

# Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida glabrata* Suşlarında Salgısal Asit Proteinaz, Fosfolipaz, Esteraz Aktivitelerinin ve Biyofilm Oluşumunun Araştırılması †

Berna GÜLTEKİN\*, Yasin TİRYAKİ\*\*, Neriman AYDIN\*

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı\*, Aydın Devlet Hastanesi, Mikrobiyoloji Bölümü\*\*

## ÖZET

**Amaç:** Kandidozlardan izole edilen türler arasında *Candida glabrata*'nın sıklığının giderek arttığı bildirilmektedir. Bu çalışmada *C. glabrata*'nın virülansı ile ilişkili olabilecek salgısal asit proteinaz (SAP), fosfolipaz, esteraz aktivitelerinin ve biyofilm oluşumunun araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Laboratuvarımızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen *C. glabrata* suşları saklama ortamından canlandırılarak kullanılmıştır. Suşların doğrulanması morfolojik testler ve polimeraz zincir reaksiyonu ile yapılmıştır. Suşların SAP aktivitesi, sığır serum albumini içeren agar-da; esteraz aktivitesi, Tween-80 içeren agarda; fosfolipaz aktivitesi, yumurta sarılı agarda; biyofilm oluşturma özelliği ise mikropalak yöntemi ile araştırılmıştır.

**Bulgular:** Çalışmaya alınan toplam 83 *C. glabrata* suşunun 65'i vajinal örnekten, 10'u kandan, dördü idrardan, ikisi pü ve ikisi ağız içi sürüntü örneğinden izole edilmiştir. Test edilen suşların ikisinde (%2,4) biyofilm oluşumu (kandan ve vajinal örnekten izole edilen suşlar) saptanmıştır. Suşların hiçbirinde SAP, esteraz, fosfolipaz aktivitesine rastlanmamıştır.

**Sonuç:** Çalışmamızda alınan sonuçlar, *C. glabrata*'nın virülansında araştırdığımız faktörlerin çok önemli olmadığını akla getirmekle birlikte, bu konunun aydınlatılması için kapsamlı çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmüştür.

**Anahtar kelimeler:** *Candida glabrata*, virülans

## SUMMARY

**Investigation of Secreted Aspartyl Proteinase, Phospholipase, Esterase, and Biofilm Formation in *Candida glabrata* Strains Isolated from Various Clinical Specimens**

**Objective:** Recent reports suggest that the frequency of *Candida glabrata* is increasing among species isolated from candidiasis. The aim of this study was to investigate the activities of secreted aspartyl proteinase (SAP), phospholipase, esterase and biofilm formation which might be related to the virulence of *C. glabrata* strains.

**Materials and Methods:** The study included the revived *C. glabrata* storage strains isolated from various clinical specimens in our laboratory. Identification of strains was confirmed by morphological tests and polymerase chain reaction. The SAP activity of the strains was tested in bovine serum albumin agar; the phospholipase activity in egg yolk agar; the esterase activity in Tween-80 agar and the biofilm production was assessed by the microplate method.

**Results:** A total of 83 *C. glabrata* strains isolated from vaginal specimens (n=65), blood (n=10), urine (n=4), pus (n=2), and oral swab samples (n=2), were included in the study. Two of the 83 strains (2.4%) were positive for biofilm production (strains from blood and vaginal specimen), while none of the isolates showed SAP, phospholipase or esterase activities.

**Conclusion:** According to these results, it can be concluded that the virulence factors investigated in this study do not seem to count as very important virulence factors for *C. glabrata* infections. However, further larger scale studies are needed to explore the virulence factors of *C. glabrata*.

**Key words:** *Candida glabrata*, virulence

**Alındığı tarih:** 20.10.2012

**Kabul tarihi:** 25.12.2012

**Yazışma adresi:** Berna Gültekin, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın

**e-posta:** gultekinberna@hotmail.com

†Bu çalışma "I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresinde (12-16 Kasım 2011, Antalya) poster bildiri olarak sunulmuştur.

## GİRİŞ

Kandidozlarda en sık etken olan tür *Candida albicans* olmakla birlikte, son yıllarda diğer türlerin ve bunlar arasında yer alan *C. glabrata*'nın görülme sıklığı artmıştır <sup>(1,2)</sup>. Flukonazole doza bağlı duyarlı ya da dirençli olabilmesi ve yüksek mortalite ile seyreden invazif enfeksiyonlara yol açabilmesi, bu türün önemli özellikleri arasında bulunmaktadır <sup>(3-6)</sup>.

