

Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Maya Türlerinde Slime Faktörü ve Proteinaz Aktivitelerinin Araştırılması(*)

Serpil GÜLENC(**), Aynur KARADENİZLİ(**), Fetiye KOLAYLI(**), Recep BİNGÖL(**)

ÖZET

Son yıllarda *Candida* türlerine hastane infeksiyon etkenleri arasında giderek daha sık oranda rastlanılmaktadır. Maya mantarları infeksiyon etkeni olabildiği gibi kolonize de olabilirler. *Candidoz*ların patogeneğinde slime faktörünün ve proteinaz aktivitesinin rolü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle virülans faktörlerinin belirlenmesi infeksiyon etyolojisindeki rolleri açısından önemlidir.

Çalışmamızda, çeşitli klinik örneklerden izole edilen, türleri API 20C AUX ile belirlenmiş olan 140 maya suşu kullanılmıştır. Bunların 113'ü (% 80.7) *Candida albicans*, 27'si (% 19.3) *C albicans* dışı maya mantarı idi.

Slime oluşumu makrotüp yöntem ile araştırılmıştır. Slime oluşumu *C albicans*'ların 54'ünde (% 47.7) zayıf pozitif, 59'unda (% 52.2) kuvvetli pozitif bulunmuştur. *C albicans* dışı maya mantarlarında ise 13'ü (% 48.1) zayıf pozitif ve 14'ü (% 51.8) kuvvetli pozitif olarak saptanmıştır. Maya türleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$).

Tüm mayaların proteinaz aktiviteleri jelatin hidrolizi testi ile araştırılmış ve % 51.4 oranında pozitif (72 suş) bulunmuştur. *C albicans* suşlarının 57'sinde (% 50.4), *C albicans* dışı mayaların ise 15'inde (% 55.5) pozitiflik saptanmıştır. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$).

Sonuç olarak çeşitli klinik örneklerden izole ettiğimiz maya mantarlarında, özellikle *C albicans* dışı *Candida* türleri açısından, slime ve proteinaz aktivitesinin önemli bir virülans faktörü olduğunu söylemek mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Maya Mantarları, Slime Faktörü, Proteinaz Aktivitesi.

SUMMARY

Investigation of Slime Factor and Proteinase Activity in Yeast Species Isolated from Various Clinical Specimens.

Hospital acquired *Candida* infections has been increased currently. *Candida* can cause an infection or colonisation. It is known that slime factor and proteinase activity play a role in the pathogenesis of candidiasis. Therefore, it is important to determine virulence factors in the aspect of infection etiology.

In this study, 140 candida species obtained from various clinical specimens were identified using API 20C AUX. One hundred thirteen (80.7 %) were *C.albicans* and 27 (19.3 %) of them were non *C.albicans*.

Slime production were investigated by macrotube method. Fifty four (47.7 %) of *C.albicans* were detected as weak positive, and 59 (52.2 %) were detected as strong positive. Among non- *C.albicans* species, 13 (48.1 %) were weak positive and 14 (51.8 %) were strong positive. There was no significant statistical difference between *Candida* species ($p>0.05$). Proteinase activity of all *Candida* species was investigated by gelatin hydrolysis test and determined as positive in 72 species (51.1 %). In 57 (50.4 %) *C.albicans*, and in 15 (55.5 %) non-*C albicans* proteinase activity were positive. There was no statistical difference between two groups ($p>0.05$).

In conclusion, slime and proteinase activity are important virulence factors among *Candida* species especially in non-*C albicans* species isolated from various clinical specimens.

Key words: Yeast, Slime Factor, Proteinase activity.

GİRİŞ

Son yıllarda *Candida* türleri hastane infeksiyon etkenleri arasında giderek daha sık oranda izole edilmektedir (1,2). Bunun nedeni steroid kullanımı, modern tıbbi tedaviler, uzun süreli antibiyotik kullanımı ile immün sistemi baskılanmış konaklardır (3,4).

Maya mantarları kolonize olabildikleri gibi infeksiyon etkeni de olabilirler (5). *Candida*'ların patogeneğinde slime faktörünün ve proteinaz aktivitesinin rolü olduğu bilinmektedir (1,6). Bu nedenle virülans faktörlerinin belirlenmesi infeksiyon etyolojisindeki rolleri açısından önemlidir.

Candida albicans'ın virülans faktörlerinin başlıcaları adezinler, hif yapımı, fenotipik varyasyonlar ve antijenik modifikasyonlar, dimorfizm, toksinler, fosfolipaz ve proteinazlardır (6,7). *C.albicans* prote-

(*)9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresinde (1999) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

(**) Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli.

inazları, in vivo olarak albümin, keratin ve deri proteinlerini parçalayabilme özelliğini taşırlar (8,9,10,11,12,13).

