

ORAL KANDİDOZLU VE SAĞLIKLI BİREYLERDEN SOYUTLANAN *CANDIDA ALBICANS* SUŞLARINDA FOSFOLİPAZ VE ESTERAZ AKTİVİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

PHOSPHOLIPASE AND ESTERASE ACTIVITY OF *CANDIDA ALBICANS* STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS WITH ORAL CANDIDOSIS AND HEALTHY INDIVIDUALS

Mine YÜCESOY Meral KARAMAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Anahtar Sözcükler: *Candida albicans*, oral kandidoz, fosfolipaz, esteraz

Key Words: *Candida albicans*, oral candidosis, phospholipase, esterase

ÖZET

Oral kandidozun oluşumu ile fosfolipaz ve esteraz üretimi arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmaya, oral kandidozlu bireylerden soyutlanan 25 ve sağlıklı bireylerden soyutlanan 29 *Candida albicans* suşu alındı. Suşların fosfolipaz aktivitesi modifiye plak yöntemi, esteraz aktivitesi ise Tween 80 opasite testi ile araştırıldı. Hastalardan soyutlanan suşların 22 (%88.0)'si ve sağlıklı bireylerden soyutlanan suşların 15 (%51.7)'i fosfolipaz olumlu olarak saptandı. Fosfolipaz olumluluğu açısından iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($\chi^2=8.2$; $p=0.004$). Hastalardan soyutlanan suşların 19 (%76.0)'u ve sağlıklı bireylerden soyutlanan suşların 26 (%89.7)'si üç günlük inkübasyon sonrası esteraz olumlu olarak saptanırken bu fark anlamlı bulunmadı ($\chi^2=1.8$; $p=0.275$). Sonuçları doğrultusunda; oral *C. albicans* infeksiyonlarının patogenezinde fosfolipaz aktivitesinin önemli bir rol oynadığı, buna karşılık, bu infeksiyonlar açısından esteraz aktivitesinin virülans faktörü olarak görülmediği düşünülmüştür.

SUMMARY

This study was undertaken to investigate the relation between the production of phospholipases and esterases and the development of oral candidosis. Twenty-five *Candida albicans* strains isolated from patients with oral candidosis and 29 strains from healthy individuals were included. The phospholipase activity of the isolates were evaluated with modified plate method. The esterase activity was examined by using Tween 80 opacity test. Twenty-two (88.0%) of the strains isolated from patients and 15 (51.7%) of the strains from healthy subjects were found to be phospholipase positive. A statistically significant difference was detected between the positivity rates of two groups ($\chi^2=8.2$, $p=0.004$). Nineteen (76.0%) isolates of the patients and 26 (89.7%) isolates from healthy subjects were found to be esterase positive after three days of incubation. No significant difference was observed between the groups ($\chi^2=1.8$, $p=0.275$). According to the results, it can be concluded that phospholipase activity plays an important role in the pathogenesis of oral *C. albicans* infections while esterase activity does not seem to count as a virulence factor for these infections.

GİRİŞ

Klinik örneklerden sıklıkla soyutlanan bir maya türü olan *Candida albicans*, insan deri ve mukozalarında yaygın şekilde kolonize olarak deri, mukoza-deri infeksiyonlarına ve sistemik infeksiyonlara neden olabilmektedir (1). Bu mikro-organizmaların virülansında rol oynadığı bildirilen

bir çok faktör söz konusudur. Bunlar arasında proteinaz, fosfolipaz ve esteraz gibi çeşitli sitolitik enzimler de yer almaktadır (2-4).

Ekstrasellüler fosfolipazlar, çeşitli mikro-organizmalar tarafından üretilen önemli bir enzim grubu olup fosfolipitleri parçalayarak konak hücre membranında hasara yol

açabilmektedir (5, 6). *Candida albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesinin varlığı ilk olarak Werner (7) tarafından bildirilmiştir.

