

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *CANDIDA ALBICANS* TÜRÜ MAYA MANTARLARINDA VİRULANS FAKTÖRLERİNİN (PROTEİNAZ, SLİME VE FOSFOLİPAZ) İN-VİTRO ARAŞTIRILMASI

IN VITRO INVESTIGATION OF VIRULENCE FACTORS (PROTEINASE, SLIME AND PHOSPHOLIPASE) IN CLINICAL ISOLATES OF *CANDIDA ALBICANS*

Uğur ARSLAN Duygu FINDIK

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya

Anahtar Sözcükler: *Candida albicans*, virulans faktörleri, proteinaz, fosfolipaz, slime

Key Words: *Candida albicans*, virulence factors, proteinase, phospholipase, slime

ÖZET

Bu çalışmada; kan, idrar, vajen akıntısı ve oral sürüntüden soyutlanan edilen 100 *Candida albicans* kökeninde kandidoz patogeneğinde etkili virulans faktörleri arasında önem taşıyan proteinaz, fosfolipaz ve slime aktivitelerinin *in vitro* belirlenmesi, fosfolipaz ve proteinaz enzimi arasında bir korelasyonun olup olmadığı ve suşların izole edildikleri vücut bölgelerine göre sahip oldukları virulans faktörlerinde bir farklılık bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. En fazla proteinaz enzimi varlığı vajinal akıntı örneklerinden (%67.5) elde edilmiştir. En yüksek proteinaz aktivitesi vajinal akıntı örneklerinde (Ort Pz = 0.819 ± 0.12) ve en düşük aktivite oral sürüntü örneklerinde (Ort Pz = 0.906 ± 0.094) gözlenmiştir. Tüm örnekler için ortalama fosfolipaz aktivitesi 0.868 ± 0.112 bulunmuştur. Suşlar arasında en yüksek slime aktivitesi idrar (%52.5) ve kan (%50) örneklerinde saptanmıştır. Hücre dışı virulans faktörlerinden proteinaz ve fosfolipaz arasındaki korelasyon sadece idrar örneklerinden izole edilen *C. albicans* suşlarında görülmüş, diğer klinik örnekler için bu korelasyon anlamlı bulunmamıştır. İncelenen virulans faktörleri ile suşların izole edildikleri vücut bölgeleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Sonuç olarak, çalışmada *C. albicans*'in neden olduğu infeksiyonun oluşum mekanizmasında mikro-organizmaya ait bir çok virulans faktörünün rolü olduğu kanısına varılmıştır.

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the presence of proteinase, phospholipase and slime activities which are important virulence factors in 100 *Candida albicans* strains isolated from blood, urine, vaginal discharge and oral cavity. The correlation between phospholipase and proteinase enzymes and the distribution of virulence factors of the isolates according to body parts were also studied. In 64 of 100 *C. albicans* isolates, proteinase activities were determined as one positive. Proteinase activity was determined in 67.5% of the strains from vaginal discharge samples. Higher phospholipase activity was observed in vaginal discharge strains (Average Pz = 0.819 ± 0.12) and lower activity in oral cavity strains (Average Pz = 0.906 ± 0.094). The average phospholipase activity in all samples was 0.868 ± 0.112. Among the isolates, the high slime activity was determined in urine (52.5%) and blood (50%), samples. The correlation between proteinase and phospholipase activities were only observed in *C. albicans* strains from urine samples and for other clinical samples no correlation was determined. There was no correlation between the virulence factors and the parts of the body from which the strains were isolated. It is concluded that more than one virulence factor play role in the infections with *C. albicans*.

GİRİŞ

Candida türleri insanlarda görülen en yaygın patojen mantarlardandır. Doğada geniş bir dağılım gösteren *Candida* türleri insan ve hayvanların normal florasında da bulunmaktadır. Bu organizmalar invazif olmayan yüzeysel infeksiyonlardan, derin dokuları tutan infeksiyonlara kadar geniş hastalık spektrumuna sahiptirler (1). İnsanların çoğunda yaşamları boyunca *Candida* infeksiyonuna karşı "doğal direnç" vardır. Konak hücre hasarını *Candida*ların virulans faktörleri ve mantara karşı savunma mekanizmaları aracılığı ile verilen konak immün yanıtını belirler (2). *Candida*ların türüne ve kökenine bağlı olan bazı faktörler konağın bağıışıklılığını yenmek için birlikte rol oynarlar. Patojenite kriterleri denilen bu faktörler *C. albicans* ve diğer *Candida* türlerinin virulansını belirler (3, 4). Virulans faktörlerinin önemi en iyi *C. albicans* türünde gösterilmiştir (5). Bu faktörlerden *C. albicans* için en önemlilerinin, konak hücreye ve yapay yüzeylere adezyonu için gerekli olan slime; ayrıca epitel hücrelerine girerek derin dokulara doğru ilerleyebilmesinde rol oynayan proteinaz ve fosfolipaz enzimleri olduğu ileri sürülmektedir (6-12).

Bu çalışmada değişik klinik örneklerden izole edilen *C. albicans* kökenlerinde önemli virulans faktörlerinden proteinaz, fosfolipaz ve slime aktivitelerinin *in vitro* saptanması, fosfolipaz ve proteinaz enzimi arasında bir korelasyonun olup olmadığı ve suşların izole edildikleri vücut bölgelerine göre sahip oldukları virulans faktörlerinde bir farklılık bulunup bulunmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney kökenleri

Ağustos 2001-Eylül 2002 tarihleri arasında, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli poliklinik ve kliniklerinden infeksiyon düşünülen hastalardan alınan örnekler kültür için Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderildi. Bu örneklerden soyutlanan 100 *C. albicans* suşu seçilerek incelemeye alındı. Kökenlerin alındıkları vücut bölgelerine göre dağılımı; dolaşım sistemi (n=10), oral sürüntü (n=10), vajina salgısı (n=40) ve idrardan (n=40)'dır. Bu örneklerden elde edilen saf maya kökenlerinden insan serumunda 37 °C'de 2-2.5 saatte çimlenme borusu geliştiren ve cornmeal agarda özgül klamidospore üretenler belirlenerek API ID 32C (bio Mérieux, Fransa) ile asimilasyon testleri uygulandıktan sonra *C. albicans* olarak tanımlanarak çalışmaya alındı. Her köken Sabouraud-dekstroz-agar (SDA) (OXOID) besiyerinde düzenli aralıklarla pasaja alınarak +4 °C'de saklandı.

