

Candida Türlerinde Salgısal Asid Proteinaz Varlığının Araştırılması

Efsun Akbaş, Nilgün Karabıçak, Engin Güvener

Özet: Bu çalışmada *Candida* cinsinden mayaların salgısal asid proteinaz (SAP) aktiviteleri incelenmiştir. Çalışma iki aşamalı olarak planlanmıştır. İlk aşamada, çeşitli klinik örneklerden infeksiyon etkeni olarak izole edilen 108 *Candida* izolatının proteinaz aktiviteleri araştırılmıştır. Türler göre SAP aktivitelerinin oranları, *C.albicans*'ta 54/73, *C.parapsilosis*'te 5/7, *C.tropicalis*'te 4/8 ve *C. (Torulopsis) glabrata*'da 2/11 olarak saptanmıştır. İkinci aşamada ise, klinik örneklerden izole edilen 73 *C. albicans* suşu ile sağlıklı bireylerin boğaz ve dışkı örneklerinden normal flora elemanı olarak izole edilen 34 *C.albicans* suşunun proteinaz aktiviteleri karşılaştırılmış; klinik izolatların % 73.9'unda, kontrol grubunun da % 29.4'ünde SAP aktivitesi gösterilmiştir. Aradaki fark χ^2 testi ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

Anahtar Sözcükler: *Candida*, asid proteinaz.

Summary: Secretory acid proteinase activity in *Candida* spp. In this study, secretory acid proteinase (SAP) activities of *Candida* species are examined. The study was planned at two steps. At the first step, 108 *Candida* isolates, which were isolated from different clinical specimens, were investigated for their proteinase activities. The SAP activity rates were found as *C.albicans* 54/73, *C.parapsilosis* 5/7, *C.tropicalis* 4/8, *C. (Torulopsis) glabrata* 2/11. At the second step, proteinase activity rates were compared between 73 isolates of *C.albicans* that isolated from clinical specimens and 34 isolates of *C.albicans* that isolated from feces and throat samples of healthy people. While the SAP activity rate of clinical isolates was found 73.9%, it was 29.4% in the control group. There was a significant difference between them statistically with χ^2 test ($p<0.001$).

Key Words: *Candida*, acid proteinase.

Giriş

Fırsatçı bir patojen olan *Candida* (özellikle *C.albicans*) ile ilk karşılaşma, doğum kanalından geçerken olmakta ve bu mikroorganizma gastrointestinal sistem ve vagina epiteli gibi mukozal yüzeylerin mikrobiyal florasında, bazen majör üye olarak yaşam boyu kolonizasyon gösterebilmektedir. İnfeksiyonlarının çoğu endojen orijinli olup patogeneizde konak savunma sistemlerinin rolünün yanı sıra *Candida*'ya ait virülans faktörlerinin önemi de vurgulanmaktadır (1,2). *Candida* proteinaz aktivitesinin patojenitedeki rolü ile ilgili olarak bugüne kadar birçok araştırma gerçekleştirilmiştir (3-5). Ancak bu potansiyel patojen canlıların nasıl olup da kolonizasyondan invazyon aşamasına geçtiği, hangi mekanizmalarla kontakta hasara yol açtığı, salgısal asid proteinazların virülansın ne kadarından sorumlu olduğuna dair sorular halen yeterince yanıtlanmamıştır. Ülkemizde ise son birkaç yıldır ilgi duyulan bu konuda henüz çok az çalışma vardır. Araştırmamızda klinik örneklerinden izole ettiğimiz değişik türde mayaların proteinaz aktivitelerinin düzeyini ve normal flora üyesi olarak bulunan *C.albicans* izolatlarının proteinaz aktivitelerinin klinik izolatlarındakinden farklı olup olmadığını saptamayı amaçladık.

