

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***Candida parapsilosis* GRUBU İZOLATLARININ VİRULANS ÖZELLİKLERİNİN**
ARAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi

Dr. Zeynep AKYÜZ

TRABZON - 2011

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***Candida parapsilosis* GRUBU İZOLATLARININ VİRULANS ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Uzmanlık Tezi

Dr. Zeynep AKYÜZ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. İlknur TOSUN

TRABZON – 2011

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince hayata dair bilgilerinden ve mesleki deneyimlerinden yararlandığım hocalarım Sayın Prof. Dr. Faruk AYDIN, Prof. Dr. Murat ERTÜRK, Doç. Dr. İlknur TOSUN, Doç. Dr. Neşe KAKLIKKAYA, Yrd. Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK'a, birlikte vakit geçirdiğim asistan arkadaşlarıma ve tüm Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmamı Doç. Dr. İlknur TOSUN yönetiminde 2009.114.001.10 kod no'lu proje ile destekleyen K.T.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Dr. Zeynep AKYÜZ
TRABZON-2011

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
RESİM LİSTESİ	viii
KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Candida parapsilosis</i> 'in Genel Özellikleri	4
2.2. <i>Candida parapsilosis</i> Türlerinin Tanısı	5
2.3. <i>Candida parapsilosis</i> 'in Epidemiyolojisi	5
2.4. <i>Candida parapsilosis</i> 'in Virulans Faktörleri	8
2.4.1. Adherens (Yapışma) ve Slime Üretimi	8
2.4.2. Fenotipik Dönüşüm	9
2.4.3. Biyofilm Üretimi	10
2.4.4. Salgısal Aspartik Proteinaz Enzimi (Sap) Üretimi	12
2.4.5. Fosfolipaz Üretimi	13
2.4.6. Lipaz Üretimi	14
2.4.7. Esteraz Üretimi	15
2.5. <i>Candida parapsilosis</i> 'in Kliniği	16
2.5.1. Fungemi	16
2.5.2. Endokardit	16
2.5.3. Menenjit	17
2.5.4. Peritonit	17
2.5.5. Artrit	18
2.5.6. Göz Enfeksiyonları	18
2.5.7. Onikomikoz	18

	iv
2.5.8. Vulvovajinit	19
2.5.9. İdrar Yolu Enfeksiyonu	19
2.6. <i>Candida parapsilosis</i> 'in Tedavisi	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. <i>Candida parapsilosis</i> İzolatları ve Standart Kökenler	21
3.2. Solüsyonlar	23
3.2.1. Agaroz Jel ve Poliakrilamid Jel Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar	23
3.2.1.1. 5XTBE Tamponu	23
3.2.1.2. 10XTAE Tamponu	23
3.2.1.3. 1/29 Akrilamid/bisakrilamid Solüsyonu	23
3.2.1.4. %10'luk APS	23
3.2.1.5. Etidyum Bromür Solüsyonu	24
3.2.2. PCR Reaksiyonu Karışımı İçin Kullanılan Solüsyonlar	24
3.2.3. Agaroz Jel Hazırlanması	24
3.2.4. Poliakrilamid Jel Hazırlanması	24
3.3. Suşların Tanımlanması	25
3.3.1. Maya Kökenlerinin Üretilmesi ve Saklanması	25
3.3.2. Germ Tüp (Çimlenme Borusu) Testi	25
3.4. Maya Kökenlerinin İdentifikasyonu	26
3.4.1. Kromojenik Agarda Değerlendirme	26
3.4.2. Mısır Unu <i>Tween</i> 80 Agar Besiyerinde Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi	26
3.4.3. Karbonhidrat Asimilasyon Testi	27
3.5. <i>Candida parapsilosis</i> Grubu İzolatlarının Tür Ayırımının Yapılması (PCR-RFLP)	28
3.5.1. DNA İzolasyonu	29
3.5.2. <i>SADH</i> Geni Amplifikasyonu ve Jelde Görüntüleme	29
3.5.3. <i>SADH</i> Gen Ürünlerinin Restriksiyon Enzim Analizi	31
3.6. Virulans Faktörlerinin Değerlendirilmesi	32
3.6.1. Esteraz Üretimi	32
3.6.1.1. Mısır Unu <i>Tween</i> 80 Besiyerinin Hazırlanması	32
3.6.1.2. Esteraz Testinin Yapılışı	32

3.6.2. Total Parenteral Nutrisyon'da Üreme Yeteneğinin Belirlenmesi	33
3.6.3. Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi	34
3.6.4. <i>SAPP</i> (<i>SAPP1</i> , <i>SAPP2</i> , <i>SAPP3</i>) Genlerinin Analizi	35
4. BULGULAR	37
4.1. <i>Candida parapsilosis</i> Grubu Kökenlerinin Dağılımı	37
4.2. <i>Candida parapsilosis</i> Grubu İzolatlarının Tür Düzeyinde Dağılımı	38
4.3. <i>Candida parapsilosis</i> Grubu İzolatlarının Materyal Düzeyinde Dağılımı	38
4.4. <i>Candida parapsilosis</i> Grubu İzolatlarının Yaş Gruplarına Göre Dağılımı	38
4.5. İzolatların Esteraz Üretimlerinin Değerlendirilmesi	40
4.6. İzolatların TPN'de Üreme Yeteneklerinin Belirlenmesi	41
4.6.1. Kan İzolatlarının TPN'de Üreme Yetenekleri	43
4.6.2. İdrar İzolatlarının TPN'de Üreme Yetenekleri	44
4.6.3. Solunum Yolu İzolatlarının TPN'de Üreme Yetenekleri	45
4.6.4. Yara İzolatlarının TPN'de Üreme Yetenekleri	46
4.6.5. Kulak İzolatlarının TPN'de Üreme Yetenekleri	47
4.7. İzolatların Biyofilm Üretimlerinin Değerlendirilmesi	47
4.8. İzolatların <i>SAPP</i> Gen Profillerinin Belirlenmesi	48
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
7. ÖZET	66
8. SUMMARY	68
9. KAYNAKLAR	70

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Maya Kökenleri	22
Tablo 2. API 20C AUX Testinde Kullanılan Karbonhidratlar	28
Tablo 3. <i>SADH</i> Geni Primerleri	30
Tablo 4. <i>SADH</i> Geninin Amplifikasyonunda Kullanılan Reaksiyon Karışımı	30
Tablo 5. <i>SADH</i> geninin Amplifikasyon Koşulları	31
Tablo 6. BanI Enzimi İle Kesim İşleminde Kullanılan Reaksiyon Karışımı	31
Tablo 7. Total Parenteral Nutrisyon’da Bulunan Maddeler	34
Tablo 8. Çalışmada Kullanılan <i>SAPP</i> Genleri Primerleri	36
Tablo 9. <i>SAPP</i> Genlerinin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Reaksiyon Karışımı	36
Tablo 10. <i>SAPP</i> Genlerinin Amplifikasyon Koşulları	36
Tablo 11. <i>Candida parapsilosis</i> Grubu Türlerinin Klinik Materyallere Göre Dağılımı	39
Tablo 12. İzolatların Yaş Grubuna Göre Dağılımı	39
Tablo 13. <i>Candida parapsilosis</i> Grubu Türlerinin Esteraz Üretme Oranları	40
Tablo 14. <i>Candida parapsilosis</i> Grubu İzolatlarının Materyal Düzeyinde Esteraz Üretme Oranları	41
Tablo 15. <i>Candida parapsilosis</i> grubu izolatlarının TPN’de üreme değerleri	42
Tablo 16. <i>Candida parapsilosis</i> Grubu Türlerinin Biyofilm Üretme Oranları	48
Tablo 17. Kan ve Diğer Materyallerden Elde Edilen <i>Candida parapsilosis</i> sensu stricto İzolatlarının Biyofilm Üretimlerinin Karşılaştırılması	48
Tablo 18. <i>Candida parapsilosis</i> Grubu Türlerinin <i>SAPP</i> Genleri Pozitiflikleri	49

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>Candida parapsilosis</i> Grubu İzolatlarının Klinik Materyallere Göre Dağılımı	37
Şekil 2. <i>Candida parapsilosis</i> Grubu İzolatlarının Tür Düzeyinde Dağılımı	38
Şekil 3. Kan İzolatlarının TPN’de Üreme Yetenekleri	44
Şekil 4. İdrar İzolatlarının TPN’de Üreme Yetenekleri	45
Şekil 5. Solunum Yolu İzolatlarının TPN’de Üreme Yetenekleri	46
Şekil 6. Yara İzolatlarının TPN’de Üreme Yetenekleri	46
Şekil 7. Kulak İzolatlarının TPN’de Üreme Yetenekleri	47

RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Resim 1. <i>Candida parapsilosis</i> 'in CHROMagar Görünümü	26
Resim 2. <i>Candida parapsilosis</i> 'in Mısır Unu Tween 80'li Besiyerindeki Görünümü (40x)	27
Resim 3. <i>SADH</i> Geninin Jel Elektroforez Görünümü	30
Resim 4. <i>Candida parapsilosis</i> Grubu Türlerinin Kesim Ürünlerinin Jel Elektroforez Görünümü	32
Resim 5. Esteraz Pozitif (Solda) ve Esteraz Negatif (Sağda) İzolatların Görünümü	33
Resim 6. <i>SAPP</i> Genlerinin Jel Elektroforez Görünümleri	35

KISALTMALAR

AbD	: Anabilim Dalı
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
APS	: Ammonium Persulphate
ATCC	: American Type Culture Collection
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
bp	: Baz pair
BSA	: Bovine (Sığır) Serum Albumini
CaCl₂	: Kalsiyum Klorür
CFU	: Colony Forming Unit
Cl	: Klor
cm	: Santimetre
Cu	: Bakır
CYBÜ	: Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi
dak	: Dakika
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
DYBÜ	: Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi
EMB	: Eosin Methylene Blue
g	: Grade
GHYBÜ	: Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi
GIS	: Gastrointestinal Sistem
Gr	: Gram

HCL	: Hidroklorik Asit
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
IgG	: Immünoglobulin G
ITS	: Internal Transcribed Spacer
IV	: İntravenöz
K	: Potasyum
kDA	: Kilodalton
KTÜ	: Karadeniz Teknik Üniversitesi
mEq	: Miliekivalen
mg	: Miligram
Mg	: Magnezyum
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
Mn	: Mangan
MW	: Molecular Weight
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum Klorür
nm	: Nanometre
NŞYBÜ	: Nöroşirurji Yoğun Bakım Ünitesi
NYBÜ	: Nöroloji Yoğun Bakım Ünitesi
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polimeraz Chain Reaction
PYBÜ	: Pediatri Yoğun Bakım Ünitesi
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
Rpm	: Revolution Per Minute
SADH	: Secondary Alcohol Dehydrogenase
SAPD	: Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi
Sapp	: Salgısal Aspartik Proteinaz Enzimi
SAPP	: Salgısal Aspartik Proteinaz Geni
SDA	: Sabouraud Dextrose Agar
SDB	: Sabouraud Dextrose Broth

Se	: Selenyum
TAK	: Trakeal Aspirat Kültürü
Taq	: Thermus Aquaticus
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TEMED	: N,N,N',N'-tetramethylethylene-diamine
TPN	: Total Parenteral Nutrisyon
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
XXT	: Tetrazolium tuzu; 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfopheny]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi
YDYBÜ	: Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi
YEPD	: Yeast Extract Pepton Dekstroz
YNB	: Yeast Nitrogen Base
Zn	: Çinko
°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Candida türleri normalde insan derisi ve mukozası florasında bulunan organizmalardır. İnsanların %30-50'sinin ağızında ve gastrointestinal kanalında bulunurlar (1). Doğum sırasında veya doğumdan kısa bir süre sonra yenidoğana bulaşarak söz konusu flora içinde yerlerini alırlar (2). Bazı hazırlayıcı faktörlerin varlığında kandidoz olarak tanımlanan yüzeysel ve/veya derin akut ve/veya kronik enfeksiyonlara neden olurlar. Florada bulunmaları nedeniyle enfeksiyonlarının çoğu endojendir. Sistemik mikozlar arasında en sık görülen kandidozdur. Genellikle enfeksiyondan önce florada bulunan mantar sayıca bir artış gösterir (kolonizasyon) ve kolonizasyonu enfeksiyon izler (1).

1980'li yıllardan bu yana fungal organizmalar, özellikle immun yetmezlikli kişilerde ve hastanede yatan, altta yatan hastalığı bulunalarda oluşan hastalıkların önemli nedenlerinden biri olarak görünmeye başlamıştır (3). Tanı ve tedaviye yönelik yapılan invaziv girişimlerin artışı, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, organ nakilleri veya başka nedenlerle sık başvuru olan güçlü immunsupresif tedavilerin yaygınlaşması, malign hastalıklar nedeni ile verilen anti-kanser ilaçların neden olduğu kemik iliği baskılanması ve nötropeni gibi faktörler ciddi fungal enfeksiyonların sıklığını artırmaktadır (4).

Candida albicans insan enfeksiyonlarından en yaygın izole edilen *Candida* türü olmasına karşın, 1990'lı yıllardan bu yana diğer *Candida* türlerine bağlı dissemine (yaygın) hastalıklarda da artış bildirilmiştir. Bunlar arasında bulunan *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*)'in, yapılan farklı tarama çalışmalarında kan akımı enfeksiyonlarından ikinci sıklıkla izole edilen maya türü olduğu belirlenmiştir. *C. parapsilosis* fungemi, endokardit, endoftalmit, septik artrit ve peritonit gibi enfeksiyonları ile önemli bir nozokomiyal patojen olarak karşımıza çıkmakta; enfeksiyonları sıklıkla invaziv işlemler ve prostetik aletlerle ilişkilendirilmektedir (5).

Candida parapsilosis ilk olarak 1928 yılında Ashford tarafından, Puerto Rico'da, diareli bir hastanın gaitasından izole edilmiştir. İzolat, bugün *C. albicans* adı ile bilinen, o dönemlerde daha yaygınca görülen ve *Monilia psilosis* olarak tanımlanan türden ayırt

edilmesi için *Monilia parapsilosis* olarak isimlendirilmiş, 1932 yılında Langeron ve Talice tarafından *C. parapsilosis* adı ile yeniden sınıflandırılmıştır. Başlangıçta patojen olmadığı düşünülse de, 1940 yılında intravenöz (IV) ilaç kullanıcılarında görülen ölümcül endokarditin nedeni olduğu anlaşılmıştır (3, 6).

Candida parapsilosis'in insidansında artışa neden olan önemli faktörler parenteral nutrisyon ve santral venöz kateter gibi destekleyici sistemlerin kullanımınıdır. *C. parapsilosis*'e bağlı oluşan kandidemilerin insidansında artışa neden olan faktörlerden biri de aynı zamanda tıbbi bakım maliyetlerini de yükselten uzun süreli hastane yatışıdır (7).

Restriksiyon fragman polimorfizmleri ile yapılan erken çalışmalar *C. parapsilosis* izolatlarının genotipik yönleriyle diğer *Candida* türlerinden daha heterojen olduklarını göstermiştir. *Randomly Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) analizi, multilokus enzim elektroforezi, ribozom kodlayan DNA'nın *internal transcribed spacer* (ITS) sekans analizi, DNA akrabalık çalışmaları, morfoloji, mitokondrial DNA sekans farklılıkları, DNA topoizomeraz II gen sekansları ve *C. parapsilosis* suşlarının DNA parmak izi analizi ile *C. parapsilosis* izolatları 3 gruba ayrılabilir (8).

Araştırmacılar *C. parapsilosis* grup I, II ve III'ün farklı genleri arasındaki DNA sekans farklılıklarının, bu grupları alttür olarak tanımlayacak kadar fazla olduğunu belirlemiş, grup II ve grup III izolatların sırası ile *Candida orthopsilosis* (*C. orthopsilosis*) ve *Candida metapsilosis* (*C. metapsilosis*) olarak adlandırılmasını, grup I izolatların ise *C. parapsilosis* adı ile kalmasını önermiştir (8). Türler arasında ayırımın yapılabilmesi için ise bir sekonder alkol dehidrojenazı kodlayan ve üç türde de yaygınca bulunan *secondary alcohol dehydrogenase* (*SADH*) geninin restriksiyon polimorfizm analizi önerilmiştir (9).

Candida enfeksiyonlarının patogenezi açıklamak ve yeni kandidoz tedavisini geliştirmek amacı ile yapılan çalışmalarda konak savunma sisteminin rolünün yanında *Candida*'lara ait virulans faktörlerinin de önemi belirtilmektedir. Yapılan araştırmalar enfeksiyonlarda tek bir virulans faktörünün rol oynamadığını göstermiştir. Özellikle adherens, germ tüp oluşturma, proteinaz, fosfolipaz major virulans faktörleridir. Ayrıca toksinler, pleomorfizm, fenotip değişimi, hücre duvarı ve yüzey değişimi ile hidrofobisite gibi faktörler de virulansta ve patogeneizde rol oynamaktadır. Slime faktör, hemolizin, esteraz ve lipaz gibi faktör ve enzimler de virulansı belirleyen diğer faktörlerdendir (10).

Candida parapsilosis'in prostetik materyallere selektif yapışma yeteneği, plastik yüzeylerde biyofilm oluşturmaya, ekstrasellüler proteaz salgılamaya, insanların ellerinde kolonize olması, yüksek glukoz ve lipid yoğunluğunda çoğalma yeteneği, fenotipik

dönüşümü, ilaç ve inhibitörlere rezistans göstermesi gibi direk olarak virulansı ile ilişkilendirilen ilginç biyolojik özellikleri bulunmaktadır (7).

Bu çalışmada, değişik klinik örneklerden izole edilen *C. parapsilosis* grubu türlerinin dağılımının belirlenmesi, maya türü mantarların patogeneğinde rolü olan esteraz üretimi, total parenteral nutrisyon'da (TPN) üreme yeteneği, biyofilm üretimi ve salgısal aspartik proteinaz geni (*SAPP* geni) varlığının araştırılması ve türler arasındaki farklılıkların belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız sonucunda hastanemizdeki *C. parapsilosis* grubu türlerinin prevalansı belirlenecek, türlerin virulans faktörlerinin karşılaştırılması sağlanacaktır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilerle türlerin patogenezi hakkında bir öngörü oluşturmamız planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Candida parapsilosis*'in Genel Özellikleri

Candida parapsilosis türleri Sabouraud Dextrose Agar (SDA) besiyerinde, 37 °C'de 24 saatte üreyerek genellikle kirli beyaz, krem rengi, yumuşak kıvamlı, tipik olarak mayamsı kokulu koloniler oluştururlar. *Candida* türlerinin mısır unu-Tween 80 besiyerindeki morfolojileri ayırıcı tanıya yardımcıdır. *C. parapsilosis* mısır unu-tween 80 besiyerinde ürediğinde yalancı hifler boyunca tek tek veya bazen küçük kümeler yapacak biçimde dizilmiş blastokonidyumlar ve aralarda dev hücreler oluşturur. Ancak *Candida* türlerinin kesin tanısı şeker fermentasyon ve asimilasyon deneyleri ile konulur (11).

Asimilasyon paternlerinin değerlendirilmesi için farklı teknikler geliştirilmiştir. 2003 yılında Hazen ve Howell adlı araştırmacılar, kağıt diskler üzerinde yerleşik küçük besiyeri plaklarına farklı karbonhidrat yerleştirerek geliştirdikleri teknikte, spesifik disk etrafında oluşan maya üremesinin mayanın karbonhidratı asimile edebildiğini gösterdiğini belirtmiştir. Bu metod basit ve hızlıdır; bu nedenle rutin laboratuvarlarda kolayca uygulanmaktadır. API 20C, API ID32C gibi farklı ticari kitlerde bu yöntemin modifikasyonu kullanılmaktadır (12).

Fermentasyon testlerinin hazırlanması daha zordur. Klasik testler farklı karbonhidratlar eklenmiş likit besiyeri, fermentasyon kriterleri olan asit üretiminin ölçülmesi için pH değişimini test eden bir renk belirteci ve gaz üretimini belirleyen bir aygıt içermektedir. Çoğu ticari kit sisteminde fermentasyon yöntemi kullanılmamakta, kit sistemleri genellikle asimilasyon testlerine dayanmaktadır (12).

Candida parapsilosis türlerinin fermentasyon ve asimilasyon profillerine baktığımızda glukozu fermente ederken laktozu fermente edemezler. Bazı kökenler sükroz, maltoz ve trehaloz fermentasyonu yaparlar. Glukoz, laktoz, maltoz, trehaloz, D-ksiloz, L-arabinoz, ribitol, D-mannitol ve sükroz yıkımını gerçekleştirirler; ancak potasyum nitrat, laktoz, raffinöz, inositol, salisin, D-arabinoz yıkımını gerçekleştirmezler (11).

2.2. *Candida parapsilosis* Türlerinin Tanısı

Geçmişte *C. parapsilosis*'in monoklonal olduğu düşünülmekte idi; ancak şimdilerde moleküler tiplendirme teknikleri ile 3 farklı türe (genotip I-II-III) ayrılmaktadır. *C. parapsilosis* ismi genotip I izolatlarını temsil ederken, genotip II ve III izolatları sırasıyla *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* adları ile ayrı türler olarak tanımlanmıştır. Bu iki yeni tanımlanan tür fenotipik yönden *C. parapsilosis*'e benzemektedir; fakat genotipik yönden farklılık göstermektedir (13).

Candida parapsilosis ile yakından bağlantılı yeni türlerin tanımlanması RAPD analizi, nükleotid sekans analizi, DNA-DNA hibridizasyonu, prob hibridizasyonu, mitokondrial DNA analizi, multilokus sekans tiplendirme yöntemi, mikrosatellit analizi, genomik DNA'nın *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP) analizi ve *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) analizi gibi farklı moleküler tekniklerle yapılmaktadır (13).

Türler arasında ayırımın yapılması için her 3 türde de yaygınca bulunan *SADH* geninin restriksiyon polimorfizm analizi (PCR-RFLP) önerilmiştir (8).

2.3. *Candida parapsilosis*'in Epidemiyolojisi

Candida parapsilosis doğada yaygınca bulunan bir mikroorganizmadır. Tür sadece toprak, deniz suyu ve bitkilerden izole edilmekle kalmamakta aynı zamanda insan ve memelilerin kommensal bir üyesi olarak mukozal yüzeyler, deri ve tırnaklardan da izole edilebilmektedir (7). Yapılan çalışmalarda sağlıklı konakların ellerinde yüksek oranda maya kolonizasyonu raporlanmış, *C. parapsilosis*'in en yaygın izole edilen maya türü olduğu belirlenmiştir. *C. parapsilosis* en sıklıkla insan ellerinin subungual bölgelerinden izole edilmektedir (3, 14).

Candida albicans, gastrointestinal sistem (GIS) ve genital mukozada kolonize olan en yaygın *Candida* türü olmasına rağmen, *C. parapsilosis* malnutrisyonlu kişilerin dışkılarından, nadiren sağlıklı yenidoğanların ve asemptomatik diabetiklerin orofarinkslerinden izole edilmekte ve kadın genital sistemden izole edilen *Candida*'ların %10'undan azını oluşturmaktadır (15).

Candida parapsilosis kandidiazis olarak tanımlanan farklı enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir patojendir. Tür nozokomiyal fungemi olgularının %30'undan

soyutlanmakta; septik artrit, peritonit, vajinit, endokardit, tırnak ve deri enfeksiyonlarına da neden olmaktadır (16).

