

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN CANDIDA ALBICANS SUŞLARININ FOSFOLİPAZ, PROTEİNAZ VE HEMOLİTİK AKTİVİTELERİ

PHOSPHOLIPASE, PROTEINASE AND HEMOLYTIC ACTIVITIES OF CANDIDA ALBICANS ISOLATES OBTAINED FROM CLINICAL SPECIMENS

Gülgün YENİŞEHİRLİ¹, Yunus BULUT¹, Ebru TUNÇOĞLU¹

¹ Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tokat.
(gulguny@gop.edu.tr)

ÖZET

Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarının, fosfolipaz ve proteinaz enzim aktiviteleri ile hemolitik özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, kan (n= 29), solunum yolu (n= 44), idrar (n= 52), yara yeri (n= 17) ve gaita (n= 5) örneklerinden izole edilen ve *C. albicans* olarak tanımlanan 147 suş dahil edilmiştir. İzolatların %81'inde proteinaz, %76'sında fosfolipaz ve tümünde (%100) beta-hemolitik aktivite belirlenmiştir. Proteinaz ve fosfolipaz pozitifliği en fazla solunum yolundan izole edilen suşlarda gözlenmiştir. Solunum yolu (%93) ve kan (%83) izolatlarının proteinaz aktivitesi; idrar (%77; p= 0.032), yara yeri (%65; p= 0.007) ve gaita (%60; p= 0.026) izolatlarının proteinaz aktivitesi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir. Fosfolipaz enzim aktivitesi dikkate alındığında, solunum yolu izolatları (%84) ile yara yeri izolatları (%53) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuş (p= 0.014), diğer bölgelerden izole edilen suşlar arasında (kan: %79, idrar: %75, gaita: %80) istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (p> 0.05). Kandan izole edilen 4+ proteinaz aktivitesine sahip 2 izolat ve idrardan izole edilen 3+ proteinaz aktivitesi gösteren 3 izolat, fosfolipaz aktivitesi bakımından negatif bulunmuştur. Buna karşın, idrardan izole edilen 4+ fosfolipaz aktivitesi gösteren 1 izolatın ve 3+ fosfolipaz aktivitesi gösteren 4 izolatın, proteinaz aktivitesi bakımından negatif olduğu belirlenmiştir. Fosfolipaz ve proteinaz aktivitesi negatif olan gaitadan izole edilen bir suş ile yara yerinden izole edilen bir suş ise 4+ hemolitik aktivite göstermiştir. Sonuç olarak, *C. albicans*'ın virülans faktörleri olarak kabul edilen fosfolipaz ve proteinaz aktivitelerinin yanı sıra, hemolitik özelliklerinin de önem taşıdığı ve bu faktörlerin enfeksiyon oluşumundaki rollerinin belirlenmesi için daha ileri klinik çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Candida albicans*, proteinaz, fosfolipaz, hemolitik aktivite.

ABSTRACT

This study was aimed to determine the phospholipase, proteinase and hemolytic activities of *Candida albicans* strains isolated from clinical specimens. A total of 147 *C. albicans* strains isolated from blood

(n= 29), respiratory specimens (n= 44), urine (n= 52), pus (n= 17) and stool (n= 5) were included in the study. Proteinase and phospholipase activities were determined in 81% and 76% of *C. albicans* isolates, respectively. All *C. albicans* isolates revealed beta-hemolytic activity on Sabouraud dextrose agar supplemented with 7% fresh sheep blood and 3% glucose. Phospholipase and proteinase positivity were highest among the respiratory isolates. Proteinase activity of respiratory (93%) and blood (83%) isolates were statistically significantly higher than that of urine (77%; $p= 0.032$), pus (65%; $p= 0.007$) and stool isolates (60%; $p= 0.026$). While phospholipase activity showed statistically significant difference between respiratory (84%) and pus (53%) isolates ($p= 0.014$), no statistically significant difference was determined for blood (79%), urine (75%) and stool (80%) isolates ($p> 0.05$). Two blood isolates with 4+ proteinase activity and 3 urine isolates with 3+ proteinase activity were phospholipase negative. One urine isolate with 4+ phospholipase activity and 4 with 3+ phospholipase activity were proteinase negative. Phospholipase and proteinase negative 1 isolate from stool and 1 isolate from pus were found to have 4+ hemolytic activity. In conclusion, besides proteinase and phospholipase enzyme activities, hemolytic activity may play an important role for the *C. albicans* infections. The pathogenetic role of these virulence factors should be evaluated by further clinical studies.