Slime faktörü visköz, ekstraselüler, plastik yüzeylere yapışmada etken olan ve prostetik materyallerde kolonizasyona neden olan yapıdır (14,15). Slime üretimi ile ilgili çalışmalar az sayıdadır (1).

Çalışmamızda bu amaçla çeşitli klinik örneklerden izole edilen çeşitli *Candida* türlerinde proteinaz aktivitesinin varlığı ve slime üretimi araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, Kocaeli Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 140 *Candida* suşu incelenmiştir. Bu suşların 37'si idrar, 34'ü vajen, 20'si balgam, 19'u dışkı, 11'i deri kazıntısı, 8'i boğaz sürüntüsü, 7'si diren materyali ve 4'ü kandan izole edilmiştir. İdentifikasyon için API 20C AUX kiti kullanılmıştır. Ayrıca izole edilen suşlar, klamidospore oluşumu yönünden incelenmek amacı ile RAT (Rice - Agar - Tween) agara çizgi şeklinde ekilmiş, germ tüp, fermentasyon ve asimilasyon deneyleri uygulanmıştır (Fungichrom, Candifast). 140 maya suşununun 113'ü (% 80.8) *C. albicans*, 27'si (% 19.2) *C. albicans* dışı maya mantarı olarak tanımlanmıştır. *C. albicans* dışı maya mantarlarının 11'i *C. glabrata*, beşi *C. kefyr*, dördü *C. parapsilosis*, ikisi *C. famata*, ikisi *Trichosporon cutaneum*, biri *C. tropicalis*, biri *C. krusei*, biri *C. lipolytica*'dır.

Çalışmamızda *C. albicans* dışı maya mantarları sayıca az olmaları nedeniyle, *C. albicans* dışı türler olarak gruplandırılmıştır.

Slime faktörü, makro tüp yöntemiyle araştırılmış ve tüplerin duvarında boyalı film tabaka oluşumuna bakılarak değerlendirilmiştir (16). Hava ile sıvının bileşim yerinde görülen boya tutulumu değerlendirmeye alınmamıştır.

C. albicans ve diğer türlerin, proteinaz aktivitelerini belirlemek için jelatin besiyeri kullanılmıştır. Jelatin hidrolizi deneyi için Saboraud-dekstroza agarda üremiş olan maya suşları jelatin besiyerine ekilmiştir. 30°C'de 48 saat inkübe edilip değerlendirildikten sonra bir gece buzdolabında bekletilip yalancı pozitifler elimine edilmiştir (17,18).

Çalışmada *C. albicans* KUEN 945 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

İstatistiksel değerlendirme ki-kare testiyle yapılmıştır.

BULGULAR

Proteinaz aktivitesi tüm mayaların 72'sinde (% 51.4) pozitif olarak bulunmuştur. *C. albicans* suşlarının 57'sinde (% 50.4), *C. albicans* dışı mayaların ise 15'inde (% 55.5) pozitiflik saptanmıştır (Tablo 1-3). Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$).

Slime oluşumu açısından tüp yöntemiyle test edilen 140 izolatın *C. albicans* için 54'ü (% 47.7) zayıf pozitif, 59'u (% 52.2) kuvvetli pozitif bulunmuştur.

Tablo1. Türlere göre proteinaz aktivitesi

Etken	Proteinaz Aktivitesi		Pozitiflik (%)
	Negatif	Pozitif	
<i>C. albicans</i> (n=113)	56	57	50.4
<i>C. albicans</i> dışı maya mantarı (n=27)	12	15	55.5

Tablo 2. *Candida albicans* dışı mayaların proteinaz aktiviteleri

Etken	Proteinaz aktivitesi	
	Negatif	Pozitif
<i>C. glabrata</i>	7	4
<i>C. kefyr</i>	2	3
<i>C. parapsilosis</i>	3	1
<i>C. famata</i>	-	2
<i>Trichosporon cutaneum</i>	-	2
<i>C. tropicalis</i>	-	1
<i>C. krusei</i>	-	1
<i>C. lipolytica</i>	-	1

(Tablo 3-4). *C. albicans* dışı maya mantarlarında ise 13'ü (% 48.1) zayıf pozitif, 14'ü (% 51.8) kuvvetli pozitif olarak saptanmıştır. Slime aktiviteleri yönünden *C. albicans* ile *C. albicans* dışı maya mantarları

