ÇEŞİTLİ *CANDIDA* TÜRLERİNİN LİPOLİTİK AKTİVİTELERİNİN SAPTANMASINDA TWEEN 80 OPAKLAŞMA TESTİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE *C. ALBICANS* İLE *C. DUBLINIESİS* AYIRIMINDAKİ YERİ

EVALUATION OF THE TWEEN 80 OPACITY TEST FOR DETECTION OF THE LIPOLYTIC ACTIVITY OF VARIOUS *CANDIDA* SPECIES AND ITS UTILITY IN DIFFERENTIATION OF *C. ALBICANS* AND *C. DUBLINIENSIS*

İştar DOLAPÇI*, Alper TEKELİ*, Sevtap ARIKAN**

ÖZET: Bu çalışmada, 10 farklı *Candida* türünden oluşan toplam 253 suşun tween 80 opaklaşma testi kullanılarak, lipolitik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Tween 80 besiyerinde 10 günlük izlem sonucunda inokulümün etrafında halo izlenmesi pozitif lipolitik (esteraz) aktivitesi olarak kabul edilmiş ve 182 *C.albicans* suşunun 174'ünün, 21 *C.tropicalis* suşunun tamamının, 1 *C.rugosa* suşu ve 5 *C.famata* suşunun 2'sinin halo oluşturduğu izlenmiştir. Negatif sonuç veren 8 *C.albicans* suşunun 7'sinin çeşitli maligniteleri olan hastaların kan kültürlerinden izole edilen suşlar olduğu görülmüştür. Geri kalan diğer *Candida* türlerine ait suşlardan; 12 *C.glabrata*, 6 *C.dubliniensis*, 8 *C.kefyr*, 5 *C.guillermondii* ve 5 *C.spherica* suşunda halo oluşumu izlenmemiştir. Tween 80 besiyerinin bazı *Candida* türlerinin ön tanısında faydalı olabileceği ancak özellikle çok benzer iki tür olan *C.albicans* ve *C.dubliniensis*'in ayırımı için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Candida türleri, lipolitik aktivite, esteraz.

ABSTRACT: In this study a total of 253 strains belonging to 10 different species of *Candida* were examined for their lipolytic activity by using the Tween-80 opacity test. Hundred and seventy-four of 182 *C.albicans*, all of 21 *C.tropicalis*, 1 *C.rugosa* and 2 of 5 *C.famata* strains produced halo on Tween 80 medium and around the inoculum after 10 days of incubation pointing out the positive lipolytic (esterase) activity. Seven of 8 negative *C.albicans* strains were isolated from hemocultures of patients with different malignancies. Remaining strains of *Candida* species; *C.glabrata* (12), *C.dubliniensis* (6), *C.kefyr* (8), *C.guillermondii* (5) and *C.spherica* (3) did not produce the halo. Tween 80 medium may be useful for the presumptive identification of some *Candida* species but regarding our results further large scale studies are necessary to establish the role of the medium in differentiating particularly the two similar species, *C.albicans* and *C.dubliniensis*.

Key words: Candida spp, lipolytic activity, esterase.

* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

Geliş Tarihi: 11.5.2004 Kabul Ediliş Tarihi: 7.10.2004

GİRİŞ

Candida türleri son yıllarda özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda sebep oldukları önemli enfeksiyonlar ile dikkat çekmektedir. Bu hastalarda *Candida albicans* en sık izole edilen mantar olmakla birlikte, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* ve *Candida krusei* gibi diğer *Candida* türlerinin prevalansında da bir artış izlenmektedir[1,2]. Son yıllarda tanımlanan yeni bir tür olan *Candida dubliniensis* de farklı hasta gruplarından izole edilmektedir[3-5].

İnvaziv enfeksiyon ve kolonizasyon oluşumunda hastalara ve mantarların virülansına bağlı pek çok hazırlayıcı faktör rol oynamaktadır. *Candida* türleri, aderans, dimorfizm, hücre yüzey yapısı, toksinleri, biyofilm oluşumu ve çeşitli enzim üretimleri gibi çeşitli virülans faktörlerine sahiptirler[6-9].