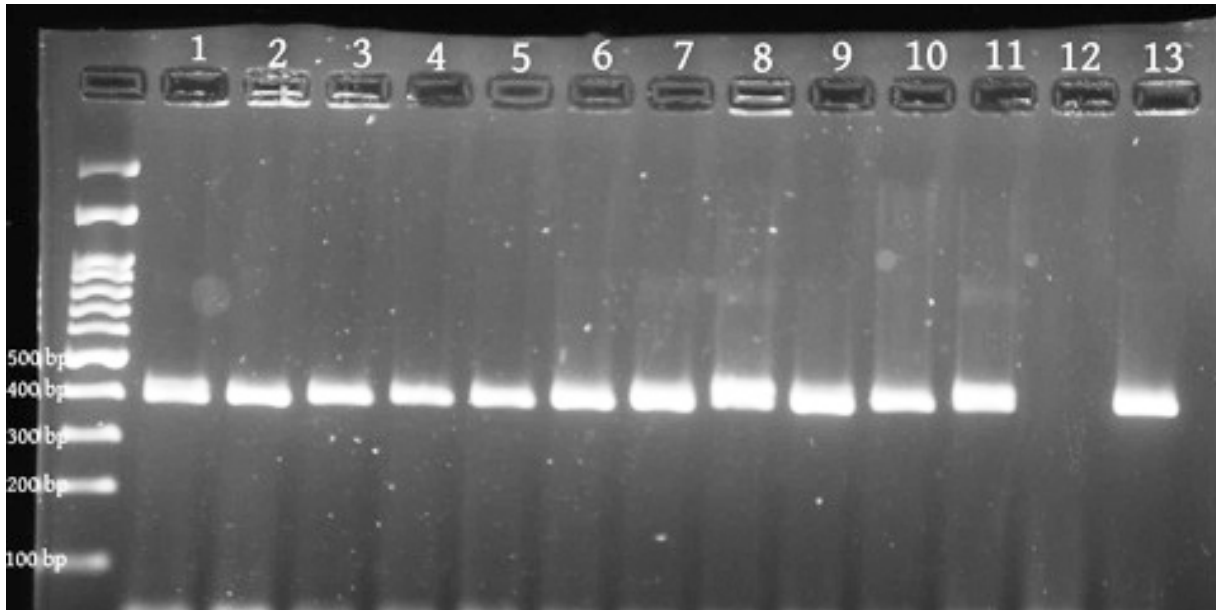
Kandidoz gelişiminde konağa ait savunma faktörlerindeki zayıflamanın yanı sıra etkene ait virülans faktörleri de önemli rol oynamaktadır. Virülans faktörleri ile ilgili çalışmalar en sık *C. albicans* üzerinde yapılmış, bu türe ait fenotip değişimi, morfolojik dimorfizm, çeşitli adezyon molekülleri, hidrolitik enzimler (fosfolipaz, lipaz, proteinazlar, vb.) gibi birçok faktör belirlenmiştir <sup>(7)</sup>. Literatürde *C. albicans* dışı *Candida* türlerinin özellikle *C. glabrata* suşlarının virülansı ile ilişkisi olabilecek özelliklerin araştırıldığı çalışma sayısı sınırlıdır.

Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *C. glabrata* suşlarında virülans ile ilişkili olabilecek faktörler arasında sayılan salgısal asit proteinaz (SAP), fosfolipaz, esteraz aktivitesinin ve biyofilm oluşumunun araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, son beş yılda çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de, yağsız süt içinde saklanmış olan *C. glabrata* suşları kullanılmıştır. Suşların tanımlanması için morfolojik testler tekrarlanmış ve tümünde Romeo ve ark. <sup>(8)</sup> çalışmasında kullandığı GLA-f ( $5'$ -CGGTTGGTGGGGTGTCTGC- $3'$ ) ve UNI-5.8S ( $5'$ -ACCAGAGGGCGCAATGTG- $3'$ ) primerleri ile *C. glabrata*'ya özgü 397 baz çifti büyüklüğünde bant, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanmıştır (Resim 1).