Key words: *Candida albicans*, proteinase, phospholipase, hemolytic activity.

GİRİŞ

Son yıllarda tüm dünyada fungal enfeksiyonların görülüş sıklığı belirgin olarak artmıştır. Bu enfeksiyonların büyük çoğunluğundan *Candida* türleri, özellikle *Candida albicans*, sorumludur¹. *C. albicans*'ın virülans faktörlerini aydınlatmak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır²⁻⁵. Günümüzde; fenotipik değişiklik, konak dokuya yapışma, toksinler ve enzimler virülans faktörleri olarak kabul edilmektedir²⁻⁹. *C. albicans*'ın salgıladığı hidrolitik enzimlerin, konak dokuda oluşan doku yıkımına ve mantarın konak dokuya invazyonuna katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu enzimlerden aspartil proteinaz ve fosfolipazın *C. albicans*'ın virülansından önemli derecede sorumlu olduğu gösterilmiştir^{4-6,9-11}.

Bilindiği gibi, patojenik mikroorganizmaların, hayatta kalabilmeleri ve enfeksiyon oluşturabilmeleri için elementer demire ihtiyaçları vardır¹². İnsan vücudunda serbest demir olmadığı için, patojen mikroorganizmalar demir ihtiyacını genellikle demir içeren bileşikler (hemoglobinin gibi) parçalayarak indirekt yolla sağlamaktadır¹³. *C. albicans*'ın hemoliz özelliğinin, demir kaynağı olarak hemoglobinin kullanılmasına olanak sağlayan diğer bir virülans faktörü olduğu düşünülmektedir^{14,15}.

Bu çalışma, çeşitli örneklerden izole edilen *C. albicans* suşlarının hemolitik aktivitesi ile fosfolipaz ve proteinaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve *C. albicans* olarak tanımlanan 147 suş alındı. *C. albicans* tanısı, jerm tüp testi, mısır unlu Tween 80 içeren besiyerinde klamidospore oluşumu ve API 20C AUX ticari kiti (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) kullanılarak yapıldı. Suşlar, çalışılınca kadar -70°C'de, %20 gliserol içeren stok besiyerinde saklandı.

İzolatların fosfolipaz aktivitelerini belirlemek için, Price ve arkadaşları¹⁶ tarafından tanımlanan yöntem modifiye edilerek uygulandı. Kısaca; 1 M NaCl, 5 mM CaCl₂ ve %8 steril yumurta sarısı (Oxoid, İngiltere) eklenen "sabouraud dextroz agar (SDA; Oxoid, İngiltere)" plaklarına, steril tuzlu suda 10⁵ koloni oluşturan birim/ml *C.albicans* olacak şekilde hazırlanan maya süspansiyonundan 10 µl inoküle edildi. Plaklar 37°C'de 4 gün boyunca inkübe edildi. Koloni çapı ve koloni çapı ile presipitasyon zonunun çapının toplamı ölçüldü. Her izolat 2 kez test edildi. *C.albicans* ATCC 10231 kontrol suşu olarak kullanıldı. Fosfolipaz aktivitesi; koloni çapı ile presipitasyon çapının toplamının koloni çapına oranı ile belirlendi ve Pz değeri olarak ifade edildi. Pz değeri 1.0 ise negatif; 0.9-1 ise 1+; 0.89-0.8 ise 2+; 0.79-0.7 ise 3+ ve < 0.69 ise 4+ olarak değerlendirildi.