Nozokomiyal *C. parapsilosis* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi karmaşıktır ve iyi tanımlanmamıştır; kolonize hastalar, hastane personeli ve türün plastik medikal aletlere yapışması, çevresel yüzeylerde yaşayabilme özelliklerini kapsamaktadır (17). Sağlık bakım çalışanlarının ellerindeki *C. parapsilosis* kolonizasyonu oranının belirlenmesi için yapılan bir çalışmada, analiz edilen 86 sağlık bakım çalışanının %59.3'ünün maya türü taşıdığı; bunlardan en yaygın olanının *C. parapsilosis* (%51) olduğu belirlenmiştir (14). Tayvan'da Chang Gung Çocuk Hastanesi yenidoğan yoğun bakım ünitesinde (YDYBÜ) ortaya çıkan bir *C. parapsilosis* fungemi salgını üzerinde yapılan çalışmada, çok düşük doğum ağırlıklı yenidoğanlar ve bu yenidoğanların sağlık bakıcılarından elde edilen 31 *C. parapsilosis* izolatu analiz edilerek yenidoğanlardan elde edilen kan izolatları ile sağlık bakım çalışanlarından elde edilen izolatlar arasında bağlantı olduğu belirlenmiş, salgının sağlık bakım çalışanlarının elleri vasıtasıyla çapraz enfeksiyondan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (18). Farklı çalışmalarda, sağlık bakım çalışanları ve yenidoğanların direk etkileşimi sırasında kateterlerin *C. parapsilosis*'in kana geçeceği bölgelerden manipüle edilmesi veya yerlerinin değiştirilmesi, likid gliserin destekleri ve topikal sıvılar kullanımı durumlarında oluşan *C. parapsilosis* salgınları bildirilmiştir. Hiperalimentasyon solüsyonları, intravasküler basınç izleme aletleri, oftalmik irrigasyon solüsyonları ve glukoz içerikli solüsyonların kontaminasyonu sonrasında oluşan başka *C. parapsilosis* salgınları da rapor edilmiştir (7).

Steroid gibi malignite için yeni tedaviler ve uygulamaların ortaya çıkması, cerrahi işlemlerin artması, geniş spektrumlu antibiyotiklerin yaygın kullanımı ve uzun süreli hastane yatışı kandidal kan akımı enfeksiyonlarında artışla ilişkilendirilmektedir. Epidemiyolojide *C. parapsilosis* lehine dönüşüm gözlenmesi, son iki dekada özellikle intravasküler aletlerle ilişkilendirilen *C. parapsilosis*'e bağlı kan akımı enfeksiyonu insidansındaki artışa bağlı olabilir (7).

Candida parapsilosis Avrupa'da tüm kandidemi epizodlarının %15-23'ünden izole edilen ikinci veya üçüncü en yaygın etken; Amerika'da 12 yaşından büyük hastalarda üçüncü (%12) sıklıkla, daha genç hastalarda ise ikinci sıklıkla (%34) izole edilen etkindir. Brezilya ve diğer Latin Amerika ülkelerinde kandidemi olgularının %20-30'unu oluşturmakta, erişkin ve pediatrik popülasyonda benzer prevalans göstermektedir (19).

2010 yılında yapılan bir çalışmada YBÜ hastalarında görülen kan akımı enfeksiyonlarının %18,7'sinin *Candida* türleri ile oluştuğu, *C. parapsilosis*'in %77.1 oranı ile ilk sırada yer aldığı belirlenmiştir (20).

Candida parapsilosis YDYBÜ'de *C. albicans*'dan(%61) sonra ikinci sıklıkla (%29) izole edilen türdür. Üstelik bazı YDYBÜ'lerde *Candida sp.* prevalansı *C. albicans*'dan *C. parapsilosis* yönüne kaymıştır. YBÜ'deki bebek hastalarda bu türe bağlı gelişen kan akımı enfeksiyonları için çok sayıda risk faktörü tanımlanmıştır. Bunlar prematür doğum, çok düşük doğum ağırlığı (<1500 gram (gr)), hastanede yatış süresinin uzaması, santral venöz kateter kullanımı, hiperalimentasyon, intralipid, parenteral nutrisyon, H₂ bloker ve özellikle üçüncü kuşak sefalosporinler olmak üzere geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımınıdır (18). Aslında *C. parapsilosis*, gastrointestinal sisteminde *Candida* kolonizasyonu bulunan yenidoğanların yaklaşık 1/3'ünden, sağlıklı yenidoğanların orofarinkslerinden ise %23 oranında izole edilebilmektedir. 1994 yılında Amerika'da George Washington Üniversitesi Hastanesi'nde 82 yenidoğan üzerinde yapılan bir çalışmada, infantların %19'unda *Candida* kolonizasyonu tespit edilmiş, bunların dördünde *C. parapsilosis* sepsisi, birinde *C. albicans* sepsisi geliştiği bildirilmiştir. Anneden bebeğe vertikal transmisyon sıklıkla *Candida* kolonizasyonu ile sonuçlanmaktadır ancak; *C. parapsilosis* bulunan infantlarda, kolonizasyon maternal izolatla açıklanamamıştır. *C. parapsilosis*'in vajinada sık bulunmayan bir tür olması, infantların doğum esnasında bu türe maruziyetini sınırlı hale getirmektedir (3).

Candida parapsilosis grubu varlığı birkaç yıldır bilinmesine rağmen, grup içinde yer alan, *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* adı ile bilinen iki nadir türün epidemiyolojisi hakkında bilinenler azdır. *C. orthopsilosis*'in salgının bir parçası olarak rapor edildiği en az 2 salgın bulunduğu kaydedilmiştir. İlk salgın San Antonio'da bir hastanede raporlanmıştır (21). Diğer salgın ise 2000 yılında, Brezilya'da tanımlanan küçük çaplı bir *C. orthopsilosis* salgınıdır (22). Tipler arasında ayırımın yapılamadığı ve bu nedenle de *C. orthopsilosis* veya *C. metapsilosis* ile oluşmuş olabileceği düşünülen başka *C. parapsilosis* salgınları da raporlanmıştır.

ARTEMIS Antifungal *Surveyans* Programı'nın dünya genelindeki kolleksiyonundan sağlanan 1929 *C. parapsilosis* olduğu düşünülen izolat üzerinde yapılan bir çalışmada, *C. parapsilosis* grubu prevalansının bölgelere göre değiştiği, en yüksek *C. orthopsilosis* prevalansının Güney Amerika'da (%10.9) olduğu belirlenmiştir (23). Bir başka çalışmada da *C. parapsilosis* grubu izolatlarının prevalans oranlarının coğrafik

bölgelere göre değiştiği, *C. parapsilosis* sensu stricto'nun hem yüzeyel hem de invaziv enfeksiyonlarda diğer *psilosis* grubu türlerine göre daha yaygın gözlendiği tespit edilmiştir (24).

Candida parapsilosis grubu türlerinin hematojen enfeksiyonları epidemiyolojisi hakkındaki en kaba veri İspanya'da yapılan popölasyon bazlı bir kandidemi çalışması ile elde edilen 87 olası *C. parapsilosis* izolatının moleküler tanımlaması ile sağlanmıştır. Bu çalışmada *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* izolatlarının enfeksiyon oranlarının sırası ile %5.7 ve %6.8 olduğu belirlenmiştir (19).

2.4. *Candida parapsilosis*'in Virulans Faktörleri

2.4.1. Adherens (Yapışma) ve Slime Üretimi

Candida parapsilosis'in kolonizasyon ve enfeksiyonu fungusun konak hücrelere ve özellikle mukozal yüzeyler olmak üzere konak dokularına adhere olma yeteneğine bağlıdır. İnvaziv medikal aletlere adherens biyofilm oluşumunu kolaylaştırmakta ve konak hasarından korumaktadır. Hücre yüzey hidrofobitesisi *C. parapsilosis*'in yüzeye ilk adherensi ile ilişkilendirilmekte ve slime üretimi *C. parapsilosis*'in plastik kateterlere adhere olma eğilimi ile bağdaştırılmaktadır (3).

Kompleks polisakkarit yapıda biyolojik bir film tabakası olan slime maddesi, mikroorganizmanın konak hücre yüzeyine yapışmasında, kateter ve tüp gibi düz yüzeyli tıbbi aletlere tutunarak buralarda çoğalmasında önemli rol oynar. Diğer taraftan opsonizasyon, fagositoz ve kemotaksis gibi immun mekanizmalara karşı mikroorganizmayı koruyan slime faktörünün, lökosit ve lenfosit etkinliğinde de azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (4).

Slime faktörünün özellikle *Staphylococcus epidermidis*'in neden olduğu kateter enfeksiyonlarında, patogeneizde önemli rol oynadığı bilinmekte, *Candida* kökenlerinin de aynı mekanizma ile ciddi enfeksiyonlara yol açtığı son yıllardaki bazı yayınlarda tartışılmaktadır (4).

Yapılan bir çalışmada, IV hiperalimentasyon alan bir hastanın kateter yüzeyinde oluşan biyofilm içinde *C. parapsilosis* varlığı belirlenmiş; bu nedenle bu organizmanın da *S. epidermidis*'de gözlenen şekilde ekstrasellüler madde üretebileceği ileri sürülmüştür (25).

Bazı raporlarda *C. parapsilosis*'in, kan ve ortopedik aletlerden izole edilen maya türleri arasında relatif olarak yüksek prevalansda olduğu rapor edilmiş ve bu tür ile alet ilişkili enfeksiyonlar arasında bağlantı varlığı ileri sürülmüştür. Ancak türün klinik alet ilişkili enfeksiyonlara eğiliminin, in vitro ve/veya hayvan modellerinde gösterdiği yüksek düzeyde adherens özelliğine atfedileceği hakkında sistematik tarzda bir çalışma yapılmamıştır (26).

Çevresel faktörler *Candida adherensini* etkileyebilir. *C. parapsilosis*'in şekerden zengin hiperalimentasyon solüsyonlarında selektif üreme avantajı bulundurduğu, glukozda üremesini takiben mukozal epitelyal hücrelere adherensinin arttığı gösterilmiştir. Bu bulgu parenteral nutrisyon ile organizmanın oluşturduğu enfeksiyon salgınları arasındaki bağlantının açıklanmasına katkı sağlayabilir. Çevresel koşullar maya hücresi yüzeyindeki bileşikler etkileyebilir ve böylece olasılıkla adherensi kolaylaştırır (26, 27).

Candida parapsilosis'in deri ve kan izolatlarının plastiğe adezyonunun değerlendirildiği bir çalışmada, her iki grup izolatların kendi aralarında belirgin derecede adezyon farklılıkları gösterdiği, izolatların çok düşük değerden yüksek değere varan düzeylerde adherens değerleri olduğu belirlenmiş, iki gruptan izolatların adherensleri arasında ise farklılık olmadığı bildirilmiştir (28). Bir başka çalışmada da kandan elde edilen *C. parapsilosis* izolatları ile diğer vücut bölgelerinden elde edilen *C. parapsilosis* izolatlarının adherens yetenekleri karşılaştırılmış, iki grup arasında anlamlı farklılık olmadığı kaydedilmiştir (29).

2.4.2. Fenotipik Dönüşüm

Mayalardaki fenotipik dönüşüm, somatik mutasyondan daha sıklıkla gözlenen ve spontan yoldan değişik morfolojide kolonilerin oluşması olarak tanımlanan in vitro geri dönüşümlü bir fenomendir. Mayalar pH, sıcaklık ve serum varlığı gibi geniş aralıkta çevresel değişikliklere cevap veren çoklu regülatör yollar geliştirirler. Bu çevresel sinyaller, oluşturduğu morfolojik değişimin sonucu olarak tüm fungal popülasyonda mayahifal dönüşümüne veya kapsül oluşumuna eğilim yaratırlar. Fenotipik değişim aynı zamanda düşük sıklıkta ve rasgele oluşabilir; değişen fenotipler bazı koşullarda seleksiyona uğramalarını sağlayan biyolojik avantajlara sahip olur. Bu durum, maya hücrelerinin farklı konak mikroçevrelerine kalımsal ve kalımsal olmayan

mekanizmalarla hızlıca adapte olmasına olanak tanıyarak, dokulara invazyonuna ve konak immun cevabından kaçışına katkı sağlar (30).

Hem in vivo hem de in vitro gözlenen tabakalı biyofilm yapısı, hifa oluşumu için meydana gelen morfolojik değişimin biyofilm maturasyonunda önemli rol aldığını ortaya çıkarmıştır. Yapılan bir çalışmada hifa veya maya formunda sabitlenen mutant hücrelerin her iki türünün de biyofilm halinde geliştiği, buna rağmen oluşan biyofilmin rudimenter kaldığı ve vahşi tip biyofilmler kadar stabil olmadığı raporlanmıştır (31).

2.4.3. Biyofilm Üretimi

Candida'ların majör virulans faktörlerinden biri farklı ortamlara adapte olabilmeleri ve biyofilm oluşturma yetenekleridir. Biyofilm, ekstrasellüler matriks ile çevrelenmiş yüzeye yapışık mikroorganizma topluluğudur ve en yaygın görülen mikrobiyal üreme formudur (3, 32).

Kandidal biyofilmler 3 aşamada oluşmaktadır. Erken fazda (0-11 saat) maya hücreleri ürüne yapışır, ara fazda (yaklaşık 12-30 saat) blastosporlar karbonhidrattan zengin ekstrasellüler matriks oluştururken aynı zamanda çoğalır, agregre olur ve mikroorganizma kümeleri oluşturur. Olgunlaşma fazında (yaklaşık 31-72 saat) maya hücreleri kalın ekstrasellüler matriks tabakası ile tamamen kaplanır (33).

Silikon elastomer ve polivinil klorid gibi düz, hidrofobik yüzeylerdeki tipik bir biyofilm tabakası iki farklı komponentten oluşur. Bunlar; bir ekstrasellüler polimerik madde ile çevrelenmiş yüzeye yapışık blastospor tabakası ve bunun üzerinde bulunan hifal element tabakasıdır. Hifal hücreler arasındaki su kanalları, çevreden sağlanan besin maddelerinin alt tabakalara difüzyonunu kolaylaştırır ve atık maddelerin uzaklaştırılmasını sağlar (33).

Biyofilm oluşumu hifal üreme yolunun aktivasyonunu gerektirmektedir. *Efg1* ve *cph1* gibi hifal üreme regülatörlerinden yoksun mutantlar biyofilm üretememektedir. *Candida* türleri, plastik veya başka yüzeylere yapışmayı takiben hücrede oluşan yapısal ve davranışsal değişim sonucunda biyofilm oluşturmaya başlar. *C. albicans*'da maya formundan hifal forma dimorfik dönüşüm ile biyofilm üretimi arasında belirgin bağlantı bulunmakta, hifal üreme formundan yoksun vahşi tip *C. albicans* suşları kateter diskleri üzerinde sadece ince bir bazal maya tabakası oluştururken, filamentöz formda üreyen hücreler yoğun biyofilm tabakası üretmektedir (35).

Candida parapsilosis'in farklı koloni morfolojileri arasında dönüşüm olduğu gösterilmiştir (36). Bir *C. parapsilosis* izolatının buruşuk, konsantrik, kar topu (*snowball*) tipi, R (*rough*, kaba) tipi ve S (*smooth*, düz) tipi olmak üzere 5 farklı fenotipi tanımlanmıştır (37). Yapılan bir çalışmada hücre morfolojisinin koloni fenotipine göre farklılık gösterdiği, buruşuk ve konsantrik fenotiplerin baskın olarak psödohifal formda bulunduğu, konsantrik fenotipteki hücrelerin yaklaşık %45 oranında daha geniş olduğu, özellikle konsantrik fenotipte olmak üzere hücrelerin uzunluğu boyunca ve tomurcuk boyunlarında kitin dağılımı gösterdiği; düz fenotipteki hücrelerin ise küçük ve maya formunda bulunduğu, baskın olarak tomurcuklanma bölgelerine lokalize kitin içerdikleri belirlenmiştir. Aynı zamanda biyofilm miktarının fenotipe spesifik ve suş kaynağından bağımsız olduğu, buruşuk fenotip gösteren bir izolatın aynı fenotipteki başka izolatlarla eşit miktarda biyofilm ürettikleri belirlenmiştir. Maya formunda üreyen düz fenotipteki *C. parapsilosis* hücrelerinin plastik yüzeylerde az miktarda biyofilm oluşturduğu, baskınca filamentöz form oluşturan konsantrik fenotipteki hücrelerin ise yoğun biyofilm ürettikleri bildirilmiştir. Sonuç olarak *C. parapsilosis*'in filamentasyon oluşturması ile biyofilm üretmesi arasında belirgin korelasyon olduğu raporlanmıştır (35).

Candida parapsilosis suşları gerçek hifa oluşturmaz, fakat yalancı hifa veya başka filamentöz formlarda ürer. *C. parapsilosis* biyofilmlerinin *C. albicans*'ın oluşturduğu biyofilmler kadar yoğun olmadığı; bu durumun türün üreme koşullarından kaynaklanabileceği, özellikle yüksek glukoz konsantrasyonu bulunan ortamlarda türün biyofilm üretiminde önemli ölçüde artış gösterdiği belirtilmiştir (3, 6, 35).

Candida parapsilosis'in IV kateter enfeksiyonları ile ilişkilendirilen bir maya türü olduğu ve nadiren de ekstrasvasküler veya hematojen yayımlı enfeksiyonların da nedeni olduğu belirlenmiştir. Yüksek glukoz konsantrasyonunda üreme ve prostetik materyallere yapışma özellikleri *C. parapsilosis*'e, vasküler aletleri kolonize ve enfekte etmesi için selektif avantaj kazandırabilmektedir. Bu gözlemlere uygun bir bulgu *C. parapsilosis*'in fazla miktarda slime üretebilmesidir. Yapılan bir çalışmada türün intravenöz hiperalimentasyon alan hastaların kateter yüzeylerinde fazla oranda biyofilm oluşturdukları rapor edilmiştir (17).

Candida parapsilosis biyofilmleri santral ve periferik venöz kateterler, hemodiyaliz ve peritoneal diyaliz kateterleri, intrakardiyak prostetik aletler ve prostetik eklemler gibi farklı medikal aletler üzerinde oluşabilir. Tür, insan derisinin kommensal üyesi

olduğundan, özellikle el hijyenine dikkat edilmeyen sağlık merkezlerinde, kullanılması öncesinde veya kullanılması esnasında medikal aletlerle etkileşime geçebilir (3).

Medikal aletlerle ilişkilendirilen kandidal enfeksiyonların tedavisinde sınırlı sayıda antifungal ilaç kullanılabilir ve enfekte aletlerin genellikle uzaklaştırılması gerekir. Biyofilm içinde yer alan *Candida*'lar, serbest yaşam formları ile karşılaştırıldığında antimikrobiyal ajanlara yüksek düzeyde rezistans gösterirler (33).

2.4.4. Salgısal Aspartik Proteinaz Enzimi (Sap) Üretimi

Candida albicans ve başka bazı *Candida*'lar tek nitrojen kaynağı olarak protein içeren besiyerlerinde proteinaz salgırlar. Bunlar *C. albicans* ve *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*)'de proteolitik ve keratinolitik etkinlik gösteren karboksil proteinaz; *C. parapsilosis*'de proteolitik etkinliği olan aspartik proteinaz ve *C. albicans*'daki kollagenolitik enzimlerdir (38).

Candida proteinazları ilk olarak Staib tarafından *C. albicans*'da keşfedilmiştir. Ardından, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* izolatlarının çoğunda da ekstrasellüler proteolitik aktivite belirlenmiştir. Hücre dışı salgı asit proteinazı 1993'de Amerika Mikrobiyoloji Cemiyeti tarafından salgı aspartik proteinazı adı ile kabul edilmiş ve *C. albicans*'ın aspartik proteinaz ailesini kodlayan birçok gen (*SAP* geni) belirlenmiş; *SAP* gen ekspresyonunun bu mantarın mayadan hife geçişi (dimorfizmi) ve fenotipik değişimi ile ilgili olduğu ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalarda *Candida* türlerinin salgısal aspartik proteinaz üretme yeteneklerinin farklı olduğu, bu proteinazların bovine serum albümini (BSA) gibi yüksek moleküler ağırlıklı nitrojen kaynağı bulunduran ve pH'ı 5.0 civarında olan *in vitro* ortamlarda rutin olarak eksprese edildiği bildirilmiştir. Klinikle ilişkili diğer *Candida* türleri (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. kefyr* ve *C. guilliermondii*) hücre dışı proteinaz üretmiyor gibi görünmektedir. Bu durum *Candida* türlerinin insandaki virülans sıralamasına da yansımaktadır. Yüksek proteolitik etkinliğe sahip *C. albicans* kökenlerinin *in vivo* proteinaz salgılayarak farelerde daha yüksek oranda ölüm ve/veya kolonileşmeye sebep oldukları gösterilmiştir. *C. parapsilosis*'de ise proteolitik aktivite ve virülans arasında korelasyon belirlenmemiştir. Proteolitik potansiyeline rağmen tür insanlarda, hayvanlarda ve *in vitro* ortamlarda düşük virülans göstermektedir (38, 39, 40).

Candida tropicalis ve *C. albicans* aspartik proteinazları 41-43 kilodalton (kDa) ağırlığında ve izoelektrik noktası 4.5 olan glikoproteinlerdir. *C. parapsilosis* aspartik

proteinazları ise 33 kDa ağırlığında ve izoelektrik noktası 5.7 olan glikoproteinlerdir. Kandidal aspartik proteinazlar pH 4.0-4.5 arasında optimal aktivite gösterirken, 2.5'in altında ve 5.0'in üzerindeki pH değerlerinde inaktive olmaktadır (41). Sap'lar konak mukozal membranları yıkarak ve immünoglobulin G (IgG) ağır zinciri, α_2 -makroglobulin, C3 protein, β -laktoglobulin, laktoperoksidaz, kollagen ve fibronektin gibi önemli immünolojik ve yapısal savunma proteinlerini parçalayarak konak dokuya invazyonu ve kolonizasyonu kolaylaştırmaktadır (3).

Sap öncül enzimleri, üç boyutlu yapısında rol alan bir amino-terminal sinyal peptidi, iki korunmuş aktif aspartik rezidü bölgesi ve dört sistein rezidüsü içermektedir. Matür enzim ise sinyal peptidi ve Kex2 enzimi ile gerçekleştirilen proteoliz işleminden sonra ortaya çıkmaktadır (42).

Candida parapsilosis'de salgısal aspartik proteinaz kodlayan 3 gen tanımlanmış ve *SAPP1*, *SAPP2* ve *SAPP3* olarak isimlendirilmiştir. *SAPP3* gen ürünü gizemini korumasına rağmen, diğer genlerin ürünleri olan Sapp-1p ve Sapp-2p izoenzimleri üzerinde enzimatik araştırmalar yapılmıştır (43).

SAPP2 geni asıl haliyle yalancı gen (pseudogen) olarak sınıflandırılrsa da, 1993 yılında yapılan bir çalışmada, *C. parapsilosis* kültürü ortamından *SAPP2* gen ürünü olan Sapp-2p izolasyonu sağlanmış; Sapp-2p'nin, *SAPP1* gen ürünü olan Sapp-1p ile karışım halinde bulunduğu ve kültür supernatanından elde edilen enzimin yaklaşık %20'sini oluşturduğu gösterilmiştir (44). 2006 yılında ise Sapp-1p ve Sapp-2p izoenzimleri üzerinde enzimatik çalışmalar yapılarak Sapp-2p'nin proteolitik aktivitesi gösterilmiş; bir başka çalışmada ise her iki enzimin de geniş substrat spesifitesi gösterdiği, fakat katalitik aktiviteleri ve ekspresyon paternlerinde farklılıklar olduğu, *SAPP2* geninin yapısal olarak transkribe edildiği, *SAPP1* transkripsiyonunun ise tek başına nitrojen kaynağı olan eksojen proteinlerin varlığında indüklendiği belirlenmiştir (43, 45).

2.4.5. Fosfolipaz Üretimi

Fosfolipaz terimi gliserofosfolipidlerde bulunan bir veya birden fazla ester bağlarını hidroliz edebilen heterojen enzim grubunu tanımlar. Tüm fosfolipazlar için tek hedef substrat fosfolipaz olmasına rağmen, her bir enzim kendine spesifik bir ester bağını hidroliz eder. Bu nedenle fosfolipazların ayırdedilmesi ve fosfolipid molekülündeki spesifik hedef bağın tanımlanması için A,B,C ve D sınıflandırması kullanılır (46).