Yöntemler

Bu çalışmaya, semptomatik bireylerin vagina, idrar, beyin omurilik sıvısı (BOS), apse gibi çeşitli klinik örneklerinden infeksiyon etkeni olarak izole edilen 108 maya izolatı ile kontrol

Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara

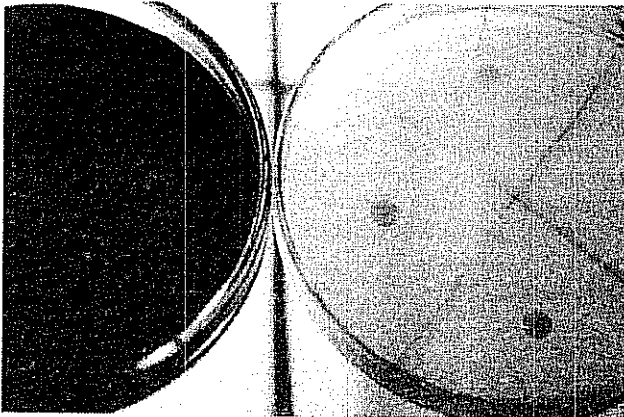
XXVII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (7-10 Mayıs 1996, Antalya)'nde bildirilmiştir.

grubu olarak sağlıklı bireylerden dışkı ve boğaz florularından izole edilen 34 *C.albicans* izolatı dahil edilmiştir. Kontrol suşu olarak Prof. R. Röchel (Göttingen Üniversitesi, Almanya)'den sağlanan ve güçlü proteolitik aktivitesi olan *C.albicans* CBS 2730 kullanılmıştır.

İlk olarak, tüm izolatlar Tween 80/Corn-Meal Agar'da üreme özelliği ve klamidiospor oluşumu, sikloheksimidli Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)'da üreme, germ tübü oluşturma, fermentasyon ve asimilasyon deneyleri gibi konvansiyonel metodlar ve gerektiğinde API20C (bioMerieux, Vitek Inc., Missouri) kullanılarak idantifiye edilmiştir. Ardından, orijinal olarak Röchel ve arkadaşları (3)'nin tanımladığı yöntem esas alınmış; salgısal proteinaz aktivitelerinin sıgır serum albümini içeren agar besiyerinde gösterilmesi amaçlanmıştır. Her *Candida* izolatının SDA'daki 24 saatlik taze pasajından bir koloni, % 1 maya özütü, % 2 pepton ve % 2 dekstroz içeren 5 ml YEPD sıvı besiyerine inoküle edilmiştir ve 30°C'de bir gece inkübasyona alınmıştır. SAP aktivitesinin gösterilmesinde kullanılan Yeast Carbon Base-Bovine Serum Albumin Agar (YCB-BSA); 11.7 gr YCB (Difco), 0.1 gr maya özütü 60 ml distile suda eritilmek suretiyle, 40 ml BSA (Difco) eklenip pH 5'e ayarlanarak stok solüsyon şeklinde hazırlanmış, membran filtreden (0.22 µm, Sartorius, Germany) süzülerek sterilize edilmiştir. Agar (% 2'lik) ayrıca hazırlanıp kapaklı tüplere 18'er ml dağıtılarak otoklavlanmış ve saklanmıştır. Çalışma sırasında 2 ml stok BSA-YCB, steril Petri kutularına, eritilip 55°C'ye soğutulan agarla birlikte dö-külerek karıştırılmış, katılaştıktan sonra her plağa 4'er adet 6 mm çapında kağıt diskler (Whatman No. 17) yerleştirilmiştir. YEPD besiyerinde bir gece inkübe edilmiş olan maya süspansiyonları, 106 hücre/ml olacak şekilde ayarlanıp otomatik pipetle 20 µl miktarlarda disklere emdirilmiştir. Plaklar 30°C'de 6 gün inkübe edildikten sonra metanol (45 ml), asetik asid (10 ml),

Tablo 1. Klinik Örneklerden İzole Ettiğimiz *Candida* Türlerinin Dağılımı ve Proteinaz Aktiviteleri

Tür	Klinik Örneklerin Dağılımı													Proteinaz Aktivitesi			
	İdrar	Vajen	Boğaz	Balgam	Kan	TTA*	Kulak akıntısı	Yara	Apse	Nefrostomi Mat	BOS	Tırnak	Ei deri kazıntısı	Toplam izolat	(+)	(++)	%
<i>C.albicans</i>	31	20	7	4	4	3		1	1		1	1		73	44	10	73.9
<i>C.glabrata</i>	5	6												11	1	1	18.1
<i>C.tropicalis</i>	3	1		1		1	1	1						8	2	2	50
<i>C.parapsilosis</i>	4						2	1						7	5	-	71.4
<i>C.pseudotropicalis</i>	4	1												5	-	-	-
<i>C.krusei</i>		2							1					3	-	-	-
<i>C.zeylanoides</i>													1	1	-	-	-