Bu çalışmada, *Candida* türlerinin virülans faktörlerinden biri olan lipolitik aktivitenin ve *Candida* türlerinin ayırımında tween 80 opaklaşma testinin kullanımının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar ve Kültür Ortamı: Bu çalışmada toplam 253 *Candida* suşu kullanıldı. Suşların 61'i kan kültürlerinden, 109'u onkoloji hastaları ve 57'si diabetes mellitus'lu hastaların orofarinkslerinden ve 26'sı da sağlıklı kadınların vajenlerinden izole edildi. Suşlar jerm tüp oluşumu, Staib agarda oluşturdukları koloni morfolojileri ve farklı ısı derecelerinde üremeleri gibi morfolojik özellikleri, API 20C AUX (Biomerieux) ile değerlendirilen karbonhidrat asimilasyon paternleri ve *C.dubliniensis* için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tiplendirildi. Kalite kontrol için referans suşlar olarak *C.albicans* NIH A, NIH B, ATCC 90028 ve 90128, *C.parapsilosis* ATCC 22019, *C.dubliniensis* CD 36, *C.tropicalis* ATCC 750 ve *C.glabrata* ATCC 90030 kullanıldı.

Esteraz Aktivitesinin Değerlendirilmesi: Bu amaçla tween 80 besiyeri kullanıldı. Besiyeri, bakteriyolojik pepton (10 g, BD Biosciences), NaCl (5 g), $CaCl_2$ (0.1 g), agar (15 g) ve distile su (1000 ml) ile hazırlandı. Daha sonra 5 ml otoklavlanmış tween 80 (Sigma) ilave edildi. Besiyeri 15 cm çaplı steril petri plaklarına dağıtıldı. Besiyeri üzerinde eküvyon kullanılarak, inokulümün ekileceği çukurlar açıldı. Her izolatın Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)'da bir gece bekletilen kültürlerinden bir öze dolusu (10 µl kalibreli öze ile) alınarak 1 ml %0.9'luk NaCl içeren tüplerde süspanse edildi. Bir kaç saniye vortekslendikten sonra her tüpten 20 µl süspansiyon alınarak tween 80 besiyeri üzerinde hazırlanan çukurlara konuldu. Bütün örnekler 30°C'de 10 güne kadar inkübe edildi. İnokuüumün etrafında halo varlığı her gün birbirinden bağımsız iki farklı araştırıcı tarafından değerlendirildi.

BULGULAR

Değerlendirilen 253 klinik izolattan 182 *C.albicans* suşunun 174'ünün, 21 *C.tropicalis* suşunun tamamının, 1 *Candida rugosa* suşunun ve 5 *Candida famata* suşunun 2'sinin 10 günlük gözlem sırasında halo oluşturduğu izlenmiştir. Geri kalan 12 *C.glabrata*, 6 *C.dubliniensis*, 8 *Candida kefyr*, 5 *Candida guillermondii* ve 3 *Candida spherica* izolatlarında 10 günün sonunda halo oluşumu görülmemiştir. Türler ve halo oluşturdukları günler Tablo I'de görülmektedir.

Tablo I: *Candida* Türlerinin Tween 80 Besiyerindeki Lipolitik Aktiviteleri

Türler	İzolat Sayısı	Esteraz Aktivitesi Gösteren İzolatların Sayısı (%)	Halo Oluşumunun Saptandığı Günler 2-3	4-6	7-10
C.albicans	182	174 (95.6)	95	77	2
C.tropicalis	21	21 (100)	14	7	–
C.glabrata	12	–	–	–	–
C.dubliniensis	6	–	–	–	–
C.parapsilosis	10	–	–	–	–
C.rugosa	1	1 (100)	1	–	–
C.kefyr	8	–	–	–	–
C.guillermondii	5	–	–	–	–
C.famata	5	2 (40)	2	–	–
C.spherica	3	–	–	–	–

Kalite kontrolü için kullanılan referans suşlarından 4 *C.albicans* suşu, 1 *C.tropicalis* suşu ve 1 *C.glabrata* suşu halo oluştururken, 1 *C.dubliniensis* suşu ve 1 *C.parapsilosis* suşunda halo oluşumu izlenmemiştir.

