

CANDIDA PARAPSILOSIS KLİNİK İZOLATLARININ MORFOTİPLENDİRİLMESİ, GENOTİPLENDİRİLMESİ VE FARKLI MORFOTİPLERDE BAZI VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI*

MORPHOTYPING, GENOTYPING AND INVESTIGATION OF SOME VIRULENCE FACTORS IN DIFFERENT MORPHOTYPES OF CANDIDA PARAPSILOSIS CLINICAL ISOLATES

Volkan AKYOL¹, Nilgün ÇERİKÇİOĞLU¹

¹ Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul. (nilguncerik@yahoo.com)

ÖZET

Son yıllarda tüm dünyada *Candida parapsilosis*'e bağlı sistemik kandidiyaz olgularının görülme sıklığında artış vardır. Ancak bu enfeksiyonların epidemiyolojik değerlendirilmesi için belirlenmiş standart bir genotiplendirme yöntemi bulunmamaktadır. Bu çalışmada, morfo-*tip*lendirmenin *C. parapsilosis* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde, genotiplendirmenin yerine kullanılabilirliği ve belirli morfo-*tip*lerde olası virülans faktörlerinin [fosfolipaz, esteraz, asit proteinaz, sıvıslık örtü (slime) üretimi ve hidrofobisite] belirlenmesi amaçlanmıştır. Buna yönelik olarak Marmara Üniversitesi Hastanesinde yatan hastaların kan (n= 40) ve idrar (n= 13) kültürlerinden izole edilen 53 *C. parapsilosis* suşunun Sabouraud-trifeniltetrazolyum agar-da (STTZ) yüzey ve renk özellikleri, malt özütü agarda (MA) ise yüzey özellikleri dikkate alınarak morfo-*tip*lendirmeleri yapılmış ve 10 farklı alt grup elde edilmiştir. İzolatların genotiplendirmesi için RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) yöntemi kullanılmış ve %90.6'sı tip II olmak üzere üç farklı genotip elde edilmiştir. Yumurta sarılı (pH: 4.2) besiyerinde yapılan deneylerin sonucunda hiçbir izolatta fosfolipaz üretimi saptanmamıştır. Tween-80'li agarda incelenen esteraz aktivitesi de, bir izolat dışında olumsuz olarak bulunmuştur. Salgisal asit proteinaz aktivitesinin saptanması amacıyla sıgır serum albumini içeren (pH: 5.0) besiyeri kullanılmış ve suşların 40 (%75.4)'ında orta düzey pozitiflik (+), 7 (%13.2)'sinde ise kuvvetli pozitiflik (++) saptanırken, 6 (%11.3)'sı negatif sonuç vermiştir. Glukoz (%8) içeren Sabouraud buyyon (SB) kullanılarak sıvıslık örtü üretimi değerlendirildiğinde, suşların %67.9'u negatif bulunmuş; %20.7'si zayıf (+), %7.5'i orta düzeyde (++) ve %3.7'si kuvvetli (+++) pozitif aktivite göstermiştir. Hekzadekanlı hidrokarbon aderens yöntemi ile izolatların yüzey hidrofobisite özellikleri araştırıldığında ise bir izolat az, diğerleri orta düzeyde hidrofobik olarak bulunmuştur. Elde edilen veriler kıyaslandığında morfo-*tip*lendirmenin genotiplendirmeye göre üstünlüğü belirlenememiştir. Ek olarak virülans faktörleri açısından da belirli bir morfo-*tip*le bağlantı kurulabilecek bir özellik saptanmamıştır.

Anahtar sözcükler: *Candida parapsilosis*, virülans, morfo-*tip*lendirme, genotiplendirme.

* Bu yüksek lisans tez çalışması, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyon Başkanlığı (BAPKO) tarafından 14.03.2005 tarih ve SAĞLIK-088 no. ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

In recent years there is an increase in frequency of systemic candidiasis cases caused by *Candida parapsilosis*. However there isn't any standardized genotyping method to be used in epidemiology of those infections. In this study we aimed to determine utility of morphotyping instead of genotyping to study the epidemiology of 53 *C.parapsilosis* strains isolated from blood (n= 40) and urine (n= 13) cultures of inpatients at Marmara University Hospital, Istanbul, Turkey. The isolates were morphotyped according to their surface and color properties on Sabouraud-triphenyltetrazolium agar (STTZ) and surface characteristics on malt extract agar (MA) media and 10 different subgroups were obtained. In order to genotype the strains, RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) method was used and three different genotypes were obtained comprising mostly type II (90.6%). One of the putative virulence factors investigated in the isolates was phospholipase activity. Phospholipase production was not detected in any of the strains on egg-yolk agar (pH: 4.2). Esterase activity of the strains on Tween-80 agar was negative except for one. In order to observe acid proteinase activity, bovine serum albumin containing (pH: 5.0) agar was used and in 11.3% of the strains no acid proteinase activity was seen while in 75.5% moderate (+), in 13.2% strong (++) activity was detected. Slime production was investigated in 8% glucose containing Sabouraud broth (SB) medium and 67.9 % of the strains were found to be negative; while 20.7% were weakly (+), 7.5% were moderately (++) and 3.7% were strongly (+++) positive. Hydrophobicity of the strains was evaluated by using hexadecane hydrocarbon adherence assay and one isolate was weakly hydrophobic while the remaining strains were found to be moderately hydrophobic. We could not observe superiority of morphotyping over genotyping. Additionally no property was found to associate with a certain morphotype, in terms of virulence factors.

Key words: *Candida parapsilosis*, virulence, morphotyping, genotyping.

