

CANDIDA TÜRLERİNİN BAZI ANTİFUNGALLERE DUYARLILIKLARININ VE FOSFOLİPAZ AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

AN INVESTIGATION ON THE ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY AND PHOSPHOLIPASE ACTIVITY OF CANDIDA SPECIES

Sema KEÇELİ¹ Fatma BUDAK¹ Gülden SÖNMEZ TAMER¹ Ayşe WILLKE²

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmit / Kocaeli

¹ Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

² Klinik Bakterioloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı

Anahtar Sözcükler: *Candida* türleri, *in vitro* antifungal duyarlılık, fosfolipaz aktivitesi, E test

Key Words: *Candida* species, *in vitro* antifungal susceptibility, phospholipase activity, E test

ÖZET

Bu çalışmada; *Candida* türlerinin saptanması, *in vitro* antifungal duyarlılıkları ve dirençlilik durumu ile fosfolipaz oluşturma arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 73 *Candida* suşunun flukonazol, itraconazol ve amfoterisin B'ye karşı duyarlılıkları E test yöntemi ile araştırıldı. Suşların türe göre dağılımında *C. albicans* (56) ilk sırada yer almakta; bunu *C. tropicalis* (dokuz), *C. kefyr* (üç), *C. guilliermondii* (iki), *C. krusei* (bir), *C. glabrata* (bir), *C. famata* (bir) izlemekte idi. En fazla direnç itraconazole karşı saptandı. İtraconazole dirençli suşların tür dağılımı *C. albicans* (yedi), *C. guilliermondii* (iki), *C. tropicalis* (iki), *C. krusei* (bir) şeklindeydi. Flukonazole dirençli dokuz (altı *C. albicans* iki *C. tropicalis*, bir *C. krusei*) suş saptandı. Amfoterisin B'ye karşı dirençli suş saptanmadı. Fosfolipaz aktivitesi toplam 50 (45 *C. albicans* ve beş *C. albicans* dışı) suşta gösterilebildi. Fosfolipaz aktivitesi ile azollere duyarlılık arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0.05$). Sonuç olarak; *Candida* türlerinin ve antifungal MİK'in saptanması tedavinin yönlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Azol direnci, *C. albicans*'in major virülans faktörlerinden biri olan fosfolipaz aktivitesi ile ilişkili değildir.

SUMMARY

The purpose of this study was to identify *Candida* spp., to determine the *in vitro* antifungal susceptibility and to investigate the relationship between susceptibility and phospholipase activity. The *in vitro* antifungal susceptibility of 73 *Candida* spp. isolated from different clinical specimens were determined by using E test. Distribution of isolates were *C. albicans* (56), *C. tropicalis* (nine), *C. kefyr* (three), *C. guilliermondii* (two), *C. krusei* (one), *C. glabrata* (one), and *C. famata* (one). The highest rate of resistance was against itraconazole; resistance was found in seven *C. albicans*, two *C. guilliermondii*, two *C. tropicalis* and one *C. krusei* strain(s). Resistance to fluconazole was in nine isolates (six *C. albicans*, two *C. tropicalis*, one *C. krusei*). No resistance against amphotericin B was detected. Phospholipase activity was detected in 50 (45 *C. albicans* and five non-*C. albicans*) isolates. There was no statistical relationship between phospholipase activity and azole resistance ($p>0.05$). In conclusion; the identification of *Candida* spp. and determination of antifungal MIC levels are important in regard to the management of treatment. Azole resistance is not related to phospholipase activity, one of the major virulence factors of *C. albicans*.

GİRİŞ

Son yıllarda immunosupresif ve antibakteriyel ilaçların yaygın olarak kullanımı sonucu mantar infeksiyonlarında artış gözlenmektedir. Sağaltımın yönlendirilmesinde *in-vitro*

antifungal duyarlılık testlerinin uygulanması yararlı olacaktır. E testi pahalı olmasına karşılık disk difüzyon gibi kolayca uygulanabilmesi, ek malzeme gerektirmemesi yanında MİK değerlerini saptayabilmesi nedeni ile son yıllarda önem kazanmıştır (1).