Ekstrasellüler esterazın fosfolipazdan farklı bir enzim olduğu, sadece karbon kaynağı olarak Tween içeren bir ortamda bu enzimin indüklendiği bildirilmiştir. Bunun yanında, indüklenebilir ekstrasellüler esterazın *in-vitro* büyüme koşulları altında fungal üreme için koşul olmadığı saptanmıştır (8).

Bu çalışmada, oral kandidozlu ve sağlıklı bireylerden soyutlanan *C. albicans* suşlarında fosfolipaz ve esteraz aktivitesinin varlığı araştırılmış ve bu enzimlerin üretilmesi ile oral kandidoz gelişimi arasındaki ilişki incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Candida suşları: Araştırmaya, sağlıklı bireylerin ağız sürüntü örneklerinden soyutlanan 29 ve oral kandidoz tanılı olguların ağız boşluğu örneklerinden soyutlanan 25 *C. albicans* suşu alındı. Suşlar; çimlenme deneyi, mısırunu-Tween 80 agardaki görünüşleri ve VITEK (bio Mérieux, Fransa) otomatize sistem ile tanımlandı.

Fosfolipaz aktivitesinin saptanması: Fosfolipaz aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Samaranayake ve ark. (9) tarafından modifiye edilen, Price ve ark. (10)'nın plak yöntemi uygulandı. Besiyeri olarak 1 M sodyum klorür, 0.005 M kalsiyum klorür ve %8 steril yumurta sarısı eklenmiş Sabouraud dekstroz agar (SDA) kullanıldı. Yumurta sarısı 1000 g'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatanta steril distile su eklenerek ilk hacmine getirildi ve 50° C'a soğutulmuş steril SDA'ya eklendi. Eşit miktarda sitrik asit ve disodyum hidrojen fosfat tampon ile besiyeri pH'sı steril koşullarda 4.3'e ayarlandı.

Sabouraud-dekstroz-agara pasajlanarak 35° C'de 24 saat inkübe edilen suşların üreyen kolonilerinden steril distile su kullanılarak Mc Farland 1'e uygun bulanıklıkta süspansiyonlar hazırlandı. Bu süspansiyonlardan dört örnek bir plağa olacak şekilde 10 µl inoküle edildi. Plaklar 30° C'de, nemli bir ortamda dört gün inkübe edildi. Dört gün sonra koloniler ve koloni ile çevresinde oluşmuş presipitasyon zonları ölçülerek Pz değerleri (Pz değeri= koloni çapı/ presipitasyon zonu çapı) belirlendi. Pz değeri 1.00'e eşit ise suş fosfolipaz olumsuz olarak değerlendirilirken, bu değer 1.00'den küçük ise fosfolipaz olumlu kabul edildi (11).

Esteraz aktivitesinin saptanması: Esteraz aktivitesinin belirlenmesi için Tween 80 agar kullanıldı. Bu besiyerinin hazırlanmasında 10.0 g pepton (Oxoid, İngiltere), 5.0 g sodyum klorür, 0.1 g kalsiyum klorür, 15.0 g agar (Oxoid, İngiltere), 1000 ml distile su içinde karıştırılarak otoklavlandı. Daha sonra 50° C'ye soğutulmuş besiyeri içine 5 ml steril Tween 80 eklendi. Eşit miktarda sitrik asit ve

disodyum hidrojen fosfat tampon kullanılarak besiyeri pH'sı 6.8'e ayarlandı.

Sabouraud-dekstroz-agara pasajlanarak üretilen suşların kolonilerine eküvyon dokundurularak alındıktan sonra, Tween 80 agara 10 mm çapında bir daire şeklinde inoküle edildi. Her suş ile iki kez çalışıldı. Otuz derecede 10 gün süreyle inkübe edilen plaklar 2-3, 4-7 ve 8-10. günlerde esteraz aktivitesi açısından değerlendirildi. Tween 80 agarda inoküle edilen bölgenin etrafında ışığı geçiren halenin varlığı esteraz olumluluğu olarak kabul edildi (12).

