

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN CANDIDA ALBICANS SUŞLARINDA PROTEİNAZ AKTİVİTESİNİN KAZEİN AGAR YÖNTEMİ İLE GÖSTERİLMESİ

DETECTION OF PROTEINASE ACTIVITY IN CANDIDA ALBICANS STRAINS
ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES WITH CASEIN AGAR METHOD

Mehmet ERGİN*, Semra KUŞTİMUR**

zet: Vajen, idrar, boğaz, balgam ve gaita gibi çeşitli klinik örneklerden yapılan mikolojik kültürlerde, 73 adet Candida suşu izole edilmiştir. Bu suşlar *C.albicans* (% 69), *C.stellatoidea* (% 8), *C.krusei* (% 7), *C.tropicalis* (% 5), *C.pseudotropicalis* (% 5), *C.parapsilosis* (% 3) ve *C.glabrata* (% 1.3) olarak tiplendirilmiştir.

Kazein Agar Yöntemi ile *C.albicans* suşlarının % 49'unda pozitif proteinaz aktivitesi bulunmuştur. Kandida enfeksiyonlarının patogeneğinde salgısal asit proteinaz enziminin önemli bir rol olduğu gznne alırsa, proteinaz aktivitesinin gsterilmesinde kazein agar ynteminin rutin uygulanabilecek bir metod olduğu sonucuna varılmıştır.

Summary: Seventythree strains of Candida were isolated from mycological cultures of various clinical samples such as vagina, urine, throat, sputum and stool. These strains are identified as *C.albicans* (69%), *C.stellatoidea* (8%), *C.krusei* (7%), *C.tropicalis* (5%), *C.pseudotropicalis* (5%), *C.parapsilosis* (3%) and *C.glabrata* (1.3%).

Positive proteinase activity was found in 49% of the *C.albicans* strains by Casein Agar Method. As the secretory acid proteinase enzyme plays an important role in the pathogenesis of Candida infections, it was concluded that the casein agar method may be used easily in rutine procedures.

G İ R İ Ő

Kandidoz, deri, tırnaklar, ağız, vajina, bronşlar, akciğerler daha seyrek olarak da, endokardı ve menenjerleri tutabilen genellikle *Candida albicans* ve nadir olarak diğer kandida türleri ile oluşan mikozdur (1).

* Türkiye Cumhuriyeti Ziraat Bankası Hastanesi, Ankara.

** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

İnsan mantarlarının parazit olarak yaşayabilmeleri için, vücut ısısında üreyebilmeleri ve buldukları yerdeki maddeleri parçalayabilecekleri enzimlere sahip olmaları gerekmektedir. Kandida'lar normal florada bulunmalarına rağmen, tüm diğer fırsatçı patojenler gibi ancak belirli hazırlayıcı faktörlerin yardımı ile değişen çeşitli klinik tablolara yol açabilirler (2).

Patojenitede; germ tüp yapımı, hif yapımı, çeşitli yüzeylere yapışma, nötrofillerin hiflere yapışmasının önlenmesi, blastosporların fagositoza direnci, serumda kümeler meydana getirme, endotoksin benzeri maddeler, fosfolipaz enzimleri ve asit proteinaz enzimleri virulans faktörleri olarak bildirilmektedir (3, 4, 5, 6).

Kandida asit proteinazi, kandida tarafından oluşturulan enfeksiyonların patolojisinde önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan deneysel enfeksiyonlarda, deriyi tutan türler arasında en fazla asit proteinaz üreten *C.albicans* suşları olmuştur. Asit proteinaz, kandidaların en önemli patojenite kriterinden biri olarak kabul edilmektedir (7).

C.albicans proteinazi gliko-protein yapısındadır. Molekül ağırlığı ortalama 45.000 Dalton olan enzim tek bir polipeptit zincir içerir (8). pH: 8.4 üzerindeki H⁺ iyonu konsantrasyonlarında denatürasyona uğrar (9, 10). Dondurularak saklanabilir. 45 °C'de aktivesini yitirir. Sütü pH: 5.5'da pıhtılaştırır (8, 10).

İnsan transferinini, α₁-antitripsini, α₂-makroglobinini, serum IgA, Ig, A₁, IgG₁, IgM ve salgısal IgA zincirlerini parçalar (10, 11).

Proteinaz pozitif suşların, fagositoz ve konakçı savunma sistemine daha kolay direnç gösterebildiği ve böylece yaygın kandidiazisin oluşmasına yol açabileceği vurgulanmıştır (12, 13).