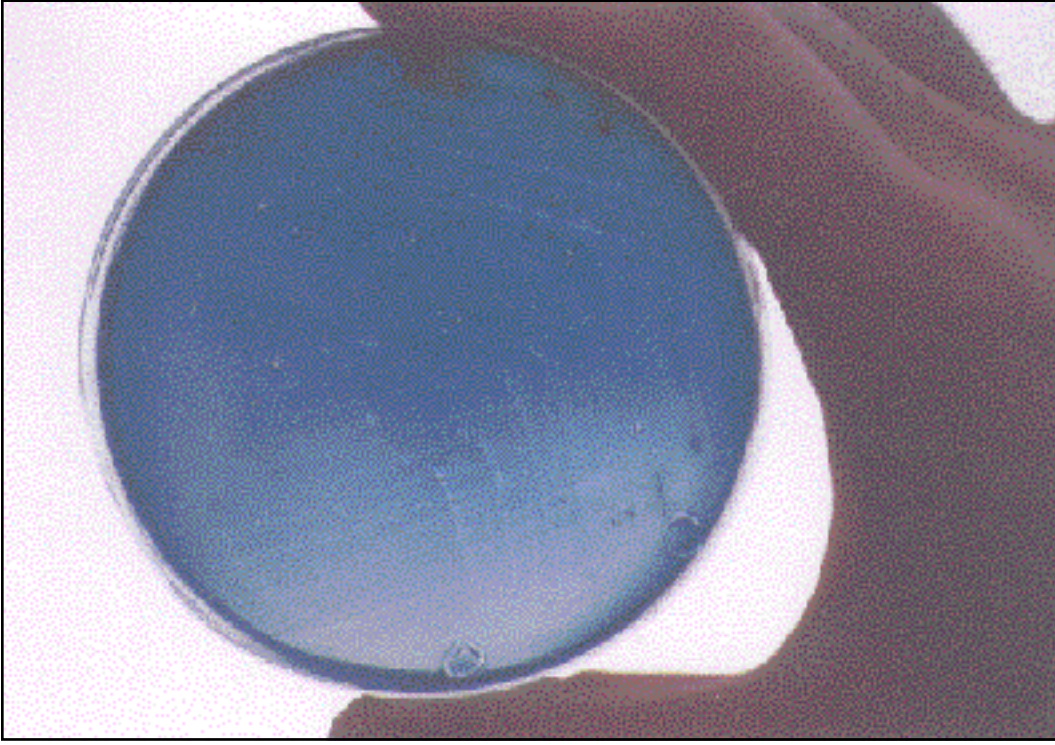
Proteinaz üretiminin belirlendiği deneyler

İzole edilen *C. albicans* kökenlerinde proteinaz varlığının gösterilmesi için, altın standart olarak kabul edilen sığır serum albumin agar (SSAA)'ı kullanıldı. SSAA için %2 glikoz, %0.1 KH₂PO₄, %0.05 MgSO₄ ve %2 agar karışımı 121 °C'de 15 dakika tutularak steril edildi ve pH 4.5'e ayarlandı. Ayrıca %1'lik sığır serum albumin (Sigma) çözeltisi hazırlandı ve 0.20 µm çapındaki membran filtre ile steril edildi. Otoklavdan çıkan besiyeri 45-50 °C'ye soğutuldu ve %20 oranında steril sığır serum albumini ilave edilerek 9 cm'lik Petri kutularına 15'er ml döküldü (13).