Mikroorganizmaların konak hücreye invaze olması için penetre olmaları ve hücre dışı membranı hasarlamaları gerekir. Bu aşama olasılıkla fizyolojik veya enzimatik yol ile veya bu ikisinin kombinasyonu ile gerçekleşir. Fosfolipidler ve proteinler konak hücre membranında en yoğun bulunan kimyasal bileşiklerdir. Bu nedenle, fosfolipaz ve proteinaz gibi bu kimyasal sınıfı hidrolize edebilen enzimlerin konak hücre invazyonu esnasında oluşan membran yıkımı aşamasında yerlerini almaları muhtemeldir (46).

Candida albicans'da ekstrasellüler fosfolipaz üretimi, 1960'lı yıllarda yumurta sarısı veya lesitin içeren katı ortamlarda bu mayaların üretilmesi ve çökmüş lipid ürünlerinin analiz edilmesiyle keşfedilmiştir (47, 48).

Yapılan bir çalışmada hem yumurta sarısı bazı yöntemler ile hem de kolorimetrik yöntemler ile non-*albicans Candida* türlerinin ekstrasellüler fosfolipaz ürettikleri belirlenmiş; ancak non-*albicans Candida* türlerinin *C. albicans*'a göre anlamlı derecede düşük miktarlarda fosfolipaz ürettiği bildirilmiştir (49).

Fosfolipazların *C. parapsilosis*'deki rolleri iyi bilinmemekte ve bu virulans faktörü hakkında çelişkili veriler bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar *C. parapsilosis* suşlarında %51 kadar fosfolipaz aktivitesi olduğunu, diğer bazıları ise fosfolipaz aktivitesi göstermediklerini belirtmektedir. Brezilya Sao Paulo'da kandidüriye neden olan 4 *C. parapsilosis* suşunun sadece birinde fosfolipaz aktivitesi gözlenmiştir. Bu uyumsuzlukların test edilen suşlar arasında bulunan biyolojik farklılıklardan ve örnek sayısının yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bundan başka, sistemik ve yüzeysel izolatların fosfolipaz üretiminde farklılıklar olduğunu belirleyen ve fosfolipaz aktivitesini sadece kan izolatlarında tanımlayan araştırmacılar da bulunmaktadır. Bazı araştırmacılara göre ise yüzeysel *C. parapsilosis* izolatları sistemik izolatlardan daha yüksek oranda fosfolipaz aktivitesi göstermektedir(3).

2.4.6. Lipaz Üretimi

Lipazlar triaçilgliserollerin sentezini ve hidrolizini katalize ederler; yüksek sıcaklıklarda ve organik çözücülerde stabil kalmaları ve proteolize direnç göstermeleri ile karakterize edilirler. Mikrobiyal ekstrasellüler lipazların, besinsel gereksinim için lipidleri parçalama, konak hücre veya dokuya adezyon, başka enzimlerle sinerjistik etkileşim, fosfolipaz aktivitesinin birlikteliğinde spesifik olmayan hidroliz, immun hücreleri etkileme yolu ile inflamasyonu başlatma, koruyucu mikrofloranın lizisi ile defans mekanizması

geliştirme gibi olası rolleri bulunur. *C. parapsilosis*'de *CpLIP1* ve *CpLIP2* olarak tanımlanan iki lipaz geni bulunmakta, bunlardan sadece *CpLIP2* aktif protein kodlamaktadır (3).

Ekstrasellüler lipaz proteinlerinin *C. parapsilosis*'in lipid içerikli solüsyonlarda proliferasyonu için gerekli olduğu farzedilir, böylece lipazlar zengin lipid içerikli ortamlarda besin sağlayan ve üremeyi kolaylaştıran kolonizasyon faktörleri olarak değerlendirilir. *CpLIP2* ve bu genin kodladığı enzim, *C. parapsilosis*'in özellikle lipid emülsiyonlarındaki proliferasyonunun inhibe edilmesi için potansiyel bir hedef oluşturur (50).

Lipaz inhibitörlerinin, rekonstite insan doku enfeksiyonunda beliren doku hasarını önemli derecede azalttığı gösterilmiştir (51). Araştırmacılar lipaz genleri *CpLIP1* ve *CpLIP2*'de gen delesyonları bulunan mutantların insan ağız epitelyumunda minimal değişiklik oluşturduğunu ve doku yüzeyi ile etkileşiminin önemli derecede azaldığını belirlemiş; böylece *C. parapsilosis*'in salgıladığı lipazın hastalık patogenezinde rol oynadığını ileri sürmüştür. Aynı zamanda lipaz üretimi ile biyofilm formasyonu arasında korelasyon bulunduğu, lipazdan yoksun *C. parapsilosis* mutantlarının biyofilm üretiminin önemli derecede azaldığı da belirtilmiştir (50).

2.4.7. Esteraz Üretimi

Lipolitik enzim araştırmaları kapsamında, *Malassezia furfur*'dan elde edilen hücre ekstresinde lipaz aktivitesi belirlenmiş, bu çalışma serisinin devamı olan bir başka çalışmada, *C. albicans*'ın karbon kaynağı olarak *Tween 80*'in kullanıldığı ortamda ekstrasellüler esteraz sekrete ettiği bildirilmiştir. Çalışmada belirlenen ekstrasellüler enzim, hidrolitik aktivitesini uzun zincirli yağ asidi bulunduran suda çözünür monoesterler üzerinde gösterdiğinden esteraz olarak tanımlanmıştır (52).

Ekstrasellüler esterazın ısı-labil olduğu, maksimum aktivitesini pH 5.5'de gösterdiği ve aktivitesinin bir lipaz aktivatörü olan sodyum taurokolat eklenmesiyle stimüle olduğu belirlenmiştir (52).

Mikroorganizmaların lipolitik aktiviteleri 1956 yılında Sierra tarafından geliştirilen suda çözünür *tween* bileşiklerinin kullanıldığı besin ortamlarında gösterilmiştir. Araştırmacı, *tween*'li ortamların, hücrelerin lipaz formasyonuna adapte olmaları için yağ ürünleri ile optimal etkileşimini sağlaması, lipaz spesifite çalışmalarında kullanılabilirliği

ve sonuçların direkt görsel yolla değerlendirilmesine imkan vermesi nedenleriyle lipaz araştırmaları için ideal olduğunu savunmuştur (53).

Candida türlerinin farklı *tween*'li substratlar için lipolitik aktivite gösterdiği ve esteraz aktivitelerinin yaygın görüldüğü belirlenmiş; *tween* 80 opasite testinde görsel opasitenin oluşması için ise ortamda yüksek yoğunlukta *tween* bileşiği ve buna ek olarak kalsiyum tuzlarının kullanılması gerektiği raporlanmıştır. Çalışmalarda esteraz indüksiyonunun ortamdaki suşa ve *tween* çeşidine göre değiştiği ileri sürülmüştür (52, 54).

Tween 80 opasite testinin *Candida* türlerinde esteraz aktivitesinin saptanmasının yanı sıra *Candida dubliniensis* (*C. dubliniensis*) kökenlerinin *C. albicans*'tan ayrılmasında da kullanılabileceği belirtilmiş ve *C. dubliniensis* türlerinin *Tween* 80 agarda inkübasyonun üçüncü gününde, opasite açısından *C. albicans* suşlarından açıkça farklılık gösterdiği bildirilmiştir (55).

2.5. *Candida parapsilosis*'in Kliniği

2.5.1. Fungemi

Candida parapsilosis parenteral hiperalimentasyon, intravasküler aletler ve kontamine oftalmik solüsyonlarla ilişkilendirilen fungemi ve invaziv kandidiazisin iyi bilinen bir nedenidir (56). *C. parapsilosis* fungemisinde dokulara yayılma ve arkasından derin yerleşimli enfeksiyonlar gelişebilmekte, mortalite oranı %4-45 arasında seyretmektedir. 2002-2003 yılları arasında İspanya'da fungemi üzerine yapılan bir araştırmada, olguların %23'ünde *C. parapsilosis* belirlenmiş, bunların %51'inin intravasküler kateterlerle ilişkilendirildiği bildirilmiştir. Klinik yönden bakıldığında *C. parapsilosis* enfeksiyonları ateş (%100), septik çok (%22), renal yetmezlik (%10) ile seyretmektedir. Olgulardaki altta yatan hastalıklar ise malignansi (%27), transplantasyon (%16) ve diabetes mellitus (DM) (%9)'dir (3).

2.5.2. Endokardit

Fungal endokardit olgularından %94.1 oranla *Candida* türleri izole edilmekte, bunların çoğu kardiyak cerrahiye takiben gelişmekte, *C. parapsilosis* tanımlanan olguların

%17'sinden sorumlu tutulmakta ve *C. albicans*'dan sonra ikinci sırayı temsil etmektedir (3).

Candida parapsilosis'e bağlı gelişen endokardit olguları genellikle fungemi esnasında ve meydana gelen doku hasarının enfeksiyona eğilim yaratması sonucunda oluşmaktadır. Genellikle enfekte olan kardiyak bölgeler aortik kapak (%56.9), mitral kapak (%29.1), triküspid kapak (%4.1), ventriküler duvar (%2.8) ve pulmoner kapaktır (%1.4). *C. parapsilosis* endokarditinin mortalite ve sıklık oranları *C. albicans*'a benzer dağılım göstermekte, mortalite oranı %41.7-65 arasında seyretmektedir (3).

2.5.3. Menenjit

Candida parapsilosis fungal menenjitin sık görülmeyen nedenlerindedir. 1966-1994 yılları arasında yayınlanan farklı kandidal menenjit raporlarında *C. albicans*'a bağlı toplam 116 (%90.1) menenjit olgusu, buna karşılık *C. parapsilosis*'e bağlı sadece 2 (%1.6) menenjit olgusu bildirilmiştir. 1998-2001 yılları arasında Slovakya'da yapılan bir başka çalışmada ise 13 nozokomiyal kandidal menenjit olgusunun 3'ünde (%23.1) *C. parapsilosis* belirlenmiş, bu olguların birinin prematür, diğer ikisinin epilepsi hastası olduğu bildirilmiştir (3).

2.5.4. Peritonit

Fungal peritonitte majör predispoze edici faktör antibiyotikle tedavi edilen bakteriyel peritonit hikayesidir; bu durumda fungal üreme kolaylaşmaktadır. Yapılan bir çalışmada *C. parapsilosis*'e bağlı gelişen 55 fungal peritonit hastasının %87.3'ünün, bir başka çalışmada 7 hastanın %71.4'ünün geçmişte antibiyotik kullandığı belirlenmiştir. *C. parapsilosis* peritoniti klinik olarak bulanık diyalizat akıntısı, abdominal ağrı, ateş ve barsak obstruksiyonu ile ilişkilendirilmekte, semptomları diğer *Candida* türleri ve bakterilerin oluşturduğu peritonit semptomlarına benzemektedir. Bu nedenle, fungal peritonit nedenleri yanlış olarak bakteriyel patojenler olarak değerlendirilmekte, sistemik antibakteriyel ajan kullanımına neden olmakta; böylece fungal hastalık hızlıca ilerlemektedir (3).

Candida albicans'ın peritonit olgularından en sık izole edilen ajan olduğuna inanılmasına rağmen, sürekli ayaktan periton diyalizi (SAPD) alan hastalarda *C.*

parapsilosis'in baskın tür olduğuna ilişkin çok sayıda rapor bulunmaktadır. Son dönemlerde yapılan bir çalışmada *Candida* türlerine bağlı gelişen fungal peritonit oranının %86 (19 olgu) olduğu raporlanmış, bunların %41'inin (9 olgu) *C. parapsilosis* ile oluştuğu bildirilmiştir (57). *C. parapsilosis* peritonitinde apse formasyonu ve kateter çıkarılmasına rağmen peritonitin uzaması gibi komplikasyonlar gelişmekte, bunların gelişme oranları diğer *Candida* türlerinden daha yüksek seyretmektedir (3, 7).

2.5.5. Artrit

Fungal artritler nadir görülmekte ve sıklıkla *Candida* türleri ile oluşturulmaktadır. Şahsi olgu raporları *C. parapsilosis*'in sıklıkla artrosentez veya protez implantasyonunu takiben eklemleri enfekte ettiğini göstermiştir. 1992'den bu yana sadece 8 *C. parapsilosis* artrit tanımlanmış, bunların 7'sinin eklem protezi yerleşimi, eklem injeksiyonu ve artrosentez gibi işlemleri takiben geliştiği belirtilmiştir (3).

2.5.6. Göz Enfeksiyonları

Candida parapsilosis özellikle operasyon sonrası gelişen endoftalmit ve keratit gibi invaziv oküler hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. *C. parapsilosis* endoftalmiti katarakt ekstraksiyonu, kortikosteroidli göz damlalarının kullanımı, ekstrakapsüler katarakt ekstraksiyonu, intraoküler lens implantasyonu, topikal ve subtenon (göz içi) steroid uygulaması ve intrakapsüler katarakt ekstraksiyonu sonrasında gelişmektedir (3).

Keratit olgularında gözlenen klinik, hastadan hastaya değişkenlik göstermekte; *C. parapsilosis* keratiti kliniğinde kızarıklık, fotofobi, ağrı, görmede azalma, sarı-beyaz bir infiltrat ve diğer mikrobiyal keratit formlarından ayırdedilemeyen özellikler gösteren nemli, nekrotik stromal inflamasyonla sonuçlanan ciddi hastalık tablosu bulunmaktadır (3).

2.5.7. Onikomikoz

Geçmiş yıllarda *C. parapsilosis*, tırnağın patolojik lezyonlarının nadir nedeni olarak anılmakta idi, fakat türün *Candida* onikomikozuna neden olan en yaygın etyolojik ajan olduğuna dair ifadeler artmaktadır. *C. parapsilosis*'in oluşturduğu tırnak enfeksiyonları raporlarına göre, daha çok proksimal subungual onikomikoz veya total distrofik

onikomikoz kliniği gösteren *C. albicans*'ın aksine türün kliniği distal tırnak hastalığı formundadır. *C. parapsilosis*'e bağlı gelişen tırnak enfeksiyonları için risk faktörleri tırnakta travmatik distrofi hikayesi ve bahçeyle uğraşmak gibi aktiviteler esnasında toprağa maruziyettir. Melanoşinin gözlendiği nadir bir *C. parapsilosis* onikomikoz olgusu da tanımlanmıştır (3, 7).

2.5.8. Vulvovajinit

Candida parapsilosis fungal vulvovajinit olgularının nadir bir nedenidir. Belçika'da bir üniversite hastanesinde aralarında sadece 39 klinik kandidiyazisi bulunan 612 hastadan elde edilen 123 pozitif vajinal swab örneklerinde en yaygın izole edilen ajan %68.3 oranı ile *C. albicans* olurken; *C. parapsilosis* %8.9 oranla üçüncü sırada yer almıştır (3).

Candida parapsilosis kaşıntı, yanma, dispareni ve vajinal akıntı gibi vulvovajinal semptomlardan sorumlu olabilmekte; fakat aynı zamanda asemptomatik de seyredabilmektedir (7).

2.5.9. İdrar Yolu Enfeksiyonu

Son dönemlerde *C. parapsilosis*'e bağlı primer idrar yolu enfeksiyonları artmakta ve üriner kateterlerin varlığı ile ilişkilendirilmektedir. Mikroorganizmanın kateter yüzeyine yapışması kolonizasyonu ve enfeksiyonu için belirleyici faktördür (7).

2.6. *Candida parapsilosis*'in Tedavisi:

İnvaziv *C. parapsilosis* hastalığının tipik tedavisi, yabancı cismin uzaklaştırılması ve sistemik antifungal uygulanımından ibaret olmasına rağmen, halen bu hastalığın tedavisinde görüş birliği sağlanamamıştır. Amfoterisin B geçmişten bu yana en yaygın kullanılan antifungal ajandır. Enfeksiyöz suşlarda amfoterisin B direnci bulunan şahsi olgu raporları yayınlanmış ve çalışmalar in vitro ortamda *C. parapsilosis*'in amfoterisin B'ye gösterdiği rezistans oranını %2-3 olarak belirtmiştir (3).

Flukonazol amfoterisin B'ye alternatif olarak en yaygınca kullanılan ajandır. İn vitro duyarlılık testleri, *C. parapsilosis*'in flukonazol direncinin %0-4.6, ortalama MIC₅₀ ve

MIC₉₀ değerlerinin sırasıyla 0.5-1 mikrogram/ml ($\mu\text{g/ml}$) ve 1-2 $\mu\text{g/ml}$ olduğunu göstermiştir (3).

Candida parapsilosis'in diğer azollerden olan itrakonazole gösterdiği direnç oranının %1.5-4 olduğu, vorikonazol MIC₅₀ ve MIC₉₀ değerlerinin ise amfoterisin B ve daha eski azollere göre düşük olduğu belirtilmiştir. Vorikonazole karşı in vitro direnç nadir görölmektedir ve erken raporlar duyarlılığın %100 olduğunu belirtmektedir. Son dönemlerde yayınlanmış bir raporda, 9371 *C. parapsilosis* izolatının sadece %1.9'unun vorikonazole dirençli olduğu, flukonazole dirençli izolatların ise %36.7'sinin vorikonazole duyarlı olduğu belirtilmiştir. Bu, aynı zamanda azoller arasındaki çapraz direnç varlığına işaret etmektedir (3).

Flusitozin genellikle kandidal menenjit olgularında ve amfoterisin B veya azollerle beraber kullanılmaktadır. 1975 yılında yapılan bir çalışmada *C. parapsilosis*'de %23 oranında in vitro flusitozin direnci saptanmasına rağmen, son yayınlarda rezistans oranı %2-6.4 arasında belirtilmiştir (3).

Ekinokandinler en yeni antifungal ajanlardır. *C. parapsilosis*'in caspofungin MIC değerleri diğer *Candida* türlerinden daha yüksektir. Bu duyarlılık paterni diğer ekinokandin türevlerinde de görölmektedir. Özellikle amfoterisin B, flukonazol veya her iki ajana dirençli *C. parapsilosis* suşları ile ilgili olgularda, yüksek MIC düzeylerine rağmen bu antifungallerin in vivo ve in vitro ortamlarda etkene karşı aktif olduğunu gösteren yayınlar vardır (3).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. *Candida parapsilosis* İzolatları ve Standart Kökenler

Bu çalışmaya 15.02.2010-25.01.2011 tarihleri arasında farklı klinik ve polikliniklerden Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Mikrobiyoloji AbD Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na gelen çeşitli örneklerden izole edilen 413 non-*albicans Candida* türü arasından *C. parapsilosis* grubu olarak tanımlanan 42 izolat dahil edildi (Tablo 1).

Maya kökenlerinin tür ayırımının ve çeşitli virulans faktörlerinin araştırılmasında yapılan testlerin kontrolünde, *C. parapsilosis* sensu stricto için ATCC 22019 standart izolatu ve AM 2001/0013 klinik izolatu, *C. orthopsilosis* için J98/226 klinik izolatu, *C. metapsilosis* için J 96 0161 klinik izolatu (Odds F, MacCallum D, School of Medical Sciences, University of Aberdeen, Foresterhill, Aberdeen, UK) kullanıldı.

Tablo 1. Çalışmada Kullanılan Maya Kökenleri

No	İzolât No	Materyal	İzolâtın Elde Edildiği Birim	Tür
1	C-38	Kan	PYBÜ	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
2	C-39	İdrar	PYBÜ	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
3	C-40	İdrar	Beyin Cerrahi Servisi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
4	C-41	İdrar	PYBÜ	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
5	C-52	İdrar	Üroloji Poliklinik	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
6	C-64	İdrar	Pediyatri Süt Çocuğu Servisi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
7	C-68	İdrar	Pediyatri Cerrahi Poliklinik	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
8	C-73	İdrar	Üroloji Servisi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
9	C-81	Boğaz	Dahiliye Onkoloji Servisi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
10	C-120	İdrar	Organ Nakli Ünitesi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
11	C-121	Kan	NYBÜ	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
12	C-139	İdrar	GHYBÜ	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
13	C-141	İdrar	Pediyatri Nefroloji Poliklinik	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
14	C-170	Kan	Yanık Ünitesi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
15	C-171	Kan	PYBÜ	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
16	C-174	İdrar	Pediyatri Süt Çocuğu Servisi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
17	C-177	İdrar	Üroloji Poliklinik	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
18	C-196	Yanık	Yanık Ünitesi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
19	C-203	Kan	Pediyatri Hematoloji Servisi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
20	C-231	İdrar	Pediyatri Cerrahi Poliklinik	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
21	C-232	Yanık	Yanık Ünitesi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
22	C-249	TAK	Kardiyovasküler Servis	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
23	C-269	İdrar	Dahiliye Hematoloji Servisi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
24	C-275	İdrar	Üroloji Servisi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
25	C-276	Kan	NŞYBÜ	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
26	C-282	Yara	Dahiliye Onkoloji Servisi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
27	C-287	Kan	PYBÜ	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
28	C-292	İdrar	Üroloji Poliklinik	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
29	C-308	İdrar	DYBÜ	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
30	C-311	İdrar	Dahiliye Servisi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
31	C-328	TAK	CYBÜ	<i>C. metapsilosis</i>
32	C-339	Kulak	KBB Poliklinik	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
33	C-348	İdrar	Üroloji Servisi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
34	C-351	Kulak	KBB Poliklinik	<i>C. orthopsilosis</i>
35	C-352	TAK	KBB Servisi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
36	C-357	Kan	Üroloji Servisi	<i>C. metapsilosis</i>
37	C-359	Kulak	KBB Poliklinik	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
38	C-362	Kulak	Beyin Cerrahi Servisi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
39	C-394	TAK	DYBÜ	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
40	C-396	İdrar	GHYBÜ	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto
41	C-397	Kan	NYBÜ	<i>C. metapsilosis</i>
42	C-419	Ağız içi	Dahiliye Onkoloji Servisi	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto

3.2. Solüsyonlar

3.2.1. Agaroz Jel ve Poliakrilamid Jel Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar

3.2.1.1. 5X Tris-Borate-EDTA (TBE) Tamponu

54 gr Tris Base (Amresco, ABD)

27.5 gr Borik asid (Borsaure, Almanya)

3.72 gr EDTA (BioBasic Inc, Kanada)

1000 ml distile suda magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözdürüldü. Ardından %50'lik Hidroklorik Asit (HCL) (Riedel-de Haen, Almanya) ile pH'ı 8.3'e ayarlandı.

3.2.1.2. 10XTAE Tamponu

48.4 gr Tris-base (Amresco, ABD)

2.92 gr EDTA (BioBasic Inc, Kanada)

10.0 ml Glacial asetic asit (Merck, Almanya) ve bir miktar deiyonize su bir balon içerisinde magnetik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak çözdürüldü. Ardından karışım deiyonize su ile 1 lt'ye tamamlandı.

3.2.1.3. 1/29 Akrilamid/bisakrilamid Solüsyonu

1 gr akrilamid (Sigma, Almanya)

29 gr bisakrilamid'in (Sigma, ABD) 100 ml deiyonize suda çözdürülmesiyle elde edildi. Süzülerek + 4 ° C de saklandı.

3.2.1.4. %10'luk Ammonium Persulphate (APS)

Bir ependorf içinde 0.1 gr APS'nin (Sigma, Almanya) 1 ml distile suda çözdürülmesi ile elde edildi. Taze hazırlandı.

3.2.1.5. Etidyum Bromür Solüsyonu

Etidyum bromür (Fischer, ABD) 10 mg/ml olacak şekilde distile su içerisinde çözüldü ve oda ısısında ışıktan korunarak saklandı.

3.2.2. Polimeraz Chain Reaction (PCR) Karışımı İçin Kullanılan Solüsyonlar

Deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) Mix (Roche, Almanya; Fermentas, ABD): 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine 100 mM'lık dTTP, dATP, dGTP, dCTP'nin 20'şer mikrolitresi (μ l), 720 μ l steril distile su ile vortekslenerek karıştırıldı. 200 μ l'lik hacimlerde steril ependorf tüplerine aktararak kullanılmaya kadar -20°C 'de muhafaza edildi.