Tablo 3. Türlere göre slime aktivitesi

Etken	Zayıf Pozitif (%)*	Kuvvetli Pozitif (%)**
<i>C. albicans</i> (n=113)	54(47.7)	59 (52.2)
<i>C. albicans</i> dışı maya mantarı (n=27)	13(48.1)	14 (51.8)

* Slime üretimi 1+ ve 2+ olarak değerlendirilen örnekler

** Slime üretimi 3+ ve 4+ olarak değerlendirilen örnekler

Tablo 4. *Candida albicans* dışı mayaların slime faktörü

Etken	Proteinaz aktivitesi	
	Zayıf Pozitif	Kuvvetli Pozitif
<i>C. glabrata</i>	4	7
<i>C. kefyri</i>	1	4
<i>C. parapsilosis</i>	3	1
<i>C. famata</i>	1	1
<i>Trichosporon cutaneum</i>	2	-
<i>C. tropicalis</i>	1	-
<i>C. krusei</i>	-	1
<i>C. lipolytica</i>	1	-

arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p>0.05).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Maya mantarlarında hif oluşumu, epitel yüzeye yapışma ve hidrolitik enzimlerin salınması önemli virülans faktörlerindedir (2). Özellikle proteinaz enzimlerinin salınması çok önemlidir (12). Proteinaz enzimi vücut sıvıları ve dokulardan salınabilmektedir (19,20).

Günümüzde *C.albicans* suşları dışında *C.tropicalis*, *C.parapsilosis* ve *C.glabrata*'nın da asit proteinaz salgıladıkları bilinmektedir (2). Sono ve ark. (21) yaptıkları çalışmada *C.tropicalis* ve *C.parapsilosis* tarafından salgılanan asit proteinazların *C.albicans* proteinaz enziminin yarı aktivitesine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Ross ve ark. (6) *Candida* türleri arasında proteinaz aktivitesi ile relatif virülansın ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Klinik örneklerden izole edilen koagülaz negatif stafilokok suşlarında "slime" üretimi yüksek oranlarda saptanmıştır (15, 22). Branchini ve ark. da, plastik kateterlere yapışan *C.parapsilosis*'in glukoz içeren solüsyonlarda slime oluşturma özelliğini incelemişler ve bunun fenotipik özellik olduğunu belirtmişlerdir. Yücesoy ve ark. (23), 148 *Candida* suşunun 11'inin (% 7.43) kuvvetli, 14'ünün (% 9.46) ise zayıf slime oluşturduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, modifiye tüp testinde suşların 12'sinin kuvvetli, birinin zayıf; mikropalak yönteminde ise 10'unun kuvvetli, dokuzunun zayıf slime üretimi gösterdiğini bildirmişlerdir.(24) Orhon ve ark (25) ise , 82 *C. albicans* suşunun 10'unda (% 12.1) slime üretimi gözlemişlerdir. Bizim bulgularımızda ise bu oran daha yüksek olarak belirlenmiştir.

Karagöz ve ark (26) 83 maya izolatının slime faktör pozitifliğini % 85.5, proteinaz aktivitesi pozitifliğini

% 89 bulmuşlardır. Slime ve proteinaz aktivite pozitifliğinin suşlara göre dağılımını ise sırasıyla şöyle bildirmişlerdir. *C. albicans* için % 83.6, *Trichosporon* için % 100; *C tropicalis* için % 90, % 100; *C. kefyri* için % 83.3, % 100; *C. glabrata* için % 100, Çalışmamızda proteinaz pozitifliği *C.albicans* dışı % 55.5, *C. albicans* suşlarında % 50.4 olarak bulunmuştur. Slime pozitifliğinde ise *C. albicans* için 54'ü (% 74.3) zayıf pozitif, 59'u (% 52.2) kuvvetli pozitif bulunmuştur. Slime oluşumu *C. albicans* dışı maya mantarlarının 13'ünde (% 48.1) zayıf pozitif, 14'ünde (% 51.8) kuvvetli pozitif olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak, çeşitli klinik örneklerden izole ettiğimiz maya mantarlarında, özellikle virülans faktörü olarak belirtilen slime ve proteinaz aktivitesi *C. albicans* dışı *Candida* türlerinde de saptanmıştır. Hastane infeksiyon etkeni olarak sıklıkla *C.albicans* düşünülmesine rağmen, slime ve proteinaz aktivitelerine sahip *C.albicans* dışı maya türlerinin de patojen olabileceği düşünülmelidir.