Resim 1. Henüz ekim yapılmamış bir BSA plağının ve amidoblack boyası ile boyanmış BSA'da bir *Candida albicans* izolatının proteolitik aktivitesinin görünümü.

distile su (45 ml) ve amidoblack boyası (0.6 gr) içeren protein boyama çözeltisi ile 5 dakika süre ile boyanmıştır. Boyamanın ardından, önce amidoblack içermeyen asetik asitli solüsyonla ve sonra çesme suyuyla plaklar 5-10 kez yıkanmıştır. Boyama ve yıkama işlemleri sonucunda, BSA agar besiyerinde disklerin çevresinde proteinlerin lizise uğradığı alanların boya almayarak şeffaflaşması beklenmektedir. Bu alanlar kalitatif olarak tanımlandığında, lizis zonu yok ise, SAP aktivitesi negatif; disk çevresinde 1-2 mm alanda lizis zonu varsa, orta derecede (+) proteolitik aktivite; disk çevresinde 3-5 mm alanda lizis zonu varsa, kuvvetli (++) proteolitik aktivite olarak değerlendirilmiştir (Resim 1).

İkinci aşamada ise, klinik örneklerden ve normal floradan izole edilen *C.albicans* suşlarının SAP aktiviteleri arasında farklılık olup olmadığı irdelenmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak x2 testi ile değerlendirilmiştir.

Sonuçlar

Candida suşlarının izole edildikleri klinik örneklere ve proteinaz aktivitelerine göre dağılımları Tablo 1'de özetlenmiştir. 108 maya, *C.albicans* (n=73), *C.glabrata* (n=11), *C.tropicalis* (n=8), *C.parapsilosis* (n=7), *C.pseudotropicalis* (n=5), *C.krusei* (n=3) ve *C.zeylanoides* (n=1) olarak tiplendirilmiştir. Proteolitik aktivite açısından referans suş CBS2730 *C.albicans* ile karşılaştırmalı çalışma sonucunda ise *C.albicans* suşlarının 54'ünde (54/73), *C.glabrata* suşlarının ikisinde (2/11), *C.tropicalis* suş-

larının dördünde (4/8) ve *C.parapsilosis* suşlarının beşinde (5/7) proteinaz aktivitesi saptanmıştır. *C.pseudotropicalis*, *C.zeylanoides* ve *C.krusei* suşlarında ise proteinaz aktivitesi gösterilememiştir. Bulgularımız, diğer araştırmacıların bulguları ile birlikte Tablo 2'de özetlenmiştir.

Ayrıca sağlıklı bireylerin boğaz ve dışkı örneklerinden flora elemanı olarak izole edilen 34 *C.albicans* suşu, proteinaz aktivitesi yönünden incelendiğinde bu grupta suşların % 29.4'ünün (10/34) orta derecede proteolitik olduğu gözlenmiştir. Klinik izolatlarmızda ise bu oran % 73.9 olup χ^2 testi ile fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$) (Tablo 3).

İrdeleme

Proteinaz enzim sekresyonu, 1960'ların ortalarından bu yana bilinmekle birlikte son yıllarda *Candida* virülansında rolü olduğu düşünüldüğünden önemi artmıştır (4,5). *Candida* SAP'larının in vitro şartlarda gösterilmesi ile ilgili olarak pek çok yöntem gelişmiştir. Proteinazın ortaya çıkarılabilmesi için öncelikle ortamda indükleyici bir nitrojen kaynağı bulunması gereklidir. Bu amaçla sığır serum albümini, ovalbümin, kazein, keratin gibi maddeler içeren besiyerleri kullanılmıştır (3,7-9). Bütün bu maddeler SAP'ların substratı olarak bilinmekle birlikte çalışmalarda en çok sığır serum albüminli agar tercih edilmektedir. *Candida*'ların SAP üretimleri için sıvı besiyerlerinde de çalışılmıştır (7,10,11). Kantitatif ölçümler için daha uygun olmasına rağmen enzim kolayca etkinliğini kaybetmesi ve zaman zaman duyarlılık sapmaları olması gibi pratik sorunlar vardır (7,10). Öte yandan BSA içeren katı ve sıvı besiyerleri çeşitli çalışmalarda birlikte kullanılmış, bu iki yöntem arasında uyumsuzluk bildirilmemiştir (5,7,10,12). Uygulama kolaylığı ve enzim varlığının somut olarak gösterilebilmesi açısından bu çalışmada da BSA agarda proteinaz saptama yöntemi kullanılmıştır.