C.albicans izolatlarının proteinaz aktiviteleri, %1.7 maya karbon bazı (Difco, Becton Dickinson & Company Sparks, ABD), %0.01 maya ekstresi (Difco, Becton Dickinson & Company Sparks, ABD) ve %0.2 sığır serum albumini (Amresco, ABD) içeren bovine serum albumin (BSA) agarda değerlendirildi¹⁷. YEPD (maya özütü, pepton, dekstrozu) buyyonda 30°C'de 4 saat inkübe edilen *C.albicans* izolatları, 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlandı. Hazırlanan maya süspansiyonuna yaklaşık 6 mm çapında büyüklük oluşturacak şekilde BSA agar üzerine damlatıldı. Her plağa en fazla 4 maya için inokülasyon yapıldı. Plaklar 28°C'de 7 gün inkübe edildi. Proteinaz aktivitesi Rüşel ve arkadaşlarının¹⁸ tarif ettiği gibi "amido black" uygulanarak görünür hale getirildi. Her izolat 2 kez test edildi. *C.albicans* ATCC 10231 kontrol suşu olarak kullanıldı. Proteinaz aktivitesi; koloni çapı ile koloni etrafında oluşan şeffaf zon çapının toplamının koloni çapına oranı ile belirlendi ve Prz değeri olarak ifade edildi. Prz değeri 1.0 ise negatif; 0.9-1 ise 1+; 0.89-0.8 ise 2+; 0.79-0.7 ise 3+ ve < 0.69 ise 4+ olarak değerlendirildi.

C.albicans izolatlarının hemolitik aktivitesi, Luo ve arkadaşlarının¹⁵ tarif ettiği yöntemle belirlendi. SDA'ya ekilen *C.albicans* izolatları 37°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra, steril serum fizyolojik içinde 1 x 10⁸ hücre/ml olacak şekilde süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyondan 10 µl alınarak, içeriğinde %3 glikoz ve %7 koyun kanı bulunan SDA'ya damlatıldı. Plaklar %5 CO₂ varlığında 37°C'de 48 saat inkübe edildi. İnokulum bölgesi etrafında oluşan belirgin şeffaf zon pozitif hemolitik aktivite olarak kabul edildi. Hemolitik aktivite; koloni çapı ile şeffaf zonun toplamının koloni çapına oranı ile belirlendi ve Hz olarak ifade edildi. Hz değeri 1.0 ise negatif; 0.9-1 ise 1+; 0.89-0.8 ise 2+; 0.79-0.7 ise 3+ ve < 0.69 ise 4+ olarak değerlendirildi.

İstatistiksel analiz iki yüzde arasındaki farkın önemlilik testi kullanılarak yapıldı. p değerinin < 0.05 olması anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 147 *C.albicans* izolatının %81'inde proteinaz ve %76'sında fosfolipaz aktivitesi belirlenmiştir. *C.albicans* izolatlarının izole edildikleri bölgelere göre proteinaz ve fosfolipaz aktivitelerinin dağılımı Tablo I'de gösterilmiştir. Proteinaz ve fosfolipaz pozitifliği en fazla solunum yolundan izole edilen suşlarda gözlenmiştir. Kan ve solunum yolundan izole edilen suşların proteinaz aktivitesi; idrar (p= 0.032), yara yeri (p= 0.007)

Tablo 1. *Candida albicans* Suşlarının İzole Edildikleri Bölgelere Göre Proteinaz, Fosfolipaz ve Hemolitik Aktiviteleri

Aktivite		İzolasyon bölgesi				
		Kan (n= 29)	Solunum yolu (n= 44)	İdrar (n= 52)	Yara yeri (n= 17)	Gaita (n= 5)
Proteinaz	1+	10	6	12	1	2
	2+	9	22	19	4	1
	3+	3	12	9	5	-
	4+	2	1	-	1	-
	Toplam (%)	24 (83)	41 (93)	40 (77)	11 (65)	3 (60)
Fosfolipaz	1+	3	8	15	4	2
	2+	7	15	15	2	2
	3+	6	12	8	2	-
	4+	7	2	1	1	-
	Toplam (%)	23 (79)	37 (84)	39 (75)	9 (53)	4 (80)
Beta-hemoliz	1+	1	3	2	3	-
	2+	8	17	19	6	2
	3+	12	17	22	7	2
	4+	8	7	9	1	1
	Toplam (%)	29 (100)	44 (100)	52 (100)	17 (100)	5 (100)

ve gaita ($p= 0.026$) izolatlarının proteinaz aktivitesi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir. Fosfolipaz enzim aktivitesi dikkate alındığında, solunum yolu izolatları ile yara yeri izolatları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuş ($p= 0.014$), diğer bölgelerden izole edilen suşlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p> 0.05$).