TARTIŞMA

Candida türlerinin virülans özellikleri, invaziv enfeksiyon ve kolonizasyon oluşturmaları açısından önemli faktörlerdir ve ayrıca virülans faktörlerinin farklı türlerdeki varlığı tür tanımlaması için faydalı olabilmektedir. Fosfolipazlar ve esterazlar gibi lipolitik enzimler özellikle fungal adezyon ve yayılma için önem taşırlar[10,11].

Mantarlar ve dermatofitlerin lipolitik aktivitesinin saptanmasında tween 80 opaklaşma testinin kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır[12-14]. Bu çalışmada, lipolitik aktivite varlığının ve bunun çeşitli *Candida* türlerini birbirinden ayırmadaki yararının araştırılması amaçlanmıştır. *C.albicans* (%95.6), *C.tropicalis* (%100), *C.rugosa* (%100) ve *C.famata* (%40)'dan oluşan grupta 10 gün içinde halo oluşumu gözlerken, bu bulguların Aktaş ve arkadaşları[14] ile Slifkin'in[13] bulgularına benzer olduğunu saptanmıştır. Çalışmamızdaki 184 *C.albicans* suşundan 174'ü halo oluşumu açısından pozitif, 8'i negatif olarak belirlenmiş ve bu bulgu Aktaş ve arkadaşlarının[14] sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Aktaş ve arkadaşlarının[14] çalışmasında 59 *C.albicans* suşundan 58'inin halo oluşturduğu gösterilmiştir. Buna karşılık Slifkin[13] incelediği 15 *C.albicans* suşunun hepsini pozitif olarak saptamıştır. Bu farkın, çalışmalarda kullanılan *C.albicans* suş sayısının azlığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Diğer çalışmalar ile uyumlu olarak çalışmamızda da *C.tropicalis, C. famata* ve *C.rugosa* suşlarında pozitif sonuçlar elde edilmiştir[13,14]. Aynı zamanda negatif olarak bulduğumuz *C.albicans* suşlarının bir tanesi dışında hepsinin değişik maligniteleri olan hastaların kan kültürlerinden, diğer suşun da diabetes mellitus'lu bir hastanın orofarinksinden izole edildiği gözlenmiştir.

C.dubliniensis ilk kez 1995 yılında Sullivan ve arkadaşları[3] tarafından tanımlanan yeni bir patojendir. Çeşitli hasta gruplarında rastlanmakla birlikte *C.dubliniensis* sıklıkla insan immün yetmezlik virusu (HIV) ile enfekte hastaların ve AIDS hastalarının

orofarinkslerinden ve oral lezyonlarından izole edilmektedir[3-5]. *C.dubliniensis* jerm tüp ve klamidospor oluşumu gibi pek çok fenotipik özelliği ile *C.albicans*'a benzer. Özellikle rutin laboratuvarlarda bu iki türü morfolojik ve kültür özelliklerini kullanarak birbirinden ayırmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir[15-17]. Karbonhidrat kullanım testleri ve moleküler teknikler de bu mantarın tanımlanmasına yardımcı olacak şekilde planlanmaktadır[18,19].