Klinik örneklerden *Candida* türlerinin izolasyon sıklıkları incelendiğinde, Almanya'da yapılan bir çalışmada başta % 81.3 ile *C.albicans* olmak üzere, onu sırasıyla *C.tropicalis* (% 8.3), *C.glabrata* (% 4.4), *C.krusei* (% 2.8), *C.pseudotropicalis* (% 0.8), *C.parapsilosis* (% 0.4) izlemektedir. Diğer Avrupa ülkeleri ve Kuzey Amerika'da da benzer dağılımlar görülmektedir (7). Çalışmamızda da klinik örneklerden en sık izole edilen tür *C.albicans* (% 67.5) olmuştur. *C.albicans*'ı sırasıyla *C.glabrata* (% 10.1), *C.tropicalis* (% 7.4) ve *C.parapsilosis* (% 6.4) izlemektedir (Tablo 1). SAP enzimi, insanda fırsatçı patojen olarak sıklıkla izole edilen bu dört tür tarafından oluşturulmakta, *C.guilliermondii* suşlarında da ancak inkübasyon süresinin uzatılmasıyla tespit edilmektedir (7,10). Çalışmamızda, 73 *C.albicans* suşunun 54'ünde (% 73.9) SAP varlığı gösterilmiştir. Çalışmamızda proteinaz aktivitesi saptanan *C.albicans* suşlarının 10'unda,

Tablo 2. Değişik Araştırmalarda Bildirilen *Candida* Türlerinin SAP Pozitiflik Oranlarının (%) Karşılaştırılması

Tür	Rüchel ⁷		Chakrabarti <i>et al.</i> ⁶		Ergin ve Kuştimur ¹⁴		Çerikçioğlu ve Alaçam ¹³		Bu çalışma	
	İzolat	(%)	İzolat	(%)	İzolat	(%)	İzolat	(%)	İzolat	(%)
<i>C.albicans</i>	103	(77)	227	(81)	51	(49)	75	(87)	73	(74)
<i>C.parapsilosis</i>	11	(72)	9	(88)	-	-	7	(0)	7	(71)
<i>C.tropicalis</i>	-	-	37	(81)	-	-	15	(53)	8	(50)
<i>C.glabrata</i>	17	(0)	10	(60)	-	-	2	(100)	11	(18)
<i>C.krusei</i>	17	(0)	7	(57)	-	-	7	(0)	3	(0)
<i>C.pseudotropicalis</i>	11	(0)	-	-	-	-	15	(33)	5	(0)

Tablo 3. Klinik Örneklerden ve Floradan İzole Edilen *C.albicans* Suşlarının SAP Aktivitelerinin Karşılaştırılması

	Proteinaz-Pozitif Suşlar	(%)
Klinik izolatlar (n=73)	54	(73.9) *
Flora izolatları (n=34)	10	(29.4) *

* <0.001

C.tropicalis suşlarının ikisinde ve *C.glabrata* suşlarının birinde SAP aktivitesi, referans suş ile paralel bulunup "kuvvetli proteolitik" olarak değerlendirilmiştir (Tablo 1). Yedi *C.parapsilosis* izolatından beşi de orta derecede proteolitik bulunmuştur. Klinik örneklerden ikinci sıklıkta izole ettiğimiz *C.glabrata*'nın SAP aktivitesi ise düşük oranda (2/11) saptanmıştır. *C.pseudotropicalis*, *C.krusei*, *C.zeylanoides* izolatlarımızın ise hiçbirinde SAP aktivitesi gözlenmemiştir. Bu McDonald (10), Rüchel (7), ve Çerikçioğlu ve Alaçam (13)'ün çalışmalarıyla uyumlu görünmektedir. Farklı olarak Chakrabarti ve arkadaşları (6), yedi *C.krusei* suşunun dördünde proteinaz aktivitesi bildirmiştir (Tablo 2).

Bu çalışmada, ilginç olarak *C.zeylanoides*, dermatofitoz benzeri bir tabloda el deri kazıntısı örneğinden izole edilmiştir. Söz konusu izolatın BSA agarda proteolitik aktivitesi gösterilememekle birlikte substratı keratin olan bir proteinazın bulunma olasılığı akla gelmektedir. Ancak konu ile ilgili bir yayına rastlanmamıştır.