Ekstrasellüler fosfolipazlar birçok mikroorganizma tarafından üretilen ve fosfolipitleri parçalayan enzimlerdir. Bu enzimlerin konak hücre membranlarında hasara yol açarak bazı bakteri ve mantarların patogeneğinde virülans faktörü olarak rol oynamaktadır. Ghannoum (2) çalışma sonuçları doğrultusunda, fosfolipazların anlaşılmasının yeni antifungal stratejileri, belirlemede önemli olduğunu bildirmiştir.

Bu çalışmanın amacı, çeşitli klinik örneklerden izole edilen kandidaların türlerinin saptanması; flukonazol, itrakonazol ve amfoterisin B'ye *in-vitro* duyarlılığının araştırılması ve dirençlilik durumu ile fosfolipaz oluşturma arasındaki ilişkiyi incelemektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Candida suşları: Hastanede yatan ya da poliklinik hastalarından alınan çeşitli klinik örneklerden (idrara, kan, vagina salgısı, rektum sürüntüsü, dışkı, balgam, periton sıvısı, kateter, diren, trakeal aspirat, yara) izole edilen 73 *Candida* suşu çalışmaya alındı. Suşların identifikasyonunda; germ tüp, mısır unu-tween 80 besiyerindeki morfolojileri ve API-20 C (bio Mérieux, Fransa) maya identifikasyon sistemi kullanıldı (3).

Antifungal duyarlılık saptanması: Çalışmaya alınan *Candida* suşlarının antifungal (flukonazole, itrakonazole ve amfoterisin B) duyarlılıkları E test (AB Biodisk, İsveç) yöntemi ile araştırıldı. E testi için %2 glukoz içeren RPMI 1640 (Angus, İtalya) besiyeri kullanıldı ve sonuçlar üretici firmanın önerilerine göre belirlendi. Minimum inhibitör konsantrasyon (MIK, mg/ml) değerleri 24-48 saat inkübasyon sonrasında değerlendirildi (1).

Fosfolipaz aktivitesinin araştırılması : Çalışmaya alınan 73 suşun 30'unda fosfolipaz aktivitesi araştırıldı. Yöntem olarak, Price ve ark. (4)'ün plak yöntemi kullanıldı. Besiyeri olarak, 1 M NaCl, 0.005 M kalsiyum klorür ve %8 steril yumurta sarısı eklenmiş Saboraud-Dekstroz-Agar (SDA) kullanıldı. Yumurta sarısı 1000 g'de 15 dakika santrifuj edildi. Daha sonra supernatanta steril distile su

eklenerek ilk volümüne getirildi ve steril SDA'ya eklendi. Eşit miktardaki sitrik asit ve disodyum hidrojen fosfat ile steril koşullarda karıştırılarak pH: 4.3'e ayarlandı.

Candida suşları SDA besiyerine pasajlanarak 24-48 saatte üretildi. Üreyen kolonilerden steril distile su kullanılarak McFarland 1'e uygun bulanıklıkta *Candida* süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlardan dört-altı örnek bir plağa olacak şekilde bir lup dolusu inoküle edildi. Plaklar 30° C'de nemli bir ortamda dört gün bekletildi.

Dört gün sonra koloniler ve koloni etrafında oluşmuş presipitasyon zonları ölçülerek presipitasyon aktivitesini gösteren (phospholipase zone) Pz değerleri aşağıdaki şekilde hesaplandı.

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

Pz değeri 1.00'e eşit ise suş fosfolipaz negatif olarak değerlendirilirken, bu değer 1.00'den küçük ise suşun fosfolipaz ürettiği kabul edildi (5).

İstatiksel analiz: Sonuçların değerlendirilmesinde ki-kare testi kullanıldı.

BULGULAR

Suşların türe göre dağılımında *C. albicans* (56) ilk sırada yer almakta; bunu *C. tropicalis* (dokuz), *C. kefyr* (üç), *C. guilliermondii* (iki), *C. krusei* (bir), *C. glabrata* (bir), *C. famata* (bir) izlemekte idi.

