

CANDIDA SUŞLARINDA FARKLI YÖNTEMLERLE SLIME ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

THE INVESTIGATION OF SLIME PRODUCTION IN *CANDIDA* STRAINS BY DIFFERENT METHODS

Nural CEVAHİR Melek DEMİR Ergun METE İlknur KALELİ

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli

Anahtar Sözcükler: *Candida*, slime, yöntemler

Key Words: *Candida*, slime, methods

ÖZET

Bu çalışmada, Candida suşlarında slime üretiminin üç farklı yöntem kullanılarak araştırılması amaçlanmıştır. İnfeksiyon nedeni 126 Candida suşu çalışmaya alınmış ve slime üretimini belirlemek için %8 glukoz içeren sıvı Sabouraud (GSS), %8 glukozlu kongo kırmızılı agar (GKKA) ve %8 glukozlu triptik soy buyon (GTSB) besiyerleri kullanılmıştır. Slime üretimi GKKA'da 56 (%44.4), GTSB'da 50 (%39.6) ve GSS'da 42 (%33.3) Candida suşunda pozitif bulunmuştur. Yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Slime üretiminin saptamada GKKA yönteminin kolay uygulanması ve değerlendirilmesi nedeniyle tercih edilebilecek bir yöntem olduğu görüşüne varılmıştır.

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the slime production in Candida strains by three different methods. One hundred-twenty-six Candida strains, causative agents of infection, were included in the study. Sabouraud broth with 8% glucose (SBG), Congo red agar with 8% glucose (CRAG) and tryptic soy broth with 8% glucose (TSBG) were used to determine slime production. In 126 Candida strains the slime production rates by CRAG, TSBG and SBG methods were 56 (44.4%), 50 (39.6%) and 42 (33.3%), respectively. There was no significant statistical difference between the three methods. The CRAG method was evaluated as the method of choice in investigating slime production for being easy and practical.

GİRİŞ

Slime faktör; amorf kapsül yapısında, glikokaliks materyali olup %40 karbonhidrat ve %27 proteinden oluşmaktadır. Slime faktör plastik ve metal yüzeylere yapışmayı sağlayan, bakterilere antifagositer özellik kazandıran, ayrıca antimikrobik maddelerin bakteri hücrelerine girişini engelleyen ekstrasellüler bir polisakkarittir (1, 2).

Slime faktör üretimi özellikle koagülaz-negatif stafilokok enfeksiyonlarında ayrıntılı biçimde incelenmiş ve mikro-

organizmanın virulansını artırdığı saptanmıştır (2). Slime faktör, mikro-organizmayı konağın savunma mekanizmalarından korur. Bu nedenle yapışma veya slime yapımı önemli bir virulans faktörü olarak kabul edilmektedir (2, 3). Candidalar için de slime üretiminin bir patojenite faktörü olabileceği; slime faktör varlığında Candida'ların konak hücrelerine, protez ve kateterlere tutunup daha kolay kolonizasyon ve enfeksiyonlara yol açtığı bildirilmektedir (4, 5).

Bu çalışmada, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 126 *Candida* suşunda slime üretimi üç farklı yöntem kullanılarak araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çeşitli örneklerden soyutlanan 126 *Candida* suşunda glukozlu Kongo kırmızılı agar (GKKA), glukozlu triptik soy buyon (GTSB) ve glukozlu sıvı Sabouraud (GSS) besiyerleri kullanılarak slime üretimi araştırıldı.

Glukozlu Sıvı Sabouraud ve GTSB yöntemleri Christensen ve ark. (2)'lerinin stafilokoklarda slime üretiminin araştırılmasında kullandıkları yöntem modifiye edilerek uygulandı (6). Glukozlu Sıvı Sabouraud besiyeri 10 g pepton, 80 g glukoz 1000 ml distile su içinde eritilip tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtılarak hazırlandı. Glukozlu triptik soybuyon besiyeri için 17 g pepton (kasein), 3 g pepton (soymeal), 5 g sodyum klorit, 2.5 g dipotasyum hidrojen fosfat, 80 g glukoz 1000 ml distile su içinde eritilip tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtılıp, otoklavlanarak sterilendi.

Glukozlu kongo kırmızısı agar daha önce stafilokoklar için tanımlanan besiyeri modifiye edilerek hazırlandı (7). Bu besiyeri için 37 g beyin- kalp infüzyon buyonu, 10 g agar, 80 g glukoz, 0.8 g Kongo kırmızısı 1000 ml distile su içinde eritilip, otoklavda sterilendikten sonra plaklara döküldü.