GİRİŞ

Son yirmi yılda mantar enfeksiyonlarının prevalansındaki artışın yanı sıra, etken olarak izole edilen mantarların çeşitliliğinde de artış görülmektedir. Halen başta *Candida albicans* olmak üzere, çeşitli *Candida* türleri tıbbi önemleri ile en ön sırada yer almaktadır. *Albicans* dışı türler arasında *Candida parapsilosis*, özellikle fungemilerden artan sıklıkta izole edilmektedir^{1,2}. *Candida* enfeksiyonlarının gerek patogenezi gerekse epidemiyolojisini araştırmak amacıyla yapılan çalışmaların çoğu *C.albicans* üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak her iki yönden de *C.parapsilosis* ile yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır ve özellikle bu organizmaya bağlı enfeksiyonların epidemiyolojisinde başvurulacak herhangi bir genotiplendirme yöntemi belirlenmemiştir.

Bu çalışmada birinci amaç, idrar ve kan kültürlerinden izole edilen *C.parapsilosis* suşlarının çeşitli besiyerlerinde morfotiplendirmesi ve RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction) yöntemi ile genotiplendirmesiyle olası alt grupların belirlenmesine dayanarak, daha kolay ve ucuz olan morfotiplendirmenin epidemiyolojik araştırmalarda kullanılabilirliğinin saptanmasıdır. İkinci amaç ise, fosfolipaz, asit proteinaz, sıvıslık örtü (slime) üretimi ve hidrofobisiteyi içeren virülans faktörleri ile belirli morfotipler ve genotipler arasındaki olası bağlantıların araştırılması ve *C.parapsilosis*'e bağlı enfeksiyonların patogenezi hakkında öngörü sağlayacak verilerin elde edilmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar

Bu retrospektif çalışmada, Marmara Üniversitesi Hastanesinde 2000-2004 yılları arasında farklı servislerde yatan hastaların kan (n= 40) ve idrar (n= 13) örneklerinden Sabouraud dekstroz agar (SDA)'da izole edilen ve germ tüp üretimi, mısır-unlu Tween 80'li besiyerindeki morfolojik özellikleri ve ID32C (bio Meriéux, Fransa) kiti ile sergiledikleri asimilasyon profillerine göre *C.parapsilosis* olarak tanımlanan maya suşları virülans faktörleri açısından incelendi³.

Referans suşlar olarak; salgısal asit proteinaz üreten *C.albicans* CBS 2730 (Reinhard Rühell, Almanya), fosfolipaz üreten *C.albicans* SC5314 (Ghannoum M, ABD) ve sıvıışık örtü üreten *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (RP62A) kullanıldı.

Virülans Faktörlerinin İncelenmesi

Salgısal asit proteinaz (SAP) varlığının araştırılmasında, %1'lik sığır serum albumini (Fraksiyon V, Sigma) içeren, pH: 5.0 olarak ayarlanan besiyeri kullanıldı. Deney ve sonuçların irdelenmesi önceden belirtildiği gibi yapıldı⁴.

Fosfolipaz araştırılmasında, yumurta sarısı içeren ve pH: 4.2 olarak ayarlanan besiyeri kullanıldı. Deney ve sonuçların irdelenmesi önceden belirtildiği gibi yapıldı^{5,6}.

Esteraz araştırılmasında, Tween 80 içeren ve pH: 6.8 olarak ayarlanan besiyeri kullanıldı. Deney ve sonuçların irdelenmesi önceden belirtildiği gibi yapıldı^{5,7-9}.

Sıvıışık örtü (slime) üretiminin araştırılmasında, modifiye tüp aderens yöntemi kullanıldı. Deney ve sonuçların irdelenmesi önceden belirtildiği gibi yapıldı^{6,10-13}.

Yüzey Hidrofobisitesinin Ölçülmesi

İzolaların yüzey hidrofobisitesi "hidrokarbon aderens" yöntemi uygulanarak belirlendi^{6,14-16}. Kısaca, kolonilerden bir öze dolusu Sabouraud glukoz buyyon (SGB)'a ekildi ve 37°C'de 14 saat inkübe edildi. Sıvı kültürden alınan örnek yeniden taze SGB'ye ekildi ve çalkalayıcı etüvde 1200 rpm'de inkübasyonu takiben 4°C'de 5 dakika 1500xg'de santrifüj edildi. Dibe çöken mayalar soğuk PUM tamponu (KH₂PO₄, üre, MgSO₄, distile su, pH: 7.2) ile yıkandı ve tekrar PUM ile sulandırılarak spektrofotometrede 600 nm'de 0.400 (± 0.100) absorbansta süspanse edildi. İki ayrı tüpe ayrılan süspansiyondan birine n-hekzadekan eklendi; diğeri kontrol olarak kullanıldı. 37°C su banyosunda inkübasyonu takiben test tüpünde iki fazın ayrılması gözlemlendi. Altteki sıvı fazın 660 nm'de absorbanı ölçüldü ve kontrol tüpündeki sonuçla karşılaştırıldı. Test her bir suş için gün içinde üç kez ve ardışık iki gün uygulandı. Her bir deneyden elde edilen 6 absorban değerin ortalaması alınıp; % A 660= [(A 660 kontrol-A660 test)/(A660 kontrol)] X 100 formülüne göre yüzde absorban değeri hesaplandı. A değeri %0-20 ise düşük, %20-80 ise orta ve %80-100 ise yüksek hidrofobik olarak değerlendirildi.

İzolatların Morfotiplendirilmesi

Bu amaçla malt özlü agar (MA) ve Sabouraud-trifeniltetrazolyum klorür agar (STTZ) besiyerleri kullanıldı. MA'da kolonilerin yüzey özellikleri, STTZ'de ise trifeniltetrazolyum klorürün farklı potansiyellerde indirgenmesine bağlı olarak oluşan değişik koloni renkleri ve yüzey özellikleri değerlendirilerek suşların morfotiplendirilmeleri yapıldı¹⁷⁻²².

