

CANDIDA TÜRLERİNİN *IN VITRO* HEMOLİTİK AKTİVİTESİ

IN-VITRO HEMOLYTIC ACTIVITY OF *CANDIDA* SPECIES

Tuncer ÖZEKİNCİ Nezahat AKPOLAT Mahmut METE Selahattin ATMACA

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

Anahtar Sözcükler: *Candida* türleri, hemolitik aktivite

Keywords: *Candida* species, hemolytic activity

Giriş: 26 Haziran 2006

Kabul: 15 Ocak 2007

ÖZET

Candida türleri, infeksiyon patogenezinde rolü olan çeşitli hidrolitik enzimler salgılamaktadır. *Candida* türlerinin hemolitik aktivitesi konusunda yapılan çalışma sayısı azdır. Bu çalışmada, *Candida* türlerinin hemolitik aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Toplam 70 *Candida* suşunun % 3 glikozla zenginleştirilmiş koyun kanlı Sabouraud dekstroz agar besiyerinde *in-vitro* hemolitik aktivitesi araştırıldı. İncelenen 53 *C. albicans* ve iki *C. guilliermondii* suşunda alfa-beta hemoliz, dört *C. albicans* suşunda alfa hemoliz saptanırken, altı *C. albicans*, üç *C. kefyr* ve iki *C. tropicalis* suşunda *in-vitro* hemolitik aktivite saptanmadı. Sonuç olarak, *Candida* türlerinin hemolitik aktivitelerinin değişken özellikte olduğu görülmektedir.

SUMMARY

Candida species secrete various hydrolytic enzymes which are involved in infection pathogenesis. There are few studies on the hemolytic activity of *Candida* species. In this study, investigation of the hemolytic activity of the *Candida* species was aimed. Totally 70 *Candida* strains were investigated for *in vitro* hemolytic activity on Sabouraud dextrose agar containing sheep blood, supplied with 3% glucose. While 53 *C. albicans* and 2 *C. guilliermondii* strains exhibited alpha-beta hemolysis and 4 *C. albicans* strains revealed alpha hemolysis, no hemolytic activity was observed in 6 *C. albicans*, 3 *C. kefyr*, and 2 *C. tropicalis* strains. In conclusion, it was observed that *Candida* species exhibited variable hemolytic activity.

GİRİŞ

Candida türleri insan ve hayvanlarda ağızda, gastro-intestinal ve vaginal florada bulunabilen, immün yetmezliği olanlarda, diyabetiklerde, yenidoğanlarda ve ameliyat sonrası hastalarda kandidoza neden olan fırsatçı patojenlerdir. *Candida* infeksiyonlarının patogenezini açıklamak ve *Candida*'lara karşı yeni ilaç geliştirmek amacı ile yapılan çalışmalarda, konakçı savunma sisteminin rolünün yanında *Candida*'ya ait virulans faktörlerinin de önemi belirtilmektedir. Yapılan araştırmalarda *Candida* infeksiyonlarında tek bir virulans faktörünün etken olmadığı, bir çok virulans faktörünün etken olduğu gösterilmiştir. Özellikle konakçı epitel ve endotel hücrelerine adezyon, germ tüp oluşturma ve

proteinaz enziminin üretimi major virulans faktörleridir. Ayrıca fosfolipaz enzimi, toksinler, fenotip değişimi, hücre duvarı ve yüzey değişimi ile hidrofobisite gibi faktörlerde virulans ve patogenezde rol oynamaktadırlar. Bu faktörler çeşitli türlerde farklı oranlarda etkili olmaktadır (1-4). *Candida* türleri tarafından oluşturulan hemolitik aktivitenin etkisi ise tam olarak bilinmemektedir. *Candida albicans*'ın, özellikle glikozla zenginleştirilmiş kanlı besiyerinde hemolitik aktivite gösterdiği 1994 yılında Manns ve ark. (5) tarafından bildirilmiştir. Bu konu ile ilgili en geniş çalışma 2001 yılında Lou ve ark. (6) tarafından yapılmıştır. Lou ve ark. (6) çalışmalarında 14 farklı türün hemolitik aktivitelerini saptamış ve hemoliz tiplerini belirlemişlerdir.