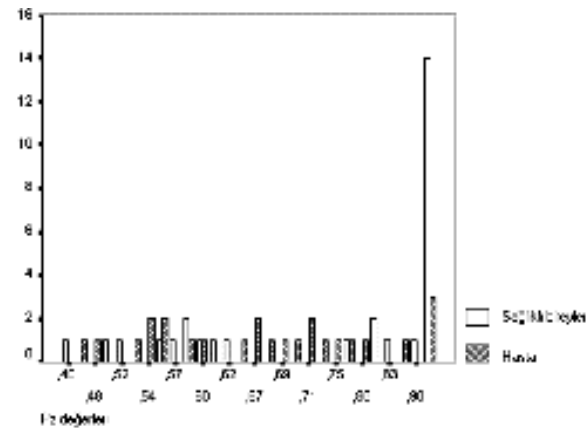
İstatistiksel analiz: Hasta ve sağlıklı bireylerden soyutlanan *C. albicans* suşları için elde edilen fosfolipaz ve esteraz olumlulukları SPSS 8.0 versiyon kullanılarak, ² testi ile değerlendirildi. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (13).

BULGULAR

Hastalardan soyutlanan suşların 22'si (%88.0), sağlıklı bireylerden soyutlanan suşların ise 15'i (%51.7) ve fosfolipaz olumlu olarak saptanmıştır. Bu iki gruptaki suşlar için saptanan fosfolipaz olumlulukları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (²=8.2; p=0.004). Hastalardan ve sağlıklı bireylerden soyutlanan suşların fosfolipaz üretenler için saptanan ortalama, ortanca, minimum ve maksimum Pz değerleri Tablo 1'de, Pz değerlerinin dağılımı ise Şekil 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1 . Her iki gruptaki olgulardan soyutlanan fosfolipaz olumlu suşların ortalama, ortanca, minimum ve maksimum Pz değerleri

	Hastalardan soyutlanan suşlar	Sağlıklı bireylerden soyutlanan suşlar
Ortalama	0.65 ± 0.11	0.65 ± 0.14
Ortanca	0.67	0.60
Minimum	0.45	0.40
Maksimum	0.85	0.90



Şekil 1. Sağlıklı bireyler ve hastalardan soyutlanan *C. albicans* suşları için elde edilen Pz değerlerinin dağılımı.

Tablo 2. Sağlıklı bireylerden ve hastalardan soyutlanan *C. albicans* suşlarının fosfolipaz ve esteraz aktivitesi sonuçları

	Fosfolipaz aktivitesi		Esteraz aktivitesi 2-3. gün		Esteraz aktivitesi 4-7. gün		Esteraz aktivitesi 8-10. gün	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Hastalardan soyutlanan suşlar	22	3	19	6	22	3	22	3
Sağlıklı bireylerden soyutlanan suşlar	15	14	26	3	29	0	29	0

Hastalardan soyutlanan suşların 19'u (%76.0), sağlıklı bireylerden soyutlananların ise 26'sı (%89.7) üç günlük inkübasyon sonrası esteraz olumlu olarak belirlenmiştir. Gruplar esteraz olumlulukları açısından karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir ($\chi^2=1.8$; $p=0.275$). Hastaların ve sağlıklıların 4-7 ve 8-10 günlük inkübasyonlar sonunda elde edilen esteraz olumluluk oranları sırasıyla %88.0 ve %100 şeklindedir. İncelenen iki grubun 4-7. ve 8-10. günlerdeki esteraz olumluluklarına bakıldığında ise yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($\chi^2=3.7$; $p=0.093$).