Çalışmamızda vaginal kandidozu olan değişik yaş gruplarından toplanan sürüntü örneklerinden mikolojik kültür yöntemi ile kandida izolasyonu yapıldı. Üretilen kandida'ların germ tüp yapımı, EMB agarında üreme özelliği, klamidiospor oluşumu, üreaz aktivitesi, fermentasyon ve asimilasyon reaksiyonlarına bakılarak türleri saptandı. *C.albicans* olarak tanımlanan suşlarında asit proteinaz aktivitesi, Kazein Agar Yöntemi ile araştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

T.C. Ziraat Bankası Hastanesi Kadın-Doğum Polikliniği ve Doğumevi Hastanesin'de jinekolojik ve çeşitli şikayetlerle gelen 135 hastadan alınan sürüntü örneklerinden Sabouraud agara ekim yapıldı. Sabouraud besiyerlerinden biri oda ısısı, diğeri 37 °C'de yaklaşık bir hafta inkübe edildi. Biyoşimik testlerin sonuçlarına göre *C.albicans* olarak tanımlanan suşlar, asit proteinaz oluşumu yönünden incelenmek üzere Sabouraud agara pasaj yapıldı (7, 14, 15).

Proteinaz Testi: Taze pasajları yapılan *C.albicans* suşları, Sabouraud dextroz buyyona tekrar ekildi. Üreme görüldükten sonra PBS solüsyonu ile santrifüje edilerek

3'er defa yıkandı. Süpernatantlardan steril distile su ile 10⁸/cc hücre olacak şekilde Thoma lamında sayılarak ayarlandı. Hazırlanan Kazein agara tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı. 96 saat oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda üreme görülen petri kutularına % 20'lik TCA'den plak yüzeyini örtecek şekilde dökülerek 15-20 dakika oda ısısında bekletildi. PBS ile en az iki defa yıkandı.

Önceden hazırlanan % 6'lık Amido-Black Boyası plakların yüzeyine döküldü ve yaklaşık 10 dakika bekletildikten sonra, solvent solüsyonu ile boya yıkandı. PBS ile yavaş hareketlerle iki defa yıkama yapıldı (7).

Uygun ışıkta maya kolonileri etrafındaki renk zonları incelenerek proteinaz aktivitesi araştırıldı (7).

Çalışmamızda, Kazein agarda proteinaz enziminin saptanmasında, Prof. Dr. Reinhard Rüche'den temin edilen 2730 kod nolu *C.albicans* suşu ile Dr. Frank C. Odd'dan (Liecester Üniver.) temin edilen 83/008 kod nolu *C.albicans* suşu pozitif kontrol suşları olarak kullanılmıştır.

B U L G U L A R

Çalışmamızda 135 adet değişik klinik örnek mikolojik yönden incelenmiştir. Çeşitli morfolojik ve biyokimyasal testler uygulanarak suşlar türlerine ayrılmıştır. Türler ve örneklerle göre dağılımı Tablo 1'de verilmiştir.