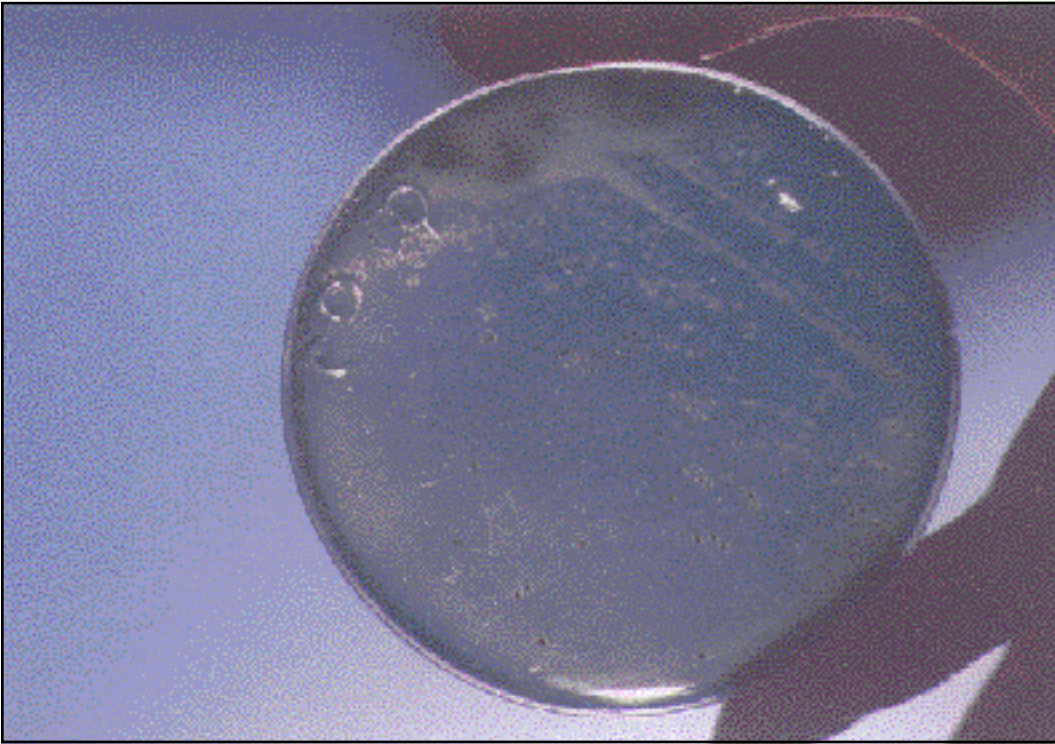
Sabouraud-dekstroz-agar'da üreyen *C. albicans* kökenleri 3 ml'lik steril Sabouraud-dekstroz-buyon içeren tüplere alındı ve oda ısısında 48 saat bekletildi. Buyonda üreyen *C. albicans* suşları santrifüj edildi ve dipte kalan çökelti steril fosfat tamponu (PBS, pH:6) ile 3000 devir/dakika'da 15 dakika santrifüj edilerek üç kez yıkandı. Yıkama sonrası çökelti steril distile su ile 2 Mc Farland (yaklaşık 10⁸ blastokonidya/ml) olacak şekilde ayarlandı. Bu süspansiyondan SSAA besiyerine tek koloni düşecek şekilde ekim yapılarak oda ısısında 96-120 saat bekletildi. Yüzyirmi saatlik inkübasyon sonunda besiyerinin üzerini örtecek şekilde %20'lik triklor asetik asit eklendi 15-20 dakika bekletildikten sonra döküldü ve pH'sı 6 olan PBS ile yıkandı. Plaklar %0.06 amidoblack boyası ile (Merck, 45: 10: 45 oranlarında metanol, asetik asit ve distile su) 10 dakika boyandı. Çözücü (boyasız 45: 10: 45 oranlarında metanol, asetik asit ve distile su) ile plaklar yıkanarak boya çıkartıldı, PBS ile plaklar tekrar iki kez yıkandı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı. Proteinez aktivitesinin ölçülmesinde ve hesaplanmasında, koloninin etrafında oluşan belirgin halka şeklindeki presipitasyon zonu dikkate alındı. Koloni etrafında şeffaf zonu olmayanlar negatif (Şekil 1), koloni köşesinden itibaren 1-2 mm'lik şeffaf zon oluşturanlar bir pozitif (+) (Şekil 2), 3-5 mm'lik zon oluşturanlar ise iki pozitif (++) olarak değerlendirildi (13).

Fosfolipaz üretiminin belirlendiği deneyler

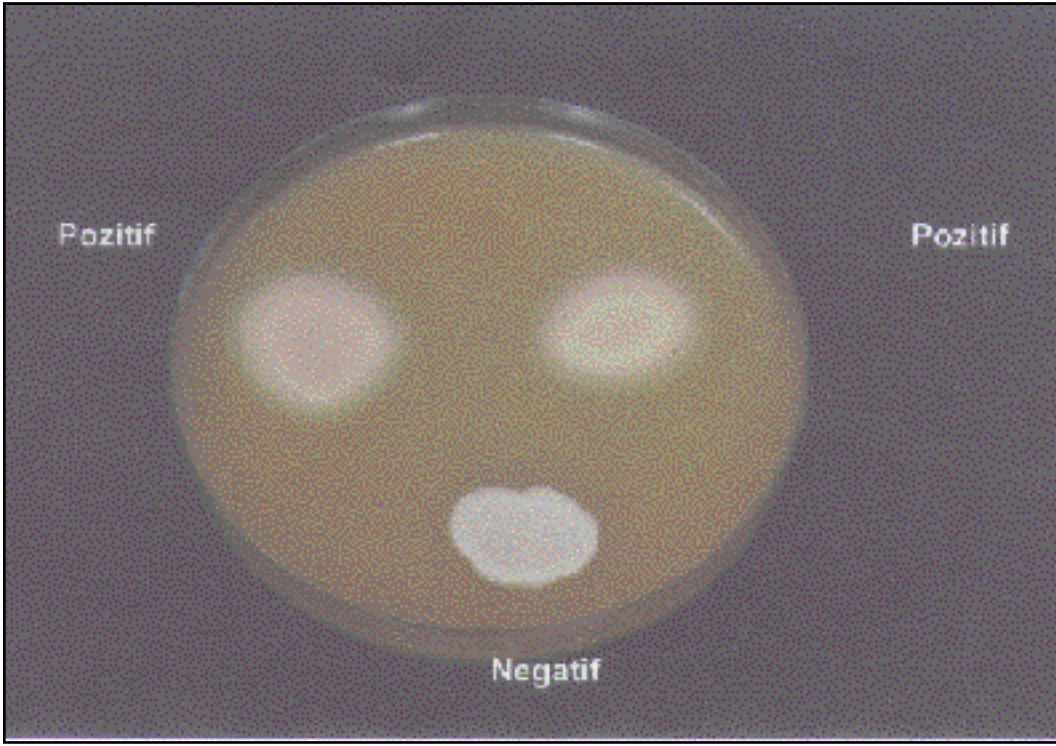
Kökenlerin fosfolipaz aktivitesinin saptanmasında yumurta sarılı agar (YSA) plak yöntemi uygulandı. Besiyeri olarak 1 M sodyum klorür, 0.005 M kalsiyum klorür ve %8 steril yumurta sarısı eklenmiş SDA kullanıldı. Yumurta sarısı 1000 g'de 15-20 dakika santrifüj edildi. Daha sonra üstteki sıvı atıldı ve çökeltiye steril distile su eklenerek ilk volümüne getirildi. Hazırlanan yumurta sarısı içerisinde 1 M NaCl₂ ve 0.005 CaCl₂ bulunan ve 121 °C'de 10 dakika tutularak steril edildi ve SDA'ya eklendi. Eşit miktarda sitrik asit ve disodyum hidrojen fosfat tamponu ile besiyeri steril koşullarda karıştırılarak pH 4.3 olacak