İzolatların Genotiplendirilmesi

DNA ekstraksiyonu, ticari bir DNA ekstraksiyon kiti (NucleoSpin, Macherey/ Nagel, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. İşlem öncesinde "Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD)" buyyonda maya süspansiyonu hazırlandı (600 nm, 10 absorbans). 5000xg'de 10 dakika santrifüj edilip, 1 ml 10 mM EDTA (pH: 8.0) ile yıkandı ve tekrar santrifüj edildi. Çözeltiye 600 µl sorbitol tampon ve 100 U litikaz eklendi ve 30°C'de 30 dakika inkübe edilerek sferoplast oluşumu sağlandı. Karışım 2000xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve bundan sonraki işlemler üretici firmanın talimatına uygun olarak yürütüldü.

RAPD-PCR yönteminde, her bir test suşu için toplam 50 µl'lik reaksiyon karışımı [25 µl 2x PCR master miks, 5 µl (50 pM) GGA7 (5'GGAGGAGG AGGAGGAGGAGGA3') primer, 15 µl DNAz ve RNAz'dan arındırılmış su ve 5 µl DNA lizati] hazırlandı. Karışım, termal döngü cihazında (Techne, Progene, İngiltere) 3 dakika, 95°C; 45 döngü (1 dakika 95°C, 1 dakika 30°C, 1.5 dakika 74°C); ve 10 dakika 74°C uzatma ısı döngüsü uygulanarak GGA primerine özgül DNA bölgeleri çoğaltıldı²⁰. PCR ürünleri elektrofores ile 1 µg/ml etidyum bromür içeren %2'lik agaroz jelde 90 Volt'ta, 45 dakika yürütülüp, UV altında bantların sayısı ve büyüklükleri görüntülendi (Vilber Lourmat, TFX-20.M, Fransa).

BULGULAR

Çalışmada, yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilmiş ve *C.parapsilosis* olarak tanımlanıp stoklanmış 53 suş kullanılmıştır. İzolatların klinik örneklerle ve servislere göre dağılımı Tablo I'de gösterilmiştir.

SAP aktivitesi; suşların 40 (%75.4)'unda orta düzey pozitif (+), 7 (%13.2)'sinde ise kuvvetli pozitif (++) olarak saptanırken, 6 (%11.3)'sında negatif olarak bulunmuştur. SAP aktivitesinin, kan izolatlarının %80 (32/40)'inde orta düzey, %7.5 (3/40)'inde kuvvetli pozitif olduğu izlenmiştir. Bu oranlar idrardan izole edilen suşlar için sırasıyla; %61.5

Tablo I. *Candida parapsilosis* İzolatlarının Servislere ve Klinik Örneklerle Göre Dağılımı

Servis	Kan (%)	İdrar (%)	Toplam (%)
Yoğun bakım ünitesi	11	2	13 (24.5)
Pediyatri	12	2	14 (26.4)
Diğer servislere	17	9	26 (49.1)
Toplam	40 (75.4)	13 (24.6)	53 (100)

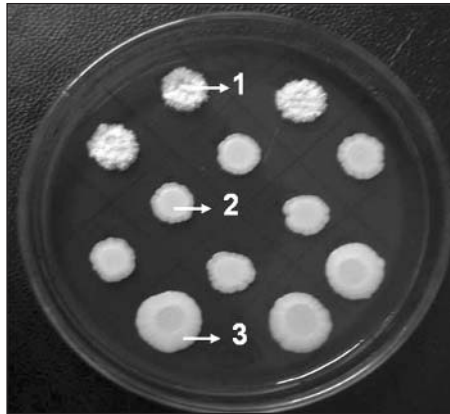
(8/13) ve %30.7 (4/13) olarak belirlenmiştir. İzolatların hiçbirisinde fosfolipaz aktivitesi saptanmamış; esteraz aktivitesi ise yalnızca 1 idrar izolatında (%1.8) tespit edilmiştir.

Sıvı sıkı örtü üretimi; suşların 11 (%20.7)'inde zayıf (+), 4 (%7.5)'ünde orta düzeyde (++) , 2 (%3.7)'sinde ise kuvvetli (+++) olarak saptanmış, 36 (%67.9) suşun "slime" üretmediği görülmüştür. "Slime" pozitifliğinin, kan izolatlarının %15 (6/40)'inde zayıf, %10 (4/40)'unda orta düzeyde; idrar izolatlarının ise %38.4 (5/13)'ünde zayıf, %15.3 (2/13)'ünde kuvvetli düzeyde olduğu belirlenmiştir.

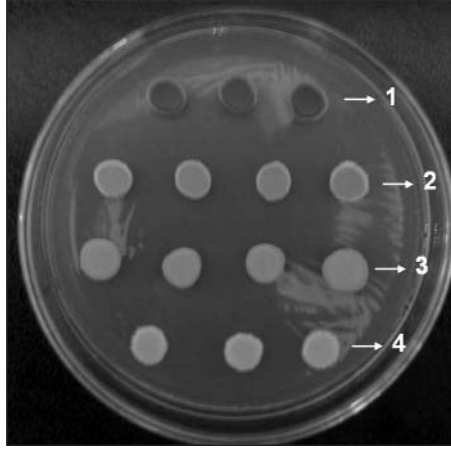
Suşların hidrofobisiteri değerlendirildiğinde; 39'u kan ve 13'ü idrar izolatu olmak üzere toplam 52 (%98.1)'sinin orta hidrofobik (A= %20-80); kandan izole edilen 1 (%1.9) suşun ise düşük hidrofobik (A= %0-20) olduğu görülmüştür.