Test edilecek *Candida* suşları Sabouraud-dekstrozagarda saf kültür olarak üretildi. *Candida* suşlarının adlandırılmasında jerm tüp oluşturma ve API 20 C AUX identifikasyon sistemi kullanıldı. Her suş bir öze dolusu sıvı besiyerlerine ve GKKA yüzeyine ekildi. Ekimler 35°C'de 48 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda GTSB ve GSS tüpleri boşaltılıp içlerine 1 ml %0.25'lik safranin konularak çalkalandı ve tüpler kurutma kağıdına ters çevrilerek bekletildi. Tüp duvarında oluşan pembe-kırmızı renkli bir film tabakanın oluşması slime üretimi yönünden olumlu olarak kabul edildi. Glukozlu kongo kırmızısı besiyerinde 48 saat sonunda siyah koloni oluşturan suşlar slime olumlu olarak değerlendirildi. Sonuçlar istatistiksel olarak ki-kare testi ile değerlendirildi

BULGULAR

Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 126 *Candida* suşu çalışma kapsamına alındı. *Candida* suşlarının 83'ü (%65.9) *C. albicans*, 43'ü (%34.1) ise *albicans* dışı *Candida* idi. *Albicans* dışı *Candida*'ların 19 (%44)'u *C. tropicalis* dokuzu (%21) *C. glabrata*, dokuzu (%21) *C. famata*, üçü

(%7) *C. parapsilosis*, ikisi (%5) *C. guilliermondii* ve biri (%2) *C. krusei* idi. Bu suşların 34'ü (%27) vagina, 30'u (%24) idrar, 17'si (%14) deri, 13'ü (%10) rektal sürüntü, 11'i (%9) trakeal aspirat sıvısı, sekizi (%6) kan, dördü (%3) kateter, dördü (%3) ağız çalkantı suyu, dördü (%3) karın içi sıvı ve biri (%1) göz örneklerinden soyutlandı.

Slime üretimi GKKA'da 56 suşta (%44.4), GTSB' da 50 suşta (%39.6) ve GSS'da 42 suşta (%33.3) olumlu bulundu (Tablo 1). Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, yöntemler arasında anlamlı farklılık bulunmadı (p>0.05).

Tablo 1. *Candida* suşlarında slime faktör pozitifliğinin çeşitli yöntemlere göre dağılımı

Slime üretimi	GKKA	GTSB	GSS
Slime (+)	56 (%44.4)	50 (%39.6)	42 (%33.3)
Slime (-)	70 (%55.6)	76 (%60.4)	84 (%66.7)
Toplam	126 (%100)	126 (%100)	126 (%100)

GKKA: Glukozlu kongo kırmızılı agar

GTSB: Glukozlu triptik soy buyon

GSS: Glukozlu sıvı Sabouraud besiyeri

Örneklerde slime üretiminin kullanılan üç yöntemle göre dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir.

Slime faktör üretimi GKKA'a göre değerlendirildiğinde; 83 *C. albicans* suşunun 30'unda (%36.1), 43 *albicans* dışı *Candida* suşunun 26'sında (%60.4) olumlu bulundu. Glukozlu triptik soy buyonda *C. albicans*'da %38.5, *albicans* dışı *Candida*'da %41.8; GSS'de *C. albicans*'da %31.3, *albicans* dışı *Candida*'da %37.2 oranında pozitiflik tespit edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 2. Örneklerde slime üretiminin farklı yöntemlere göre dağılımı

Örnek	Sayı	GKKA		GTSB		GSS	
		Slime (+)	%	Slime (+)	%	Slime (+)	%
Vagina	34	14	41.8	10	29.4	13	38.2
İdrar	30	12	40.0	12	40.0	7	23.3
Deri	17	13	76.4	7	41.1	8	47.0
Rektal sürüntü	13	7	53.8	7	53.8	6	46.2
Trak. asp. sıvısı	11	5	45.5	8	72.7	5	45.5
Kan	8	2	25.0	4	50.0	1	12.5
Karın içi sıvı	4	3	-	2	-	2	-
Ağz. çal. sıvısı	4	-	-	-	-	-	-
Kateter	4	-	-	-	-	-	-
Göz	1	-	-	-	-	-	-
Toplam	126	56	44.4	50	39.6	42	33.3