Bu çalışmada değişik klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 70 *Candida* suşu kullanıldı. İzole edilen suşların 63'ü *C. albicans*, üçü *C. kefyr*, ikisi *C. guilliermondii*, ikisi *C. tropicalis* idi. *Candida* suşlarının tür ayrımı; Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besiyerindeki koloni morfolojileri, üreaz aktiviteleri, karbonhidrat fermantasyonu ve asimilasyon deneyleri, germ tüp oluşumu ve mısır unlu Tween 80 agar besiyerinde lam kültürü yöntemi ile yapıldı. Türlerin hemolitik aktiviteleri Lou ve ark. (6)'nın çalışmasına benzer bir şekilde plak yöntemi ile araştırıldı. Ayrıca *C. albicans* ATCC 10231 kontrol suşu olarak kullanıldı. Eksi 20° C'de bekletilen kökenler SDA'da 37° C'de 18 saat inkübe edilerek taze kültürleri elde edildi. Elde edilen *Candida* suşları steril tuzlu su içerisinde süspansiyonu hazırlandı. Hazırlanan süspansiyonların içinde 10⁸ hücre/ml olacak şekilde süspansiyonlar hazırlandı. Bu süspansiyondan 10 µl sıvı alınarak, %3 glikozla zenginleştirilmiş, %7 koyun kanlı SDA besiyerine yaklaşık 5 mm çapında yuvarlak bir alan oluşturacak şekilde bir damla inoküle edildi. Besiyeri pH'sı 5.6± 0.2 idi. Plaklar 37° C'de 48 saat inkübe edildi. Oluşan kolonilerin etrafında oluşan zon çapları 24 ve 48 saat sonunda ölçüldü. Özellikle 48 saatlik inkübasyondan sonra kolonilerin etrafında iki halkalı hemoliz gözlemlendi. Birincisi maya kolonilerini çevreleyen ve ışığı geçiren bölge, ikincisi ise beta hemoliz zonunu çevreleyen koyu yeşil alfa tipi hemoliz halkası idi. Çalışmada hemolitik aktivite gösteren suşlar alfa hemoliz yapanlar, beta ve alfa hemoliz birlikte yapan suşlar ve hemoliz yapmayan suşlar olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Değişik klinik örneklerden izole edilen 70 *Candida* suşunun hemolitik aktivitesi test edildi. İzole edilen suşların 63'ü *C. albicans*, üçü *C. kefyr*, ikisi *C. guilliermondii*, ikisi *C. tropicalis* olarak sınıflandırıldı. Test sonuçlarına göre 63 *C. albicans* suşunun 53'ü (% 84.1) ve iki *C. guilliermondii* suşu hemolitik aktivite gösterirken, çalışmada izole edilen üç *C. kefyr* ve iki *C. tropicalis* suşunun hemolitik aktivite göstermediği saptandı (Tablo 1). İlk 24 saatlik inkübasyondan sonra hemolitik aktivite gösteren suşların 48 saat sonraki kültürlerinde tam hemoliz zonlarının etrafları genişleyerek ikinci bir alfa hemoliz benzeri zonlar görüldü.

Tablo 1. İzole edilen 70 *Candida* kökeninin hemolitik aktivitesi

Tür	Sayı	Alfa	Alfa+Beta	Gama
<i>C. albicans</i>	63	4	53	6
<i>C. kefyr</i>	3	-	-	3
<i>C. tropicalis</i>	2	-	-	2
<i>C. guilliermondii</i>	2	-	2	-