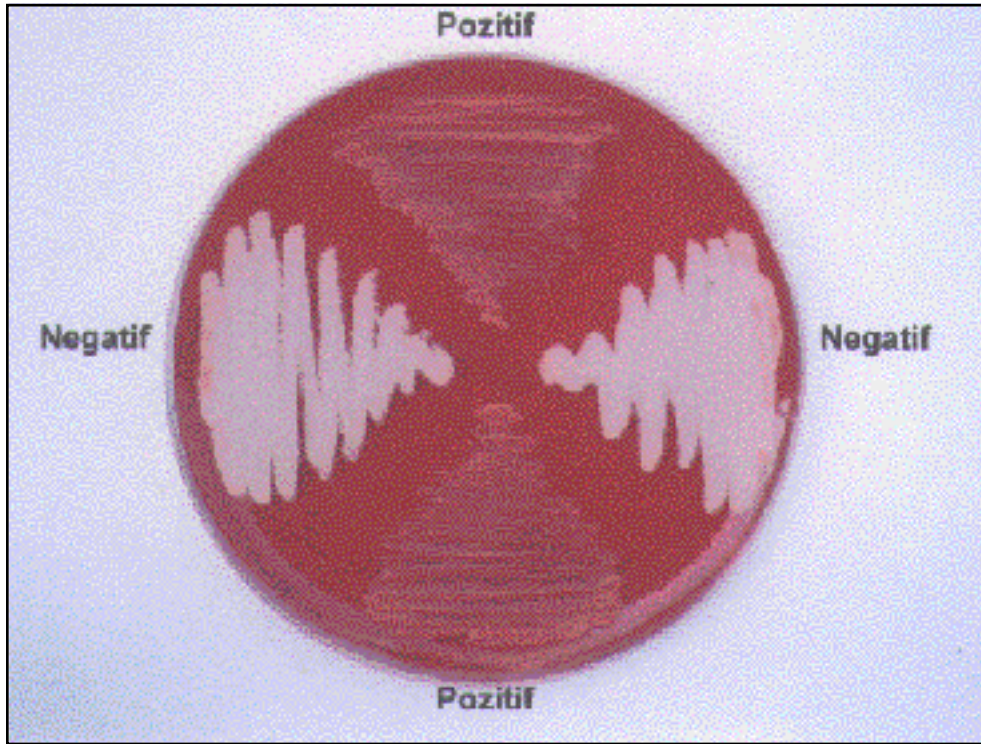
Şekil 1. *C. albicans*'ın sığır serum albumin agardaki proteinaz aktivitesi negatif koloni görünümü.



Şekil 2. *C. albicans*'ın sığır serum albumin agardaki proteinaz aktivitesi pozitif koloni görünümü.



Şekil 3. *C. albicans*'ın yumurta sarılı agardaki fosfolipaz aktivitesi pozitif ve negatif suşların görünümü.



Şekil 4. *C. albicans*'ın kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon agardaki slime aktivitesi pozitif ve negatif suşların görünümü.

şekilde ayarlandı. Sabouraud-dekstroz-agar'da üretilen *C. albicans* kökenlerinden serum fizyolojik ile Mc Farland 1'e uygun bulanıklıkta süspansiyonlar hazırlandı. Plak 4 veya 6 eşit parçaya bölündü ve bu süspansiyondan 10 µl alınarak ekimler yapıldı. Plaklar 30 °C'de nemli ortamda dört gün bekletildi. Dört gün sonra koloni etrafında presipitasyon zonu oluşturanlar, fosfolipaz aktivitesi yönünden pozitif kabul edilerek aktivite ölçüldü (14) (Şekil 3).

Fosfolipaz aktivitesinin ölçülmesinde ve hesaplanmasında, dört gün sonra koloninin etrafında oluşan belirgin halka şeklindeki presipitasyon zonu (Pz) dikkate alındı. Fosfolipaz aktivitesi (Pz) koloni çapının, koloni ile birlikte presipitasyon zonunun toplam çapına oranı (r/R) olarak hesaplandı. Bulunan Pz katsayılarına göre Pz aktiviteleri dört grupta değerlendirildi; 0.9-1 (+) çok yüksek Pz grubu, 0.89-0.80 (++) yüksek Pz grubu, 0.79-0.70 (+++) düşük Pz grubu ve <0.69 (++++) çok düşük Pz grubu olarak adlandırıldı. Bu değerlendirmeye göre Pz değeri küçüldükçe fosfolipaz aktivitesi artmakta, Pz=1.00 değeri negatif fosfolipaz aktivitesini göstermektedir. Bu durumda 0.9-1.00 değerine sahip olanlar fosfolipaz aktivitesi çok düşük grubu; <0.69 olanlar fosfolipaz aktivitesi çok yüksek grubu oluşturmaktadır (15).

Slime faktör üretiminin belirlendiği deneyler

Slime faktör varlığı Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon (KKBKI) agar yöntemi ile incelendi. Besiyeri litrede 80 g glikoz ve 0.8 g Kongo kırmızısı olacak şekilde hazırlandı. Otoklavda steril edildikten sonra, 9 cm'lik petrilere döküldü (16). Sabouraud-dekstroz-agar'daki test edilecek *C. albicans* kökenlerin bir plakta en fazla dört köken olacak şekilde pasajları yapıldı. Pasajlar 35 °C'de 48 saat inkübe edildi. Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon agar yönteminde slime varlığı "kongo red fenomenine" göre değerlendirildi. Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon agarda süre sonunda koyu kırmızı koloni oluşturan *C. albicans*lar slime olumlu, pembe koloni oluşturanlar ise olumsuz olarak değerlendirildi (16,17) (Şekil 4).

İstatistiksel analiz

Candida albicans suşları için elde edilen virulans faktörlerinin olumluluğu ile suşların izole edildikleri bölgeler arasındaki ilişki çok gözlü düzende ki-kare testi ile değerlendirildi. Fosfolipaz aktivitesi pozitif *C. albicans* suşları için elde edilen ortalama Pz değerleri ile izole edildikleri bölgeler arasındaki ilişki ise ortalama arasındaki farkın önemlilik testi ile değerlendirildi.