Alt ve üst solunum yolu enfeksiyonları, diyare ve vulvovajinal kandidiyazda izole edilen *Candida* türlerinde patojenite-komensalizm ayrımı yapmak güçtür. Bu konuda yapılan bir çalışmada vulvovajinal kandidiyazda hasta izolatlarının taşıyıcılara göre istatistiksel olarak anlamlı bir farkla yüksek oranda proteolitik aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur (5). Chakrabarti ve arkadaşları (6) ise semptomatik olguların balgam, boğaz, dışkı ve idrar örneklerinden izole edilen *Candida*'ların, asemptomatiklere göre istatistiksel olarak anlamlı bir farkla yüksek oranda proteinaz aktivitesi gösterdiğini saptamıştır. Bu çalışmada da, sağlıklı bireylerin boğaz ve barsak florasından izole edilen *C.albicans* suşları ile klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *C.albicans* suşlarının proteinaz aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu dikkati çekmektedir (p<0.001) (Tablo 3). Çalışmamızda klinik orijinli *C.albicans* suşlarının yüksek oranda proteolitik aktivite göstermesi ve komensal *C.albicans* izolatları ile aralarında proteolitik aktivite açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunması, konu ile ilgili yapılan çalışmalarını destekler niteliktedir.

Dünyadaki benzer çalışmalarda proteolitik aktivitenin türler arasında dağılımını incelediğimizde, klinik örneklerden yüksek

sıklıkla izole edilen türlerin aynı zamanda yüksek oranda proteinaz aktivitesine sahip oldukları anlaşılmaktadır. Bu ilginç paralellik, sekretuar asit proteinazları olan türlerin enfeksiyona neden olma şansının artmasıyla ilgili olabileceği gibi, türlerin izolasyon sıklığı SAP'ların gösterilebilme olasılığını da belirliyor olabilir.

Bakteriyolojiden farklı olarak klinik mikolojinin ötündeki en önemli sorunlardan biri, izole edilen mantarın, hangi ölçütler temel alınarak patojen kabul edileceğidir. Bu nedenledir ki, fungusun davranışları ve patogenezele ilgili mekanizmaların anlaşılmasına dönük araştırmalar, aynı zamanda patojen-saprofit ayrımını yapabileme umudunu da taşımaktadır. Laboratuvarında *Candida* SAP aktivitesinin kolayca gösterilebilir oluşu, başlangıçta bu umudu desteklemişse de, konu ile ilgili daha ileri çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

Kaynaklar

1. Oddis FC. Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31:2-5
2. Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 1991; 45:187-218
3. Rüchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; 20:233-44
4. Rüchel R, Bernardis F, Ray TL, Sullivan PA, Cole GT. *Candida* acid proteinases. *Sabouraudia* 1992; 30:123-32
5. Cassone A, DeBernardis F, Mondello F, Ceddia T, Agatensi L. Evidence for correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis* 1987; 156:777-83
6. Chakrabarti A, Nayak N, Talwar P. In vitro proteinase production by *Candida* species. *Mycopathologia* 1991; 114:163-8
7. Rüchel R. A variety of *Candida* proteinases and their possible targets of proteolytic attack in the host. *Zentralbl Bakteriell Hyg* 1984; 257:266-74
8. Hattori M, Yoshiura K, Negi M, Ogawa H. Keratinolytic proteinase produced by *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1984; 22:275-83
9. Homma M, Chibana H, Tanaka K. Induction of extracellular proteinase in *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* 1993; 139:1187-93
10. Mac Donald F. Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species. *Sabouraudia* 1984; 22:79-82
11. Kuştimur S, El-Nahi H. Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin patojenite testleri ile saptanması ve bunlarda asit proteinazın gösterilmesi. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg* 1991; 21:64-9
12. DeBernardis F, Lorenzini R, Verticchio R, Agatensi L, Cassone A. Isolation, acid proteinase secretion, and experimental pathogenicity of *Candida parapsilosis* from outpatients with vaginitis. *J Clin Microbiol* 1989; 27:2598-603
13. Çerikçioğlu N, Alaçam R. *Candida* suşlarında salgısal asit proteinaz enzim varlığının proteinli agar besiyerlerinde gösterilmesi. *Mikrobiyol Bil* 1993; 27:344-51
14. Ergin M, Kuştimur S. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarında proteinaz aktivitesinin kazein agar yöntemi ile gösterilmesi. *Mikrobiyol Bil* 1994; 28: 338-44