Suşların salgısal asit proteinaz (SAP) aktivitesinin araştırılmasında sığır serum albumini içeren agar da erime zonu oluşum testi kullanılmıştır. Bu test için, Sabouraud dekstroz agar da (SDA)  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübasyon sonrası oluşan maya kolonilerinden yeast pepton dekstroz buyyona (YPDB) pasaj yapılmış ve  $30^{\circ}\text{C}$ 'de dört saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında McFarland 0.5 bulanıklığında süspansiyon ayarlanmıştır. Süspansiyondan  $10\mu\text{l}$  alınarak sığır serum albuminli agar besiyerine yerleştirilmiş olan steril kâğıt diskler (6mm çapında) üzerine damlatılmıştır. Besiyerleri  $30^{\circ}\text{C}$ 'de altı gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, kâğıt disklerin çevresinde oluşan, besiyerindeki proteinin parçalan-



Resim 1. Seçilmiş *Candida glabrata* suşlarında polimeraz zincir reaksiyonu sonrası jel elektroforezi görüntüsü (1-11: Çalışmamızda yer alan *C. glabrata* suşlarından örnekler, 12: Negatif kontrol, 13: *C. glabrata* ATCC 90030).

dığını gösteren erime zonları milimetrik olarak ölçülerek, proteolitik aktivitenin düzeyi belirlenmiştir. Bu testte erime zonu olmayan suşlar SAP aktivitesi yönünden negatif olarak değerlendirilmiştir. Erime zonu olan suşlarda ise bu zon diskin 1-2mm dışındaki alana yayılmış ise orta derecede, diskin 3-5mm dışındaki alana yayılmış ise kuvvetli olarak değerlendirilmiştir<sup>(9)</sup>.

Suşların esteraz aktivitesi Tween-80 içeren agarda üreme testi ile araştırılmıştır. Bu testte suşların saf pasajlarından ekivyon ile Tween-80 agara 10mm çaplı daire şeklinde ekim yapılmış ve besiyerleri 10 gün süre ile 30°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında ekim bölgesinin etrafında ışığı geçiren hale oluşumu saptandığında test sonucu pozitif kabul edilmiştir<sup>(10)</sup>.

Suşların fosfolipaz aktivitesinin araştırılmasında yumurta sarılı agar yöntemi kullanılmıştır. Bu testte 0.5 McFarland bulanıklığındaki maya süspansiyonundan 10µl yumurta sarılı agara ekilmiş ve besiyerleri 37°C'de dört gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında koloni çapının presipitasyon çapına oranı (Presipitasyon zonu; Pz) hesaplanmıştır. Bu yöntemle fosfolipaz aktivitesi; Pz ≥ 1 olan suşlarda negatif, Pz <69 bulunan suşlarda ise çok kuvvetli (++++) pozitif olarak değerlendirilmiştir<sup>(11,12)</sup>.

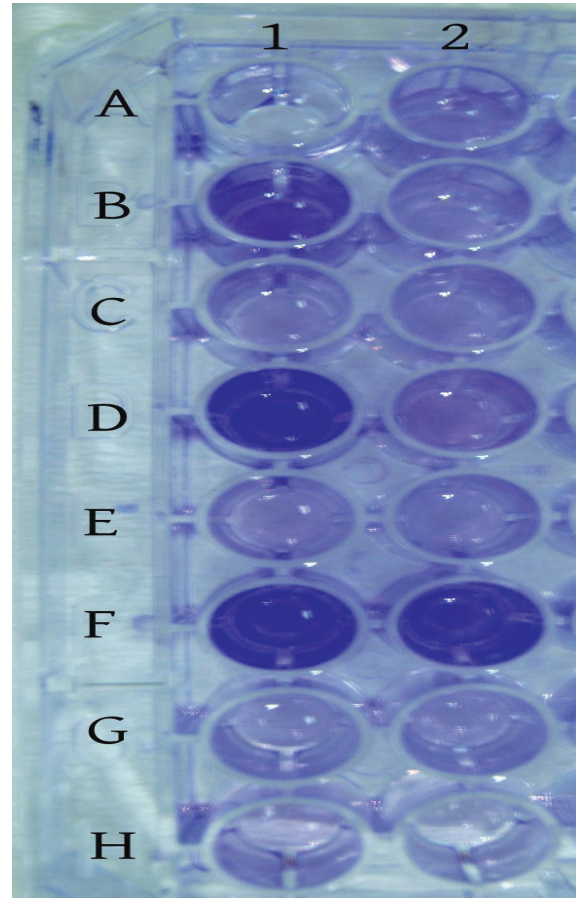
Suşların biyofilm oluşumunun araştırılmasında, Ruzicka ve ark.'nın<sup>(13)</sup> çalışmalarında olduğu şekilde mikropalak yöntemi kullanılmıştır. Bu testte %0.9 NaCl içinde 3 McFarland standardına ayarlanan maya süspansiyonu (20 µl) ile %8 glukoz içeren Sabouraud dekstroz buyyon (bioMérieux, Fransa) (180 µl) düz tabanlı polistiren mikropalaklar (Greiner bio one, Almanya) içinde karıştırılmıştır. Kırk sekiz saat 30°C'de inkübasyondan sonra kuyucuklar boşaltılarak üç kez distile su ile yıkanmış ve havada kurutulmuştur. Tespit amacı ile kuyucuklara 200µl metanol eklenip, 5 dk sonra boşaltılmış ve kuruması beklenmiştir. Kristal viyole (%1 dilüsyonda) ile 20 dk. boyama, yıkama ve kurutma işlemlerinden sonra kuyucuklara 200µl %96'lık etanol eklenmiş ve mikropalak okuyucuda (Bio Tek, EL x 800, USA) 630 nm'lik filtre ile okutulurak optik dansite (OD) değer-