BULGULAR

Değişik kliniklerden soyutlanan 100 *C. albicans* suşunun 64'ünde proteinaz aktivitesi saptanmıştır. Proteinaz aktivitesi pozitif suşların; hepsi bir pozitif (+) olarak saptanmış, iki pozitif (++) proteinaz aktivitesi saptanmamıştır. Klinik örnekler arasında en yüksek proteinaz aktivitesi vajinal akıntı örneklerinden (%67.5) elde edilmiştir. Oral sürüntü örnekleri ile kan örnekleri için aynı oranda (%60) proteinaz aktivitesi saptanmıştır. Fakat örneklerin alındığı yer ile suşların proteinaz üretimi arasında istatistiksel bir fark ($p>0.05$) gözlenmemiştir.

Çalışmaya alınan kökenlerin %75'inde fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. Klinik örnekler göre değerlendirme yapıldığında; en yüksek aktivite vajinal akıntı örneklerinde (Ort. Pz = 0.819 ± 0.12) ve en düşük aktivite oral sürüntü örneklerinden (Ort. Pz = 0.906 ± 0.094) gözlemlenmiştir. Tüm örnekler için ortalama fosfolipaz aktivitesi 0.868 ± 0.112 bulunmuştur. Klinik kökenlerin, izole edildikleri bölgelere göre fosfolipaz değerleri ve aktivite pozitifliği açısından anlamlı farklılık ($p<0.05$ ve $\chi^2=0.93$, $p>0.05$) göstermediği belirlenmiştir.

Kongo kırmızılı beyin-kalp infüzyon besiyerinde test edilen 100 *C. albicans* kökeninin 48'i slime oluşumu açısından pozitif bulunmuştur. Kökenler arasında en yüksek slime aktivitesi idrar ve kan örneklerinde (sırasıyla %52.5 ve %50) gözlenmiştir. Slime aktiviteleri yönünden klinik örneklerin alındığı yerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ($p>0.05$) bulunmamıştır.

Çalışmaya alınan 100 *C. albicans* suşunun proteinaz, fosfolipaz ve slime deneylerinin sonuçları Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. *Candida albicans* suşlarının proteinaz, fosfolipaz (Pz) ve slime deneylerinin sonuçları

Örnek (n)	Proteinaz				Fosfolipaz					Slime	
	Pozitif	(%)	(+)	(++)	Pozitif	(%)	Ort Pz ± SD	Min	Max	Pozitif	(%)
Kan (10)	6	(60)	(6)	(-)	7	(70)	0.884 ± 0.114	0.68	1.00	5	(50)
İdrar (40)	25	(62.5)	(25)	(-)	29	(72.5)	0.865 ± 0.107	0.64	1.00	21	(52.5)
Vagina (40)	27	(67.5)	(27)	(-)	32	(80)	0.819 ± 0.120	0.58	1.00	18	(45)
Ağız (10)	6	(60)	(6)	(-)	7	(70)	0.906 ± 0.094	0.76	1.00	4	(40)
Toplam (100)	64	(64)	(64)	(-)	75	(75)	0.868 ± 0.112	0.58	1.00	48	(48)

Tablo 2. Test edilen *Candida albicans* suşlarının kliniklere göre ürettikleri fosfolipaz ve proteinaz enzimlerinin farklı profillerinin dağılımı.

Enzimler	Kan (10)	Ağız sürüntüsü (10)	Vagina (40)	İdrar (40)	Toplam
Proteinaz (+) Fosfolipaz (+)	4	3	20	15	42
Proteinaz (+) Fosfolipaz (-)	2	3	7	10	22
Proteinaz (-) Fosfolipaz (+)	3	4	12	14	33
Proteinaz (-) Fosfolipaz (-)	1	0	1	1	3

Test edilen *C. albicans* suşlarının kliniklere göre ürettikleri fosfolipaz ve proteinaz enzimlerinin farklı profillerinin dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir. Çalışmada yalnız idrar örneklerinden izole edilen *C. albicans* suşlarının salgıladıkları proteinaz ve fosfolipaz enzimleri arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.022 < 0.05$). Diğer klinik örneklerden izole edilen *C. albicans* suşlarında böyle bir korelasyon saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Son yıllarda sistemik mikoz etkenlerinin sayısının artması ile birlikte morbidite ve mortalitede de bu artışın gözlenmesi dikkatleri bu konu üzerine çekmiştir. Mantar patojenezini açıklamak için bir çok *in vitro* test geliştirilmiştir. Bunun yanında, hayvan modellerinde infeksiyon oluşturularak konağın savunma sistemi ve *Candida*'ya ait virulans faktörlerinin önemi ortaya konmuştur. Böylece yeni tedavi alternatifleri geliştirilmeye başlanmıştır. Benzeri çalışmalar ve özellikle virulans faktörleri ile ilgili çalışmalar çoğunlukla *C. albicans* prototipi üzerinde yoğunlaşmaktadır, çünkü *C. albicans* hala en sık görülen ve tıbbi açıdan en önemli maya türüdür (4, 6, 18).

Candida'larda asit proteinaz varlığı ilk defa 1965 yılında Staib tarafından saptanmış ve üç yıl sonra Remold ve Fasold proteinaz enzimini saflaştırarak tiplendirmişlerdir (19). Patojen *Candida*'ların salgıladığı hücre dışı proteinazların doku harabiyetine bağlı olarak, mayanın yayılımını desteklediği, mayanın mukozalarda devamlı kalmasını sağladığı ve mayayı organizmanın savunma sistemine karşı koruduğu belirtilmektedir (7).