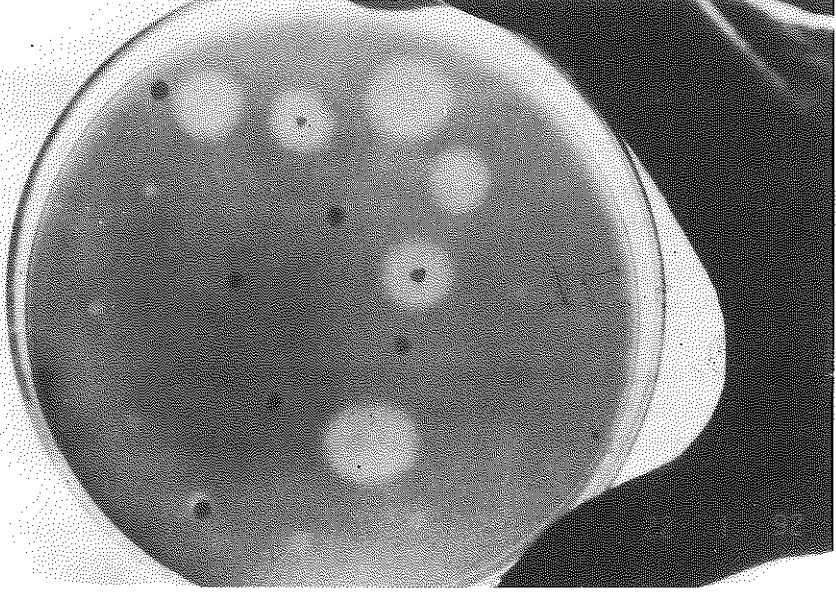
Tablo 1

İzole Edilen Kandida Türleri ve Örneklerle Göre Dağılımı

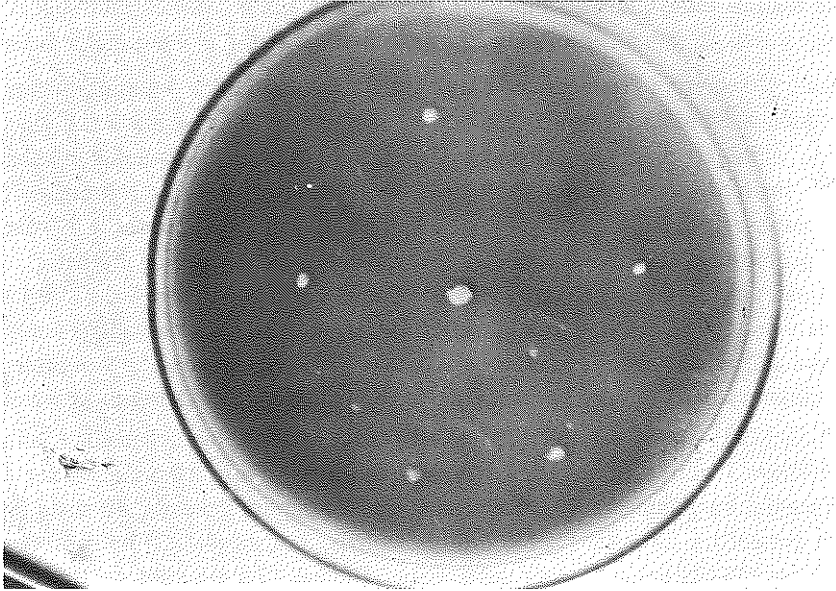
Örnek Cinsi	Vajen	İdrar	Boğaz	Balgam	Dışkı	Toplam
Örnek Sayısı	98	16	15	2	4	135
<i>C.albicans</i>	46	2	1	1	1	51
<i>C.tropicalis</i>	2	1	-	-	1	4
<i>C.krusei</i>	2	2	1	-	-	5
<i>C.parapsilosis</i>	2	-	-	-	-	2
<i>C.glabrata</i>	-	1	-	-	-	1
<i>C.pseudotrop.</i>	1	1	2	1	-	4
<i>C.stellatoidea</i>	3	2	1	-	-	6
Toplam	56	9	5	1	2	73

135 klinik örnekten izole edilen 73 adet maya suşundan 51 adet *C.albicans*, 6 adet *C.stellatoidea*, 5 adet *C.krusei*, 4 adet *C.tropicalis*, 4 adet *C.pseudotropicalis*, 2 adet *C.parapsilosis* 1 adet *C.glabrata* saptandı.

Kazein agarda proteinaz aktivitesi yönünden incelenmeye alınan *C.albicans* suşlarının % 49'unda proteinaz pozitif, % 51'inde proteinaz negatif sonuç elde edildi. Proteinaz pozitif ve negatif suşların kazein agardaki görünümleri Şekil 1 ve 2'de gösterilmektedir.



Şekil 1
Kazein agarda üreyen proteinaz pozitif *C.albicans* kolonileri çevresindeki zonların Amido-black boyası ile görünüşü.



Şekil 2
Proteinaz aktivitesi negatif *C.albicans* kolonilerinin Kazein Agarda görünümü.

T A R T I Ş M A

Bazı kandida türleri insanların mukoz membranlarında saprofit mikroorganizmalar olarak bulunur. Antibiyotik kullanımı, hormonal bozukluk, hastalık sonucu hücre sel bağışıklığın azalması, aşırı duyarlılık ve ilaç tedavisi gibi durumlarda, kandida'ların üremeleri artarak yüzeysel ve derin kandidiyazis'e neden olurlar (11, 16).

Son yıllarda kandida patogenezesinden sorumlu virulans faktörleri arasında, salgısal asit proteinazın önemli bir faktör olabileceği görüşü kesinlik kazanmaktadır (4).