Çalışmaya alınan 53 *C.parapsilosis* suşu içinde 40 kan izolatinin 30 (%75)'unda MA besiyerinde düzgün (D), 2 (%5)'sinde buruşuk (B), 8 (%20)'inde ışınal çizgili koloni (Ç) saptanırken; 13 idrar izolatinin hepsinde yalnızca D morfolotipi belirlenmiştir. Dolayısıyla toplam 43 (%81.1) suşun D, 2 (%3.7) suşun B ve 8 (%15.1) suşun Ç morfolotipine sahip olduğu görülmüştür (Resim 1). Buna karşın STTZ besiyerinde, 40 kan izolatinin hepsinin (%100) düzgün (d), 29 (%72.5)'unun koyu mor (M2), 4 (%10)'ünün açık mor (M1), 2 (%5)'sinin koyu pembe (P2) ve 5 (%12.5)'inin açık pembe (P1) morfolotipte olduğu saptanmıştır (Resim 2). İdrar izolatları dikkate alındığında; hepsinde (13/13; %100) d, %76.9 (10/13)'unda M2, %15.4 (2/13)'ünde M1, ve %7.7 (1/13)'sinde P1 morfolotipi belirlenmiştir. Dolayısıyla 53 izolatin hepsinin d, 39 (%73.6)'unun M2, 6 (%11.3)'sinin M1, 2 (%3.8)'sinin P2, 6 (%11.3)'sinin P1 morfolotipine sahip olduğu görülmüş; bu morfolotiplere ek olarak 3'ü kan ve 2'si idrar olmak üzere toplam 5 (%9.4) izolatta "miçelyal zon" oluşumu gözlenmiştir (Resim 3).

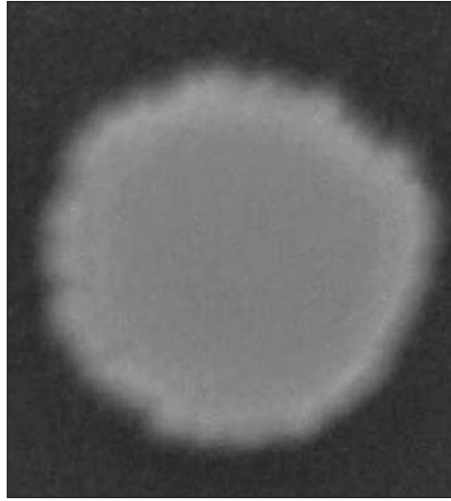
Çalışmamızda, MA ve STTZ besiyerlerinde elde edilen farklı morfolotiplere ait kodlar birleştirilerek, daha doğru bir ayırım gücü elde edilmiş ve 10 farklı grup oluşturulmuştur



Resim 1. MA besiyerinde *C.parapsilosis* suşlarının farklı yüzey morfolojileri; (1) Buruşuk: B, (2) Düzgün: D, (3) Tek merkezli, ışınal çizgili: Ç.



Resim 2. STTZ besiyerinde *C.parapsilosis* suşlarının farklı yüzey morfolojileri; (1) dM2 (düzgün, koyu mor), (2) dM1 (düzgün, açık mor), (3) dP2 (düzgün, koyu pembe), (4) dP1 düzgün, açık pembe).



Resim 3. Miçelyal zon oluşumu.

(Tablo II). İzolatların STTZ ve MA'daki özelliklerinin çaprazlandırılmasına dayanarak yapılan analizlerde, hastanemizin çocuk hastalıkları servislerinde B ve D grubuna ait; yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve diğer servislerde ise yalnızca B grubuna ait morfortip kümeleri saptanmıştır. Toplam 53 izolatın genotipik dağılımı incelendiğinde; 48 (%90.6)'i tip II, 4 (%7.5)'ü tip I ve 1 (%1.9)'i tip III olarak belirlenmiş; kan izolatlarının hepsi (n= 40) tip II iken, 13 idrar izolatının 8'i tip II, 4'ü tip I ve 1'i tip III genotipinde saptanmıştır.

Farklı dönemlerde, farklı servislerden izole edilen *C.parapsilosis* suşlarının morfotiplendirilmesi sonucu saptanan alt gruplar, virülans özelliklerine ve genotiplerine göre de kar-

Tablo II. STTZ ve MA Besiyerlerinde *Candida parapsilosis* Suşlarının Morfotiplendirilmesi Sonucunda Elde Edilen Alt Grupların Kodlarına ve Yüzdelere Göre Dağılımları

Alt gruplar				Grup kodu	Toplam (%)
MA besiyerinde koloni özelliği	STTZ besiyerinde koloni özelliği			MA + STTZ	
D	d	M1	Var*	A	3 (5.7)
D	d	M2	Yok	B	33 (62.3)
B	d	M2	Yok	C	1 (1.9)
Ç	d	M2	Yok	D	5 (9.4)
D	d	P1	Yok	E	5 (9.4)
B	d	M1	Var	F	1 (1.9)
Ç	d	P1	Yok	G	1 (1.9)
D	d	P2	Yok	I	2 (3.8)
Ç	d	M1	Var	J	1 (1.9)
Ç	d	M1	Yok	K	1 (1.9)

* Miçelyal zon oluşumunu ifade etmektedir.

D: Düzgün, B: Buruşuk, Ç: Işınsal çizgili koloni (Ç), d: Düzgün, M1: Açık mor, M2: Koyu mor, P1: Açık pembe, P2: Koyu pembe, STTZ: Sabouraud-trifeniltetrazolyum klorür agar, MA: Malt özlü agar.

şılaştırılmış ve A-K arası yeni bir gruplandırma yapılmıştır (Tablo III). Suşlar, klinik örnek-
lere göre irdelendiğinde, kan izolatlarında tüm grupların (A-K) gözleendiği; idrar izolatla-
rında ise A, B ve E olmak üzere yalnızca üç grubun belirlendiği saptanmıştır.