3.2.3. Agaroz Jel Hazırlanması

40 ml sulandırılmış TBE tamponuna %2 oranında agaroz (Quantum, ABD) eklenerek mikrodalga fırında (Vestel, Türkiye) eritildi. 50°C 'ye soğutulunca içerisine 2.5 μ l etidyum bromür (Fischer, ABD) eklendi, karıştırılarak jel kabına döküldü. Jel büyüklüğüne uygun tarak kullanılarak jelde örnek kuyucukları oluşturuldu. Üzerine yüzeyini kaplayacak şekilde TBE tamponu döküldü.

3.2.4. Poliakrilamid Jel Hazırlanması

Çalışmada %10'luk poliakrilamid jel kullanıldı. Bunun için sırası ile 6 ml 1/29 oranında akrilamid/bisakrilamid, 17.8 ml 1x TAE, 24 μ l N,N,N',N'-tetramethylethylene-diamine (TEMED) (Amresco, ABD) ve 240 μ l %10'luk APS bir behere aktarıldı. Karışım, katılaşmamasına dikkat edilerek 1.5-2 dakika (dak) süre ile dairevi hareketlerle karıştırıldıktan sonra jel kabına döküldü. Üzerine örnek kuyucuklarının oluşturulması için uygun bir tarak, katılaşması için de hava girişini önlemek amacıyla jelin tüm yüzeyini ve yan kısımlarını kapatan ayrılabilir ince bir tabaka yerleştirildi. Jel katılaştıktan sonra ayrılabilir tabaka ve tarak dikkatlice çıkarıldı, jel elektroforez tankına yerleştirildi. Üzerine yüzeyini kaplayacak şekilde 1x TAE döküldü.

3.3. Suşların Tanımlanması

3.3.1. Maya Kökenlerinin Üretilmesi ve Saklanması

Mikrobiyolojik kültür incelemesi amacıyla laboratuvarımıza gönderilen klinik örnekler %5 koyun kanlı agar (Salubris, Türkiye), Eosin methylene blue agar (EMB) (Oxoid, İngiltere) ve SDA'ya (Merck, Almanya) ekildi. 18-24 saatlik inkübasyon sonrasında kültürde üreyen kolonilerden Gram boyama yapılarak 100x büyütme ile ışık mikroskopunda inceleme yapıldı. Gram boyamada maya görünümü veren koloniler tek koloni ekim yöntemi ile SDA'ya pasajlanarak 37 °C'lik etüve kaldırıldı. İnkübasyon süresi sonrasında beyaz-krem renkli, yumuşak kıvamlı kendine has maya kokusu veren izolatlardan Gram boyama yapıldı. Yuvarlak veya oval şekilli tek halde maya ya da tomurcuklanmış maya halinde görülen örnekler germ tüp testi yapıldı.

Kan kültür örnekleri otomatize kan kültür sistemine (Bactec 9240, Becton Dickinson, ABD) yerleştirildi. 7 günlük inkübasyon süresini takiben şişelerden Gram boyama için örnekleme yapıldı. Gram boyama sonucunda hif ya da psödohif oluşturmuş yuvarlak veya oval şekilli maya görünümündeki örnekler SDA'ya pasajlandı. Üreyen kolonilere germ tüp testi yapıldı.

3.3.2. Germ Tüp (Çimlenme Borusu) Testi

SDA'da üretilen *Candida*'lardan birkaç koloni alınarak bir tüp içerisindeki 0.5 ml insan serumu ile suspanse edildi. 37 °C'lik etüvde (Mermert, Almanya) 2 saatlik inkübasyondan sonra tüpten alınan bir damla örnekten lam-lamel arasında nativ preparat hazırlandı, ışık mikroskobu ile 40x büyütmede incelendi. Mikroskopik görünümde maya hücresinden boğumlanma yapmadan çıkan, uzunluğu boyunca kabarıklık göstermeyen filament tarzındaki yapılar germ tüp (çimlenme borusu) olarak değerlendirildi (58). Germ tüp oluşturan izolatlar *C. albicans* olarak tanımlandı ve çalışma dışı bırakıldı. Germ tüp oluşturmayan izolatlar ileri identifikasyona alınmak üzere %20 gliserol (Merck, Almanya) ilaveli Yeast Ekstract Pepton Dekstroz (YEPD) besiyeri içerisinde -80°C'de saklandı. YEPD besiyeri %1 maya ekstresi (Merck, Almanya), %2 pepton (Oxoid, İngiltere), %2 dekstroz (Oxoid, İngiltere), %20 gliserol içerecek şekilde distile su ile hazırlandı.

3.4. Maya Kökenlerinin İdentifikasyonu

3.4.1. Kromojenik Agarda Değerlendirme

CHROMagar (Oxoid, İngiltere) besiyeri üretici firmanın önerisine göre hazırlandı. Buna göre magnetik karıştırıcının olduğu bir balonda 15.6 gr toz 500 ml distile su içinde kaynama noktasına gelinceye kadar ısıtılarak çözdürüldü. Besiyeri 45 °C'ye soğutulduktan sonra steril petrilere döküldü. Petriler karanlık ortamda saklandı.

YEPD besiyerinden SDA'ya pasajlanarak canlandırılan izolattan birkaç koloni alınarak CHROMagar besiyerine pasajlandı, 35 °C'lik etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda petriler görsel olarak değerlendirildi. Açık kahve rengi veren kolonilerin *C. parapsilosis* olabileceğine karar verildi (Resim 1).



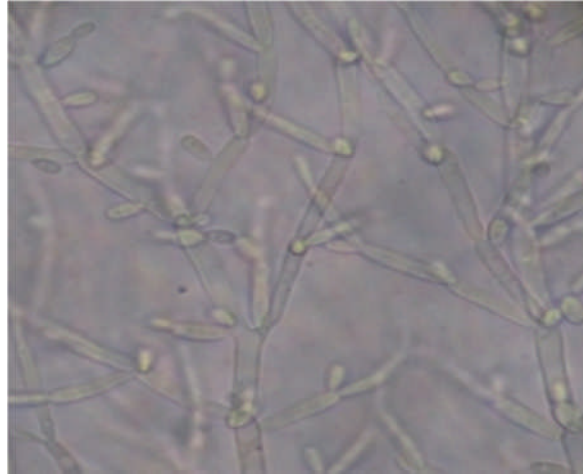
Resim 1. *Candida parapsilosis*'in CHROMagar Görünümü

3.4.2. Mısır Unu Tween 80 Agar Besiyerinde Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Mısır unlu agar besiyeri (Himedia, Hindistan) firmanın önerilerine göre hazırlandı. Magnetik karıştırıcı bulunan bir balonda, 1 lt distile su içinde 17 gr toz ve %1 oranında tween 80 (Sigma, Almanya) ısıtılarak çözdürüldü. 1 dak'lık kaynamanın ardından besiyeri 121 °C'de 15 dak steril edildi. Soğutulduktan sonra steril petrilere döküldü.

Hazırlanan besiyerine Dalmau tekniğine göre koloni ekimi yapıldı. Buna göre; iğne öze ile alınan koloniler, besiyeri yüzeyine besiyerini parçalamayacak ve dip kısmına inmeyecek şekilde birbirine paralel iki çizgi halinde ekildi. Besiyeri, ekim çizgilerinin üzeri steril bir lamelle kapatıldıktan sonra 26 °C’de 72 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda örnekler 40x büyütmedeki mikroskop ile blastokonidia, hif ve psodohif oluşumu yönünden değerlendirildi.

Çok sayıda ağaç şeklinde dallanmış pseudohif, pseudohifler boyunca tek tek veya ufak kümeler halinde dizili blastosporların görüldüğü, dev hücreler olarak adlandırılan iri hifler bulunduran suşlar *C. parapsilosis* olabileceği yönünde değerlendirildi (11) (Resim 2).



Resim 2. *Candida parapsilosis*'in Mısır Unu Tween 80'li Besiyerindeki Görünümü (40x)

3.4.3. Karbonhidrat Asimilasyon Testi

İzolatların kesin tanıların yapılması için ticari API 20C AUX (BioMerieux, Fransa) karbonhidrat asimilasyon kiti kullanıldı. API 20C AUX asimilasyon sistemi 19 farklı karbonhidrat adsorbe edilmiş kuyucuklarda oluşan reaksiyon profillerine göre izolatları tiplendirir. Kuyucuklarda görsel bulanıklık olması reaksiyonun gerçekleştiğini, izolatın karbonhidrat kaynağını kullandığını gösterir. Tablo 2’de API yönteminde kullanılan karbonhidratlar verilmiştir.

Tablo 2. API 20C AUX Testinde Kullanılan Karbonhidratlar

Negatif kontrol	0	D-sorbitol	SOR
D-glukoz	GLU	Metil- α D-glikopiranozid	MDG
Gliserol	GLY	N-asetil-glukozamin	NAG
Kalsiyum 2-keto glukonat	2KG	D-sellobiyoz	CEL
L-arabinoz	ARA	D-laktoz	LAC
D-Xylose	XYL	D-maltoz	MAL
Adonitol	ADO	D-sakkaroz	SAC
Ksilitol	XLT	D-trehaloz	TRE
D-galaktoz	GAL	D-melezitoz	MLZ
Inositol	INO	D-raffinoz	RAF

SDA'da üretilen 24 saatlik suşlardan steril distile su ile 2 McFarland bulanıklığında solüsyonlar hazırlandı. Solüsyondan 100 μ l alınarak kitin sağladığı API C medium'a aktarıldı. Herbiri farklı karbonhidrat içeren 19 kuyucuk ve karbonhidrat içermeyen bir negatif kontrol kuyucuğu steril bir pipet kullanılarak hazırlanan yeni karışımla dolduruldu. Kuyucukları taşıyan identifikasyon stripi inkübasyon kabına yerleştirilerek 30 °C'lik etüvde 48-72 saat inkübe edildi. Bu süre içerisinde ortamın nemli kalması için inkübasyon kabına 5 ml distile su aktarıldı. 48 saatlik inkübasyonun ardından yapılan ilk değerlendirmeye göre glukoz kuyucuğunda üreme olmaması durumunda inkübasyon süresi 72 saate kadar uzatıldı. Inkübasyon süresi sonunda görsel olarak, negatif kuyucuğa göre bulanıklaşmanın olması reaksiyonun olduğu yönünde değerlendirildi. Reaksiyonlar kit içeriğindeki skorlama kağıdına pozitif veya negatif şeklinde rapor edilerek bir biyotip skoru elde edildi. Elde edilen biyotip skoru firmanın sağladığı programa göre hesaplanarak kökenlerin identifikasyonu yapıldı.

3.5. *Candida parapsilosis* Grubu İzolatlarının Tür Ayırımının Yapılması (PCR-RFLP)

Çalışmada türlerin ayırımı için PCR-RFLP yöntemi uygulandı. Bunun için önce izolatların DNA'ları izole edildi, daha sonra *SADH* geni primeri kullanılarak *SADH* geni amplifiye edildi. İzole edilen ve çoğaltılan *SADH* gen PCR ürünleri BanI (Fermentas, ABD) restriksiyon enzimi ile kesilerek oluşan restriksiyon profillerine göre tür tayini yapıldı (8).

3.5.1. DNA İzolasyonu

İzolatların DNA'larının izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation kiti (Roche Diagnostic, Almanya) kullanıldı.

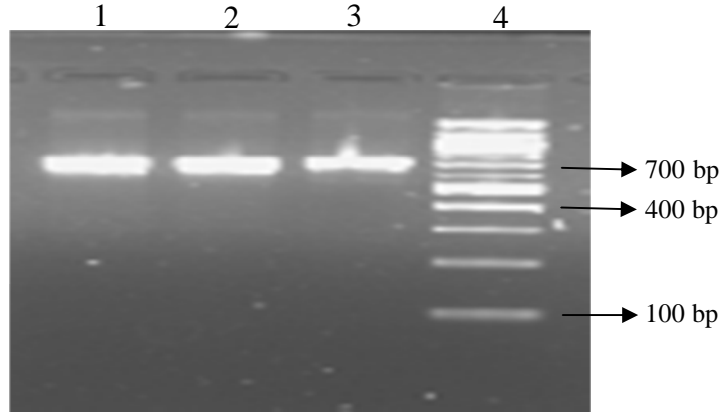
DNA izolasyon aşamaları:

- Distile su ile ml'de 10^8 maya hücresi bulunduran süspansiyon hazırlandı.
- Süspansiyon 3000 grade (g)'de 5 dak santrifüj edildi, üstteki sıvı kısım dökülerek maya hücresi pelleti elde edildi.
- Pellet 200 µl Phosphate Buffered Saline (PBS) (Medicago, İsveç) ile resuspanse edildi.
- 10 µl litikaz (Sigma, ABD) (0.5 mg/ml) eklenerek 37 °C'de 30 dak inkübasyona bırakıldı.
- 4.5 ml çift distile suda çözdürülen proteinaz K'dan (Roche, Almanya) 40 µl eklenerek 70 °C'de 10 dak inkübe edildi.
- DNA'ların polaritesinin azaltılması için 100 µl propanol (SDS, Peypin, Fransa) eklendi.
- Karışım filtreli tüpe aktarılarak 8000 g'de 1 dak santrifüj edildi.
- Filtreli tüp çeperlerinde kalan saf nükleik aside 500 µl İnhibitör Removal Buffer eklenerek 8000 g'de 1 dak santrifüj edildi.
- Nükleik asitler 500 µl saf etanol eklenmiş yıkama solüsyonu ile 2 kez yıkandı, her yıkamanın ardından 8000 g'de 1 dak santrifüj yapıldı.
- 70 °C'ye ısıtılmış 500 µl elution buffer eklendi.
- Filtreli tüp steril bir ependorf tüpüne yerleştirilerek 8000 g'de 1 dak santrifüj edildi.
- Ependorf tüpü içindeki 500 µl'lik ürün kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.5.2. *SADH* Geni Amplifikasyonu ve Jelde Görüntüleme

SADH geni amplifikasyonu için Promega'dan (ABD) sağlanan ürünler kullanıldı. Amplifikasyon için bir reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışım ısı döngü cihazına (Techno, Tc-512, ABD) yerleştirildi ve hedef amplifikasyon basamaklarına ayarlanmış program ile *SADH* geni çoğaltıldı. Amplifikasyon ürünleri ve 100 baz pair (bp) DNA belirteci (Biolabs, İngiltere) 5'er µl yükleme boyası (Fermentas, ABD) ile karıştırılarak elektroforez tankına

yerleştirilen agaroz jelin örnek kuyucuklarına aktarıldı. 100 Volt (V)'da 60 dak elektroforez uygulandı. Süre sonunda jel ultraviyole (UV) (Vilber Lourmat) ışığı altında gözlemlendi (Resim 3).



Resim 3. *SADH* Geninin Jel Elektroforez Görünümü, 1, C-357; 2, C-351; 3, C-141; 4, MW (100 bp)

Tablo 3’de *SADH* geni primerleri (İnvitrogen, ABD), Tablo 4’de *SADH* geninin amplifikasyonunda kullanılan reaksiyon karışımının içeriği, Tablo 5’de *SADH* geninin amplifikasyon koşulları gösterilmiştir.

Tablo 3. *SADH* Geni Primerleri

Primer	Dizi(5’-3’)	Gen Bölgesi	PCR Ürünü Büyüklüğü (bp*)	Referans
S1-F Sens	5’-GTTGATGCTGTTGGATTGT-3’	<i>SADH</i>	716 bp	8
S1-R Antisens	5’-CAATGCCAAATCTCCCAA-3’			

bp*: Baz Pair

Tablo 4. *SADH* Geninin Amplifikasyonunda Kullanılan Reaksiyon Karışımı

Komponent	Stok Konsantrasyonu	Miktar (1x) µl
Mg içermeyen buffer	10X	10
dNTP karışımı	2.5 mM	2
MgCl ₂	25 mM	3
Forward primer	10 mM	1
Reverse primer	10 mM	1
Taq polimeraz	5U/µl	0.2
Kalıp DNA		10
dH ₂ O		22.8
Toplam hacim		50

Tablo 5. *SADH* geninin Amplifikasyon Koşulları

94 °C 5'	İlk Denatürasyon	} 40 Döngü
94 °C 1'	Denatürasyon	
51 °C 2'	Bağlanma	
72 °C 2'	Uzama	
72 °C 7'	Final Uzama	

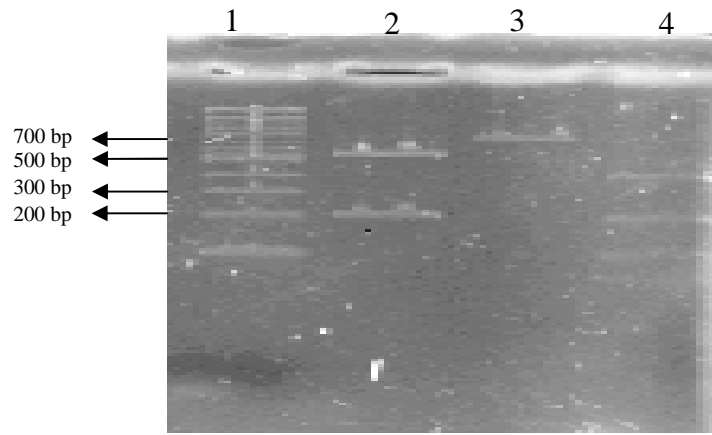
3.5.3. *SADH* Gen Ürünlerinin Restriksiyon Enzim Analizi

SADH gen ürünlerinin kesimi için içerisinde restriksiyon enzimi bulunan bir reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 6). BanI (Fermentas, ABD) restriksiyon enziminin reaksiyon karışımına en son eklenmesine dikkat edildi. Karışım 37 °C'lik su banyosunda (Mommert, Almanya) 2 saat, arkasından enzimin inaktive edilmesi için 65 °C'de 30 dak bekletildi.

Elektroforez tankına yerleştirilen poliakrilamid jel üzerindeki kuyucuklara BanI restriksiyon enzimi ile kesilmiş ürünlerden, *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* kontrol suşu kesim ürünlerinden ve 100 bp DNA belirtecinden (Biolabs, İngiltere) 5'er µl yüklendi. Elektroforez işlemi 50 V'da 45 dak sürede gerçekleştirildi. Elektroforez işleminin ardından jel etidyum bromürlü deiyonize su ile yavaş programlı çalkalayıcıda (Rottatar Nuve Model SL 350) 30 dak süre ile yıkandıktan sonra UV ışık altında gözlendi. Çalışılan kontrollerle karşılaştırılarak 2 bant içeren örnekler *C. parapsilosis* sensu stricto, 3 bant içeren örnekler *C. metapsilosis*, kesilmeyen ve tek bant içeren örnekler *C. orthopsilosis* olarak belirlendi (Resim 4).

Tablo 6. BanI Enzimi ile Kesim İşleminde Kullanılan Reaksiyon Karışımı

Komponent	Miktar (1x) µl
PCR ürünü	20
10 x Buffer O	4
BanI enzimi (10 U/ml)	1
Deiyonize su	15
Toplam	40



Resim 4. *Candida parapsilosis* Grubu Türlerinin Kesim Ürünlerinin Jel Elektroforez Görünümü, 1-MW (100 bp), 2-*C. parapsilosis* sensu stricto (C-141), 3-*C. orthopsilosis* (C-351), 4-*C. metapsilosis* (C-357)

3.6. Virulans Faktörlerinin Değerlendirilmesi

3.6.1. Esteraz Üretimi

Esteraz üretiminin gözlenmesi için *Tween* 80 katkılı agar yöntemi (*Tween* 80 opasite medium) kullanıldı.

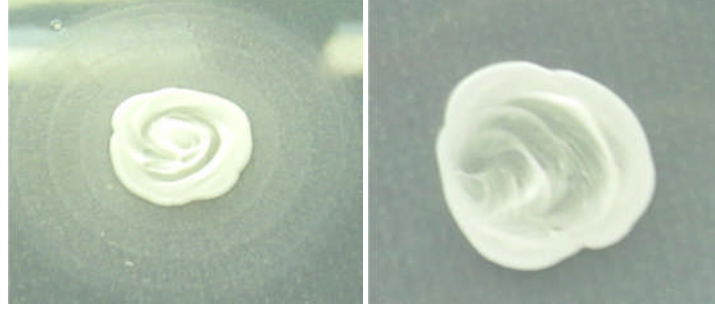
3.6.1.1. Mısır Unu *Tween* 80 Besiyerinin Hazırlanması

10 gr pepton (Oxoid, İngiltere), 5 gr sodyum klorür (NaCl) (Merck, Almanya), 0,1 gr kalsiyum klorür (CaCl₂) (Merck, Almanya), 15 gr agar (Merck, Almanya) ve 1000 ml distile su ile hazırlanan besiyeri 121 °C'de 15 dak süre ile steril edildi. Sterilizasyon sonrasında besiyeri 50 °C'ye soğutulunca içerisine % 0.5 oranında *tween* 80 (Sigma, ABD) eklendi.

3.6.1.2. Esteraz Testinin Yapılışı

SDA'da üreyen 24 saatlik *Candida* suşlarından pamuk uçlu eküvyon çubuğu ile alınarak hazırlanan besiyerine 1 santimetre (cm) çapında ekildi. Besiyerleri 30 °C'de 10 gün inkübe edildi. İnkübasyon süresi içinde ekim sahası etrafında *Tween* 80'in hidrolizi ile

açığa çıkan yağ asidinin kalsiyum ile birleşerek opak kristaller halinde çökmesi; pozitif esteraz aktivitesi olarak değerlendirilmektedir (10) (Resim 5).



Resim 5. Esteraz Pozitif (Solda) ve Esteraz Negatif (Sağda) İzolatların Görünümü

3.6.2. Total Parenteral Nutrisyon'da Üreme Yeteneğinin Belirlenmesi

Candida parapsilosis suşlarının TPN solüsyonunda üreme yeteneklerinin araştırılması için KTÜ Farabi Hastanesi TPN Ünitesinden sağlanan TPN kullanıldı (Tablo 7).

Testin Yapılışı: Steril 50 ml kapasiteli tüpler içerisine 10'ar ml TPN dağıtıldı. SDA'da üretilen 24 saatlik *Candida* suşlarından 0.5 McFarland bulanıklığında solüsyonlar hazırlandı. Hazırlanan maya solüsyonlarından 10'ar µl TPN bulunan tüplere aktarıldı. Maya hücresi içeren TPN'lerden steril ependorf tüpleri içerisinde seri dilüsyonlar (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) hazırlandı. İki farklı uygun sulandırımıdaki ependorf tüplerinden 100'er µl alınarak iki ayrı SDA'ya yayma yöntemi ile ekim yapıldı. İlk ekim saati 0.saat olarak belirlendi. Ekim işlemi biten TPN'ler 30 C°'lik etüve kaldırıldı. 24. ve 48. saatlerde de aynı TPN solüsyonlarından seri dilüsyonlar hazırlanarak, uygun dilüsyonlardan iki ayrı SDA'ya 100'er µl ekim yapıldı. Sulandırımın amacı uygun veri değerlendirilmesinin yapılabilmesi için SDA besiyerine düşen maya kolonilerinin 30-300 arasında düşürülmesinin sağlanmasıdır. Üreyen koloni sayısı SDA'daki koloni sayısı, ekilen miktar ve dilüsyon katsayısına göre düzenlenmiş formülle belirlendi. Her saat için ayrı hesaplamalar yapıldı ve belirlenen saatlerde ekilen iki SDA'daki koloniler de sayılarak hesaplamaya 30-300 arasında koloni bulunduran SDA'nın dilüsyon katsayısı alındı. Bu sayı aralığında üremenin olmadığı durumlarda daha ileri dilüsyonlarla seyreltme yapılarak test tekrarlandı.