TARTIŞMA

Candida türlerinin değişik hidrolitik enzimler salgıladığı bilinmektedir. Ancak farklı hemoliz paternlerinin mekanizması henüz açıklanmamıştır. Ayrıca *Candida*'ların virulans faktörlerinden olan proteaz, lipaz ve fosfolipaz ile ilgili pek çok çalışma olmasına rağmen hemolitik aktivitelerini gösteren çalışma sayısı azdır. Manns ve ark. (5) glikozla zenginleştirilmiş kanlı agarda bütün *C. albicans* suşlarının hemolitik aktivite gösterdiğini ve konak hücredeki demiri kullanmak için hemolitik faktör salgıladıklarını bildirmişlerdir. Lou ve ark. (6) *C. albicans* dışında 13 *Candida* türünde hemolitik aktivitelerini belirlemiş, ayrıca bu türlerin üç ayrı tipte hemoliz oluşturduklarını saptamışlardır. Ayrıca çalışmalarında izole ettikleri 80 *Candida* suşunun 24 saatlik inkübasyonu sonunda *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. lusitanae*, *C. krusei* ve *C. tropicalis* de alfa hemoliz saptamış, 48 saatlik inkübasyonu sonunda ise hemoliz zonunun genişlediği ve içte beta hemoliz, dış kısımda ise alfa hemoliz olacak şekilde çift zon oluşturduğunu göstermişlerdir (6). *Candida famata*, *C. guilliermondii*, *C. rugosa* ve *C. utilis* 72 saat sonunda alfa hemoliz, *C. parapsilosis* ve *C. pelliculosa*'da hemolitik aktivite saptamamışlardır. Birinci ve ark (7). çalışmalarında *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* ve *C. kefyr* suşlarında alfa hemoliz saptarlarken, 48 saatlik inkübasyonu sonunda ise hemoliz zonunun, içte beta dışta ise alfa hemoliz olacak şekilde çift zon oluştuğunu, *C. parapsilosis*'in hemolitik aktivite göstermediğini saptamışlardır. Metin ve ark (8). glikozsuz besiyerinde hemolitik aktiviteyi gözleyemediklerini, *C. parapsilosis* dışında tüm izole ettikleri *Candida* türlerinin kanlı agar besiyerinde birbiri içine geçmiş farklı renkli zonlarda oluşan hemolitik aktivite gösterdiklerini saptamışlardır. Aktaş ve ark. (9) izole ettikleri 114 farklı *Candida* suşunun 24 saatlik inkübasyonu sonunda tümünün alfa hemoliz oluşturduğunu, *C. parapsilosis*'te hemolitik aktivite saptayamadıklarını belirtmişlerdir. Cevahir ve ark. (10) 38 *C. albicans* suşunun tümünde hemolitik aktivite saptamışlardır. Çalışmamızda 63 *C. albicans*

suşunun 24 saatlik inkübasyonunda dördünün alfa, 48 saat sonunda 53'nün alfa-beta hemoliz zonu oluşturduğunu, altı *C. albicans* suşunun hemoliz oluşturmadığını saptadık.

Sonuç olarak, çalışmaların *in-vitro* hemolitik aktiviteden çok *in-vivo* olarak etkilerinin belirlenmesi yönünde de

yapılması ve hemolitik aktivitelerinin tanısal değerinin araştırılması için daha kapsamlı çalışmalarda gereklidir. Ayrıca demir konsantrasyonunun, ortamın atmosferinin (CO₂ oranı gibi) ve glikoz miktarının *Candida*'ların hemolitik aktiviteleri üzerine etkilerinin araştırılması da gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sousa AS, Tarrago D, Velasco J, Alvarez ME, Baquero F. Adherence to polystyrene of clinically relevant isolates of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 379-82.
2. Kuştimur S. *Candida*; tiplendirme, virulans ve immünite. 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi Tutanaklar'da. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 1999: 145-50.
3. Odds FC. *Candida* and Candidosis. London: Bailliere Tindall, 1988.
4. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationship of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* 1991; 55: 1-20.
5. Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun* 1994; 62: 5154-6.
6. Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential *in vitro* hemolytic activities. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2971-4.
7. Birinci A, Bilgin K, Cihan ÇÇ, Acuner Ç, Çoban AY, Durupınar A. *Candida* türlerinin hemolitik aktivitelerinin araştırılması. *İnfek Derg* 2005; 19: 373-5.
8. Metin DY, Hilmioğlu S, İnci R, Tümbay E. *Candida* türlerinin *in vitro* hemolitik aktivitesi. *İnfek Derg* 2005; 19: 239-49.
9. Aktaş AE, Yiğit N, Uyanık MH, Ayyıldız A. *Candida* türlerinin hemolitik aktivitelerinin araştırılması. *Candida Mikrobiyolojisi ve İnfeksiyonları Simpozyumu (2002, Eskişehir) Tutanaklar'da*. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 2002: 188.
10. Cevahir N, Kaleli İ, Demir M, Yıldırım U, Gürbüz M. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarının fosfolipaz, esteraz ve hemolitik aktivitelerinin araştırılması (Özet). XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (2004, Kuşadası, Aydın) Kongre Kitabı'nda. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 2004: 329.

İLETİŞİM

Yrd. Doç. Dr. Tuncer ÖZEKİNCİ
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
21280 DİYARBAKIR
e-posta: tunozek@dicle.edu.tr