TARTIŞMA

Dünya genelinde kandidemiler, kan dolaşımı enfeksiyonlarında dördüncü sırada yer almaktadır. Bu enfeksiyonların %50'sinden fazlası *C. albicans*'a bağlı olarak gelişmekle bir-
likte, özellikle yenidoğan ve cerrahi YBÜ'lerde *C. parapsilosis* ve *Candida glabrata*'nın ar-
tan sıklıkta izole edildiği belirtilmektedir²³⁻²⁶. Bu enfeksiyonların ortaya çıkışında kona-
ğa ait faktörlerin yanı sıra, etken olan mantara ait virülans faktörleri de önemli rol almak-
tadır²⁷. Ek olarak, bu organizmaların bulaş yolları, çapraz yayılımları ve ilaç direnci gibi
enfeksiyon koşullarına epidemiyolojik bir yaklaşım getirebilmek için de tür ve alt türlerin
belirlenmesi ve morfoliplendirme/karyotiplendirme gibi yöntemlerle tiplendirme yapıl-
ması büyük önem taşımaktadır^{20,22}.

Çalışmamızda asit proteinaz (AP) aktivitesi, izolatların %11.3'ünde negatif,
%75.4'ünde orta, %13.2'sinde kuvvetli olarak bulunmuştur. Orta ve kuvvetli AP akti-
vitesi kan izolatları için sırasıyla %80 ve %7.5; idrar izolatları için sırasıyla %61.5 ve
%30.7 oranlarındadır. Chakrabarti ve arkadaşları⁴ balgam ve dışkı kaynaklı *C. parapsi-
losis* izolatlarında %88.8; Dağdeviren ve arkadaşları⁵ ise *C. parapsilosis*'in kan dışı izo-
latlarında %64.3 ve kan izolatlarında %26.3 oranında proteolitik aktivite bildirmişler-
dir. Literatürdeki az sayıda veri ile kıyaslandığında, AP etkinliği daha çok kan dışı ör-

Tablo III. *Candida parapsilosis* İzolatlarının Virülans ve Genotiplendirme Sonuçlarının Alt Gruplara Göre dağılımları

No	Kod	Grup	Genotip	E	F	Pr	SÖ	H (%)	Servis	Örnek	Dönem	Yıl
1	A	DdM1V	II	-	-	+	+	21.2	D	İdrar	Mart	2000
27	A	DdM1V	III	+	-	-	-	38.6	YBÜ	İdrar	Kasım	2002
34	A	DdM1V	II	-	-	+	-	24.3	D	Kan	Kasım	2002
2	B	DdM2Y	II	-	-	+	+	28.9	P	İdrar	Temmuz	2000
5	B	DdM2Y	II	-	-	+	-	28.9	P	Kan	Haziran	2000
8	B	DdM2Y	II	-	-	+	+	37.3	YBÜ	Kan	Ekim	2000
9	B	DdM2Y	II	-	-	+	-	40.4	P	Kan	Aralık	2000
11	B	DdM2Y	II	-	-	+	+++	47	D	İdrar	Ağustos	2001
12	B	DdM2Y	II	-	-	++	-	32.3	D	İdrar	Ağustos	2001
13	B	DdM2Y	II	-	-	+	-	34.8	P	Kan	Ocak	2001
15	B	DdM2Y	II	-	-	+	-	28	YBÜ	Kan	Şubat	2001
16	B	DdM2Y	II	-	-	+	-	43.6	YBÜ	Kan	Şubat	2001
19	B	DdM2Y	II	-	-	+	++	43.6	D	Kan	Haziran	2001
22	B	DSM2Y	II	-	-	+	+	40.5	P	Kan	Ekim	2001
23	B	DdM2Y	II	-	-	+	+	42.5	YBÜ	Kan	Ocak	2001
24	B	DdM2Y	I	-	-	+	+	43.6	P	İdrar	Mart	2002
25	B	DdM2Y	I	-	-	++	-	41	D	İdrar	Nisan	2002
26	B	DdM2Y	I	-	-	+	+	41.1	D	İdrar	Mayıs	2002
28	B	DdM2Y	II	-	-	-	-	45.2	YBÜ	Kan	Şubat	2002
29	B	DdM2Y	II	-	-	+	+	32.2	D	Kan	Haziran	2002
30	B	DdM2Y	II	-	-	+	-	26.7	P	Kan	Temmuz	2002
31	B	DdM2Y	II	-	-	+	-	34.7	P	Kan	Ekim	2002
32	B	DdM2Y	II	-	-	-	-	41.8	D	Kan	Ekim	2002
33	B	DdM2Y	II	-	-	+	-	39.9	D	Kan	Kasım	2002
35	B	DdM2Y	II	-	-	++	-	39.7	D	Kan	Kasım	2002
37	B	DdM2Y	II	-	-	+	-	41.6	YBÜ	İdrar	Temmuz	2003
38	B	DdM2Y	II	-	-	++	-	43.2	D	İdrar	Ekim	2003
45	B	DdM2Y	II	-	-	+	-	48.3	YBÜ	Kan	Temmuz	2003
46	B	DdM2Y	II	-	-	+	-	45.4	D	Kan	Ağustos	2003
47	B	DdM2Y	II	-	-	-	-	37.2	D	Kan	Ağustos	2003
48	B	DdM2Y	II	-	-	-	-	34.4	P	Kan	Haziran	2003
49	B	DdM2Y	I	-	-	++	+	40.8	D	İdrar	Haziran	2004
50	B	DdM2Y	II	-	-	+	-	26.2	D	İdrar	Eylül	2004
51	B	DdM2Y	II	-	-	-	-	41.4	YBÜ	Kan	Nisan	2004

Tablo III. *Candida parapsilosis* İzolatlarının Virülans ve Genotiplendirme Sonuçlarının Alt Gruplara Göre Dağılımları (devamı).