Koloni sayısının hesaplanmasında kullanılan formül:

$$\text{Koloni Sayısı (CFU/ml)} = \frac{\text{SDA'daki Koloni Sayısı}}{\text{Ekilen miktar x Dilüsyon katsayısı}}$$

Tablo 7. TPN’de Bulunan Maddeler

KATKI MADDELERİ				ELEKTROLİTLER	
Primene %10	500 ml	Cernevit	5 ml	Na	189.85 mEq
Dextrose %10	800 ml	Tracutil	5 ml	K	25.00 mEq
Lipid %20	250 ml	Magnezyum sülfat	10 ml	Mg	12.00 mEq
İzotonik NaCl	400 ml	Potasyum klorür	25 ml	Zn	1.63 mEq
%3 NaCl	250 ml			Mn	0.28 mEq
				Cu	0.38 mEq
				Se	0.01 mEq
				Cl	214.85 mEq

3.6.3. Biyofilm Üretiminin Belirlenmesi

İzolatların biyofilm üretme yeteneklerinin araştırılması için 96 kuyucuklu mikrotiter pleyt yöntemi kullanıldı. Tetrazolium tuzunun (XXT) indirgenmesi sonrası oluşan renk değişimine göre biyofilm üretimi tespit edildi (59).

SDA’da canlandırılan izolatlardan bir öze dolusu alınarak içerisinde 5 ml YEPD besiyeri bulunduran tüplere aktarıldı. Tüpler 30°C’ye ısıtılmış ve 180 rpm hızda çalışan çalkalayıcıda (GFL 1086, Almanya) bir gece inkübe edildi. İnkübasyonun ardından steril endorph tüplerine 1 ml kadar izolat bulunduran YEPD besiyeri aktararak 3000 g’de 5 dak santrifüj edildi. Supernatan atıldıktan sonra pellet kuru buzda bulundurulan steril PBS ile 2 kez yıkandı. Her yıkamanın ardından 3000 g’de 5 dak santrifüj yapıldı, supernatan atıldı. Kalan pelletten steril PBS kullanılarak 3 McFarland bulanıklığında solüsyonlar hazırlandı. Solüsyonlardan 100’er µl 37°C’ye ısıtılmış 900 ml RPMI 1640 (Lonza, Belçika) besiyerine pipetlenerek 10⁻¹ oranında dilüsyon elde edildi. Böylece RPMI 1640 besiyeri içerisinde 1x10³ (colony forming unit/mililitre) CFU/ml yoğunluğunda koloni sayısı elde edildi. Dilue edilen izolatların 100’er µl’si mikrotiter pleyt kuyucuklarına ikiyeşerli sıra halinde pipetlendi. Pleytin son kuyucukları sadece XXT/menadion karışımı aktarılmak üzere boş bırakıldı. XXT/ menadion karışımı 10 ml steril PBS içerisinde 25

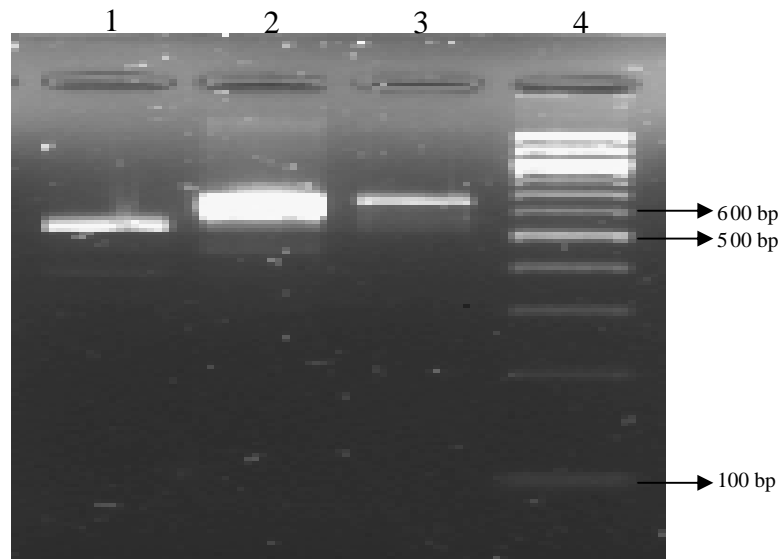
mg/ml XXT (Sigma, Almanya) çözdürülmesinin ardından 1 µl menadion (Sigma, ABD) eklenmesiyle hazırlandı. Pleytler 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından mikrotiter pleyt kuyucukları aspire edildikten sonra, adhere olmayan hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla steril PBS ile 3 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından 100’er µl XXT/ menadion karışımı mikrotiter pleyt kuyucuklarına pipetlendi, 37 °C’de karanlık ortamda 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklarda oluşan renk değişimi 490 nm dalga boyunda okutuldu.

Son kuyucuklardaki XXT/menadion karışımının absorbans değeri izolatların absorbans değerleri ortalamalarından matematiksel hesapla çıkarıldı. Net absorbans değerleri >0.200 olan izolatlar biyofilm üretimi açısından pozitif kabul edildi (60).

3.6.4. *SAPP* (*SAPP1*, *SAPP2*, *SAPP3*) Genlerinin Analizi

Candida parapsilosis grubu izolatlarının *SAPP1*, *SAPP2* ve *SAPP3* genleri PCR ile çoğaltıldı.

Amplifikasyon sonrasında ürünler %2’lik agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi. 100 bp DNA belirteci (Biolabs, İngiltere) ile yapılan karşılaştırmaya göre 660 bp uzunluğundaki ürün *SAPP1*, 666 bp uzunluğundaki ürün *SAPP2*, 537 bp uzunluğundaki ürün *SAPP3* olarak belirlendi (Resim 6).



Resim 6. *SAPP* Genlerinin Jel Elektroforez Görünümleri, 1, *SAPP3*; 2, *SAPP 2*; 3, *SAPP 1*; 4, MW (100 bp)

Tablo 8’de çalışmada kullanılan *SAPP* genleri primerleri (İnvitrogen, ABD), Tablo 9’da *SAPP* genlerinin amplifikasyonu için kullanılan reaksiyon karışımı, Tablo 10’da *SAPP* genlerinin amplifikasyon koşulları gösterilmiştir.

Tablo 8. Çalışmada Kullanılan *SAPP* Genleri Primerleri

Primer	Dizi(5’-3’)	Gen Bölgesi	PCR Ürünü Büyüklüğü (bp*)	Referans
S1-F Sens	5’-CTCATTCAAGTCATTAGGCTC-3’	<i>SAPP1</i>	660	8
S1-R Antisens	5’-GCAAGCATTGGCAGTACT-3’			
S1-F Sens	5’-GGAGCTGCTTTCACCTATTTCG-3’	<i>SAPP2</i>	666	8
S1-R Antisens	5’-GACAAGTACCATCACCATTT-3’			
S1-F Sens	5’-TAATTGCTGTCTTTCACCTGGA-3’	<i>SAPP3</i>	537	8
S1-R Antisens	5’-AGACCCATGACCCCTTG-3’			

bp*: Baz Pair

Tablo 9. *SAPP* Genlerinin Amplifikasyonu İçin Kullanılan Reaksiyon Karışımı

Komponent	Stok Konsantrasyonu	Miktar (1x) µl
Mg içermeyen buffer	10X	10
dNTP karışımı	2.5 mM	2
MgCl ₂	25 mM	3
Forward primer	10 mM	1
Reverse primer	10 mM	1
Taq polimeraz	5U/µl	0.2
Kalıp DNA		10
dH ₂ O		22.8
Toplam hacim		50

Tablo 10. *SAPP* Genlerinin Amplifikasyon Koşulları

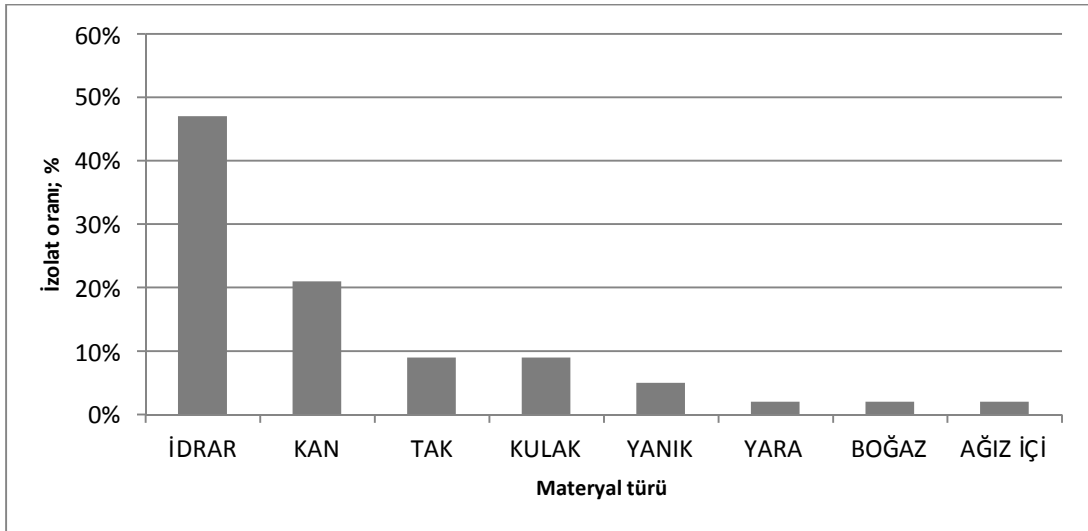
94 °C 5’	İlk Denatürasyon	} 40 Döngü
94 °C 1’	Denatürasyon	
51 °C 2’	Bağlanma	
72 °C 2’	Uzama	
72 °C 7’	Final Uzama	

4. BULGULAR

4.1. *Candida parapsilosis* Grubu Kökenlerinin Dağılımı

KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji AbD Hasta Hizmetleri Laboratuvarına çeşitli klinik ve polikliniklerden gelen 413 non-*albicans Candida* türü arasından; çimlenme borusu oluşturmayan, CHROMagar'da açık kahve rengi veren, Corn Meal Tween 80 Agar'da tipik görünüm oluşturan ve API 20C AUX sistemi ile identifikasyonu yapılan 42 *C. parapsilosis* grubu izolatu çalışmaya dahil edildi. *C. parapsilosis* grubunun non *albicans Candida* türleri arasındaki oranı %10.2 olarak belirlendi.

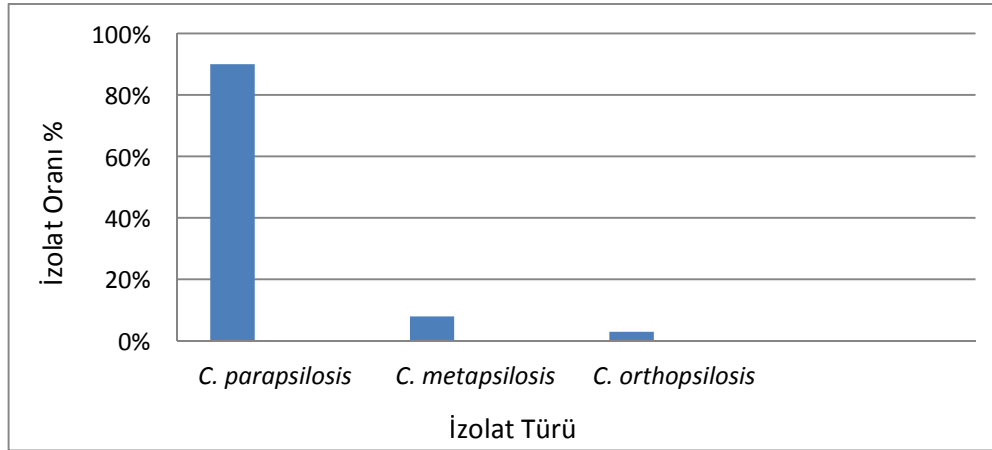
İzolatların 20'si (%47.6) idrar, 9'u (%21.4) kan, 4'ü (%9.5) trakeal aspirat (TAK), 4'ü (%9.5) kulak, 2'si (%4.8) yanık, 1'i (%2.4) yara, 1'i (%2.4) ağız içi sürüntüsü, 1'i (%2.4) boğaz sürüntüsü örneklerinden elde edildi (Şekil 1).



Şekil 1. *Candida parapsilosis* Grubu İzolatlarının Klinik Materyallere Göre Dağılımı

4.2. *Candida parapsilosis* Grubu İzolatlarının Tür Düzeyinde Dağılımı

Çalışmaya dahil edilen *C. parapsilosis* grubu izolatlarının 38'i (%90.5) *C. parapsilosis sensu stricto*, 3'ü (%7.1) *C. metapsilosis*, 1'i (%2.4) *C. orthopsilosis* olarak belirlendi (Şekil 2).



Şekil 2. *Candida parapsilosis* Grubu İzolatlarının Tür Düzeyinde Dağılımı

4.3. *Candida parapsilosis* Grubu İzolatlarının Materyal Düzeyinde Dağılımı

İdrar izolatlarının 20'si (%100) *C. parapsilosis sensu stricto*; kan izolatlarının 7'si (%77.8) *C. parapsilosis sensu stricto*, 2'si (%22.2) *C. metapsilosis*; TAK izolatlarının 3'ü (%75) *C. parapsilosis sensu stricto*; 1'i (%25) *C. metapsilosis*; kulak izolatlarının 3'ü (%75) *C. parapsilosis sensu stricto*; 1'i (%25) *C. orthopsilosis*; diğer materyallerden izole edilen kökenler ise *C. parapsilosis sensu stricto* olarak belirlendi (Tablo 11).

4.4. *Candida parapsilosis* Grubu İzolatlarının Yaş Gruplarına Göre Dağılımı

Çalışmaya alınan 42 *C. parapsilosis* grubu izolatının 27'si (%64.3) erişkin yaş grubundan; 15'i (%35.7) çocuk yaş grubundan izole edildi. Erişkin yaş grubundan izole edilen kökenlerin 13'ü (%48.2) servis, 8'i (%29.6) YBÜ ve 6'sı (%22.2) poliklinik hastalarından; çocuk yaş grubundan izole edilenlerin 7'si (%46.7) servis, 5'i (%33.3) YBÜ, 3'ü (%20) poliklinik hastalarından izole edildi. PYBÜ izolatları arasında bulunan 1 kan ve 1 idrar izolatı YDYBÜ'deki bir hastadan elde edildi.

Candida metapsilosis ve *C. orthopsilosis* izolatları sadece erişkin yaş grubu klinik örneklerinde dağılım gösterirken; *C. parapsilosis* sensu stricto izolatları her iki yaş grubunda da tespit edildi. Erişkin hastalardan elde edilen izolatların klinik birimler arasındaki dağılımı değerlendirildiğinde; *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarının 12'si (%52.2) servis birimlerinden, 6'sı (%26.1) YBÜ'den, 5'i (%21.7) poliklinik birimlerinden; *C. metapsilosis* izolatlarının 2'si (%66.7) YBÜ'den, 1'i (%33.3) servis birimlerinden; 1 *C. orthopsilosis* izolatı poliklinik biriminden elde edildi (Tablo 12).

Tablo 11. *Candida parapsilosis* Grubu Türlerinin Klinik Materyallere Göre Dağılımı

Materyal (n)	<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto		<i>C. metapsilosis</i>		<i>C. orthopsilosis</i>	
	sayı	%	sayı	%	sayı	%
İdrar (20)	20	100	-	-	-	-
Kan (9)	7	77.8	2	22.2	-	-
TAK(4)	3	75	1	25	-	-
Kulak (4)	3	75	-	-	1	25
Yamk (2)	2	100	-	-	-	-
Yara (1)	1	100	-	-	-	-
Boğaz (1)	1	100	-	-	-	-
Ağız içi (1)	1	100	-	-	-	-
Toplam (42)	38	90.5	3	7.1	1	2.4

Tablo 12. İzolatların Yaş Grubuna Göre Dağılımı

Tür (n)	Klinik Birim	YAŞ GRUBU (n)			
		Erişkin (27)		Çocuk (15)	
<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto (38)	Poliklinik	5	21.7	3	20
	YBÜ	6	26.1	5	33.3
	Servis	12	52.2	7	46.7
<i>C. metapsilosis</i> (3)	Poliklinik	-	-	-	-
	YBÜ	2	66.7	-	-
	Servis	1	33.3	-	-
<i>C. orthopsilosis</i> (1)	Poliklinik	1	100	-	-
	YBÜ	-	-	-	-
	Servis	-	-	-	-

Çalışmada yer alan *C. metapsilosis* suşlarından 1'i 71 yaşındaki CYBÜ hastasının TAK'ından, 1'i 77 yaşındaki üroloji servisi hastasının kanından, 1'i de 48 yaşındaki

NYBÜ hastasının kan kültüründen; *C. orthopsilosis* suşu 72 yaşındaki poliklinik hastasının kulak kültüründen izole edildi.

4.5. İzolatların Esteraz Üretimlerinin Değerlendirilmesi

İzolatların esteraz üretimleri *Tween* 80 katkılı agar yöntemi ile belirlendi. 42 *C. parapsilosis* grubu izolatının 34'ü (%80.9) esteraz üretimi yönünden pozitif, 8'i (%19.1) negatif olarak tespit edildi. Tür düzeyinde değerlendirildiğinde 38 *C. parapsilosis sensu stricto* izolatının 30'u (%78.9) esteraz pozitif iken, *C. parapsilosis sensu stricto* dışındaki 4 türün (*C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis*) 4'ü (%100) de esteraz pozitif bulundu (Tablo 13).

Tablo 13. *Candida parapsilosis* Grubu Türlerinin Esteraz Üretme Oranları

TÜR (n)	Esteraz Olumlu		Esteraz Olumsuz	
	SAYI	%	SAYI	%
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i> (38)	30	78.9	8	21.1
<i>C. orthopsilosis</i> (1)	1	100	-	-
<i>C. metapsilosis</i> (3)	3	100	-	-
TOPLAM (42)	34	80.9	8	19.1

İdrar izolatlarının 15'i (%75), kan izolatlarının 7'si (%77.8), kulak izolatlarının 3'ü (%75) esteraz pozitif olarak belirlendi. TAK, yanık, yara, ağız içi sürüntüsü ve boğaz izolatlarının tümünde esteraz pozitif idi (Tablo 14).

Pediatri grubundan elde edilen 15 izolatın 13'ü (%86.6) esteraz pozitif iken, erişkin gruptan elde edilen 27 izolatın 21'i (%77.7) esteraz pozitif olarak belirlendi. PYBÜ hastalarından elde edilen izolatların 4'ü (%80); erişkin YBÜ hastalarından elde edilen izolatların 5'i (%62.5); pediatri servis hastalarından elde edilen izolatların 6'sı (%85.7), erişkin servis hastalarından elde edilen izolatların 11'i (%84.6); pediatri poliklinik hastalarından elde edilen izolatların 3'ü (%100), erişkin poliklinik hastalarından elde edilen izolatların 5'i (%83.3) esteraz pozitif olarak saptandı.

Tablo 14. *Candida parapsilosis* Grubu İzolatlarının Materyal Düzeyinde Esteraz Üretme Oranları

MATERYAL (n)	ESTERAZ OLUMLU		ESTERAZ OLUMSUZ	
	SAYI	%	SAYI	%
İdrar (20)	15	75	5	25
Kan (9)	7	77.8	2	22.2
TAK (4)	4	100	-	-
Kulak (4)	3	75	1	25
Yanık (2)	2	100	-	-
Yara (1)	1	100	-	-
Boğaz (1)	1	100	-	-
Ağız içi (1)	1	100	-	-

4.6. İzolatların TPN'de Üreme Yeteneklerinin Belirlenmesi

İzolatların 0., 24. ve 48. saatlerde TPN'de gösterdikleri üreme değerleri Tablo 15'de gösterildi.

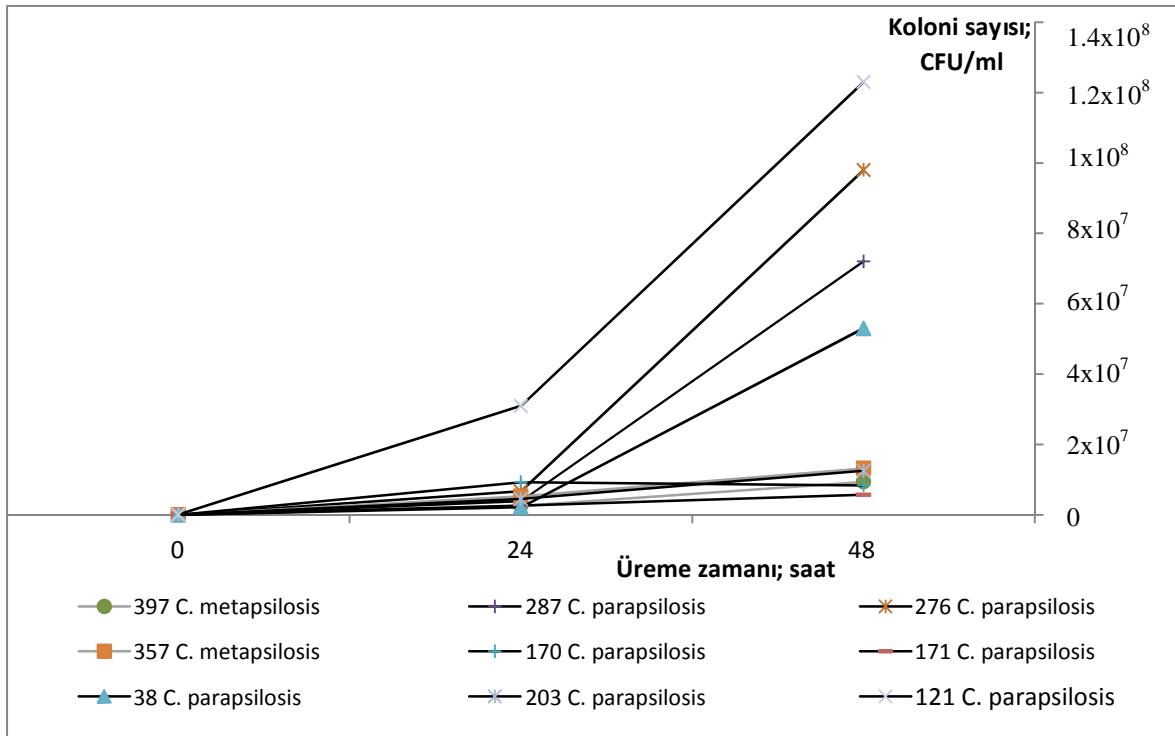
Tablo 15. *Candida parapsilosis* Grubu İzolatlarının TPN’de üreme değerleri