Slifkin[13], 15 *C.albicans* izolatının hepsinde esteraz aktivitesi saptarken, 16 *C.dubliniensis* izolatının hiç birisinde saptamamış ve tween 80 opaklaşma testinin *C.dubliniensis* tanımı için yararlı bir araç olduğunu bildirmiştir. Bizim çalışmamızda ise esteraz aktivitesi incelen 182 *C.albicans* suşundan 174'ünde bulunurken, 6 *C.dubliniensis* suşunun hiç birisinde görülmemiştir. Her iki çalışmada da *C.dubliniensis* izolatları lipolitik aktivite açısından negatif olarak saptanmışlardır. Bu bulgu tween 80 opasite testinin *C.dubliniensis*'in *C.albicans*'dan ayırımında kullanılabileceğini göstermekle birlikte, bazı *C.albicans* suşları lipolitik aktiviteden yoksun oldukları için bu yöntemin tek tanı aracı olarak kullanılamayacağını düşünmekteyiz. Aktaş ve arkadaşları[14] da bizim bulgularımıza paralel olarak bazı *C.albicans* suşlarında lipolitik aktivite bulamadıklarını bildirmişlerdir.

Sonuç olarak, tween 80 besiyerinin bazı *Candida* türlerinin ön tanısında yararlı olabileceği, ancak özellikle iki benzer tür olan *C.albicans* ile *C.dubliniensis*'in ayırımında yetersiz kalabileceği kanısına varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Kan kültür izolatlarının sağlanmasındaki desteklerinden dolayı Sedef Göçmen, Derya Aysev ve Haluk Güriz'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Wingard JR: Importance of *Candida* species other than *C.albicans* as pathogens in oncology patients. Clin Infect Dis 1995, 20: 115-125.
2. Davies AN, Brailsford S, Broadley K, Beighton D: Oral yeast carriage in patients with advanced cancer. Oral Microbiol Immunol 2002, 17: 79-84.
3. Sullivan D, Westerneng T, Haynes AK, Bennett D, Coleman D: *Candida dubliniensis* sp. novel phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidiasis in HIV-infected individuals. Microbiology 1995, 141: 1507-1521.
4. Willis AM, Coulter WA, Sullivan DJ, et al: Isolation of *C.dubliniensis* from insulin-using diabetes mellitus patients. J Oral Pathol Med 2000, 29: 86-90.
5. Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Merz WG, Baqul AAMA, Kelley JI, Meiller TF: Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinicaly laboratory isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV infected individuals. J Clin Microbiol 2000, 38: 2423-2426.
6. Haynes K: Virulence in *Candida* species. Trends Microbiol 2001, 9: 591-596.
7. Ghannoum M: Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev 2000, 13: 122-143.
8. Juo G, Sanaranayake LP, Yau JYY: *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. J Clin Microbiol 2001, 39: 2971-2974.

9. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, et al: Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from non-neutropenic patients: Comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J Clin Microbiol 2002, 40: 1244-1248.

10. Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG, Ryley JF: A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. J Gen Microbiol 1985, 131: 1217-1221.

11. Tsuboi R, Komatsuzaki H, Ogawa H: Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. Infect Immun 1996, 64: 2936-2940.

12. Slifkin M, Cumbie R: Evaluation of the Tween opacity test for the identification of dermatophytes. Med Microbiol Lett 1996, 5: 401-407.

13. Slifkin M: Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. J Clin Microbiol 2000, 38: 4626-4628.

14. Aktas E, Yıgıt N, Ayyıldız A: Esterase activity in various *Candida* species. J Int Med Res 2002, 30: 322-324.

15. Staib P, Morschhauser J: Chlamydospore formation on Staib agar as species- specific characteristic of *Candida dubliniensis*. Mycoses 1999, 42: 521-524.

16. Sullivan D, Haynes K, Bille J, et al: Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. J Clin Microbiol 1997, 35: 960-964.

17. Sullivan D, Coleman D: *Candida dubliniensis*, characteristics and identification. J Clin Microbiol 1998, 36: 329-334.

18. Tiltelnot K, Haase G, Seibold M, et al: Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. J Clin Microbiol 2000, 38: 1599-1608.

19. Kurzai O, Korting HC, Harmsen D, et al: Molecular and phenotypic identification of the yeast pathogen *Candida dubliniensis*. J Mol Med 2000, 78: 521-529.