Kandan izole edilen 4+ proteinaz aktivitesine sahip 2 izolat ve idrardan izole edilen 3+ proteinaz aktivitesi gösteren 3 izolat, fosfolipaz aktivitesi bakımından negatif bulunmuştur. Diğer yandan; idrardan izole edilen 4+ fosfolipaz aktivitesi gösteren 1 izolatın ve 3+ fosfolipaz aktivitesi gösteren 4 izolatın, proteinaz aktivitesi bakımından negatif olduğu belirlenmiştir. İzolatların tümünde beta-hemolitik aktivite izlenmiştir (Tablo 1).

TARTIŞMA

C. albicans'ın patojenitesi, virülans faktörlerine ve konağın bu faktörlere karşı oluşturduğu immün yanıtı bağlıdır¹⁹. Özellikle proteinaz ve fosfolipaz enzimlerinin *C. albicans*'ın virülansında önemli rol oynadığı bildirilmektedir²⁻¹¹. Bernardis ve arkadaşlarının⁴ çalışmasında, *C. albicans*'ın proteinaz üretiminin sadece suşun ve enfeksiyonun tipine değil, çevresel şartlara ve enfeksiyonun evresine de bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Bizim çalışmamızda, *C. albicans* izolatlarının %81'inin proteinaz aktivitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Ülkemizden ve yurt dışından yapılan çeşitli çalışmalarda *C. albicans* suşlarında proteinaz aktivitesini; Basu ve arkadaşları²⁰ %66.6, Fotedar ve Al-Hedaithy²¹ %100, Kantarcıoğlu ve Yücel² %95, Kumar ve arkadaşları³ %94.1, Borst ve Fluit⁵ %95, Öksüz ve arkadaşları²²

%56.7 olarak bildirmişlerdir. Gökçe ve arkadaşları²³ kan kültürlerinden izole ettikleri *C.albicans* suşlarının %89.7'sinin proteinaz aktivitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda, kan kültürlerinden izole edilen suşların %83'ü proteinaz aktivitesine sahip bulunurken, en yüksek proteinaz aktivitesinin solunum yolundan izole edilen suşlarda (%93) saptandığı izlenmiştir. Bu suşların proteinaz aktivitesi; idrar, yara yeri ve gaita izolatlarının proteinaz aktivitesinden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Benzer şekilde Borst ve Fluit⁵ solunum yolundan izole edilen *C.albicans* izolatlarının idrar yolu ve yara örneklerinden izole edilenlere göre daha yüksek miktarda proteinaz ürettiklerini bildirmişlerdir. Kan ve solunum yolu izolatları arasında ise proteinaz aktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Fotedar ve Al-Hedaihy²¹, kan izolatlarının %88'inde, solunum yolu izolatlarının %80'inde proteinaz aktivitesinin 2+ ve üzeri olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda da solunum yolu izolatlarının %85.3'ü 2+ ve üzerinde proteinaz aktivitesi göstermiştir.

Bu çalışmada *C.albicans* izolatlarının %76'sında fosfolipaz aktivitesi belirlenmiştir. Birinci ve arkadaşlarının²⁴ 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada, kandan izole edilen suşlarda fosfolipaz aktivitesinin diğer bölgelerden izole edilen suşlara göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Price ve arkadaşları¹⁶, *C.albicans* izolatlarının fosfolipaz aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında, kan izolatlarının %55'inde, yara izolatlarının %50'sinde ve idrar izolatlarının %30'unda fosfolipaz aktivitesi saptamışlardır. Borst ve Fluit⁵, yaptıkları benzer bir araştırmada, kan izolatlarının %71'inde, idrar izolatlarının %72'sinde ve yara izolatlarının %29'unda fosfolipaz aktivitesi varlığı bulmuşlardır. Aynı çalışmada, fosfolipaz enzim aktivitesinin en fazla solunum yolundan izole edilen *C.albicans* suşlarında (%87) gözlemlendiği ve bu izolatların %61'inin 2+ ve üzeri değerlerde fosfolipaz ürettikleri bildirilmiştir⁵. Bizim çalışmamızda, solunum yolundan izole edilen suşların %84'ünün fosfolipaz enzim aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca bu suşların %66'sı, 2+ ve üzeri değerlerde fosfolipaz üretmektedir. Solunum yolu izolatlarının fosfolipaz enzim aktivitesinin, yara yeri izolatlarına (%53) göre anlamlı olarak yüksek olduğu ($p < 0.05$), ancak diğer bölgelerden izole edilen suşlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı izlenmiştir ($p > 0.05$). Çalışmamızda ayrıca; kandan izole edilen ve 4+ proteinaz aktivitesi gösteren 2 izolat ile idrardan izole edilen 3+ proteinaz aktivitesi gösteren 3 izolatın fosfolipaz aktivitesi göstermediği saptanmıştır. Bunun yanı sıra, yüksek fosfolipaz aktivitesi (3+ ve 4+) gösteren 5 idrar izolatı proteinaz aktivitesi yönünden negatif bulunmuştur. Benzer şekilde, Basu ve arkadaşları²¹ da raporlarında, 4 proteinaz negatif *C.albicans* suşunun fosfolipaz pozitif ve 11 fosfolipaz negatif suşun proteinaz pozitif bulunduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, tüm *C.albicans* suşlarının beta-hemolitik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Luo ve arkadaşları¹⁵, 14 *Candida* spp. izolatının in vitro hemolitik aktivitelerini inceledikleri çalışmalarında *C.albicans* suşlarının beta-hemoliz yaptıklarını rapor etmişlerdir. Watanabe ve arkadaşları²⁵ *C.albicans*'ın beta-hemoliz oluşturmamasının, hücre duvarında bulunan mannoproteinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Luo ve arkadaşları¹⁵, tüm *Candida* türlerinin hücre duvarında mannoprotein bulunmasına rağmen, hemolitik aktivitelerini inceledikleri 14 *Candida* türünden 6'sının beta-hemoliz yapmadığını bildirmiş-