İZOLAT NO	MATERYAL	0. SAAT (CFU/ml)	24. SAAT (CFU/ml)	48. SAAT (CFU/ml)
C-38	Kan	3x10 ⁴	2,2 x10 ⁶	5,3 x10 ⁷
C-39	İdrar	2,51 x10 ⁴	1,17 x10 ⁷	3,7 x10 ⁷
C-40	İdrar	5,3 x10 ⁴	2,2 x10 ⁶	1,91 x10 ⁷
C-41	İdrar	5,2 x10 ⁴	2,8 x10 ⁶	7 x10 ⁶
C-52	İdrar	7,5 x10 ⁴	3 x10 ⁶	1,33 x10 ⁷
C-64	İdrar	5,6 x10 ⁴	7,5 x10 ⁶	1,11 x10 ⁷
C-68	İdrar	4,7 x10 ⁴	1,45 x10 ⁷	8,6 x10 ⁶
C-73	İdrar	4,4 x10 ⁴	1,5 x10 ⁶	4,5 x10 ⁷
C-81	Boğaz	3 x10 ⁴	3,4 x10 ⁶	5,6 x10 ⁶
C-120	İdrar	5 x10 ⁴	1,18 x10 ⁷	9,1 x10 ⁷
C-121	Kan	4,9 x10 ⁴	3,1 x10 ⁷	1,23 x10 ⁸
C-139	İdrar	4,7 x10 ⁴	1,48 x10 ⁷	6 x10 ⁷
C-141	İdrar	4,3 x10 ⁴	1,07 x10 ⁷	9,7 x10 ⁶
C-170	Kan	3,4 x10 ⁴	9,3 x10 ⁶	8,4 x10 ⁶
C-171	Kan	3,4 x10 ⁴	2,6 x10 ⁶	5,7 x10 ⁶
C-174	İdrar	5,5 x10 ⁴	1,5 x10 ⁶	4,6 x10 ⁷
C-177	İdrar	6,4 x10 ⁴	4,5 x10 ⁶	6,2 x10 ⁶
C-196	Yamık	5,1 x10 ⁴	8,4 x10 ⁶	5,4 x10 ⁷
C-203	Kan	2,54 x10 ⁴	4,5 x10 ⁶	1,25 x10 ⁷
C-231	İdrar	4 x10 ⁴	4,8 x10 ⁶	6,4 x10 ⁷
C-232	Yamık	2,7 x10 ⁴	4,6 x10 ⁶	4,8 x10 ⁷
C-249	TAK	4,2 x10 ⁴	1 x10 ⁷	9,5 x10 ⁶
C-269	İdrar	3,6 x10 ⁴	9,8 x10 ⁶	5,8 x10 ⁷
C-275	İdrar	3,4 x10 ⁴	1,02 x10 ⁷	1,52 x10 ⁷
C-276	Kan	3,3 x10 ⁴	6,7 x10 ⁶	9,8 x10 ⁷
C-282	Yara	2,1 x10 ⁴	6,7 x10 ⁶	1,05 x10 ⁸
C-287	Kan	2,3 x10 ⁴	3,9 x10 ⁶	7,2 x10 ⁷
C-292	İdrar	4,1 x10 ⁴	6,2 x10 ⁶	1,34 x10 ⁷
C-308	İdrar	3,4 x10 ⁴	3 x10 ⁶	5,1 x10 ⁷
C-311	İdrar	1,7 x10 ⁴	6,3 x10 ⁶	2,27 x10 ⁷
C-328	TAK	2,48 x10 ⁴	4,1 x10 ⁶	5,6 x10 ⁶
C-339	Kulak	2,59 x10 ⁴	7,7 x10 ⁶	1,3 x10 ⁷
C-348	İdrar	3 x10 ⁴	8,1 x10 ⁶	9,3 x10 ⁶
C-351	Kulak	2,24 x10 ⁴	5,7 x10 ⁶	4,5 x10 ⁶
C-352	TAK	3 x10 ⁴	6,1 x10 ⁶	4,3 x10 ⁷
C-357	Kan	3,4 x10 ⁴	5,3 x10 ⁶	1,32 x10 ⁷
C-359	Kulak	3,4 x10 ⁴	7,3 x10 ⁶	9,6 x10 ⁶
C-362	Kulak	3,7 x10 ⁴	4,8 x10 ⁶	4,5 x10 ⁷
C-394	TAK	4,1 x10 ⁴	9 x10 ⁶	1 x10 ⁷
C-396	İdrar	3 x10 ⁴	7,6 x10 ⁶	4,9 x10 ⁷
C-397	Kan	1,62 x10 ⁴	2,56 x10 ⁶	9,4 x10 ⁶
C-419	Ağız içi	4,6 x10 ⁴	6,3 x10 ⁶	7,4 x10 ⁷

4.6.1. Kan İzolatlarının TPN’de Üreme Yetenekleri

Kan izolatlarının TPN’de üreme yetenekleri Şekil 3’de gösterildi. Buna göre *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarının 4’ü 48 saat süresince giderek artan oranlarda üreme gösterirken; 2 *C. parapsilosis* sensu stricto ve 2 *C. metapsilosis* izolatının üremeleri artış göstermedi. En fazla üreme gösteren 121 ve 276 no’lu kan izolatlarında esteraz üretimi negatif, biyofilm üretimi pozitif; daha az üreme gösteren 38 no’lu kan izolatında hem biyofilm hem de esteraz üretimi pozitif; 287 no’lu kan izolatında ise esteraz üretimi pozitif, biyofilm üretimi negatif olarak belirlendi. Üreme göstermeyen *C. parapsilosis* sensu stricto ve *C. metapsilosis* izolatlarında esteraz üretimi pozitif, biyofilm üretimi negatif bulundu. TPN’de üreme gösteren kan izolatlarının 4’ü de YBÜ’den, üreme göstermeyen kan izolatlarının biri PYBÜ’den; diğer 3’ü üroloji servisinden, yanık ünitesinden ve pediatri hematoloji servisinden izole edildi.

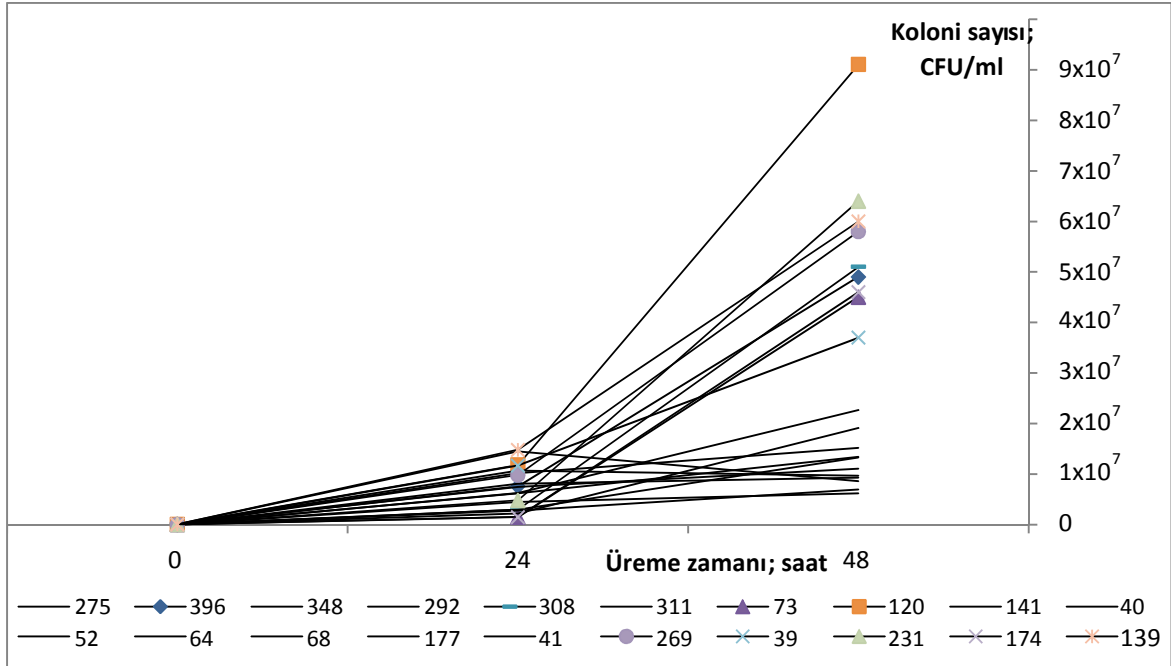
Şekilde görüldüğü gibi 121, 276, 287 ve 38 kod no’lu izolatlar üreme gösterdi. En yüksek üreme gösteren 121 no’lu izolat 0. saatte 4.9×10^4 CFU/ml, 24. saatte 3.1×10^7 CFU/ml, 48. saatte 1.23×10^8 CFU/ml koloni sayısında üreme gösterirken; üreme artışı en düşük olan 38 no’lu izolatın üreme değerleri 0. saatte 3×10^4 CFU/ml, 24. saatte 2.2×10^6 CFU/ml, 48. saatte 5.3×10^7 CFU/ml olarak belirlendi. Üreme göstermeyen izolatları temsilen gösterilen 357 no’lu *C. metapsilosis* izolatının üreme değerleri 0. saatte 3.4×10^4 CFU/ml, 24. saatte 5.3×10^6 CFU/ml, 48. saatte 1.32×10^7 CFU/ml olarak belirlendi. *C. metapsilosis* izolatı ile en düşük üreme artışı gösteren 38 no’lu *C. parapsilosis* sensu stricto izolatı karşılaştırıldığında, 0. saatte neredeyse aynı koloni sayısı bulunduran izolatların 48. saatteki değerlerinde belirgin farklılık olduğu gözlemlendi.



Şekil 3. Kan İzolatlarının TPN’de Üreme Yetenekleri

4.6.2. İdrar İzolatlarının TPN’de Üreme Yetenekleri

İdrar izolatlarının TPN’de üreme yetenekleri Şekil 4’de gösterildi. Buna göre idrar izolatlarının 9’u 48 saat süresince artan oranlarda üreme gösterirken, kalan 11 izolatın TPN’de üreme eğrilerinde az yükselme gözlemlendi. TPN’de üreme gösteren izolatların 2’sinde, TPN’de üreme eğrilerinde artış bulunmayan izolatların da 2’sinde esteraz negatif bulundu. Üreme gösteren izolatlardan olan 120, 231, 139, 308, 174 ve 73 no’lu izolatlarda hem esteraz hem de biyofilm üretimi pozitif; 269, 396 ve 39 no’lu izolatlarda esteraz üretimi pozitif, biyofilm üretimi negatif olarak belirlendi. Her iki virulans faktörünün pozitif olduğu 3 izolat en fazla üreme yeteneği gösterdi. En fazla üreme artışı gösteren 120 no’lu izolat 0. saatte 5×10^4 CFU/ml, 24. saatte 1.18×10^7 CFU/ml, 48. saatte 9.1×10^7 CFU/ml; en az üreme gösteren izolat 0. saatte 2.51×10^4 CFU/ml, 24. saatte 1.17×10^7 CFU/ml, 48. saatte 3.7×10^7 CFU/ml koloni sayısında üredi.

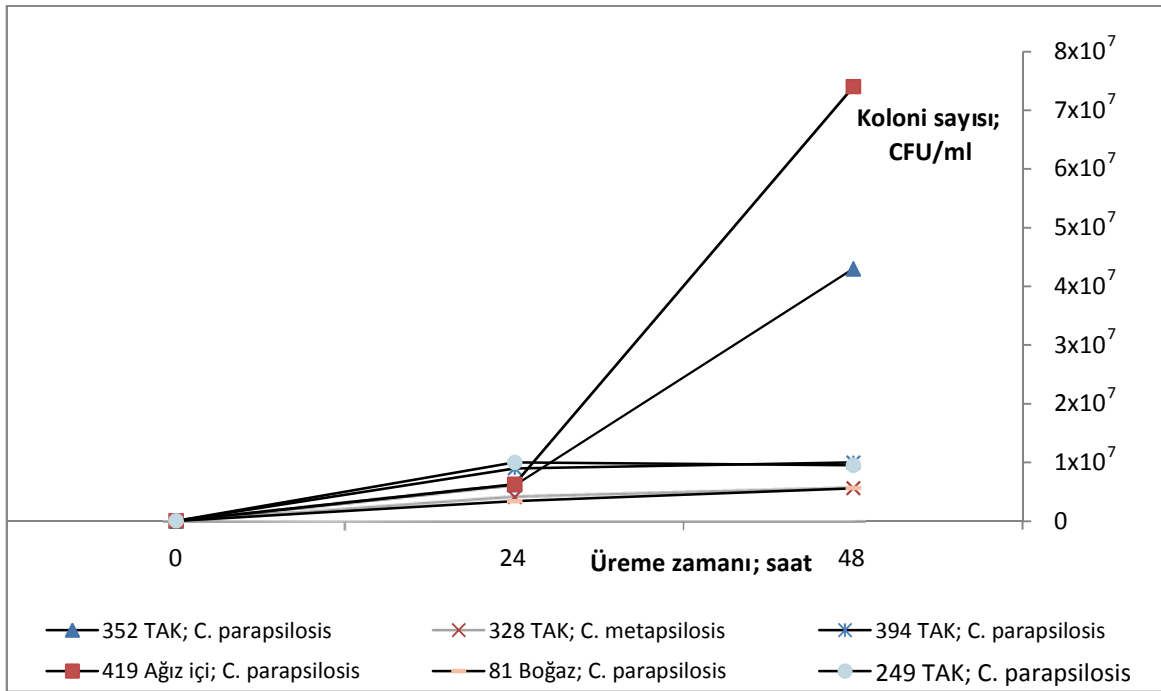


Şekil 4. İdrar İzolatlarının TPN’de Üreme Yetenekleri

4.6.3. Solunum Yolu İzolatlarının TPN’de Üreme Yetenekleri

TAK, boğaz ve ağız içi sürüntü izolatları ‘solunum yolu izolatları’ adı altında değerlendirildiğinde en yoğun üreme ağız içi sürüntü izolatında gözlemlendi. TAK izolatlarının biri 48 saat süresince üreme gösterirken; diğer TAK izolatı, boğaz izolatı ve TAK’da üreyen *C. metapsilosis* izolatı üremesinde artış saptanmadı. İzolatların hepsinde de esteraz üretimi pozitif, biyofilm üretimi negatif olarak belirlendi (Şekil 5).

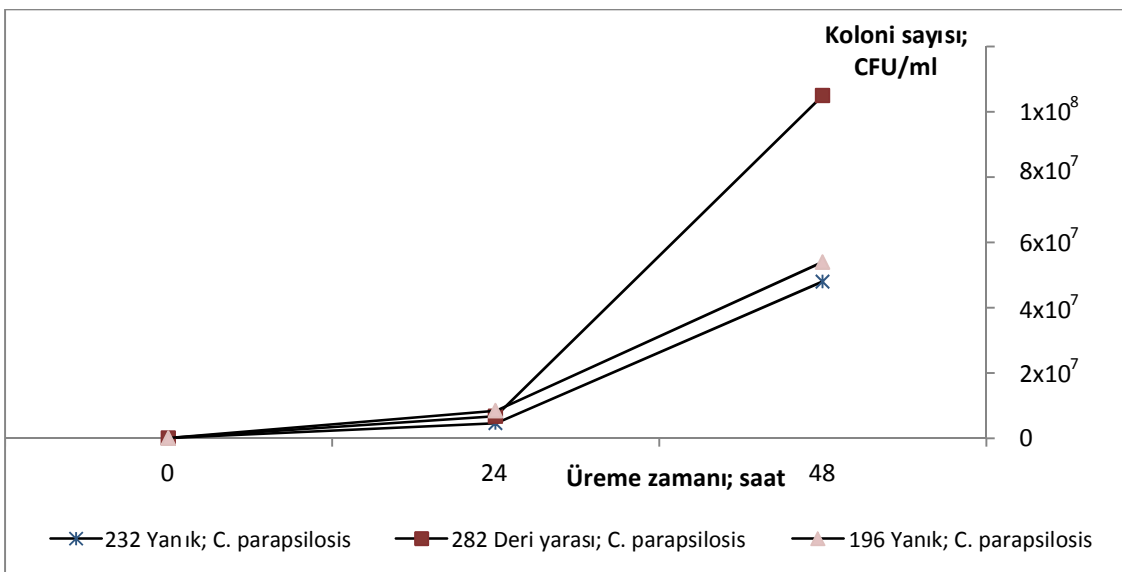
Ağız içi sürüntü izolatının üreme değerleri 0. saatte 4.6×10^4 CFU/ml, 24. saatte 6.3×10^6 CFU/ml, 48. saatte 7.4×10^7 CFU/ml olarak belirlendi. *C. metapsilosis* ise 0. saatte 2.48×10^4 CFU/ml, 24. saatte 4.1×10^6 CFU/ml ve 48. saatte 5.6×10^6 CFU/ml koloni sayısında olup üreme artışı göstermedi.



Şekil 5. Solunum Yolu İzolatlarının TPN’de Üreme Yetenekleri

4.6.4. Yara İzolatlarının TPN’de Üreme Yetenekleri

Yara izolatlarının (deri yarası, yanık) TPN’de üreme yetenekleri Şekil 6’da gösterildi. Buna göre her 2 yanık yarası izolatu da 48 saatlik süre boyunca TPN’de üreme gösterirken, deri yarası izolatu yanık yarası izolatlarından daha fazla üreme yeteneği gösterdi. İzolatların hepsinde de esteraz üretimi pozitif, biyofilm üretimi negatif saptandı.

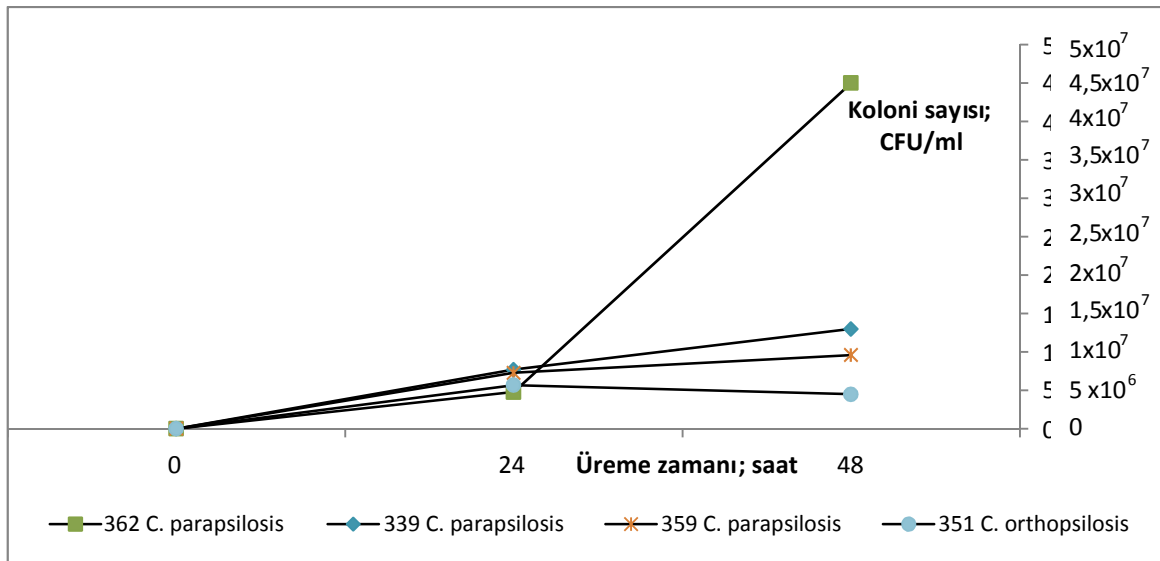


Şekil 6. Yara İzolatlarının TPN’de Üreme Yetenekleri

En fazla üreme gösteren 282 no'lu deri yarası izolatının üreme değerleri 0. saatte 2.1×10^4 CFU/ml, 24. saatte 6.7×10^6 CFU/ml, 48. saatte 1.05×10^8 CFU/ml iken; en az üreme gösteren 232 no'lu yanık izolatının üreme değerleri 0. saatte 2.7×10^4 CFU/ml, 24. saatte 4.6×10^6 CFU/ml, 48. saatte 4.8×10^7 CFU/ml olarak belirlendi.

4.6.5. Kulak İzolatlarının TPN'de Üreme Yetenekleri

Kulak izolatlarının TPN'de üreme yetenekleri Şekil 7'de gösterildi. Buna göre bir *C. parapsilosis* sensu stricto izolatı 48 saat süresince giderek artan oranlarda üreme gösterirken, diğer 2 *C. parapsilosis* sensu stricto izolatı üreme göstermedi. *C. orthopsilosis* izolatının üremesi ise azalma gösterdi. İzolatların hepsinde de esteraz üretimi pozitif, biyofilm üretimi negatif olarak saptandı. Üreme gösteren 362 no'lu izolatın üreme değerleri 0. saatte 3.7×10^4 CFU/ml, 24. saatte 4.8×10^6 CFU/ml, 48. saatte 4.5×10^7 CFU/ml iken, *C. orthopsilosis* izolatının üreme değerleri 0. saatte 2.24×10^4 CFU/ml, 24. saatte 5.7×10^6 CFU/ml, 48. saatte 4.5×10^6 CFU/ml olarak belirlendi.



Şekil 7. Kulak İzolatlarının TPN'de Üreme Yetenekleri

4.7. İzolatların Biyofilm Üretimlerinin Değerlendirilmesi

İzolatların biyofilm üretimleri 96 kuyucuklu mikrotiter pleytlerde tetrazolium bileşiğinin indirgenmesi esasına dayanılarak belirlendi.

Biyofilm üretimi sadece *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarında gözlenirken, *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* izolatlarında belirlenmedi. *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarının biyofilm üretme oranı %28.9 olarak tespit edildi. Materyal düzeyinde değerlendirildiğinde kan izolatlarının 3'ünün (%33.3), idrar izolatlarının 8'inin (%40) biyofilm ürettiği diğer materyal izolatlarının ise biyofilm üretmediği belirlendi. Kanda üreyen *C. parapsilosis* sensu stricto izolatları ile (%42.9) diğer materyallerde üreyen *C. parapsilosis* sensu stricto izolatları (%25.8) arasında Fisher'in kesin testine göre istatistiki yönden anlamlı farklılık tespit edilmedi ($p=0.390$). Tablo 16'da *C. parapsilosis* grubu türlerinin biyofilm üretme oranları; Tablo 17'de kan ve diğer materyallerden elde edilen *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarının biyofilm üretimlerinin karşılaştırılması gösterildi.

Tablo 16. *Candida parapsilosis* Grubu Türlerinin Biyofilm Üretme Oranları

TÜR (n)	BİYOFİLM POZİTİF		BİYOFİLM NEGATİF	
	SAYI	%	SAYI	%
<i>C. parapsilosis</i> sensu stricto (38)	11	28.9	27	71.1
<i>C. orthopsilosis</i> (1)	-	-	1	100
<i>C. metapsilosis</i> (3)	-	-	3	100
TOPLAM (42)	11	26.2	31	73.8

Tablo 17. Kan ve Diğer Materyallerden Elde Edilen *Candida parapsilosis* sensu stricto İzolatlarının Biyofilm Üretimlerinin Karşılaştırılması ($p=0.390$)

MATERYAL (n)	BİYOFİLM POZİTİF		BİYOFİLM NEGATİF	
	SAYI	%	SAYI	%
Kan (7)	3	42.9	4	57.1
Diğer materyaller (31)	8	25.8	23	74.2

4.8. İzolatların SAPP Gen Profillerinin Belirlenmesi

42 *C. parapsilosis* grubu izolatının SAPP1, SAPP2 ve SAPP3 genlerinin varlığı uygun primerler kullanılarak PCR yöntemi ile belirlendi. Buna göre 38 *C. parapsilosis* sensu stricto izolatı, 1 *C. metapsilosis* izolatı ve *C. orthopsilosis* izolatı 3 SAPP genini de bulundururken; diğer 2 *C. metapsilosis* izolatında sadece SAPP3 gen bandı gözlemlendi. 2 *C. metapsilosis* izolatında SAPP1 ve SAPP2 genleri tespit edilmedi (Tablo 18).

Tablo 18. *Candida parapsilosis* Grubu Türlerinin *SAPP* Genleri Pozitiflikleri

TÜR (n)	<i>SAPP1</i>	<i>SAPP2</i>	<i>SAPP3</i>
<i>C. parapsilosis sensu stricto</i> (38)	38 / 38	38 / 38	38 / 38
<i>C. orthopsilosis</i> (1)	1 / 1	1 / 1	1 / 1
<i>C. metapsilosis</i> (3)	1 / 3	1 / 3	3 / 3

5. TARTIŞMA

Candida parapsilosis grubu türleri genellikle immun yetmezliği bulunanlarda, nütropenili şahıslarda, yanık olgularında, yenidoğanlarda ve CYBÜ’de bulunan hastalarda geniş spektrumda klinik belirtilere neden olmakta, aynı zamanda pediatri ünitesi hastalarından da yaygınca izole edilmektedir (61).

Geçmişte *C. parapsilosis*’in monoklonal olduğu düşünölmekte idi; ancak şimdilerde moleküler tiplendirme teknikleri ile 3 farklı türe ayrılmaktadır (8, 62, 63). *C. parapsilosis* grubunun ayırımında ayırdedicilik özelliği yüksek olan yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle farklı moleküler yöntemler tanımlanmıştır (8, 23, 61, 64, 65).