Yücesoy ve ark. (13) SSAA kullanarak yaptıkları çalışmada, oral kandidozlu hastalardan izole edilen 31 *C. albicans* suşunun üçünde (%9.7) iki pozitif, 16'sında (%51.6) bir pozitif proteinaz aktivitesi saptamışlardır. Yapılan diğer çalışmalarda ise; Çerikcioğlu ve Alaçam (20) 75 *C. albicans* suşunun 65'inde (42'si bir pozitif, 23'ü iki pozitif), Erdeniz ve Gürler (18) *C. albicans*'in etken olduğu vulvovajinal kandidozlu hastalardan izole ettikleri 31 suşun tümünde (7'sini bir pozitif, 24'ünü iki pozitif) proteinaz aktivitesi bulmuşlardır. Kantarcıoğlu ve Yücel (21) değişik klinik örneklerden izole edilen *Candida*

türleriyle yaptıkları çalışmada, 60 *C. albicans* suşunun 57'sinde (%95) proteinaz aktivitesi saptamışlardır. Ener ve ark. (22) ise bu oranı %89.2 olarak bulmuşlardır. Değişik klinik örnekleri kapsayan diğer *C. albicans*-proteinaz çalışmaları; Gülenç ve ark. (23) 113 *C. albicans* suşunun %50.4'ünde, Ergin ve Kuştimur (24) 51 *C. albicans* suşunun %49'unda, Akbaş ve ark. (25) ise 73 *C. albicans* suşunun %73.9'da proteinaz aktivitesi saptamışlardır.

Suudi Arabistan kadınlarında vajinit etkeni *Candida*'larla yapılan çalışmada (26); *C. albicans* ve *C. parapsilosis* izolatlarının tümünün (%100), *C. tropicalis* türlerinin %95'nin asit proteinaz ürettiği bildirilmiştir. Yurt dışında yapılan diğer çalışmalarda ise; Rüchel ve ark. (27) 103 *C. albicans* suşunun 74'ünde, Chakrabarti ve ark. (28) 227 *C. albicans* suşunun %60'ında proteinaz aktivitesi gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada; 100 *C. albicans* suşunun 64'ünde (%64) proteinaz varlığı saptanmıştır. En yüksek proteinaz aktivitesi (%67.5) vajinadan elde edilen suşlarda olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuçlara göre elde edilen oranlar diğer çalışmalarda uyumludur, ancak çalışılan suşların hepsinde proteinaz aktivitesi bir pozitif bulunduğundan, bu aktivitenin düşük düzeyde olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Candida albicans izolatları için en önemli virulans faktörlerinden biri olan fosfolipaz enzimi, konak hücreyi lize uğratmakta veya hücrenin yüzey özelliklerini değiştirmektedir. Bu değişiklikler sonucu mantarın dokuya adezyonuna ve penetrasyonuna yardımcı olduğu düşünülmektedir. Ortaya çıkan bu etkiler nedeniyle fosfolipaz enzimi infeksiyonun patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır (29, 30). Fosfolipaz enziminin varlığı kadar miktarda önem taşımaktadır (10, 31).

Fosfolipaz enzimini saptamak için modifiye Price plak yönteminin kullanıldığı çalışmalarda, Arıkan ve ark. (32) 258 *C. albicans* suşunun 203'ünde (%78.7), Yücel ve Kantarcıoğlu (15) 54 *C. albicans* suşunun 51'inde (%94.4), Yücesoy ve Yuluğ (33) 175 *C. albicans* suşunun 120'sinde (%68.6), Kantarcıoğlu ve Yücel (21) 60 *C. albicans* suşunun 56'sında (%93.3), Ener ve ark. (22) 28 *C. albicans* suşunun 16'sında (%57.1) fosfolipaz aktivitesi bulmuşlardır. Aynı yöntemin kullanıldığı bu çalışmada, incelenen

100 *C. albicans* suşunun 75'inde (%75) fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. Çalışmada elde edilen oran, diğer çalışmalarla uyumludur.

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *C. albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesi değişik oranlarda ifade edilmektedir (32-34). Arıkan ve ark. (32) idrar, ağız, vajinal akıntı ve kan örneklerinden izole edilen *C. albicans* suşlarında sırasıyla %76.4, %77.9, %82,5 ve %71.4'ünde; Yücesoy ve Yuluğ (33) oral sürüntü, kan, idrar ve vajinal sekresyon izolatlarında sırasıyla %78.6, %68.4, %66.7 ve %72.7'sinde fosfolipaz aktivitesi saptamışlardır. Yurt dışında yapılan çalışmada ise, Price ve ark. (34) kan ve idrar örneklerinden soyutlanan suşlarda sırasıyla %55 ve %30'unda fosfolipaz aktivitesi saptamışlardır. Bu çalışmada fosfolipaz aktivitesinin klinik bölgelere göre dağılımı incelendiğinde; vajinal akıntı %80, idrar %72.5, kan ve oral sürüntü örneklerinin %70 oranında fosfolipaz aktivitesi gösterdikleri izlenmiştir. Çalışmada saptanan oranlar diğer çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Yücel ve Kantarcıoğlu (15) en yüksek fosfolipaz aktivitesini ürogenital sistem kökenlerinde (Ort. Pz = 0.78 ± 0.10) ve en düşük aktiviteyi de ağız boşluğundan izole edilenlerde (Ort. Pz = 0.81 ± 0.14) gözlemişlerdir. Yücesoy ve Yuluğ (33) ise fosfolipaz aktivitesini ortalama olarak 0.702 ± 0.112 saptamışlardır. Bu çalışmada ise klinik örnekler göre değerlendirme yapıldığında; en yüksek aktivite vajinal akıntı örneklerinden (Ort. Pz = 0.819 ± 0.12) ve en düşük aktivite oral sürüntü örneklerinden (Ort. Pz = 0.906 ± 0.094) elde edilmiştir. Tüm örnekler için ortalama fosfolipaz aktivitesi 0.868 ± 0.112 bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda (22, 32, 33) ve bu çalışmada klinik örneklerin izole edilen *C. albicans*'ların izole edildikleri bölgelere göre fosfolipaz aktivitesi açısından anlamlı farklılık göstermediği belirlenmiştir.