leri elde edilmiştir. Eşik değer (negatif kontrollerin OD ortalaması + 3x standart sapma değeri) hesaplanarak OD değeri eşik değer üzerinde bulunan örneklerin biyofilm oluşum testi pozitif kabul edilmiştir.

Testler her suş için üçer kez tekrar edilmiştir. Çalışmada kontrol suşları olarak *C. albicans* ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 6258 ve *C. glabrata* ATCC 90030 kullanılmıştır.

## BULGULAR

Çalışmaya alınan 83 *C. glabrata* suşunun 65'i vajinal örnekten, 10'u kandan, dördü idrardan, ikisi pü ve ikisi ağız içi sürüntü örneğinden izole edilmiştir. Kandan ve vajinal örnekten izole edilen iki (%2,4) suşun biyofilm oluşturduğu görülmüştür (Resim 2).



Resim 2. Seçilmiş suşlarda biyofilm oluşumu (A1 ve H2: Negatif kontrol; B1: *C. albicans* ATCC 90028; C1: *C. glabrata* ATCC 90030; D1: *C. krusei* ATCC 6258; F1, F2: Biyofilm pozitif *C. glabrata* suşları; diğer kuyucuklar: Biyofilm negatif *C. glabrata* suşları).

*C. glabrata* suşlarının hiçbirinde SAP, esteraz veya fosfolipaz aktivitesi saptanmamıştır.

## TARTIŞMA

*Candida* türlerinin virülans faktörleri ile ilgili çalışmalar en sık *C. albicans* suşları üzerinde yapılmıştır. Çeşitli çalışmalarda *C. albicans* suşlarında SAP, fosfolipaz, esteraz, *C. tropicalis* suşlarında esteraz, *C. albicans* dışı suşlarda biyofilm oluşumunun yüksek oranlarda saptandığı bildirilmiştir<sup>(14-19)</sup>.

Çalışmamızda *C. glabrata* suşlarında SAP, esteraz, fosfolipaz oluşturan suşa rastlanmazken iki suşun biyofilm oluşum testi pozitif bulunmuştur. Literatürde *C. glabrata* ile ilişkili olabilecek virülans faktörlerinin araştırıldığı az sayıda çalışma bulunmaktadır. Shin ve ark.'nın<sup>(20)</sup> 61 *C. glabrata* suşunda biyofilm oluşumunu araştırdığı çalışma dışında ulaşabildiğimiz çalışmalarda suş sayısı oldukça düşüktür (15 ve altında). Bu durum sonuçlarımızı karşılaştırma olanağımızı sınırlamakla birlikte, literatürde benzer çalışmalar incelendiğinde bu dört test ile ilgili farklı sonuçların alındığı görülmektedir. Akbaş ve ark.<sup>(21)</sup> çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri 11 kökenin ikisinde SAP aktivitesi saptamıştır. Cevahir ve ark.<sup>(22)</sup> çeşitli örneklerden izole edilen dokuz *C. glabrata* suşundan beşinin biyofilm oluşturduğunu (glukozlu kongo kırmızılı agar da alınan sonuç) bildirmiştir. Öksüz ve ark.<sup>(23)</sup> sağlıklı yetişkinlerin farklı anatomik bölgelerinden izole edilen dokuz suştan birinde proteinaz aktivitesinin bulunduğunu, fosfolipaz pozitif suş saptamadıklarını bildirmiştir. Kumar ve ark.<sup>(24)</sup> solunum yolundan izole edilen 22 *C. glabrata* suşunun tümünde SAP aktivitesi saptadıklarını, suşların 12'sinde fosfolipaz aktivitesi bulunduğunu bildirmişlerdir. Slifkin ve ark.<sup>(10)</sup> 15 *C. glabrata* suşunda esteraz aktivitesini saptamadıklarını bildirmişlerdir. Shin ve ark.<sup>(20)</sup> çeşitli klinik örneklerden izole edilen 61 *C. glabrata* suşunda biyofilm oluşturma oranını %28 olarak saptamışlardır.