Tavanti ve ark. (8) türler arasında ayırımın yapılması için her 3 türde de yaygınca bulunan *SADH* geninin restriksiyon polimorfizmi analizini (PCR-RFLP) önermiştir. Araştırmacılar yaptıkları bir çalışmada, *C. parapsilosis* türlerinden PCR ile elde ettikleri *SADH* ürünlerine, BanI enzimi ile restriksiyonları sonrasında sekans analizi uygulamış, *SADH* DNA fragmanlarının 3 türde de farklı restriksiyon haritası oluşturduğunu belirlemiştir. Çalışmada grup I izolatların *SADH* sekanslarında 196. pozisyonda olduğu tahmin edilen 1 BanI kesim bölgesi bulunduğu, grup III izolatların sekanslarında 96, 469 ve 529. pozisyonlarda olmak üzere 3 BanI kesim bölgesi bulunduğu; grup II izolatların sekanslarında ise kesim bölgesi gözlenmediği bildirilmiştir. Grup I izolatların kesim ürünlerinin elektroforezinde, bir kesim bölgesi bulundurmalarından dolayı 521 ve 196 bp uzunluğunda iki bant gözlenirken, Grup III izolatların kesim ürünlerinin elektroforezinde 3 kesim bölgesi bulundurmalarından dolayı 370, 188, 93 ve 60 bp uzunluğunda 4 bant belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada 42 *C. parapsilosis* grubu izolatlarının tür düzeyinde tanımlanmasında PCR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile *C. parapsilosis* grubu izolatlarının 38’inin (%90.5) *C. parapsilosis sensu stricto*, 3’ünün (%7.1) *C. metapsilosis*, 1’inin (%2.4) *C. orthopsilosis* olduğu belirlenmiştir.

PCR-RFLP yöntemi, maliyeti yüksek bir yöntemdir. Bu nedenle rutin tanı için uygun değildir; ancak epidemiyolojik çalışmalar için kullanılmaktadır.

Candida parapsilosis sensu stricto, üzerinde en fazla çalışılan ve karakterize edilen *C. parapsilosis* grubu üyesidir. Tür, *C. parapsilosis sensu lato*'ya atfedilen enfeksiyonların yaklaşık %90'ını oluşturmakta ve dünya genelinde, sistemik enfeksiyonlarda görülen yüksek insidansından anlaşıldığı gibi insan konağına diğer iki yakın tür olan *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis*'den daha iyi adapte olmakta, birçok ülkede kandideminin ikinci sıklıkta gelen etkeni olarak değerlendirilmektedir (66).

Candida parapsilosis sensu stricto'nun klinik izolatlar arasında baskın türü temsil etmesi, kısmen türün yüksek biyofilm oluşturma yeteneği ile açıklanabilir. Son çalışmalar *C. parapsilosis* olarak tanımlanan bazı klinik izolatların aslında ilişkili türler olarak bilinen *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis*'e karşılık geldiğini ve bu türlerin tüm *C. parapsilosis* izolatlarının yaklaşık %10'unu oluşturduğunu göstermiştir (61).

Tavanti ve ark. (8) 2005 yılında yaptıkları bir çalışmada 32 *C. parapsilosis* grubu izolatının 21'inin *C. parapsilosis* sensu stricto, 9'unun *C. orthopsilosis* ve 2'sinin *C. metapsilosis* olduğunu belirlemiş; 2007 yılında yaptıkları bir başka çalışmada (9)İtalya'daki farklı hastanelerden elde ettikleri *C. parapsilosis* grubu kolleksiyonunu analiz ederek, öncesinde *C. parapsilosis*'e atfedilen enfeksiyonların %4.5'inin aslında *C. orthopsilosis* ile oluşturulduğunu bildirmiştir. Hensgens ve ark. (67) çalışmasında, biyokimyasal profilleri bazında *C. parapsilosis* olarak tanımlanan 395 *C. parapsilosis* grubu izolatının 20'sinin *C. metapsilosis* olduğunu, böylece tüm *C. parapsilosis* enfeksiyon/ kolonizasyon olgularının %5'inin bu tür ile oluşturulduğunu tespit etmiştir.

2001-2006 yılları arasında Lockhart ve ark. (23) ARTEMIS evrensel *surveyans* çalışmasının bir parçası olarak, dünya genelindeki '*psilosis*' grubu türlerinin dağılımlarını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmasında, *C. parapsilosis* olduğu kabul edilen 1976 izolatı analiz ederek, 1762'sinin (%91.3) *C. parapsilosis* sensu stricto, 117'sinin (%6.1) *C. orthopsilosis* ve 34'ünün (%1.8) *C. metapsilosis* olduğunu belirlemiştir. Çalışmada yer alan 72 Türkiye izolatının 1'inin *C. orthopsilosis*, 2'sinin *C. metapsilosis* olduğu raporlanmıştır. Fakat bu izolatların hangi örneklerden elde edildiğine dair veri bildirilmemiştir.

İspanya Barcelona'da, Gomez-Lopez ve ark. (68) 2002-2003 yılları arasında yaptıkları prospektif popülasyon bazlı bir kandidemi *surveyans* çalışmasından elde ettikleri

C. parapsilosis grubu izolatlarını bir başka çalışmalarında analiz ederek %5.7'sinin (5/87) *C. orthopsilosis*, %6.9'unun (6/87) *C. metapsilosis* olduğunu raporlamıştır.

Brezilya'da 141 *C. parapsilosis* olduğu farzedilen kan akımı izolatının 124'ünün (%88) *C. parapsilosis* sensu stricto, 13'ünün (%9) *C. orthopsilosis* ve 4'ünün (%3) *C. metapsilosis* olduğu (19); Amerika'da yapılan bir çalışmada 70 *C. parapsilosis* grubu izolatının 1'inin (%1.4) *C. orthopsilosis*, 1'inin de (%1.4) *C. metapsilosis* olduğu bildirilmiştir (69).

Kuveyt'de Asadzadeh ve ark.'nın (64) rasgele seçtikleri 66 kan akımı izolatı ve 48 kan dışı vücut bölgesi izolatı olmak üzere 114 *C. parapsilosis* grubu izolatını türe spesifik ITS bölgesi amplifikasyonu ve *SADH* geninin PCR-RFLP yöntemi ile analiz ettikleri bir çalışmada, izolatların 109'u *C. parapsilosis* sensu stricto, 5'i *C. orthopsilosis* olarak belirlenmiş, *C. metapsilosis* izolatı ise tespit edilmemiştir.

Mirhendi ve ark. (70) 2004-2008 yılları arasında Danimarkalı hastalar üzerinde yaptıkları popülasyon bazlı bir kandidemi *surveyans* çalışmasında konvansiyonel fenotipik yöntemlerle elde ettikleri 79 *C. parapsilosis* grubu izolatını genotipik yönden analiz ederek grup içindeki *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis*'in prevalansını belirlemeyi amaçlamıştır. Çalışma sonucunda izolatların 75'i (%95) *C. parapsilosis* sensu stricto, 2'si (%2.5) *C. orthopsilosis*, 2'si (%2.5) *C. metapsilosis* olarak belirlenmiştir.

Yaptığımız çalışmada *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* oranları sırası ile %90.5, %7.1 ve %2.4 olarak belirlenmiştir. Bu oranlar yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuş; ancak bu çalışmaların aksine *C. metapsilosis* oranının *C. orthopsilosis* oranından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir .

Lockhart ve ark. da (23) ARTEMIS evrensel *surveyans* çalışmasında çalışmamıza uyumlu şekilde *C. metapsilosis*'in *C. orthopsilosis*'den daha fazla oranda gözleendiği coğrafik bölgelerin olduğunu raporlamıştır. Araştırmacılar, *C. metapsilosis* prevalansının Avustralya'da *C. orthopsilosis* prevalansından daha yüksek olduğunu, Polonya'da ise en yüksek orana (%13.8) ulaştığını kaydetmiştir. Buradan yeni tanımlanan türlerin dağılımının coğrafik bölgelere göre farklılık gösterdiğini söyleyebiliriz.

Candida parapsilosis grubu türlerinin farklı biyolojik materyallerden izole edilebildiği belirtilmiştir. Portekiz'de yapılan bir çalışmada *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* suşları kan dışındaki biyolojik örneklerden (4 *C. orthopsilosis* suşu idrar örneklerinden izole edilirken, *C. metapsilosis* suşlarından biri solunum örneklerinden, 4'ü

mukozal yüzeylerden izole edilmiştir), *C. parapsilosis* sensu stricto izolatları test edilen tüm biyolojik örneklerde tespit edilmiştir (61).

Lockhart ve ark.'nın (23) çalışmasında da *C. orthopsilosis* izolatlarının asit sıvısı, apse, kateter, beyin omurilik sıvısı (BOS), plevral ve bronkoalveolar lavaj (BAL) sıvısı gibi pulmoner örneklerden; *C. metapsilosis* izolatlarının da apse, asit sıvısı, BAL sıvısı ve eklem sıvısı gibi farklı örneklerden izole edildiği bildirilmiştir.

Kocsube ve ark.'nın (5) çalışmasında kan kültürlerinden elde edilen 22 *C. parapsilosis* grubu izolatının 2'sinin *C. metapsilosis* olduğu; De toro ve ark.'nın (60) çalışmasında 10 *C. orthopsilosis* izolatının 6'sının kandan izole edildiği; Chen ve ark.'nın (71) çalışmasında da 3 *C. metapsilosis* ve 2 *C. orthopsilosis* izolatının kandan izole edildiği bildirilmiştir.

Çalışmamız kapsamındaki 42 *C. parapsilosis* grubu izolatının 20'si (%47.6) idrar, 9'u (%21.4) kan, 4'ü (%9.5) TAK, 4'ü (%9.5) kulak, 2'si (%4.8) yanık, 1'i (%2.4) yara, 1'i (%2.4) ağız içi sürüntüsü, 1'i (%2.4) boğaz sürüntüsü örneklerinden elde edilmiştir. *C. parapsilosis* sensu stricto izolatları tüm biyolojik materyallerden izole edilirken; 3 *C. metapsilosis* izolatının 2'si kandan diğeri TAK'dan, *C. orthopsilosis* izolatı ise kulak örneğinden izole edilmiştir. Böylece 3 türün de diğer çalışmalarla uyumlu olarak farklı biyolojik materyallerden elde edilebildiği belirlenmiştir. Diğer çalışmalara benzer şekilde 2 *C. metapsilosis* izolatının kan gibi steril vücut sıvılarından izole edilmesi ise tanımlanan yeni türlerin bölgemizdeki hastalarda ortaya çıkan kan akımı enfeksiyonu gibi önemli insan hastalıklarından da görülebileceğini göstermiştir.

Candida parapsilosis'in virulans faktörleri hakkında bilinenler sınırlıdır. *Candida* türlerinde bulunan virulans faktörlerden biri olasılıkla biyofilm oluşturma yeteneği ile ilgili yüzey adherens kapasiteleridir. Klinik olarak elde edilen *C. albicans* izolatları enfeksiyon oluşumuna yardımcı olan biyofilm tabakasını üretirler. Adezyon ve biyofilm formasyonu, enfeksiyonlarında baskın rolü olduğu düşünülen invaziv aletlerden dolayı *C. parapsilosis* için de önemlidir (72).

Son 10 yılda *Candida* enfeksiyonlarındaki artış, tıbbi alanda protezler, endotrakeal tüpler, çeşitli kateterler gibi biyomateryallerin yaygın olarak kullanılmasıyla paralel görünmektedir. Bu biyomateryaller, 'slime' oluşturan mikroorganizmalarla kolonize olmakta ve biyofilmden ayrılan organizmalar çoğu kez bir septisemiye yol açmaktadır. Bu açıdan biyofilmler, enfeksiyonlar için önemli ve sürekli bir kaynak oluşturmaktadır (73).

Yaptığımız biyofilm çalışmasında 42 izolatın %26.2'sinin biyofilm ürettiği tespit edilmiştir. Tür düzeyinde değerlendirildiğinde ise 38 *C. parapsilosis* sensu stricto izolatının 11'inin (%28.9) biyofilm ürettiği; *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* izolatlarının ise biyofilm üretmedikleri saptanmıştır. Çalışmamızda sadece kan ve idrar örneklerinden elde edilen *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarının biyofilm ürettiği, diğer materyallerden elde edilen *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarının biyofilm üretmedikleri; kan izolatlarının biyofilm üretme oranının %33.3, idrar izolatlarının biyofilm üretme oranının %40 olduğu tespit edilmiştir.

Tavanti ve ark. (66) farklı coğrafik bölge (İtalya, Macaristan, Arjantin ve Yeni Zellanda) ve anatomik bölgelerden (kan, mukoza, tırnak, BOS vb.) elde edilen bir '*psilosis*' koleksiyonundan sağladıkları 62 *C. parapsilosis* grubu izolatının biyofilm üretimini değerlendirmiş; Macaristan, Arjantin, Yeni Zellanda ve İtalya izolatlarının biyofilm üretme oranlarının sırası ile %92.8, %85.7, %66.6 ve %36.8 olduğunu belirlemiştir. Çalışmada tırnak ve kan örneklerinin biyofilm üreten ve üretmeyen izolatları arasında istatistiki yönden anlamlı farklılık bulunduğu, en fazla biyofilm üreten izolatların ise kan örneklerinden sağlandığı raporlanmıştır. Bu çalışmaya göre çalışmamızdaki izolatların biyofilm üretimi oranları (%26.2) düşük düzeydedir. Biyofilm üretimi idrar ve kan izolatlarımızda gözlenmiştir. Buradan biyofilm üretimi ile coğrafik ve anatomik kaynak arasında bir bağlantı olabileceğini söyleyebiliriz. Fakat bunun daha fazla sayıda izolatla yapılacak çalışmalarla doğrulanması gerekmektedir.

Gökçe ve ark.'nın (74) 2007 yılında yaptıkları çalışmasında kan kültürlerinden izole edilen 6 *C. parapsilosis* izolatının tüp aderens metoduna göre biyofilm pozitifliği %12.5 olarak belirlenmiştir. Özkan ve ark. (75) ise aynı yöntemle 19 *C. parapsilosis* kan izolatının 17 (%89.5)'sinde slime pozitifliği saptamıştır. Shin ve ark.'nın (76) çalışmasında %8 glukoz ve %1 oranında protein içeren Sabouraud Dextrose Broth (SDB) besiyeri kullanılarak 35'i kan akımından, 17'si diğer bölgelerden sağlanan 52 *C. parapsilosis* izolatı değerlendirmeye alınmış; kan akımı izolatlarının 30'unda, diğer bölge izolatlarının 8'inde olmak üzere, izolatların 38'inde (%73) biyofilm pozitifliği saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise kan izolatlarının biyofilm üretme oranı %33.3 olarak belirlenmiştir. Çalışmalardaki çelişkiler kullanılan yöntemlerin ve çalışma koşullarının farklılığından kaynaklanabilir.

Üç türün biyofilm oluşturma kabiliyetine ilişkin çelişkili veriler bulunmaktadır. Tavanti ve arkadaşları 2005 (8) yılında yaptığı çalışmada 3 türün biyofilm oluşturma

yeteneği arasında istatistiki yönden anlamlı farklılık olmadığını rapor etmiştir. Ancak; aynı araştırmacılar sonrasında yaptıkları bir çalışmada *C. orthopsilosis* izolatlarının in vitro biyofilm oluşturmadıklarını raporlamış; Song ve arkadaşlarının (77) yaptıkları çalışmada da *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* izolatlarının biyofilm oluşturmadıkları bildirilmiştir.

Lattif ve ark.'nın (78) dünyanın farklı coğrafik bölgelerinden sağladıkları ve kan akımı enfeksiyonundan soyutlanan 10 *C. parapsilosis* sensu stricto, 10 *C. metapsilosis* ve 10 *C. orthopsilosis* izolatlarının silikon elastomer diskler üzerinde biyofilm üretmeleri yönünde yaptıkları çalışmalarında her 3 türün de biyofilm ürettiğini, *C. metapsilosis* izolatlarının ürettikleri biyofilmlerin metabolik aktivitelerinin *C. parapsilosis* sensu stricto ve *C. orthopsilosis* izolatlarının biyofilmlerinden anlamlı derecede yüksek olduğunu, ancak izolatların biyofilm miktarları arasında istatistiki farklılık olmadığını belirlemiştir.

De toro ve ark.'nın (60) çalışmasında 122 *C. parapsilosis* grubu izolatının 65'inde (%58.5) biyofilm pozitifliği saptanmış; *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarının tek biyofilm üreticisi olduğu, 10 *C. orthopsilosis* ve 1 *C. metapsilosis* izolatının in vitro biyofilm üretmedikleri bildirilmiştir. Araştırmacı kan akımı ve diğer materyallerden elde ettikleri *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarının biyofilm üretimlerini karşılaştırarak, kan izolatlarının %65'inin, diğer materyal izolatlarının %50.9'unun biyofilm ürettiğini, iki grup arasında istatistiki anlamlılığın olmadığını belirlemiştir.

Çalışmamızda De toro ve ark.'nın (60) çalışmasına benzer şekilde, sadece *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarının biyofilm ürettiği, kandan elde edilen *C. parapsilosis* sensu stricto izolatları (%42.9) ile diğer materyallerden elde edilen *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarının (%25.8) biyofilm üretimleri arasında istatistiki yönden anlamlılık olmadığı belirlenmiştir (p=0.390). *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* izolatlarının sayısının yetersizliğinden dolayı 3 türün biyofilm üretimleri arasındaki istatistiki anlamlılık saptanmamıştır.

Patojen funguslar patogenezlerinde önemli rol oynayan bazı enzimler salgılamaktadırlar. Bu enzimler genel olarak peptid bağlarını parçalayan proteinazlar ve fosfolipidleri hidroliz eden fosfolipazlar olmak üzere 2 grupta toplanmaktadır (79). Mayaların bunların dışında lipolitik aktivite gösteren enzimler salgıladığı ilk kez 1978 yılında Rudek tarafından Tween 80 opasite testi ile gösterilmiştir (54).

Çalışmamızda izolatların esteraz aktivitesi %0.5 tween 80 içeren besiyeri kullanılan opasite testi ile belirlenmiştir. İncelemeye alınan 42 izolatın %80.9'u esteraz pozitif, %19.1'i esteraz negatif olarak tespit edilmiştir. Tür düzeyinde değerlendirildiğinde *C.*

parapsilosis sensu stricto izolatlarında %78.9, *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* izolatlarında %100; materyal düzeyinde değerlendirildiğinde idrar izolatlarında %75, kan izolatlarında %77.8, kulak izolatlarında %75 esteraz pozitifliği belirlenmiştir. TAK, yara, ağız içi sürüntüsü, boğaz, yanık izolatlarının tümünde de esteraz aktivitesinin pozitif olduğu gözlemlenmiştir.

Esteraz enzim aktivitesinin kandidoz patogenezindeki rolü ile ilgili bilgiler sınırlı olduğundan, bu konu hakkında kesin bir kaniya varılamamıştır. Yeni türlerin esteraz aktiviteleri ile ilgili ilk bilgi çalışmamızda tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar ekstrasellüler esterazın fungal üreme için koşul olmadığını ve esteraz aktivitesinin bir virulans faktör olarak görülmediğini düşündürmektedir. Bununla birlikte birçok çalışmada kandidoz patogenezinde esteraz aktivitesinin rolü araştırılmıştır.

Yücesoy ve ark.'nın (79) çalışmasında aralarında 14 *C. parapsilosis* suşunun olduğu 124 *Candida* türünün esteraz aktivitesi araştırılmış; 10 günlük inkübasyon süresinin sonunda *C. parapsilosis* suşlarının 8'inde (%57) esteraz pozitifliği saptanmıştır.

Akyol ve ark.'nın (80) çalışmasında idrar ve kan örneklerinden elde edilen ve *C. parapsilosis* olarak tanımlanan 53 izolatın virulans faktörleri üzerinde değerlendirme yapılmış; sadece 1 (%1.8) idrar izolatında esteraz pozitifliği saptanmıştır.

Kumar ve ark. (81) HIV seropozitif ve malignansili hastalardan elde ettiği *Candida* izolatlarının farklı virulans faktörlerini değerlendirdiği çalışması kapsamında 4 *C. parapsilosis* suşundan sadece 1'inde esteraz pozitifliği gözlemlendiğini raporlamıştır.

Dolapçı ve ark. (82) çeşitli *Candida* türlerinin lipolitik aktivitesini değerlendirdiği çalışmasında incelemeye aldığı 10 *C. parapsilosis* izolatının hiçbirinde esteraz pozitifliği saptanmadığını raporlamıştır. Bu çalışmada *C. parapsilosis* için kullanılan kalite kontrol suşu ATCC 22019'da da esteraz pozitifliğinin saptanmadığı belirlenmiştir.

Keçeli ve ark. (83) *Candida* türlerinin esteraz aktivitesini değerlendirdiği çalışmasında 3 *C. parapsilosis* izolatının hiçbirinde esteraz aktivitesini saptamadıklarını belirlemiştir. Aktaş ve ark.'nın (84) çalışmasında da incelenen 2 *C. parapsilosis* suşunda esteraz pozitifliği tespit edilmemiştir.

Rudek (54), Tween 20, 40, 60, 80 ve 85 maddelerini substrat olarak kullandığı çalışmasında, klinik örneklerden izole edilen *Candida* türleri arasında esteraz aktivitesinin yaygın görüldüğünü, izolatların substratlardan en az biri için lipolitik aktivite gösterdiğini bildirmiştir.

Slifkin (55) *C. parapsilosis* ve *Candida glabrata* suşlarında lipolitik aktivite görülmediğini bildirmesine karşın; Tsuboi ve ark. (52) 85 klinik *Candida* izolatu üzerinde yaptıkları bir çalışmada izolatların farklı derecelerde esteraz aktivitesi gösterdiğini; *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*'in esteraz aktivitelerinin diğer *Candida* türlerinden daha yüksek olduğunu raporlamıştır.

Şimdiye kadar *C. parapsilosis* grubunun in vitro enzimatik aktivitesini değerlendiren birkaç çalışma yapılmıştır. Üstelik bunların çoğunda grup tür düzeyinde ayırdedilmemiştir ve bu çalışmaların sonuçları oldukça çelişkilidir. Bu nedenle *C. parapsilosis* sensu stricto ve yakın türlerin enzimatik aktiviteleri açısından farklılıkları karakterize edilmemiştir. Bu çalışmalardan biri 2011 yılında Yi Ping Ge ve ark. (85) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar 20 *C. parapsilosis* sensu stricto izolatının 1'inde, 12 *C. metapsilosis* izolatının 2'sinde esteraz aktivitesi saptamış; esteraz pozitif *C. parapsilosis* sensu stricto izolatının deriden, esteraz pozitif *C. metapsilosis* izolatının 1'inin deriden diğerinin de vajinadan elde edildiğini raporlamıştır. Çalışmada, iki tür arasında besiyerindeki inokulasyon bölgesinin etrafındaki halenin çapının ölçümüne göre tespit edilen aktivite düzeyleri açısından anlamlı farklılık gözlenmediği belirtilmiştir.

Çalışmamızda yer alan *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* izolatlarının sayısı az olduğundan türlerin esteraz aktiviteleri arasındaki anlamlılık belirlenmemiştir. Bunun için daha fazla sayıda izolatla yapılacak başka çalışmalara gereksinim vardır.

Candida albicans, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* nitrojen kaynağı olarak eksojen proteinlerin bulunduğu ortamlarda asit proteinaz sekrete eder. Bu enzimler pepstatin ile inaktive edilirler; bu nedenle pepsin ailesine aittirler (41). *C. parapsilosis*'de sekrete aspartik proteinaz kodlayan 3 gen tanımlanmış ve *SAPP1*, *SAPP2* ve *SAPP3* olarak isimlendirilmiştir (45).

Salgısal aspartik proteinaz üretimi *C. parapsilosis* suşları arasında farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmalarda *C. parapsilosis*'in vulvovajinal ve deri izolatlarının in vitro Sap aktivitelerinin kan izolatlarından fazla olduğu, böylece izolasyon bölgesi ile Sap üretimi arasında bağlantı bulunduğu gösterilmiş; sonuç olarak Sap'ların kan akımı enfeksiyonları patogenezindeki rolünün, özellikle vajinal enfeksiyonlar olmak üzere lokalize invaziv enfeksiyonlardan daha az önemli olduğu ileri sürülmüştür. Bir başka çalışmada da *C. parapsilosis*'in aspartik proteinaz üretiminin özellikle yüzeysel *Candida* enfeksiyonlarında gözlemlendiği, vajinal çevrenin proteinaköz materyal bulundurması ve geniş

pH aralığına tolerans göstermesi gibi enzim ekspresyonuna ve yüksek düzeyde proteinaz indüklenmesine uygun bazı özellikler içerdiği belirtilmiştir (28, 86).