Proteinaz ve fosfolipaz enzimleri hücre dışı salgılanan virulans faktörleridir. Shimizu ve ark. (35) izole ettikleri *C. albicans* suşlarının %73'nün hyaluronidaz, konroidin sülfataz, proteinaz ve fosfolipaz ürettiğini saptamışlar ve dört enzimi de bulduran suşların fare deneylerinde %100 mortaliteye neden olduğunu göstermişlerdir. Enzimlerin her hangi birinin eksikliğinde virulansın azaldığını ve proteinaz üretmeyen suşların fosfolipaz üretmeyen suşlara göre daha az virulan olduğunu görmüşlerdir (35). Videtto ve ark. (36)'nın *C. albicans* kökenlerinde germ tüp oluşturma, fosfolipaz ve proteinaz aktivitesi ve ağız epitel hücrelerine adherensi araştırdıkları çalışmada fosfolipaz ve proteinaz üretimi arasında korelasyon saptamışlardır. Araştırmacılar fosfolipaz, proteinaz üretimi ve germ tüp arasında korelasyonu yalnızca üriner sistemde gözlemişlerdir (36). Bu çalışmada da yalnız idrar

örneklerinden izole edilen *C. albicans* suşlarının salgıladıkları proteinaz ve fosfolipaz enzimleri arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p = 0.022<0.05). Diğer klinik örneklerden izole edilen *C. albicans* suşlarında proteinaz ve fosfolipaz üretimi açısından böyle bir korelasyon saptanmamıştır.

İlk kez 1982'de Christensen tarafından *Staphylococcus epidermidis* için tanımlanan slime faktör; protein, hekzaminler, nötral şekerler, fosforlu bileşikler gibi bir çok maddenin oluşturduğu karışık bir yapıdır (37, 38). 1990'lı yıllarda artan *Candida* infeksiyonlarının epidemiyolojisine paralel *Candida*'larda slime faktör ilişkisi araştırılmaya başlanmıştır (38). Orhon ve ark. (39) izole ettikleri 82 *C. albicans* suşunda tüp aderans testi ile slime pozitifliğini kateter örneklerinde %20, vaginal sürüntü örneklerinde %10 ve oral sürüntü örneklerinde %16 oranında saptamışlardır. Karaca ve ark. (40) tarafından kan ve vagina örneklerinden izole edilen *C. albicans* suşlarında %77.8 oranında slime pozitifliği saptanmıştır. *Candida albicans* kökenleri ile yapılan diğer çalışmalarda; Yüce ve ark. (41) %11.1, Kalkancı ve ark. (38) %9.3 slime pozitifliği bulmuşlardır. Yapılan bu çalışmalarda da modifiye tüp aderans testi kullanılmıştır (38, 40, 41). Hilmioğlu ve ark. (16)'ı KKBKI agar yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada; kan, vagina, idrar ve oral sürüntüden elde edilen *Candida* kökenlerinde sırasıyla %52, %60, %51.1 ve %45 oranında slime pozitifliği bulmuşlardır. Zer ve ark. (42) ise çalışmalarında *C. albicans* kökenlerinde %53.91 oranında slime pozitifliği gözlemişlerdir. Bu çalışmada, Kongo kırmızılı agar yöntemi kullanılarak incelenen tüm *C. albicans* suşlarında slime faktör pozitifliği %48 bulunmuştur. Sonuçlar aynı yöntemi kullanan araştırmacıların sonuçları ile uyumludur.

