcı olacağı gibi tedavide de yol gösterici olabilir. Serumda bulunan transferrin sayesinde *Candida* üremesinin engellenebileceği gösterilmiştir. Transferrin ortamda bulunan serbest demiri bağlayarak mikro-organizmanın serbest demiri çoğalma faktörü olarak kullanmasını engellemektedir (17, 18).

Sonuç olarak, bu çalışmada *Candida*'larda hemolitik aktivitenin var olduğu, hemoliz indeksinin türler arasında değiştiği ve *C. albicans*'ın diğer türlere göre daha yüksek bir hemolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. **Kupfahl C, Ruppert T, Dietz A, Geginat G, Hof H.** *Candida* species fail to produce the immunosuppressive secondary metabolite gliotoxin *in vitro*. *FEMS Yeast Res* **2007**; 7: 986-92.
2. **Pincus DH, Orenga S, Chatellier S.** Yeast identification past, present and future methods. *Med Mycol* **2007**; 45: 97-121.
3. **Segal E.** *Candida* still number one - what do we know and where are we going from there? *Mycoses* **2005**; 48: 3-11.
4. **Richardson MD.** Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother* **2005**; 56 (Suppl 1): i5-i11.
5. **Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, et al.** Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* **1995**; 63: 1993-8.
6. **Luo G, Samaranayake LP, Yau JYY.** *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 2971-4.
7. **Brostt A, Fluit AC.** High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. *J Med Microbiol* **2003**; 52: 971-4.
8. **Yang LY.** Virulence factors of *Candida* species. *J Microbiol Immunol Infect* **2003**; 36: 223-8.
9. **Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B.** Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* **2005**; 48: 365-77.
10. **Manns JM, Mosser DM, Buckley HR.** Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun* **1994**; 62: 5154-6.
11. **Metin DY, Polat SH, İnci R, Tümbay E.** *Candida* türlerinin *in vitro* hemolitik aktivitesi. *İnfek Derg* **2005**; 19: 239-43.
12. **Aktaş AE, Yiğit N, Uyanık MH, Ayyıldız A.** *Candida* türlerinin hemolitik aktivitelerinin araştırılması (Özet). Kiraz N, Kiremitçi A, Akgün Y, ed. *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Sempozyumu (21-22 Haziran 2002, Eskişehir) Tutanaklar'da*. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 43. Eskişehir: OGÜ Basımevi, **2002**: 188.
13. **Barnard JP.** The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. *Infect Immun* **1996**; 64: 3853-7.
14. **Danley DL, Hilger AE, Winkel CA.** Generation of hydrogen peroxide by *Candida albicans* and influence on murine polymorphonuclear leukocyte activity. *Infect Immun* **1983**; 40: 97-102.
15. **Linares CEB, Loreto ES, Silveira CP, et al.** Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. *Rev Inst Med Trop S Paulo* **2007**; 49: 203-6.
16. **Watanabe T, Tanaka H, Nakao N, Mikami T, Matsumoto T.** Hemoglobin is utilized by *Candida albicans* in the hyphal form but not yeast form. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**; 232: 350-3.
17. **Yücel A, Kantarcıoğlu S.** Hastane kaynaklı mantar infeksiyonlarının epidemiyolojisi. *Cerrahpaşa J Med* **2001**; 32: 259-69.
18. **Watanabe T, Takano M, Murakami M, et al.** Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology* **1999**; 145: 689-94.

İLETİŞİM

Yrd. Doç. Dr. Nimet YİĞİT
Atatürk Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu
Tıbbi Laboratuvar Bölümü
Aziziye Araştırma Hastanesi
250070 Yenişehir, ERZURUM
e-posta: nimyigit@hotmail.com