İtrakonazole direnç toplam 11 suшта saptandı. Bunların tür dağılımı; *C. albicans* (yedi), *C. guilliermondii* (iki), *C. tropicalis* (iki) şeklindeydi. Flukonazol dirençli dokuz (altı *C. albicans*, iki *C. tropicalis* bir *C. krusei*) suş saptandı. Amfoterisin B'ye karşı dirençli suş saptanmadı. *C. albicans* ve *C. albicans* dışı suşların MIK₅₀ ve MIK₉₀ değerleri aşağıda Tablo 1'de gösterilmektedir.

Çalışmaya alınan 73 *Candida* suşunun 50'sinde (%68.5) fosfolipaz aktivitesi saptandı. Bunların 45'i (%81.8) *C. albicans* ve beşi (%27.8) ise *C. albicans* dışı idi. İki grup

Tablo 1. *Candida* türlerinin E test yöntemi ile *in-vitro* antifungal duyarlılıkları (µg/ml)

<i>Candida</i> türleri ve antifungal ilaç	MIK aralığı	MIK ₅₀	MIK ₉₀
<i>C. albicans</i> (n=55)			
Flukonazol	0.032->256	0.125	1.0
İtrakonazol	0.004->32	0.016	>32
Amfoterisin B	0.023-0.64	0.032	0.32
<i>C. albicans</i> dışı <i>Candida</i> spp. (n=18)			
Flukonazol	0.032->256	0.125	>256
İtrakonazol	0.004->32	0.032	>32
Amfoterisin B	0.008-0.64	0.064	0.47

arasında fosfolipaz enzimi varlığı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p>0.05$). Minimum ve maksimum Pz değerleri sırasıyla 0.08 ve 1.0 idi, ortalama Pz değeri ise 0.733 ± 219 olarak hesaplandı. Flukonazol dirençli dokuz suşun altısında (beş *C. albicans*, bir *C. tropicalis*); itrakonazol dirençli 11 suşun dokuzunda (sekiz *C. albicans*, bir *C. tropicalis*) fosfolipaz aktivitesi saptandı. Fosfolipaz enzim varlığı ile azollere duyarlılık veya dirençlilik karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamadı ($p>0.05$) (Tablo 2). Aynı karşılaştırma *C. albicans* suşları içerisinde yapıldığında yine anlamlı bir ilişki saptanamadı.

Tablo 2. Fosfolipaz aktivitesi ile flukonazole ve itrakonazole duyarlılığı arasındaki ilişki

Fosfolipaz aktivitesi	Sayı	Flukonazol		İtrakonazol	
		Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
Negatif	23	20	3	41	2
Pozitif	50	44	6	21	9
Toplam	73	64	9	62	11

TARTIŞMA

Candida infeksiyonlarında kullanılan antifungal ilaçlara karşı direnç geliştiği gözlenmektedir. Bu nedenle uygun ve etkin antifungal seçiminde *in vitro* antifungal duyarlılık testlerine gereksinim artmaktadır. Standart antifungal duyarlılık testi olarak buyon mikrodilution testi olan National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS M27-A) kullanılmaktadır. Bu yöntem alternatif olarak daha basit, pratik ve daha çabuk sonuç verebilen testlere ihtiyaç bulunmaktadır. Alternatif yöntemlerden biri olan E test ile tekrar edildiğinde, aynı kantitatif MIK sonuçları elde edilebilmektedir (6). E testin standart NCCLS yöntemi ile karşılaştırıldığı; birkaç çalışmada MIK uyumu flukonazole için %67-%90, itrakonazole için %63.8-%84, amfoterisin B için %78-%100 olarak saptanmıştır (1,7-9). Buyon dilüsyon metodu ile E test arasındaki düşük MIK uyumları her iki yöntem için farklı besiyerinin seçilmiş olmasından kaynaklanabilir. E test yönteminde, özellikle azoller denendiğinde, inhibisyon zone sınırlarının belirlenmesinde zorluk yaşanmaktadır. Farklı MIK değerleri belirlemeyi engellemek için, petriyeri aynı kişinin değerlendirmesi ve değişik üreme paternleri gösteren kontrollerin kullanılması sağlanmalıdır.