Proteinaz enziminin, doku istilasında kandida hücrelerinin etrafında lokalize olduğu belirlenmiştir. Proteinaz defektli organizmaların, proteinaz içeren organizmalara göre farelerde daha az virulan oldukları ve kolay fagosite olabilecekleri bildirilmiştir. Enzimin etki mekanizması henüz kesin bilinmemekle birlikte, epitel dokuya, kandida hücrelerinin yapışmasını kolaylaştırdığı ve yayılmasını sağlayarak sitopatik etkiye yol açtığı düşünülmektedir. Ayrıca salgılanan proteinazın, fagositoza ve hücre içi öldürmeye direnç sağladığı gösterilmiştir (13, 17).

Kwon-chung ve ark (17), enzimatik yöntemle inceledikleri kandida suşlarında değişik zaman aralıklarında farklı oranlarda aktivite izlenmişlerdir. Kuştimur ve ark (18), kolorimetrik yöntemle inceledikleri kandida suşlarında değişik zaman aralıklarında proteinaz aktivitesi izlenmişler, en yüksek aktiviteyi 18 saatte tesbit etmişler ve bütün suşlarda değişen aktivitelerde proteolitik etki saptamışlardır. Negi ve ark (19), kandida'larda proteinaz aktivitesinin yüksek oranda bulunabileceğini ve önemli bir virulans faktörü olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca deri, tırnak, kornea gibi süperfisyal enfeksiyonlarda, keratinolitik proteinazın önemli rol oynadığını belirtmektedirler.

Staib (20), Serum Protein Agar Yöntemi ile pH: 5 ortamında 5 günlük inkübasyon periyodunda % 84 oranında proteolitik aktivite saptamıştır. Staib ve ark. (21), yine aynı yöntemle yaptıkları diğer bir çalışmada *C.albicans* suşlarında 10 günlük inkübasyon sonunda proteolitik aktiviteyi % 97 olarak tesbit etmişlerdir. Jorgenson (22), Auxanographic metoduyla, 65 *C.albicans* suşu kullanarak yaptığı çalışmada % 57 oranında pozitif proteolitik aktivite saptamıştır. Araştırmacı aynı yayında belirttiği diğer çalışmasında, Berum-Potein Agar metoduyla 62 adet kandida suşunun 24, 72 ve 120'nci saatlerdeki proteolitik aktivitelerini gözlemiştir. Üreme, presipitasyon ve lizis zonlarının genişliğini değerlendirmiştir. 24 saatte % 70 üreme, % 51 presipitasyon ve % 4 proteolizis zonu saptanmışken, 72. ve 120. saatlerde bu oranların giderek arttığını göstermiştir.

Rüchel (23), Bovin-Serum-Albumin Agar metodu ile yaptığı çalışmada *C.albicans* kolonilerinin 3 günde ürediğini ve proteinaz aktivitesinin 10 güne kadar takip edilebileceğini vurgulamıştır. 103 *C.albicans* suşu ile yaptığı deneyde, 48 suşta (% 47) kuvvetli proteolizis, 28 suşta (% 27) orta proteolizis, 3 suşta (% 1.3) hafif proteolizis, 24 suşta ise (% 23) negatif değer saptamıştır. Thomas (7), albumin ve Kazein agar kullanarak 6 kandida suşunda proteinaz aktivitesi göstermiştir. pH: 4.5 ve pH: 7 derecelerinde proteinaz aktivitesini gözlemiştir. pH: 4.5'da bütün suşlarda aktivite

saptanmasına rağmen, pH: 7'de aktivite saptanamamıştır. Ayrıca, araştırmacı, kütanoz invazyonlu hastalardan izole edilen C.albicans'ların hepsinde proteolitik aktivite gösterildiğini belirtmektedir.

Bizim çalışmamızda büyük çoğunluğu mukozal orijinli olan C.albicans'ların % 49'unda proteinaz aktivitesi saptandı.

Proteinaz enzim aktivitesi bilinen 2730 ve 8/008 kod nolu kontrol suşlarında Kazein agar yöntemi ile de aynı aktivite gösterildi. Çalışmamızda saptadığımız pozitif proteinaz aktivite yüzdesi, Röchel'in bulgusu ile uyumlu ise de diğer araştırmacıların bulgularıyla oldukça farklılık göstermektedir. Buna neden olarak uygulanan yöntemlerin farklılığı, inkübasyon süresi, ortamın pH derecesi, suşların yapılan pasaj sayısı ve etkenin izolasyon odağının farklı olması gösterilebilir.