No	Kod	Grup	Genotip	E	F	Pr	SÖ	H (%)	Servis	Örnek	Dönem	Yıl
52	B	DdM2Y	II	-	-	++	-	37.7	D	Kan	Nisan	2004
53	B	DdM2Y	II	-	-	+	+	34.7	D	Kan	Ekim	2004
3	C	BdM2Y	II	-	-	+	++	24	YBÜ	Kan	Mayıs	2000
4	D	ÇdM2Y	II	-	-	+	-	31.9	P	Kan	Haziran	2000
14	D	ÇdM2Y	II	-	-	+	-	40.8	D	Kan	Ocak	2001
39	D	ÇdM2Y	II	-	-	+	-	37.2	D	Kan	Nisan	2003
40	D	ÇdM2Y	II	-	-	+	-	41.8	P	Kan	Mayıs	2003
42	D	ÇdM2Y	II	-	-	+	++	48.6	P	Kan	Haziran	2003
6	E	DdP1Y	II	-	-	+	-	23.1	D	Kan	Temmuz	2000
10	E	DdP1Y	II	-	-	++	-	23.6	YBÜ	Kan	Aralık	2000
20	E	DdP1Y	II	-	-	+	++	54.6	D	Kan	Temmuz	2001
36	E	DdP1Y	II	-	-	+	+++	50.5	D	İdrar	Nisan	2003
41	E	DdP1Y	II	-	-	+	-	30.4	YBÜ	Kan	Mayıs	2003
7	F	BdM1V	II	-	-	+	+	22.7	D	Kan	Ağustos	2000
17	G	ÇdP1Y	II	-	-	+	-	28.6	P	Kan	Nisan	2001
18	I	DdP2Y	II	-	-	+	-	39.5	D	Kan	Mayıs	2001
44	I	DdP2Y	II	-	-	+	-	11.6	P	Kan	Haziran	2003
21	J	ÇdM1V	II	-	-	+	-	32.2	D	Kan	Eylül	2001
43	K	ÇdM1Y	II	-	-	+	-	31.6	YBÜ	Kan	Haziran	2003

E: Esteraz, F: Fosfolipaz, Pr: Proteinaz, SÖ: Sıvışık örtü, H: Hidrofobisite, P: Pediatri, D: Diğer servisler grubu, YBÜ: Yoğun bakım ünitesi.

neklerde gösterilmiş olmakla birlikte, çalışmamızda kan izolatlarında daha yüksek bulunan oran, çalışılan suş sayılarının farklılığı ile açıklanabilir. Çalışmada, *C.parapsilosis* izolatlarımızda fosfolipaz ve esteraz etkinliği anlamlı bulunmamıştır; özellikle kan dolaşımı enfeksiyonlarında *C.parapsilosis* suşlarının lipolitik salgılarının önemini vurgulamak olanaklı değildir. Diğer yandan Dağdeviren ve arkadaşlarının⁵ çalışmasında, kandan izole edilen *C.parapsilosis* suşlarında anlamlı düzeyde fosfolipaz üretimi saptanmıştır. Benzer olarak Gacser ve arkadaşları²⁸, fare modellerinde lipaz üretemeyen *C.parapsilosis* mutantlarının virülansının zayıfladığını ve makrofajlar tarafından daha kolay fagosite edildiklerini göstermişlerdir.

Araştırdığımız bir diğer virülans faktörü "slime" (sıvışık örtü) üretimidir. Çeşitli çalışmalarda, kan ve kateterden izole edilen *C.parapsilosis* suşlarında bu etkinlik, diğer vücut bölgelerinden izole edilenlere oranla daha yüksek düzeyde saptanmıştır^{1,10,12}. Çalışmamızda 53 adet *C.parapsilosis* suşu arasında 40 kan izolatının %15'i zayıf, %10'u orta; 13 idrar izolatının ise %38.4'ü zayıf, %15.3'ü kuvvetli sıvışık örtü üretimi göstermiştir. Kuv-

vetli “slime” üretiminin yalnızca idrar izolatlarında saptanması da dikkat çekicidir (Tablo III). Literatür verileri ile kendi verilerimiz arasındaki bu farklılığı açıklayabilecek olası bir neden bulunamamıştır. Ayrıca, diğer çalışmalarda tek başına idrar izolatlarına ait sıvı sıkı örtü üretimi olduğuna dair bir veriye de rastlanmamıştır.

Candida suşlarının bir diğer virülans faktörü hidrofobisitedir. Çalışmamızda, Rosenberg ve arkadaşlarının²⁸ ilk kez uyguladığı hidrokarbon adezyon testi ile izolatların hidrofobik özellikleri araştırılmıştır. Bu konudaki en kapsamlı verileri içeren bir çalışmada, ağız, deri lezyonları ve kandan izole edilen 24 *C.parapsilosis* suşunda ksilen hidrokarbon aderens yöntemi kullanılarak hidrofobisite araştırılmış ve iki izolatta az, diğer izolatlarda ise orta düzeyde hidrofobisite saptanmıştır²⁹. Bu çalışmada artan hidrofobisite ile yanak epiteline adezyon gücü arasında uyum olduğu gösterilmiştir²⁹. Üreme sıcaklığının da hidrofobisite düzeyini etkilemesinden yola çıkarak, çalışmamızda *C.parapsilosis* izolatları insan vücut ısısında (37°C) inkübe edilmiş ve bir kan izolatu dışında tüm izolatlar orta hidrofobik olarak saptanmıştır (Tablo III). Bunun da *C.parapsilosis* izolatlarının virülansında önemli bir yeri olduğu düşünülmüştür.