Sağlıklı bireylerden ve hastalardan soyutlanan suşların fosfolipaz ve esteraz aktivitesi sonuçlarının dağılımı Tablo 2'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Candida türlerinin önemli patojenler arasında yer almalarını sağlayan "slime" yapımı, dokuya enzimler ile invazyon, ekstrasellüler proteinler, morfolojik değişim (dimorfizm), hücre duvar yapısı, hem kandidaya ait hem de ona ait olmayan sideroforları kullanabilme özelliği gibi bir çok virülans faktörünün yanısıra konak savunma mekanizmalarının eksikliğinin de ciddi kandida infeksiyonları ile karşılaşmada önemli olduğu vurgulanmıştır (14, 15). Araştırmacılar bu bağlamda *Candida* türlerinin çeşitli ekstrasellüler lipolitik enzimler salgıladıkları ve bu enzimlerden bazılarının virulansda rol oynayabileceğini bildirmişlerdir (2-4). Çalışmada hasta grubundan soyutlanan 25 *C. albicans* suşunun 22 (%88.0)'sinde değişen derecelerde fosfolipaz aktivitesi saptanmıştır. Klinik örneklerden soyutlanan suşlarda bu derece yüksek oranda fosfolipaz aktivitesi varlığı saptanırken, sağlıklı bireylerin ağız sürüntülerinden elde edilen *C. albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesinin istatistiksel anlamlı olacak derecede daha az izlenmesi (%51.7) ekstrasellüler fosfolipazların virulansdaki rolünü ortaya koyan çalışmaları desteklemektedir (4, 15). Doğruman ve ark. (16) da çalışmalarında 92 *C. albicans* kökeninin %89.1'inde fosfolipaz aktivitesini olumlu saptamışlar, klinik örnekler göre değerlendirme yaptıklarında idrar, boğaz, kan, vagina sürüntüleri, yara, balgam, dışkı ve diğerlerinde sırasıyla %88, %90.9, %88.8, %100, %85.7, %80, %100, %85.7, %80, %100 ve %83.3 oranlarında enzim aktivitesinin olduğunu belirlemişlerdir.

İbrahim ve ark. (17), kandida virulansında fosfolipazın rolünü belirlemek için sağlıklı gönüllülerden elde edilen *C. albicans* ağız suşları ile hastaların kan kültürlerinden soyutlanan *C. albicans*'ların fosfolipaz düzeylerini incelemiş ve kan kökeni *C. albicans* türlerinin, sağlıklı bireylerden soyutlanan kommensal suşlardan istatistiksel olarak daha fazla fosfolipaz salgıladıklarını saptamışlardır. Aynı araştırmacılar (17) kan kökenlerinin kandidoz oluşturma risklerini değerlendirmiş ve yüksek fosfolipaz aktivitesi bulunan suşlarla infekte farelerin 5.6 kez daha fazla relatif ölüm riski ile karşılaştıklarını gözlemlemişlerdir. Bunun yanında, Barrett-Bee ve ark. (6), fosfolipaz aktivitesinin mukoza invazyonu ile korele olduğunu ve daha fazla fosfolipaz üreten *C. albicans* suşlarının farelerde daha yüksek oranda mortaliteye neden olduğunu bildirmişlerdir. Mitrović ve ark. (18) da sağlıklı ve vajinitli hastaların vajinal sürüntülerinden soyutlanan *C. albicans* suşlarının fosfolipaz aktivitelerini karşılaştırdığında, patolojik örneklerden soyutlanan suşların fosfolipaz aktivitesinin daha yüksek olduğunu görmüşlerdir. Bu çalışmanın bulguları da diğer çalışmaların sonuçları ile paralel doğrultudadır.