Sonuç olarak, C.albicans proteinaz aktivitesinin özgül ve duyarlı bir patojenite kriteri olabileceğini, kaynak bilgilerine göre doğrularken Kazein Agar Yönteminin proteinaz aktivitesinin gösterilmesinde rutin uygulanabilecek bir metod olduğu kanısına varmış bulunmaktayız.

KAYNAKLAR

1. Tümbay E: Candida ve Enfeksiyonları. Türk Mik Cem Yayınları, Bilgehan basımevi, İzmir, 9-64, 1986.
2. Unat EK: Tıp Parazitolojisi, İnsanın ökaryonlu parazitleri ve bunlarla oluşan hastalıkları. İ Ü Cerrahpaşa Tıp Fak Yay, İstanbul, 695-770, 1982.
3. Mc.Donald F, Odds FC: Virulence for mice of proteinase secreting strain of Candida albicans and asit proteinase deficient mutant. J Gen Microbiol, 129: 431-438, 1983.
4. Odds FC: Commensalism and pathogenicity of yeast on skin. J Med Microbiol, 17 (3): 8-4, 1984.
5. Patrich KCH, et al: Chronic mucocutaneous Candidiasis. Model-Building in cellular immunity. An Intern Med, 74: 955-978, 1971.
6. Price MF, Cowsan RA: Phospholipase activity in Candida albicans. Sabouraudia. 15: 179-185, 1977.
7. Thomas LR, Candia DP: Comparative production and rapid purification of Candida acid proteinase from protein-supplemented cultures. Infect Immun, 52 (2): 508-514, 1990.
8. Remold H, Fasold H, Staib F: Purification and characterization of proteolytic enzyme from Candida albicans. Biochem-Biophys. Acta, 65 (812): 309-405, 1968.
9. McDonald F, Odds FC: Inducible proteinase of Candida albicans diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic Cadidiasis. J Med Microbiol, 13: 425-435, 1980.
10. Röchel R: Properties of a purified proteinase from the yeast Candida albicans. Biochem Biophys. Acta, 659: 99-113, 1981.
11. Röchel R, Tegeler R, Trast M: Comparison of secretory proteinase form different strains of Candida albicans. Sabouraudia, 20: 233-244, 1982.
12. Kuştımur S: Candida'larda proteinaz aktivitesinin virulans ile ilişkisi. Gazi Üni Tıp Fak Derg, 3 (1): 221-227, 1987.
13. Kuştımur S, Elnahi H, Altan N: Virulence of proteinase, positive and proteinase negative Candida albicans to mouse and killing of the yeast by normal human leukocytes, Candida and Candida mycosis. Edit by E. Tümbay, Plenum Press. Newyork, 259-266, 1991.
14. Evans EGV, Richardson MD: Medical Mycology. Ed. Machenzie WRD, Chapt. 10. Oxford Univer Press, London, pp. 201-233, 1989.

15. Rippon JW: Medical Mycology. Ph W.B. Saunders. Co. Mexico-City. pp. 490-525, 1982.
16. McDonald F, Odds FC: Purified *Candida albicans* proteinase in the serological diagnosis of systemic candidiosis. *Jama*, 243: 2409-2411, 1980.
17. Kwon-Chung KJ, Lehman D, Good C, Magee PT: Genetic evidence of role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun*, 3 (49): 571-576, 1985.
18. Kuştımur, S. Elnahi H: Klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinin patojenite testleri ile saptanması ve bunlarla asit proteinazın gösterilmesi. *Türk Mikr Cem Derg*, 21 (1): 64-69, 1991.
19. Negi M, Tsuboi R, Matsui T, Ogawa H: Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*. Substrate spesificity. *J Invest Dermatol*, 83: 32-36, 1984.
20. Staib F: Serum proteins as nitrogen source for yeast like fungi. *Sabouradia*, 4: 187-193, 1965.
21. Staib F, Grosse G, et al: Proteolysing *Candida albicans* strains in vitro in animal experiment. 2nd Inter Symp of Yeast Tokyo, 118-124, 1972.
22. Jorgenson BE: Proteolytic activity of *Candida albicans* supp. As related to the pathogenesis of denture stomatitis. *Sabouraudia*. 12: 266-271, 1971.
23. Röchel R: Avarety of *Candida* proteinase and their possible targets of proteolytic attack in the host. *Zb Bakte Hyg*, 257: 266-274, 1984.