Epidemiyolojik veri elde edebilmek amacıyla gerçekleştirdiğimiz morfotiplendirme çalışmasında, STTZ ve MA besiyerlerinden elde edilen verilere göre alt gruplar oluşturulmuş ve bunlar, izolasyon dönemi, servis ve virülans faktörleri temel alınarak irdelenmiştir. Literatürde her iki yöntemin de uygulandığı bir çalışmada, *C.parapsilosis* izolatlarının STTZ’de düzgün yüzeyli tüm kolonilerde açık pembe, koyu pembe, açık mor, koyu mor olmak üzere 4 farklı morfotip; MA’da ise çoğu düzgün yüzeyli olmak üzere kesintisiz saçaklı ve yer yer saçaklı olarak 3 farklı morfotip gösterdiği saptanmıştır¹⁸. Miguel ve arkadaşları²⁰ ise, *C.parapsilosis* kan izolatlarında koloni rengini göz ardı ederek, MA ve STTZ yöntemiyle çoğu düzgün olmak üzere, buruşuk ve kısmen buruşuk yüzeyli olmak üzere 3 farklı morfotip belirlemişlerdir. Ancak literatürdeki hiçbir çalışmada epidemiyolojik değerlendirme için uygulanan yöntemlere dayalı yeterli ve güvenilir sonuçlar elde edilmemiştir. Çalışmamızda, MA besiyerinde suşların %81.1’i düzgün (D), %3.7’si buruşuk (B) ve %15.1’i ışınal çizgili (Ç) olarak belirlenmiştir (Tablo II). Kan izolatlarının çoğu D olarak gözlenirken, 13 adet idrar izolatının hepsi D morfotipi sergilemiştir; bu da idrar izolatlarının sayıca az olmasıyla açıklanabilir. İzolatlarımızın hepsi STTZ besiyerinde düzgün yüzey (d) morfolojisinde olup, koloni rengi olarak çoğunlukla koyu mor (M2) ve daha az oranda açık mor (M1), açık pembe (P1) ve en az oranda koyu pembe (P2) olarak gözlenmiştir. İzolatların %9.4’ünün ise miçelyal zon oluşturduğu saptanmıştır (Tablo II). Her iki besiyeri ile elde edilen sonuçlar literatür verilerinin çoğu ile uyumludur^{17,21,22}. Ancak verilerimiz epidemiyolojik değerlendirme açısından yetersiz kaldığı için, morfotiplendirmenin ayırım gücünü artırmak amacıyla MA ve STTZ besiyerlerinden elde edilen veriler birleştirilerek değerlendirilmiştir (Tablo II). Buna göre kan izolatlarında çoğu B olmak üzere 10 farklı alt grup, idrar izolatlarında ise çoğu B olmak üzere A ve E dahil 3 farklı morfotip belirlenmiştir (Tablo III). Miguel ve arkadaşları²⁰, *C.parapsilosis* suşlarında, renk dağılımına bakmaksızın 8 farklı alt grup elde etmiştir. Elde ettiğimiz alt gruplar, servis ve dönem temelinde değerlendirildiğinde; pediatri 2000-2002 döneminde saptanan B grubu 8 izolat ve 2003’te saptanan D grubu 2 izolat kümelenme olasılığını akla getirmiş-

tir. Yoğun bakım ünitesinde ise 2001'de 3 ve 2003'te 2 adet B grubu suşun izolasyonu kümelenmeyi düşündürürken, diğer servislerde 2001-2004 arasında izole edilen 16 adet B grubu suşun, olası kümelenme ile bağlantılı olduğu şüphesini doğurabilir (Tablo III).

RAPD-PCR yöntemiyle yapılan genotiplendirmede, suşlarımızda, büyük çoğunluğu (%90.5) tip II olmak üzere toplam 3 farklı genotip belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen morfotipler ağırlıklı olarak tip II altında toplanmış olmakla birlikte, morfotipler ve kümelenme paternleri belirli bir genotiple ilişkilendirilememiştir. Miguel ve arkadaşları²⁰, morfo- ve genotiplendirmeyi yeniden bir arada değerlendirerek, izolatlarının salgın suşları olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ancak bizim çalışmamızda, morfo-ve genotiplendirme arasındaki uyumun irdelenebilmesi ve mümkünse epidemiyolojik araştırmalarda morfo- tiplendirmenin de güvenle kullanılabilirliğinin belirlenmesi amacıyla bir "yeniden kodlama" yapılmamıştır.

Ulaşılabildiği kadarıyla literatürde, izolatların gerek klinik örneğe, gerekse STTZ ve MA morfotiplerine ve farklı virülans faktörlerine göre bir arada değerlendirildikleri çalışmalara rastlanmamıştır. Khun ve arkadaşları²⁵, genotiplendirme ile salgın suşu olarak tanımlanan 6 adet *C.parapsilosis* (grup I) izolatında sıvı sıkı örtü, AP ve fosfolipazı irdemişler ve fosfolipaz ve AP aktiviteleri açısından büyük farklılıklar belirlemişlerdir. Araştırmacılar, yalnızca sıvı sıkı örtü üretiminin klonal olarak benzer suşlarda sporadik suşlara oranla daha fazla üretildiğini ve bunun da salgında önemli bir faktör olabileceğini öne sürmüşlerdir²⁵. Bernardis ve arkadaşları¹⁷ ise, yüksek proteolitik aktivite saptadıkları *C.parapsilosis* izolatlarında çok farklı karyo ve biyotip profilleri bildirmişlerdir. Çalışmamızda, izolatların virülans faktörleri birbirleriyle kıyaslandığında, bir suş dışında esteraz ve fosfolipaz negatif olmaları ve hidrofobisitenin tüm suşlarda orta düzeyde saptanması, bu faktörler açısından izolatlar arası benzerliği yansıtmaktadır. Ancak AP ve "slime" üretimleri arasında farklılıkların saptanması, Khun ve arkadaşlarının²⁵ sonuçlarına uyan bir veridir.