Sonuç olarak, çalışmamızda SAP, esteraz ve fosfolipaz aktivitesi olan suşlara rastlanmamış, bu türün virülans faktörlerini aydınlatılmak için yapılacak kapsamlı çalışmalara gereksinim duyulduğu düşünül-

müştür.

**TEŞEKKÜR:** Çalışmamızda kullandığımız besiyerlerinin hazırlanmasındaki yardımlarından dolayı Laboratuvar Teknikeri Recai Kılıçkan'a teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. **Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, et al.** Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1519-27. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.4.1519-1527.2004> PMID:15070998 PMCID:PMC387610
2. **Pappas PG, Rex JH, Lee J, et al.** A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* 2003; 37:634-43. <http://dx.doi.org/10.1086/376906> PMID:12942393
3. **Pfaller MA, Diekema DJ.** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:133-63. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00029-06> PMID:17223626 PMCID:PMC1797637
4. **Singh N.** Changing spectrum of invasive candidiasis and its therapeutic implications. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(Suppl 2):1-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2001.tb00004.x> PMID:11525214
5. **Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, et al.** Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clin Infect Dis* 1999; 28:1071-9. <http://dx.doi.org/10.1086/514731> PMID:10452637
6. **Bedini A, Venturelli C, Mussini C, et al.** Epidemiology of candidaemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary-care hospital. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12:75-80. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01310.x> PMID:16460550
7. **Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A.** Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol* 2009; 56:211-24. PMID:19543556
8. **Romeo O, Scordino F, Pernice I, Lo Passo C, Criseo G.** A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarenensis*. *J Microbiol Methods* 2009; 79:117-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.07.016> PMID:19635503
9. **Çerikçioğlu N, Alaçam R.** *Candida* suşlarında salgısal asit proteinaz enzim varlığının proteinli agar besiyerlerinde gösterilmesi. *Mikrobiyol Bul* 1993; 27:344-51. PMID:8264448
10. **Slifkin M.** Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4626-8. PMID:11101607 PMCID:PMC87648
11. **Samaranayake LP, Raeside JM, MacFarlane TW.** Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia* 1984; 22:201-7. <http://dx.doi.org/10.1080/00362178485380331> PMID:6379916
12. **Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO.** Plate method for



- detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; 20:7-14.  
<http://dx.doi.org/10.1080/00362178285380031>  
PMid:7038928
13. **Ruzicka F, Hola V, Votava M, Tejkalová R.** Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. *Folia Microbiol (Praha)* 2007; 52:209-14.  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF02931300>
  14. **Arslan U, Fındık D.** Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virulans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in-vitro araştırılması. *İnfeksi Derg* 2003; 17:471-81.
  15. **Yenişehirli G, Bulut Y, Tunçoğlu E.** Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarının fosfolipaz, proteinaz ve hemoliz aktiviteleri. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44:71-7.  
PMid:20455401
  16. **Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y, Kırdar S, Aydın N.** Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarında antifungal duyarlılığın ve bazı virülans faktörlerinin araştırılması ve RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45:306-17.  
PMid:21644074
  17. **Yücesoy M, Marol S.** *Candida* türlerinin esterase aktivitesinin belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul* 2003; 37:59-63.  
PMid:12838679
  18. **Demirbilek M, Timurkaynak F, Can F, Azap O, Arslan H.** Hastane kaynaklı *Candida* türlerinde biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılık paternleri. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41:261-9.
  19. **Dolapçı İ, Tekeli A.** Çeşitli *Candida* türlerinde slime faktörü yapımının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2002; 36:323-8.  
PMid:12838667
  20. **Shin JH, Kee SJ, Shin MG et al.** Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1244-8.  
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.4.1244-1248.2002>  
PMid:11923339 PMCid:PMC140345
  21. **Akbaş E, Karabıçak N, Güvener E.** *Candida* türlerinde salgısal asid proteinaz varlığının araştırılması. *Klinik Derg* 1997; 10:127-9.
  22. **Cevahir N, Demir M, Mete E, Kaleli İ.** *Candida* suşlarında farklı yöntemlerle slime üretiminin araştırılması. *İnfeksiyon Derg* 2003; 17:67-70.
  23. **Oksuz S, Sahin I, Yıldırım M, et al.** Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. *Jpn J Infect Dis* 2007; 60:280-3.  
PMid:17881867
  24. **Kumar VG, Latha R, Vedhagiri K, et al.** Phospholipase C, proteinase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from pulmonary tuberculosis patients. *J MycolMed* 2009; 19:3-10.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2008.11.002>