GKKA: Glukozlu kongo kırmızılı agar

GTSB: Glukozlu triptik soy buyon

GSS: Glukozlu sıvı Sabouraud besiyeri

Tablo 3. *Candida* türlerindeki slime üretiminin yöntemlere göre dağılımı

Türler	Sayı	GKKA		GTSB		GSS	
		Slime (+)	%	Slime (+)	%	Slime (+)	%
<i>C. albicans</i>	83	30	36.1	32	38.5	26	31.3
<i>C. tropicalis</i>	19	13	68.4	6	31.5	4	21.0
<i>C. glabrata</i>	9	5	55.5	4	44.4	4	44.4
<i>C. famata</i>	9	3	33.3	3	33.3	3	33.3
<i>C. parapsilosis</i>	3	3	-	3	-	3	-
<i>C. guilliermondii</i>	2	2	-	2	-	2	-
<i>C. krusei</i>	1	-	-	-	-	-	-
Toplam	126	56	44.4	50	39.6	42	33.3

GKKA: Glukozlu kongo kırmızılı agar

GTSB: Glukozlu triptik soy buyon

GSS: Glukozlu sıvı Sobouraud besiyeri

TARTIŞMA

Candida cinsi mayalar; normal koşullarda ağız, mide, bağırsak kanalı ve vajina florasında bulunan mantarlardır. Hazırlayıcı koşulların varlığında yüzeysel ve derin kandidozlara neden olurlar (8). Son yıllarda nozokomiyal infeksiyon etkenleri içinde *Candida* türleride önemli oranda yer almaktadır. İnvazif işlemlerin artmasına, geniş spektrumlu antibiyotiklerin giderek daha yaygın kullanılmasına bağlı olarak *Candida* infeksiyonlarının sıklığında artış olmuştur (9).

Candida infeksiyonlarının oluşmasında konakçı savunma sisteminin yanında *Candida*'ya ait virulans faktörlerinde önemi vardır. Özellikle konakçı epitel hücrelerine yapışma, jerm tüp oluşturma, proteinaz enzim oluşturma özellikleri önemli virulans faktörleri olarak bildirilmektedir (10). *Candida*'nın konak hücresine yapışması ve kolonizasyonu infeksiyona öncülük eder. Slime faktör varlığında *Candida*'ların konak hücresine, protezlere, kateterlere daha kolay tutunarak kolonizasyon ve invazif infeksiyonlara yol açtığı bildirilmektedir (4, 5).

Önemli nozokomiyal infeksiyonlar arasında sayılan kateter infeksiyonları, mikro-organizmaların kateterlere yapışma ve kolonizasyonu sonucu oluşmaktadır. Bu yapışma ve kolonizasyon için slime faktörün gerekli olduğu bildirilmektedir. Kateterlerde ortaya çıkan biyofilmlerde hem mikrobiyal hem de konak faktörleri görev almaktadır. Mikrobiyal faktör olarak slime, konak faktörü olarak ise fibrin ve fibronektin rol oynamaktadır (11). Branchini ve ark. (6) venöz kateterlerden ve kandan izole edilen 31 *C. parapsilosis* suşunda slime üretimini %80 olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Pfaller ve ark. (5) 60 *C. parapsilosis* suşunda slime üretimini %65 oranında bulmuşlardır. Kan ve kateter örneklerinden izole edilen suşlarda ise %83 pozitiflik saptamışlardır. *Candida para*

psilosis'in yüksek şeker konsantrasyonlarında proliferasyon olarak ve slime faktör üretmekle katetere yapışıp infeksiyonlara neden olduğunu belirtilmiştir (5, 6). Bu çalışmada, ikisi kandan biri trakeal aspirat sıvısından olmak üzere üç tane örnekten *C. parapsilosis* izole edilmişti. Slime faktör üretimi her üç suşta da olumlu bulundu.

Çalışmada; sekiz kan örneğinin ikisinde GKKA, dördünde GTSB, birinde GSS ile slime faktör üretiminin olduğu görülmüş; kateter örneklerinde slime üretimi saptanmamıştır. Bunun çalışma kapsamına alınan kateter örnek sayısının az olmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Hilmioğlu ve ark. (7) slime üretimini kan örneklerinde %52 oranında saptamışlardır.