KAYNAKLAR

- 1.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 32: 452 (1994).
- 2.Chakrabarti A, Nayak N, Alwar P: In vitro proteinase production by *Candida* species, Mycopathologia 114: 163 (1991).
- 3.Young RC, Bennet JE, Geehold GW, Levine AS: Fungemia with compromised host resistance: A study of 70 cases, Ann Intern Med 80: 805 (1974).
- 4.Rippon JW: Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the pathogenic Actinomyces, 3th Ed, p. 533-581, WB Saunders, Philadelphia (1988).
- 5.Cassone A, De Bernardis F, Mondello F, Cedia T, Agatensi L: Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal Candidosis, J Infect Dis 156 : 777 (1987).
- 6.Ross IK, De Berdardis F, Emerson GW, Cassone A, Sullivan PA: The secreted aspartate proteinase of *Candida albicans*: Physiology of secretion and virulence of a proteinase-deficient mutant, J Gen Microbiol 136: 687 (1990).
- 7.Wu T, Samaranayake LP, Cao BY, Wang J: In vitro proteinase production by oral *Candida albicans* isolates from individuals with and without HIV infection and its attenuation by anti-myotic agents, J Med Microbiol 44: 311 (1996).
- 8.Kwang-Chung KJ, Lehman D, Good C, Magee PT:

Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*, Infect Immun 49: 571 (1985).

9. Negi M, Tsuboi T, Ogawa H: Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: substrate specificity, J Invest Dermatol 83: 32 (1984).

10. Hattori M, Yoshiura K, Negi M, Ogawa H: Keratinolytic proteinase produced by *Candida albicans*, Sabouraudia 22: 175 (1984).

11. Röchel R: Properties of a purified proteinase from the yeast *Candida albicans*: Biochim Biophys Acta 659: 99 (1981).

12. Staib F: Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi, Sabouraudia 4: 187 (1965).

13. Röchel R: Tegeler R, Trost M: A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*, Sabouraudia 20: 233 (1982).

14. Davenport DS, Massanari RM, Phaller MA, Bale MJ, Streed SA, Hierholzer WJ: Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase-negative staphylococci, J Infect Dis 153 (2): 332 (1986).

15. Ishak MA, Gröschel OM, Mandell GL, Wenzer RP: Association of slime with pathogenicity of coagulase negative staphylococci causing nosocomial septicemia, J Clin Microbiol 22: 1025 (1995).

16. Isenberg HD, Clin Microbiol Procedures Handbook, p. 11.14.2-11.14-3, American Society of Microbiol, Washington DC (1992).

17. Larone DH: Media, Medically Important Fungi, A guide to identification, p. 204, Ame Soc Microbiol, Washington DC 2 nd ed. (1993).

18. Tümbay E, Pratik Tıp Mikolojisi, p. 383, Bilgehan Basımevi, İzmir, (1983).

19. Macdonald F, Odds FC: Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis, J Med Microbiol 13: 423 (1980).

20. Röchel R: A variety of *Candida* proteinases and their possible targets of proteolytic attack in the host, Zentralbl Bacteriol Microbiol Hyg (A) 257: 226 (1984).

21. Sono E, Masuda T, Takesako K, Kato I, Uchida K, Murayama SY, Yamaguchi H.: Comparison of secretory acid proteinase from *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. albicans*, Microbiol Immunol 36: 1099 (1992).

22. Günaydın M, Leblebicioğlu H, Saniç A, Pirinççiler M: Koagülaz-negatif stafilokoklarda slime yapımı ve antibiyotik direnci ile ilişkisi, Mikrobiyol Bül 29: 26 (1995).

23. Yücesoy M, Karaman M, Yuluğ N: *Candida* türlerinde slime üretiminin incelenmesi, (Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş Ed.), 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi özet kitabı, p. 279, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No: 36, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, (1999).

24. Yücesoy M, Avcı E, Yuluğ N: *Candida* türlerinde slime üretiminin saptanmasında alternatif bir yöntem, (Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş Ed.), 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi özet kitabı, p. 280, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No: 36, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, (1999).

25. Orhan H, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S, Tünger Ö, Sivrel Arısoy A: İnfeksiyon etkeni olan *C. albicans* suşlarında slime üretimi ve antifungal ajanlara duyarlılıkları, Türk Mikrobiyol Cem Derg. 28: 103 (1998).

26. Karagöz S, Koç AN, Çetinkaya F: Hastane infeksiyon etkeni olarak düşünülen maya izolatlarının slime ve proteinaz aktiviteleri, (Tümbay E, İnci R, Hilmioğlu S, Aydemir Ş Ed.) 1. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Kongresi özet kitabı, p. 277, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No: 36, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir, (1999).