Candida'ların esteraz aktiviteleri ile ilgili veriler oldukça sınırlıdır. Slifkin (12), Tween 80 opasite testinin *Candida* türlerinde esteraz aktivitesinin saptanmasının yanısıra *C. dubliniensis* kökenlerinin *C. albicans*'tan ayrılmasında da kullanılabileceğini belirtmiş ve *C. dubliniensis* türlerinin Tween 80 agarda inkübasyonun üçüncü gününde, opasite açısından *C. albicans* suşlarından açıkça farklılık gösterdiğini bildirmiştir. Kullanılan Tween 80 besiyerinde *Candida* suşları tarafından salgılanan yağ asitleri ortamdaki kalsiyuma bağlanmakta ve kalsiyum kompleksi inokülasyon noktasının etrafında çözünmeyen kristaller olarak izlenmektedir. Aktaş ve ark. (19) da, maliyeti ucuz ve uygulanışı kolay olan Tween 80 opasite testinin *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. guilliermondii* türlerini tanımlamada ve diğer türlerden ayırmada yardımcı olabileceğini ve rutin çalışmalarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmada, oral kandidozlu olgulardan ve sağlıklı bireylerden soyutlanan *C. albicans* suşlarında esteraz aktivitesi açısından bir farklılık olmadığı gözlenmiş ($\chi^2=1.8$; $p=0.275$), 4-7 ve 8-10 günlük inkübasyonlar sonunda da bu sonucun değişmediği görülmüştür ($\chi^2=3.7$; $p=0.093$). Literatürde *C. albicans* türlerinin virulansında esteraz

aktivitesinin rolünün araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, bulgular başka araştırma sonuçları ile karşılaştırılmamıştır. Ancak bulgular doğrultusunda, *C. albicans* suşları tarafından salgılanan esteraz enziminin virülansda önemli olmadığı söylenebilir.

Sonuçlar ışığında, oral *C. albicans* infeksiyonlarının patogenezinde fosfolipaz aktivitesinin önemli bir rol oynadığı, buna karşılık, bu infeksiyonlar açısından esteraz aktivitesinin virülans faktörü olarak görülmediği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Naglik JR, Newport G, White TC, et al. *In-vivo* analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis. *Infect Immun* 1999; 67: 2482-90.
2. Ghannoum MA. Extracellular phospholipase as universal virulence factor in pathogenic fungi. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 1998; 39: 55-9.
3. Krempf-Lamprecht L. Factors of the pathogenicity of *Candida albicans*, A review. In: Tümbay E, Seeliger HPR, Ang Ö, eds. *Candida and Candidamycesis*. New York: Plenum Press, 1991: 49-53.
4. Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ N. Sağlıklı ve *Candida* infeksiyonu olan bireylerden soyutlanan *Candida albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. *İnfek Derg* 2000; 14: 405- 8.
5. Titball RW. Bacterial phospholipases C. *Clin Microbiol Rev* 1993; 57: 347-66.
6. Barrett-Bee, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Ger Microbiol* 1985; 131: 1217-21.
7. Wemer H. Untersuchungen über die Lipase-Aktivität bei Hefen und hefeähnlichen Pilzen. *Zentralbl Bakteriol Orig* 1966; 200: 113-24.
8. Tsuboi R, Komatsuzaki H, Ogawa H. Induction of extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infect Immun* 1996; 64: 2936-40.
9. Samaranyake LP, Raeside JM, Mac Farlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species *in vitro*. *Sabouraudia* 1984; 22: 201-7.
10. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; 20: 7-14.
11. Lodder J. *The Yeast, A Taxonomic Study*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 1970.
12. Slişkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4626-8.
13. SPSS win 8.0, Chicago, Illinois, 1989-1997.
14. Calderone RA, Gow NAR. Host recognition by *Candida* species. In: Calderone RA, ed. *Candida and Candidiasis*. Washington, DC: ASM Press, 2002: 67-86.
15. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 122-43.
16. Doğruman AI F, Aktaş A E, Yiğit N, Ayyıldız A. *Candida albicans* kökenlerinde fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. *T Parazit Derg* 2001; 25: 398-401.
17. İbrahim AS, Mirbod F, Filler SG, et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995; 63: 1993-8.
18. Mitrović S, Kranjčić-Zec I, Arsic V, Dzamic A. Pathogenicity determinants of isolates of *Candida* species from vaginal swabs. In: 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), (Vienna, 1995), Abstract Book, p.156 (Abstract No: 799).
19. Aktaş AE, Yiğit N, Ayyıldız A. Çeşitli *Candida* türlerinde esteraz aktivitesinin araştırılması. 2. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongres (19-21 Haziran 2001, Ankara) Tutanakları'da. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 2001: 192-2.