Çalışmamızda, virülans faktörleri ile genotipler arasındaki ilişki incelendiğinde, belirgin bir ilişkiye rastlanmamıştır. Yalnızca, tip III olarak belirlenen tek izolatımızın aynı zamanda tek esteraz pozitif suş olması da dikkat çekicidir (Tablo III). Hastanemizde kümelendiğini düşündüğümüz suşların "slime" üretimi dışında, diğer virülans faktörleri açısından pediatri ve yoğun bakım biriminde uyumluluk sergiledikleri gözlemlenmiş; diğer servisler grubunda ise böyle bir uyum elde edilmemiştir (Tablo III). Dolayısıyla servisler arasında morfotip olarak B alt grubunda yoğunlaşan suşlarımızın, gerek genotipik gerekse virülans faktörleri ile ilgili net bir profil çizdikleri ileri sürülemez. Bundan sonraki amacımız, bu çalışmaya dahil edilen *C.parapsilosis* suşlarının, anabilim dalımız bünyesinde *C.orthopsilosis* ve *C.metapsilosis* açısından yeniden değerlendirilmesidir.

Sonuç olarak, ucuz ve kolay olmakla birlikte MA ve STTZ yöntemlerine dayalı morfo- tiplendirmenin, *C.parapsilosis* enfeksiyonlarının epidemiyolojik irdelenmesinde ve salgın suşlarının ürettikleri virülans faktörlerinin belirlenmesinde yeterli olmadığı ve ayırım gücü daha yüksek birkaç yöntemin bir arada uygulanması ve sonuçların PFGE gibi ileri moleküler yöntemlerle kıyaslanmasıyla daha güvenilir fenotiplendirme yöntemlerinin elde edileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 1994; 32: 452-6.
2. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. Infect Immun 2002; 70: 878-88.
3. Larone DH. Medically Important Fungi: A Guide to Identification. 2002, 4th ed. ASM Press, Washington, DC.
4. Chakrabarti A, Nayak N, Talwar P. In vitro proteinase production by *Candida* species. Mycopathologia 1991; 14: 163-8.
5. Dağdeviren M, Çerikçiöğlu N, Karavuş M. Hastanede yatan fungemili hastalardan izole edilen *Candida parapsilosis* kökenlerinin virülans faktörleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2003; 33: 315-22.
6. Dağ A, Çerikçiöğlu N. Hastanede yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen *Trichosporon asahii* suşlarında bazı virülans faktörlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2006; 40: 225-35.
7. Keçeli SA, Budak F. *Candida* türlerinde esterase aktivitesi. Mikrobiyol Bul 2004; 38: 99-103.
8. Slifkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. J Clin Microbiol 2000; 38: 4626-8.
9. Yücesoy M, Marol S. *Candida* türlerinin esterase aktivitesinin belirlenmesi. Mikrobiyol Bul 2003; 37: 59-63.
10. Dolapçı İ, Tekeli A. Çeşitli *Candida* türlerinde slime faktörü yapımının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2002; 36: 323-8.
11. Ozkan S, Kaynak F, Kalkancı A, Abbasoğlu U, Kustimur S. Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolates from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro 2005; 100: 319-24.
12. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ. Variations in DNA subtype antifungal susceptibility and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. Diagn Microbiol Infect Dis 1995; 21: 9-14.
13. Yücesoy M, Karaman M. *Candida* türlerinin biyofilm üretimi ve antifungal duyarlılık paternleri. Mikrobiyol Bul 2004; 38: 91-8.
14. Hazen KC, Plotkin BJ, Klimas DM. Influence of growth conditions on cell surface hydrophobicity of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. Infect Immun 1986; 54: 269-71.
15. Minagi S, Miyake Y, Fujioka Y, Tsuru H, Suganaka H. Cell-surface hydrophobicity of *Candida* species as determined by the contact-angle and hydrocarbon-adherence methods. J Gen Microbiol 1986; 132: 1111-5.
16. Sweet SP, Macfarlane TW, Samaranyake LP. Determination of the cell surface hydrophobicity of oral bacteria using of modified hydrocarbon adherence method. Fems Microbiology Letters 1987; 48: 159-63.
17. Bernardis FD, Mondello F, Millan RS, Ponton J, Cassone A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 1999; 37: 3481-6.
18. Cassone A, Bernardis FD, Pontieri E, et al. Biotype diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. J Infect Dis 1995; 171: 967-75.
19. Cook WL, Schlitzer RL. Isolation of *Candida albicans* from freshwater and sewage. Appl Environ Microbiol 1981; 41: 840-2.
20. Garcia San Miguel L, Pla J, Cobo J, et al. Morphotypic and genotypic characterization of sequential *Candida parapsilosis* isolates from an outbreak in a pediatric intensive care unit. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 49: 189-96.
21. Phongpaichit S, Mackenzie DW, Fraser C. Strain differentiation of *Candida albicans* by morphotyping. Epidemiol Infect 1987; 99: 421-8.
22. Quindos G, Fernandez-Rodriguez M, Burgos A, Tellaetxe M, Cisterna R, Ponton J. Colony morphotype on sabouraud-triphenyltetrazolium agar: a simple and inexpensive method for *Candida* subspecies discrimination. J Clin Microbiol 1992; 30: 2748-52.
23. Medrano DJ, Brilhante RS, Cordeiro Rde A, Rocha MF, Rabenhorst SH, Sidrim JJ. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2006; 48: 17-20.
24. Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M, et al; Barcelona Candidemia Project Study Group. Epidemiology, risk factors and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain 2002 to 2003. J Clin Microbiol 2006; 44: 1681-5.

25. Kuhn DM, Mukherjee PK, Clark TA, et al. *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1074-81.
26. Lupetti A, Tavanti A, Davini P, et al. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2363-9.
27. Gacser A, Trofa D, Schäfer W, Nosanhuick JD. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest* 2007; 117: 3049-58.
28. Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett* 1980; 9: 29-33.
29. Panagoda GJ, Ellepola AN, Samaranayake LP. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surface correlates with cell surface hydrophobicity. *Mycoses* 2001; 44: 29-35.