lerdir. Araştırmacılar bu durumun, *Candida* türleri arasında hücre duvarı mannoprotein içeriğinin farklı olmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir¹⁶. Çalışmamızda ayrıca, hem fosfolipaz hem de proteinaz aktivitesi negatif olan bir gaita ve bir yara izolatının 4+ hemolitik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, *C. albicans*'ın önemli virülans faktörleri olarak kabul edilen proteinaz ve fosfolipaz enzimlerinin yanı sıra, beta-hemoliz yapabilme yeteneğinin de patogeneizde rol oynayabileceği düşüncesine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Pfaller M, Wenzel R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990s. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11: 287-91.
2. Kantarcıoğlu AS, Yücel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 2002; 45: 160-5.
3. Kumar CP, Kumar SS, Menon T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia* 2006; 161: 213-8.
4. De Bernardis F, Sullivan PA, Cassone A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med Mycol* 2001; 39: 303-13.
5. Borst A, Fluit A. High levels of hydrolytic enzymes secreted by *Candida albicans* isolates involved in respiratory infections. *J Med Microbiol* 2003; 52: 971-4.
6. Banno Y, Yamada T, Nozawa Y. Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*, separation of three enzymes and some biological properties. *Sabouraudia* 1985; 23: 47-54.
7. Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases *Curr Top Med Mycol* 1996; 1: 55-69.
8. Calderone RA, Fonzi VA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 327-35.
9. Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 1991; 45: 187-218.
10. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 122-43.
11. Ibrahim AS, Mirbod F, Filler GS, et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995; 63: 1993-8.
12. Bullen JJ. The significance of iron in infection. *Rev Infect Dis* 1981; 3: 1127-38.
13. Belanger M, Begin C, Jacques M. Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin. *Infect Immun* 1995; 63: 656-62.
14. Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. *Infect Immun* 1994; 62: 5154-6.
15. Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2971-4.
16. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; 20: 7-14.
17. Cassone A, De Bernardis F, Mondello F, Ceddia T, Agatensi L. Evidence for a correlation between proteinase secretion and vulvovaginal candidosis. *J Infect Dis* 1987; 156: 777-83.
18. Ruchel R, Tegeler R, Trost M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; 20: 233-44.
19. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* 2005; 48: 365-77.
20. Basu S, Guignani HC, Joshi S, Gupta N. Distribution of *Candida* species in different clinical sources in Delhi, India, and proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20: 137-40.
21. Fotadar R, Al-Hedaithy SSA. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C. dubliniensis*. *Mycoses* 2005; 48: 62-7.

22. 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.
23. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia* 2007; 164: 265-9.
24. Birinci A, Cihan CC, Bilgin K, Acuner C, Durupinar B. Phospholipase activity of *Candida* species isolated from different clinical samples. *Mikrobiyol Bul* 2005; 39: 205-9.
25. Watanabe T, Takano M, Murakami M, et al. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. *Microbiology* 1999; 145: 689-94.