Patojen *Candida*'lar arasında *C. albicans* en yaygın etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Normal floranın bir üyesi olan *C. albicans* klinik örneklerden izole edildiğinde gerçek bir patojen mi yoksa floranın bir üyesi mi olduğunun ayırt edilmesi her zaman kolay olmamaktadır. Ayrıca bu potansiyel patojen mantarın nasıl olup da kolonizasyondan invazyon aşamasına geçtiği, hangi mekanizmalarla konak hasarına yol açtığı yeterince açıklanamamıştır. Tüm araştırmacılar *C. albicans*'ın neden olduğu yüzeye infeksiyondan yaygın kandidoza kadar değişen infeksiyonlarda tek bir virulans faktörünün etkin olmadığı görüşündedirler. Sonuç olarak, araştırılan üç virulans faktöründen (proteinaz, fosfolipaz ve slime) herhangi birinin farklı örneklerden izole edilen *C. albicans* suşları için tek başına bir virulans faktörü olmadığı, böylece *C. albicans* ile infeksiyonda bir çok faktörün rol oynayabileceği görüşünün geçerli olduğu kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. **Koç AN.** Tıbbi bakımdan önemi olan *Candida* türlerinin mikolojik özellikleri. *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu (21-22 Haziran 2002, Eskişehir)* kitabında. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **2002**: 37-45.
2. **İnci R.** *Candida* infeksiyonlarının patogenezi konağın rolü. *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu (21-22 Haziran 2002, Eskişehir)* kitabında. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **2002**: 71-83.
3. **Ener B.** *Candida* infeksiyonlarının patogenezi: Etkenin rolü. *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu (21-22 Haziran 2002, Eskişehir)* kitabında. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, **2002**: 65-70.
4. **Yücel A, Kantarcıoğlu AS.** *Candida*'ların patojenlik belirtgenleri. *Cerrahpaşa J Med* **2000**; 31: 172-86.
5. **Kuştimur S.** Fungal infeksiyonlarda virulans faktörleri. *X. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi (15-19 Ekim 2001, Adana)*, kitabında. İstanbul: KLİMİK Derneği, **2001**: 197-9.
6. **Kuştimur S.** *Candida*'da virulans faktörleri. 1. *Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (4-6 Mayıs 1999, İzmir) Tutanaklarda*. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi, **1999**: 145-50.
7. **Kuştimur S.** Kandidalarda proteinaz aktivitesinin virulans ile ilişkisi. *Gazi Üniv Tıp Fak Derg* **1987**; 3: 221-7.
8. **Haynes K.** Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* **2001**; 9: 591-6.
9. **Ghannoum MA.** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **2000**; 13: 122-43.
10. **Lane T, Garcia JR.** Phospholipase production in morphological variants of *Candida albicans*. *Mycoses* **1991**; 34: 217-20.
11. **Ghannoum MA.** Extracellular phospholipases as universal virulence factor in pathogenic fungi [Abstract]. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **1998**; 39: 55-9.
12. **Calderone RA, Fonzi WA.** Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **2001**; 9: 327-35.
13. **Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ N.** Sağlıklı bireylerden ve oral kandidiazisli olgulardan izole edilen *Candida albicans* türlerinde proteinaz aktivitesinin incelenmesi. *Mikrobiyol Bül* **2001**; 35: 443-50.
14. **Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ N.** Sağlıklı ve *Candida* infeksiyonlu olan bireylerden soyutlanan *Candida albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. *İnfek Derg* **2000**; 14: 405-8.
15. **Yücel A, Kantarcıoğlu AS.** *Candida albicans* kökenlerinde bazı virulans faktörlerinin (fosfolipaz, proteaz, çimlenme borusu ve aderens) ve aralarındaki korelasyonun belirlenmesi. *İnfek Derg* **2001**; 15: 517-25.
16. **Hilmioğlu S, İlik M, Çavuşoğlu C, Aydemir Ş, Tümbay E.** *Candida* kökenlerinde slaym (slime) üretiminin üç ayrı yöntemle gösterilmesi ve slaym üretiminin kristal viyole reaksiyonu ile ilişkisi. *İnfek Derg* **1999**; 13: 183-6.
17. **Freeman DJ, Falkner FR, Keane CT.** New method for detecting slime production by coagulase negative *Staphylococci*. *J Clin Pathol* **1989**; 42: 872-4.
18. **Erdeniz H, Gürler B.** *Candida albicans* suşlarının proteinaz aktivitesi ile vulvovajinal kandidoz arasındaki ilişkinin araştırılması. *İnfek Derg* **1998**; 12: 389-92.
19. **Kuştimur S.** Kandida patogenezi rol oynayan faktörler. *Mikrobiyol Bül* **1994**; 28: 175-81.
20. **Çerikcioğlu N, Alaçam R.** Kandida suşlarında salgısal asit proteinaz enzim varlığının proteinli agar besiyerinde gösterilmesi. *Mikrobiyol Bül* **1993**; 27: 344-51.
21. **Kantarcıoğlu AS, Yücel A.** Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* **2002**; 45: 160-5.
22. **Ener B, Eskiürk A, Aydın Ö, Delialioğlu N, Berkiroğlu N, Quint W.** Çeşitli *Candida albicans* izolatlarını suş düzeyinde tiplendirmede virulans faktörlerinin rolü. *Mikrobiyol Bül* **1996**; 30: 391-8.
23. **Gülenç S, Karadenizli A, Kolaylı F, Bingöl R.** Çeşitli klinik örneklerden izole edilen maya türlerinde slime faktörü ve proteinaz aktivitelerinin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **2003**; 33: 235-8.
24. **Ergin M, Kuştimur S.** Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarında proteinaz aktivitesinin kazein agar yöntemi ile gösterilmesi. *Mikrobiyol Bül* **1994**; 28: 338-44.
25. **Akbaş E, Karabıçak N, Güvener E.** *Candida* türlerinde salgısal asit proteinaz varlığının araştırılması. *KLİMİK Derg* **1997**; 10: 127-9.
26. **Al-Hedaihy SS.** Spectrum and proteinase production of yeasts causing vaginitis in Saudi Arabian women. *Med Sci Monit* **2002**; 8: 498-501.
27. **Rüchel R, Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA, Cole GT.** *Candida* acid proteinases. *Sabouraudia* **1992**; 30: 123-32.
28. **Chakrabarti A, Nayak N, Talwar P.** *In vitro* proteinase production by *Candida* species. *Mycopathologia* **1991**; 114: 163-8.
29. **Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, et al.** Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* **1995**; 63: 1993-8.
30. **Banno Y, Yamada T, Nozowa Y.** Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. *Sabouraudia: J Med Vet Mycol* **1985**; 23: 47-54.

31. **Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF.** A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Ger Microbiol* **1985**; 131: 1217-21.
32. **Ankan S, Sancak B, Haşcelik G, Günalp A.** *Candida albicans* izolatlarında fosfolipaz aktivitesinin saptanması. *Flora* **1998**; 3: 240-3.
33. **Yücesoy M, Yuluğ N.** *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. *İnfek Derg* **1999**; 13: 569-74.
34. **Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO.** Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* **1982**; 20: 7-14.
35. **Shimizu MT, Almeida NQ, Fantinato V, Unterkircher CS.** Studies on hyaluronidase, chondroitin sulphatase, proteinase and phospholipase secreted by *Candida* species. *Mycoses* **1996**; 39: 161-7.
36. **Videtto V, Koga-ito CY, Garramone A, Ponton J, Quindos G, Aoki S.** Virulence factors, serotype distribution and adherence in *Candida albicans*. *Mycoses* **1999**; 42: 219.
37. **Kocazeybek B, Çakan H, Ayyıldız A, Küçükateş E, Gülsoy Ö, Ordu A.** Cerrahi yoğun bakım ünitesinden izole edilen koagülaz negatif stafillakoklarda slime faktörü oluşturma ve bunların kemoterapötiklere dirençle ilişkisinin araştırılması. *ANKEM Derg* **2001**; 4: 683-9.
38. **Kalkancı A, Çırak Yalınay M, Mansuroğlu H, Kuştimur S.** *Candida* türlerinde slaym faktör belirlenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **1999**; 29: 183-5.
39. **Orhon H, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S, Tünger Ö, Sivrel Ansoy A.** İnfeksiyon etkeni olan *Candida albicans* suşlarında slime üretimi ve antifungal ajanlara duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **1998**; 28: 103-6.
40. **Karaca N, Koç AN, Karagöz S.** Kan ve vajen örneklerinden izole edilen *Candida* türlerinin Slime aktiviteleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* **2001**; 31: 224-6.
41. **Yüce A, Yücesoy M, Yuluğ N.** Detection slime production among isolates of *Candida albicans*. *İnfek Derg* **1996**; 10: 267-9.
42. **Zer Y, Balcı I, Meric G.** Identification and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from intensive care unit patients. *New Microbiol* **2002**; 25: 489-94.