E test ile antifungal duyarlılık değerlendirilirken MIK değeri amfoterisin için 2 µg/ml, flukonazole için 64 µg/ml, itrakonazole için ≥ 1 µg/ml olarak kabul edilmiştir. Bu değerler referans olarak değerlendirmeye gidildiğinde en yüksek direncin itrakonazole karşı olduğu gözlenmiştir. Çalışmada itrakonazole için MIK aralığının 0.004 ile >32 µg/ml arasında değiştiği görülmüştür. Dirençli 11 suşun

yedisi *C. albicans*, ikisi *C. guilliermondii*, ikisi *C. tropicalis*'tir. Bu sonuçlara benzer, Chryssathhou (8)'nin çalışmasında itrakonazole için MIK aralığını 0.008->32 µg/ml, Koç ve ark. (1) ise 0.03->32 µg/ml olarak bildirmişlerdir (1).

Flukonazol için MIK aralığı 0.032->256 arasında değişmekte olup dokuz dirençli suş saptanmıştır. Bu suşların altısı *C. albicans*, ikisi *C. tropicalis* ve biri *C. krusei*'dir. Epsinel-Ingroff ve Pfaller (10) çalışmalarında MIK değerlerini 0.25->64 µg/ml, Hawser ve ark. (11) 0.12->256 µg/ml ve ark. (12) 0.12->64 µg/ml, Arıkan ve ark. (13) <0.2->64 µg/ml olarak saptadıklarını bildirmişlerdir.

Amfoterisin B kuşkulu ciddi mantar infeksiyonların ampirik tedavisinde kullanımı sağlayan geniş spektrumlu fungisidal aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte, *C. lusitanae* ve *C. guilliermondii* gibi türlerde primer direnç görülebilmektedir (14). Amfoterisin B'ye direnç nadir olarak bildirilmesine karşın, bazı çalışmalar poliyen direncinin klinik başarısızlıkla ilgili olabileceğini göstermiştir (1, 2). E test yönteminin amfoterisin B'ye duyarlılığı azalmış kökenlerinin saptanmasında standart mikrobuyon dilüsyon yöntemine göre daha üstün olduğu ileri sürülmesine karşın bu çalışmada amfoterisin B'ye dirençli suş saptanmamıştır (15). Bu sonuçla, azollere dirençli *Candida* suşlarında amfoterisin B'nin en etkin antifungal ajan olduğu gösterilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında *Candida* türlerinin fosfolipaz aktivitesi değerlendirilmiştir. Ekstrasellüler fosfolipaz aktivitesi kandidaların patogeneğinde virülans faktörü olarak rol oynamaktadır. Yücesoy ve ark. (16) sağlıklı ve *Candida* infeksiyonu olan bireylerden soyutlanan *C. albicans* suşlarında yaptıkları bir çalışmada fosfolipaz aktivitesini sırasıyla %55.5 ve %76.9 olarak bildirmişlerdir. Yücel ve Kantarcıoğlu (17) ise sadece *C. albicans* kökenlerinde yaptıkları çalışmada bu oranı daha yüksek %94.4 olarak saptamışlardır. Bu çalışmada enzim varlığı saptanan suşların 45'inin (%81.8) *C. albicans* olması, *C. albicans* suşlarının virülansında fosfolipaz aktivitesinin diğer *Candida* suşlarına oranla önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir ($p<0.05$).

Antifungal direnci ile virülans faktörleri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar az sayıdadır. Flukonazol direnci ile *C. albicans*'in germinasyon, adhezyon, proteinaz ve fosfolipaz gibi virülans faktörleri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda, sadece proteinaz aktivitesi ile direnç arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (18-21). Bununla birlikte, Kalkanlı ve ark. (22)'nin vulvovajinal kandidoz etkeni *Candida* suşlarında virülans faktörleri ile antifungal (flukonazol, ketokanazol, itrakonazol, amfoterisin B ve terbinafin) duyarlılık arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmasında; *C. albicans* suşlarının %84'ünde fosfolipaz ve aynı

zamanda proteinaz aktivitesi saptanmış, fakat enzim aktivite ile antifungal duyarlılık arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bu çalışmada da azol direnci ile fosfolipaz aktivitesi arasında anlamlı bir ilişki saptanamamıştır.