Candida suşlarında slime üretiminin *albicans* dışı *Candida*'lar içinde önemli bir virulans faktörü olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (5, 6, 12, 13). Çalışmada; GKKA'da *C. albicans* suşları için slime pozitifliği %36.1 iken, *albicans* dışı *Candida* suşlarında %60.4 oranında saptanmıştır. Burada *albicans* dışı *Candida*'larda slime üretiminin daha fazla olduğu bulunmuştur. Kalkancı ve ark. (14) *C. albicans* için %9.3, *albicans* dışı *Candida*'lar için %25 slime pozitifliği saptamışlardır. Yüce ve ark. (4) *C. albicans* için %11 oranında pozitiflik tespit etmişlerdir. Yücesoy ve ark. (15) *C. albicans* suşlarında slime üretimini %10 bulurken, *albicans* dışı *Candida*'lar için slime üretimini %34 oranında saptamışlar ve özellikle *albicans* dışı *Candida*'lar için slime üretiminin önemli bir virulans faktörü olduğunu belirtmişlerdir.

Candida'larda slime faktör üretimi, yapılmış çeşitli çalışmalarda koagülaz negatif stafilkoklar için kullanılan yöntemler modifiye edilerek araştırılmıştır (4-7). Bu çalışmada, 126 *Candida* suşunda slime üretimi üç farklı yöntem kullanılarak araştırıldı. Slime faktör yapımı GKKA %44.4, GTSB'da %39.6 ve GSS'de %33.3 oranında saptandı. Yöntemler slime üretimi açısından değerlendirildiğinde, en fazla GKKA'da pozitiflik saptandı. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında slime üretimi açısından yöntemler arasında fark bulunmadı.

Türkiye'de Hilmioğlu ve ark. (7) üç ayrı yöntem ile 215 *Candida* suşunda slime yapımını araştırdıkları çalışmalarında, Kongo kırmızılı-glukozlu beyin-kalp infüzyon agarında %53, GSS ve glukozlu beyin kalp infüzyon sıvısında %48.4 oranında slime üretimini pozitif bulmuşlar ve yöntemler arasında anlamlı fark saptamamışlardır (7).

Candida'larda slime faktör araştırılmasında kullanılan yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına karşın, GKKA yönteminin kolay uygulanması ve değerlendirilmesi nedeniyle tercih edilebilecek bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Cengiz AT.** *Staphylococcus*. Ustaçelebi Ş, ed. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*'de. Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**: 339-47.
2. **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.
3. **Kotilainen P.** Association of coagulase negative staphylococcal slime production and adherence with the development and outcome of adult septicemias. *J Clin Microbiol* **1990**; *28*: 2779-85.
4. **Yüce A, Yücesoy M, Yuluğ N.** Detection of slime production among isolates of *Candida albicans*. *İnfek Derg* **1996**; *10*: 267-9.
5. **Pfaller MA, Messer SA, Hollisn RJ.** Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1995**; *21*: 9-14.
6. **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.
7. **Hilmioğlu S, İkit M, Çavuşoğlu C, Aydemir Ş, Tümbay E.** *Candida* kökenlerinde slaym üretiminin üç ayrı yöntemle gösterilmesi ve slaym üretiminin kristal viyole reaksiyonu ile ilişkisi. *İnfek Derg* **1999**; *13*: 183-6.
8. **Konemann WE, Allen SD, Janda MW.** *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. New York: Lippincott, **1997**: 983-1069.
9. **Hoşoğlu S.** Nozokomiyal hematojen kandidoz. Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş, ed. *1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi (4-6 Mayıs 1999, İzmir) Tutanaklar*'da. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, **1999**: 157-65.
10. **Edwards JE.** *Candida* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, **1995**: 2289-305.
11. **Raad II.** The pathogenesis and prevention of central venous catheter-related infections. *Middle East J Anesthesiol* **1994**; *12*: 381-403.
12. **Girmenia C, Martino P, De Bernardis F, et al.** Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. *Clin Infect Dis* **1996**; *23*: 506-14.
13. **Levin AS, Costa SF, Mussi NS, et al.** *Candida parapsilosis* fungemia associated with implantable and semi-implantable central venous catheters and the hands of health care workers. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1998**; *30*: 243-9.
14. **Kalkancı A, Çırak MY, Mansuroğlu H, Kuştımur S.** *Candida* türlerinde slaym faktör belirlenmesi. *KLİMİK 99, 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (3-8 Ekim 1999, Antalya) Özet Kitabı*'nda. İstanbul: KLİMİK Derneği, **1999**: 195.
15. **Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ N.** *Candida* türlerinde slaym üretiminin incelenmesi. Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş, ed. *1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi (4-6 Mayıs 1999, İzmir) Tutanaklar*'da. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, **1999**: 279.