Sonuç olarak, tüm *Candida* türlerinde artan direncin özellikle immünitesi zayıf kişilerde önemli bir sağaltım sorunu olduğu, bu nedenle de türlerin tanımlanmasının ve antifungal testlerinin yapılmasının ve antifungal ilaç seçiminin özenli davranılmasının gerekliliği ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Koç AN, Gökahmetoğlu S, Oğuzkaya M. Comparison of E test with the broth microdilution method in susceptibility testing of yeast isolates against four antifungals. *Mycoses* 2000; 43: 294-7.
2. Ghannoum MA. Extracellular phospholipase as universal virulence factor in pathogenic fungi [Abstract]. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 1998; 39: 55-9.
3. Roberts GD. Laboratory methods in basic mycology. In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM, eds. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology* 9th ed. St Louis: Mosby, 1994: 752-8.
4. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; 20: 7-14.
5. Lodder J, ed. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 1970.
6. Sanchez ML, Jones R. E test, an antimicrobial susceptibility testing method. *Antimicrob Newslett* 1993; 8: 1-7.
7. Colombo LA, Barchiesi F, McGough DA, Rinaldi MG. Comparison of E test and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth microdilution method for azole antifungal susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 535-40.
8. Chyrssanthou E. Trends in antifungal susceptibility among Swedish *Candida* species bloodstream isolates from 1994 to 1998: Comparison of the E test and the sensititre yeastone colorimetric antifungal panel with the NCCLS M27-A Reference method. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4181-3.
9. Pfaller MA, Messer SA, Bolmström A, Odds FC, Rex JH. Multisite reproducibility of the E test MIC method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1691-3.
10. Espinel-Ingróff AE, Pfaller MA. Antifungal agents and susceptibility testing. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al., eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1995: 1405-14.
11. Hawser SP, Norris H, Jessup CJ, et al. Comparison of a 2,3-bis (2 methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5 (phenylamino carbonyl)-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility for antifungal agents. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1450-2.
12. Gün H, Özyurt M, Haznedaroğlu T. Klinik örneklerden patojen etken olarak izole edilen kandida suşlarının sistemik etkili antifungal ajanlara duyarlılıkları. *Gaziantep Üniv Tıp Fak Derg* 1993; 4: 181-92.
13. Arkan S, Gür D, Akova M. Klinik önem taşıyan *Candida* türlerinin antifungal ajanlara *in vitro* duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 1995; 9: 60.
14. Powderly WG, Kobayashi GS, Herzig GP, Medoff G. Amphotericin B-resistant yeast infection in severely immunocompromized patients. *Am J Clin Microbiol* 1988; 84: 826-32.
15. Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH. Comparison of E test and National Committee for Laboratory Standards broth microdilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2520-2.
16. Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ, N. Sağlıklı ve *Candida* enfeksiyonu olan bireylerden soyutlanan *C. albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. *İnfek Derg* 2000; 14: 405-8.
17. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. *Candida albicans* kökenlerinde bazı virülans faktörlerinin (fosfolipaz, proteinaz, çimlenme borusu ve adherans) ve aralarındaki korelasyonun belirlenmesi. *İnfek Derg* 2001; 15: 517-25.
18. Forgacs-Fekete K, Gyüre L, Lenkey B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses* 2000; 43: 273-9.
19. Özkütük A, Ergon C, Özdemir S, Yuluğ N. *Candida albicans* suşlarında bazı virülans faktörleri ve flukonazol direnci arasındaki ilişki. *Candida Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Simpozyumu (21-22 Haziran 2002, Eskişehir)* kitabında. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 2002: Poster No. 1.
20. Ghannoum M, Abu-Elteen K. Correlative relationship between proteinase production, adherence and pathogenicity of various strains of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 1986; 24: 47-13.
21. Ollert MW, Wende C, Görlich M, et al. Increased expression of *Candida albicans* secretory proteinase, a putative virulence factor, in isolates from human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2543-9.
22. Kalkancı A, Kuştimur S, Bozdayı G, Biri A. Vulvovajinal kandidoz etkeni *Candida* suşlarında bazı virülans faktörleri. 2. *Ulusal Manta Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi (19-21 Haziran 2001, Ankara) Tutanaklar'da*. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 2001: Poster No. 13.