Wu ve Samaranayake'nin (39) çalışmasında *C. albicans*, *C. tropicalis* *C. parapsilosis* klinik kökenlerinin glukoz katılmış insan tükürüğünde Sap salgılanmasının iyi olduğu, *C. albicans* kökenlerinin albicans olmayanlardan daha fazla proteolitik oldukları, tükürüğün total protein içeriğinin Sap'ların salgılanma derecesini etkilediği, bu üç türün ağız kandidiyazı oluşturmasında karbonhidrat diyeti ile de bağlantılı olarak Sap'ların etkin rol oynamalarının kuvvetli olasılık olduğu bildirilmiştir.

2009 yılında Silva ve ark.'nın (87) 6 *C. parapsilosis* izolatının virulans özelliklerini belirlemek üzere rekonstite insan epitelyal hücrelerinde yaptıkları çalışmada, kontrol suşu ATCC 22019'un *SAPP3* genini eksprese etmediği, bunun dışındaki tüm planktonik formdaki *C. parapsilosis* suşlarının 3 *SAPP* geninin de eksprese ettiği; suşların rekonstite insan epitelyal hücrelerini enfekte eden formlarında ise farklı *SAPP* gen ekspresyon profillerinin ortaya çıktığı bildirilmiştir. Çalışmada insan epitelyal dokuları enfekte eden 1 üriner izolatın *SAPP1*, 2 vajinal izolatın *SAPP2* ve 1 vajinal izolatın da *SAPP3* genini eksprese etmediği; böylece *SAPP* ekspresyonunun suş bağımlı olduğu, aynı zamanda enfekte izolatların daha fazla oranda *SAPP* eksprese ettikleri raporlanmıştır.

Çalışmamızda 42 *C. parapsilosis* grubu izolatının *SAPP* gen varlığı *SAPP1*, *SAPP2* ve *SAPP3* primerleri kullanarak PCR yöntemi ile belirlenmiştir. *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarında *SAPP1*, *SAPP2* ve *SAPP3* geni pozitifliğinin %100 olduğu; *C. metapsilosis*'in tüm izolatlarında sadece *SAPP3* geninin, *C. orthopsilosis* suşunda ise tüm genlerin pozitif olduğu belirlenmiştir. *C. metapsilosis* izolatlarının *SAPP1* ve *SAPP2* genleri belirlenmemiştir. Bu genlerin sekanslama yöntemi ile dizi analizinin belirlenmesi gerekmektedir.

Parenteral nutrisyon oral veya enteral yoldan beslenemeyen hastalarda malnutrisyonun önlenmesi gereken durumlarda endikedir. Enterokutanöz fistül, anastomatik kaçak, postoperatif ileus, iskemik barsakla ilişkilendirilen kısa barsak sendromu, Crohn's hastalığı, abdominal travma, radyasyon enteriti veya intestinal obstrüksiyon gibi hastalıklarda parenteral nutrisyon kullanma endikasyonu vardır (88).

Parenteral nutrisyon durumu kritik, akut ve kronik bakım alan hastalarda kateter ilişkili kan akımı enfeksiyonları için bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. Parenteral nutrisyon uygulanımı için kullanılan santral venöz kateterlerde %1.3-26.2 oranında enfeksiyon görüldüğü, bu geniş oran aralığının araştırma yöntemine, kateter ilişkili kan

akımı enfeksiyonu tanımlamasına, popülasyon ve çalışma alanına göre belirlendiği bildirilmiştir (88).

Kuwahara ve ark.'nın (89) çalışmasında bakteriyal ve kandidal mikroorganizmaların standart ve klinik izolatlarının lipid içeren TPN solüsyonlarındaki üremeleri araştırılmıştır. Çalışmada asiditenin mikrobiyal üreme üzerine etkisinin araştırılması için farklı pH değerlerinde lipid içeren TPN solüsyonları, multivitamin ve bisülfid etkisinin araştırılması için de bu maddelerle desteklenmiş TPN'ler kullanılmıştır. *Candida* türlerini temsilen *C. albicans* klinik izolatu ve standart köken olarak ATCC 10231 analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda hem klinik, hem de kontrol *Candida* suşunun herhangi bir pH değerindeki lipid içerikli TPN'de hızlıca ve benzer üreme artışı gösterdiği, üremelerinin bisülfid veya multivitamin eklenmesinden etkilenmediği belirlenmiştir.

İspanya'da parenteral nutrisyon kateterlerinde kolonize olan mikroorganizma türlerinin belirlenmesi ve kolonizasyon açısından risk faktörlerinin değerlendirilmesi amacıyla 2657 hastadan 3632 kateterin analiz edildiği bir çalışmada, 689 hastaya ait 823 kateterde (%22.8) mikrobiyal kolonizasyon varlığı belirlenmiştir. Kolonize kateterlerin 22'sinde maya türlerinin bulunduğu, 13'ünde de kandidemi epizodu geliştiği raporlanmış, uzun süreli kateterizasyonun (>20 gün) ve başka enfeksiyon odağı varlığının maya kolonizasyon riskini önemli derecede artırdığı bildirilmiştir (90).

Levy ve ark.'nın (27) çalışmasında 80 pediatrik hastada oluşan 81 kandidemi epizodu değerlendirilmiş; epizodların 35'inin (%43) yenidoğanlarda, 46'sının (%57) infantlarda ve 6 ay-20 yaş arasındaki çocuklarda gözleendiği, en yaygın izole edilen türün *C. parapsilosis* olduğu, türün yenidoğanlardaki izolasyonunun diğer çocuklardaki izolasyonundan anlamlı derecede yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Çalışmada en yaygın görülen potansiyel predispozan faktörlerin santral venöz kateter varlığı, parenteral nutrisyon solüsyonu kullanımı ve antibiyotik tedavisi öyküsü olduğu, antibiyotik tedavisi öyküsü oranının yenidoğanlarda 22 (%63), yenidoğan dışındaki diğer çocuklarda 36 (%78); santral venöz kateter varlığı oranının yenidoğanlarda 29 (%83), yenidoğan dışındaki çocuklarda 36 (%78); TPN kullanımı oranının yenidoğanlarda 32 (%91), yenidoğan dışındaki çocuklarda 28 (%61) olduğu belirlenmiştir. Çalışmada *C. parapsilosis* ile enfekte hastaların santral venöz kateter veya TPN kullanımı oranı *C. parapsilosis* dışındaki *Candida* türleri ile enfekte hastaların bu materyalleri kullanım oranından anlamlı derecede yüksek bulunmuş; santral venöz kateter ve TPN kullanımı ile *C. parapsilosis* enfeksiyonu arasında kuvvetli bağlantı olduğu sonucuna varılmıştır.

Clark ve ark.'nın (91) bir *C. parapsilosis* fungemisi salgın kümesi kapsamındaki 15 kesin ve 7 şüpheli hasta grubu ile salgın döneminde aynı hastanede yatarak tedavi alan hastalardan seçili kontrol grubu üzerinde yaptıkları olgu-kontrol çalışmasında fungemiye neden olan potansiyel risk faktörleri analiz edilmiştir. Çalışmada çok değişkenli analiz yöntemi ile risk faktörlerinin bağımsız haliyle anlamı değerlendirilmiş, eşzamanlı YBÜ'de yatış ve TPN kullanımının bağımsız olarak fungemi olgusu oluşumunda artmış risk ile bağlantılı olduğu ve tahmini modellerde diğer faktörlere göre klinikle ilintisi en yüksek olan faktörler olduğu belirlenmiştir. Yapılan analizlerde TPN hazırlanması aşamasında bir problem olmadığı; ancak sağlık bakım çalışanlarının el hijyenine uyum oranının başka çalışmalarla uyumlu şekilde %50'den az olduğu belirlenmiş; uygun olmayan el hijyeni nedeniyle sağlık bakıcılarının, ellerinde geçici olarak kolonize olan maya türlerini, sık olarak etkileşimde buldukları yoğun bakım hastalarına taşıdıkları; bu nedenle sağlık bakıcılarının önerilen el hijyeni pratiğine uyumunun iyileştirilmesi gerektiği ileri sürülmüştür.

Kuhn ve ark. (72) Missisipi Hastanesi'nde gözlenen bir *C. parapsilosis* salgını izolatlarının genetik ve fenotipik özelliklerinin belirlenmesi kapsamında yaptıkları bir çalışmada, salgın kümesinde bulunan 5 kan veya kateter izolatu ve 1 sağlık bakım çalışanı el izolatu ile aynı hastanenin klinik koleksiyonundan sağlanan sporadik enfeksiyon izolatlarını silikon elastomer diskler üzerinde biyofilm üretim yetenekleri yönünden karşılaştırmış, salgın izolatlarının biyofilm üretme yeteneklerinin kendi aralarında benzer olduğunu; fakat klinik koleksiyon izolatlarına göre anlamlı derecede yüksek olduğunu gözlemiş, salgın izolatlarının yeast nitrogen base besiyeri (YNB) yerine TPN'de üretilmeleri durumunda biyofilm üretimlerinin %40'lara varan oranda arttığını belirlemiştir.

Almirante ve ark.'nın (92)2002-2003 yılları arasında İspanya'daki 14 hastaneyi kapsayan prospektif populasyon bazlı kandidemi *surveyans* çalışmasında 345 kandidal kan akımı enfeksiyonu epizodu tanımlanmış, bunların %23 oranıyla 78'inin *C. parapsilosis* ile oluşturulduğu belirlenmiştir. Çalışmada *C. parapsilosis* fungemisi ile ilişkilendirilen en yaygın üç faktörün %97 oranla IV kateter kullanımı, %91 oranla daha önceden antibiyotik kullanım öyküsü, %54 oranla parenteral nutrisyon kullanımı olduğu bildirilmiştir. *C. parapsilosis* kandidemisinin risk faktörlerinin tanımlanması için 78 *C. parapsilosis* epizodu ile kontrol grubu olarak belirlenen ve aynı *surveyans* çalışmasından elde edilen 175 *C. albicans* izolatu karşılaştırılmış, tek değişkenli analiz yöntemine göre vasküler

kateter kullanımının *C. parapsilosis* fungemisinde en yaygın kaynak olduğu ve *C. parapsilosis* fungemi hastalarının TPN kullanım oranlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiş, diğer epidemiyolojik çalışmalarda da gösterildiği gibi *C. parapsilosis* enfeksiyonlarının özellikle parenteral nutrisyon alan hastalarda olmak üzere intravenöz kateteri bulunan hastalarda daha sıklıkla gözlemlendiği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda *C. parapsilosis* grubu türlerinin TPN'de üreme yetenekleri değerlendirilmiştir. Şimdiye kadar bu 3 türün TPN'de üretimini karşılaştıran çalışma yapılmamıştır. Ancak belirttiğimiz çalışmalarda *Candida* türlerinin TPN'de üreme yeteneklerinin iyi olduğu; TPN gereksinimi nedeniyle kateter kullanan hastalarda fungemi açısından artmış risk oluştuğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarının 48 saat süresince genellikle TPN'de üreme gösterdikleri; ancak *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* izolatlarının üreme göstermedikleri belirlenmiştir. TPN'de üreme göstermemeleri ve biyofilm üretimlerinin negatif olması nedeniyle yeni tanımlanan türlerin *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarından daha az virulan olabileceği kanaatindeyiz. Ancak klinik örneklerden izole edilen baskın türün *C. parapsilosis* sensu stricto olduğunu ve TPN'de iyi ürediğini bildiğimizden, TPN hazırlanması aşamasında sterilizasyon koşullarına dikkat edilmesi ve TPN solüsyonlarında tür üremesi açısından rutin tarama çalışmaları yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. 42 *Candida parapsilosis* grubu izolatının 20'si (%47.6) idrar, 9'u (%21.4) kan, 4'ü (%9.5) TAK, 4'ü (%9.5) kulak, 2'si (%4.8) yanık, 1'i (%2.4) yara, 1'i (%2.4) ağız içi sürüntüsü, 1'i (%2.4) boğaz sürüntüsü örneklerinden elde edildi.
2. *Candida parapsilosis* grubu izolatlarının 38'i (%90.5) *C. parapsilosis* sensu stricto, 3'ü (%7.1) *C. metapsilosis*, 1'i (%2.4) *C. orthopsilosis* olarak belirlendi.
3. İdrar izolatlarının 20'si (%100) *C. parapsilosis* sensu stricto, kan izolatlarının 7'si (%77.8) *C. parapsilosis* sensu stricto; 2'si (%22.2) *C. metapsilosis*; TAK izolatlarının 3'ü (%75) *C. parapsilosis* sensu stricto; 1'i (%25) *C. metapsilosis*, kulak izolatlarının 3'ü (%75) *C. parapsilosis* sensu stricto; 1'i (%25) *C. orthopsilosis*; yara, yanık, ağız içi sürüntüsü ve boğaz sürüntüsü izolatları *C. parapsilosis* sensu stricto olarak belirlendi.
4. İzolatının 27'si (%64.3) erişkin yaş grubundan; 15'i (%35.7) çocuk yaş grubundan elde edildi.
5. Erişkin yaş grubundan izole edilen kökenlerin 13'ü (%48.2) servis, 8'i (%29.6) YBÜ ve 6'sı (%22.2) poliklinik hastalarından; çocuk yaş grubundan izole edilenlerin 7'si (%46.7) servis, 5'i (%33.3) YBÜ, 3'ü (%20) poliklinik hastalarından izole edildi.
6. PYBÜ izolatları arasında bulunan 1 kan ve 1 idrar izolatu YDYBÜ'deki bir hastadan izole edildi.
7. *Candida metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* izolatları sadece erişkin yaş grubu klinik örneklerinde dağılım gösterirken; *C. parapsilosis* sensu stricto izolatları her iki yaş grubunda da tespit edildi.
8. *Candida metapsilosis* suşlarından 1'i 71 yaşındaki CYBÜ hastasının TAK'ından, 1'i 77 yaşındaki üroloji servisi hastasının kanından, 1'i de 48 yaşındaki NYBÜ hastasının kan kültüründen; *C. orthopsilosis* suşu 72 yaşındaki poliklinik hastasının kulak kültüründen izole edildi.

9. 42 *C. parapsilosis* grubu izolatının 34'ü (%80.9) esteraz üretimi yönünden pozitif, 8'i (%19.1) negatif olarak belirlendi.
10. 38 *C. parapsilosis* sensu stricto izolatının 30'u (%78.9) esteraz pozitif iken, *C.parapsilosis* dışı 4 alt türün (*C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis*) 4'ü (%100) de esteraz pozitif olarak belirlendi.
11. İdrar izolatlarının 15'i (%75), kan izolatlarının 7'si (%77.8), kulak izolatlarının 3'ü (%75) esteraz pozitif bulundu. TAK, yanık, yara, ağız içi sürüntüsü ve boğaz izolatlarının tümünde esteraz pozitif olarak saptandı.
12. Pediatri grubundan elde edilen 15 izolatın 13'ü (%86.6) esteraz pozitif iken, erişkin gruptan elde edilen 27 izolatın 21'i (%77.7) esteraz pozitif idi.
13. PYBÜ hastalarından elde edilen izolatların 4'ü (%80); erişkin YBÜ hastalarından elde edilen izolatların 5'i (%62.5); pediatri servis hastalarından elde edilen izolatların 6'sı (%85.7), erişkin servis hastalarından elde edilen izolatların 11'i (%84.6); pediatri poliklinik hastalarından elde edilen izolatların 3'ü (%100), erişkin poliklinik hastalarından elde edilen izolatların 5'i (%83.3) esteraz pozitif olarak belirlendi.
14. Kandan izole edilen *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarının 4'ü 48 saat süresince giderek artan oranlarda üreme gösterirken; 2 *C. parapsilosis* sensu stricto ve 2 *C. metapsilosis* izolatının üremelerinde artış görülmedi.
15. Kandan izole edilen ve TPN'de üreyen *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarından ikisinde esteraz üretimi negatif, biyofilm üretimi pozitif; birinde hem biyofilm hem de esteraz üretimi pozitif; diğer kan izolatında ise esteraz üretimi pozitif, biyofilm üretimi negatif olarak belirlendi.
16. Kandan izole edilen ve TPN'de üremeyen *C. parapsilosis* sensu stricto ve *C. metapsilosis* izolatlarında esteraz üretimi pozitif, biyofilm üretimi negatif olarak belirlendi.
17. Total parenteral nutrisyon'da üreme gösteren kan izolatlarının 4'ü de YBÜ'den, üreme göstermeyen kan izolatlarının biri PYBÜ'den; diğer 3'ü üroloji servisinden, yanık ünitesinden ve pediatri hematoloji servisinden izole edildi.
18. 20 idrar izolatlarının 9'unda TPN'de üreme gözlemlendi. Üreme gösteren izolatlardan 120, 231, 139, 308, 174 ve 73 no'lu izolatlarda hem esteraz hem de biyofilm üretimi pozitif; 269, 396 ve 39 no'lu idrar izolatlarında esteraz üretimi

pozitif, biyofilm üretimi negatif idi. Her iki virulans faktörünün pozitif olduğu 3 izolat en fazla üreme yeteneği gösterdi.

19. TAK izolatlarının biri 48 saat süresince üreme gösterirken; diğer TAK izolatı, boğaz izolatı ve TAK'da üreyen *C. metapsilosis* izolatı üremesinde artış saptanmadı. İzolatların hepsinde de esteraz üretimi pozitif, biyofilm üretimi negatif idi.
20. 2 yanık yarası izolatı da 48 saatlik süre boyunca TPN'de üreme gösterirken, deri yarası izolatı yanık yarası izolatlarından daha fazla üreme yeteneği gösterdi. İzolatların hepsinde de esteraz üretimi pozitif, biyofilm üretimi negatif saptandı.
21. Kulaktan elde edilen bir *C. parapsilosis* sensu stricto izolatı 48 saat süresince giderek artan oranlarda üreme gösterirken, diğer 2 *C. parapsilosis* sensu stricto izolatı üreme göstermedi. *C. orthopsilosis* izolatının ise üremesi azalma gösterdi. İzolatların hepsinde de esteraz üretimi pozitif, biyofilm üretimi negatif olarak saptandı.
22. Biyofilm üretimi sadece *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarında gözlenirken, *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* izolatlarında belirlenmedi.
23. *Candida parapsilosis* sensu stricto izolatlarının biyofilm üretme oranları %28.9 olarak belirlendi.
24. Kan izolatlarının %33.3'ünde, idrar izolatlarının %40'ında biyofilm üretimi saptandı.
25. Kan ve diğer materyallerden elde edilen *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarının biyofilm üretimleri arasında istatistiki yönden anlamlı farklılık belirlenmedi ($p= 0.390$).
26. 38 *C. parapsilosis* sensu stricto izolatı, 1 *C. metapsilosis* izolatı ve *C. orthopsilosis* izolatında 3 *SAPP* geni de pozitif olarak belirlendi.
27. 2 *C. metapsilosis* izolatında sadece *SAPP3* gen bandı gözlemlendi, *SAPP1* ve *SAPP2* genleri tespit edilmedi.

Sonuç olarak; *C. parapsilosis* grubu türlerinin farklı biyolojik materyallerden izole edilebildiği, en baskın görülen türün *C. parapsilosis* sensu stricto olduğu, yeni tanımlanan türlerin kan gibi steril vücut sıvılarında da bulunabildiği; bu nedenle de kan akımı enfeksiyonları gibi önemli insan hastalıklarında da gözlenebileceği belirlenmiştir.

Esteraz enzimi üç türde de gözlenmiş, biyofilm üretimi ve TPN'de üreme yeteneği ise sadece *C. parapsilosis* sensu stricto türlerinde gözlenmiş olup; yeni tanımlanan türlerin sayılarının az olmasından dolayı bu virulans özellikleri arasındaki farklılık istatistiki düzeyde belirlenmemiştir. Bunun için daha fazla sayıda izolatin analiz edildiği başka çalışmalara gereksinim vardır.

Candida metapsilosis izolatlarında *SAPP1* ve *SAPP2*'nin belirlenmemesi nedeniyle bu genlerin dizi analizlerini belirleyecek sekanslama çalışmaları yapılmalıdır.

7. ÖZET

Candida parapsilosis grubu genellikle invaziv işlemler ve prostetik aletlerle ilişkilendirilen enfeksiyonlara neden olan önemli bir maya türü olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu çalışmada *C. parapsilosis* grubu türlerinin dağılımını belirlemek ve bu mayanın patogenezinde rolü olan esteraz üretimi, TPN'de üreme yeteneği, biyofilm üretimi ve *SAPP* genlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmaya KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji AbD Hasta Hizmetleri Laboratuvarına gönderilen farklı klinik ve poliklinik hastası örneklerinden elde edilen 42 *C. parapsilosis* izolatı dahil edilmiştir. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması çimlenme borusu oluşturmamaları, cornmeal-Tween 80 agarda mikroskopik inceleme, CHROMagarda gösterdikleri koloni rengi ve API 20C AUXmaya identifikasyon sistemi ile sağlanmıştır. *C. parapsilosis* grubu izolatlarının ayırımı PCR-RFLP yöntemi ile yapılmıştır. Esteraz üretimi Tween 80 opasite testi ile, TPN solüsyonunda üreme yetenekleri KTÜ Farabi Hastanesi'nden sağlanan TPN solüsyonları kullanılarak değerlendirilmiştir. Biyofilm üretimi, tetrazolium tuzunun indirgenmesi esasına dayanan 96 kuyucuklu mikrotiter pleyt yöntemi ile tespit edilmiştir. Türlerin *SAPP* gen profilleri *SAPP1*, *SAPP2*, *SAPP3* primerleri kullanılarak PCR yöntemi ile belirlenmiştir.

Çalışmamız sonucunda izolatların 38'i (%90.5) *C. parapsilosis* sensu stricto, 3'ü (%7.1) *C. metapsilosis*, 1'i (%2.4) *C. orthopsilosis* olarak belirlenmiştir. *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarının %78.9'u, *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* izolatlarının hepsi pozitif esteraz aktivitesi göstermiştir. *C. parapsilosis* sensu stricto izolatları TPN solüsyonlarında genellikle üreme artışı gösterirken, *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* izolatları belirgin bir üreme artışı göstermemiştir. *C. parapsilosis* sensu stricto izolatlarında %28.9 oranında biyofilm üretimi belirlenmiştir. *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis* izolatlarında biyofilm üretimi negatif olarak tespit edilmiştir. *C. parapsilosis* sensu stricto ve *C. orthopsilosis* izolatlarında tüm *SAPP* genleri tespit edilmiş, *C. metapsilosis*

izolatlarının üçünde ise *SAPP3* geni pozitif iken *SAPP1* ve *SAPP2* genleri belirlenmemiştir.

Sonuç olarak, *C. parapsilosis* grubu türlerinin dağılımının diğer çalışma verileri ile uyumlu olduğu saptanmıştır . Çalışmamızda bulunan yeni türlerin sayıları az olduğundan türlerin virulans özellikleri arasındaki farklılıklar istatistiki düzeyde belirlenmemiştir. Bunun için daha fazla izolatla yapılacak ek çalışmalara gereksinim vardır. Ek olarak *C. metapsilosis* izolatlarında *SAPP1* ve *SAPP2*'nin belirlenmemesi nedeniyle bu genlerin sekans analizi yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: *C. parapsilosis* grubu, *SADH* geni, virulans faktörler.

8. SUMMARY

Investigation of Virulence Properties of *Candida parapsilosis* Complex Isolates

Candida parapsilosis complex have emerged as an important yeast species causing infections which usually occur in association with invasive procedures or prosthetic devices.

The aim of this study was to determine distribution of *C. parapsilosis* complex isolates and analyse presence of esterase production, the capability of growth in total parenteral nutrition (TPN) solution, biofilm production and *SAPP* gene expression that is involved in its pathogenesis.

In this study, a total of 42 *C. parapsilosis* complex isolates were included that isolated from various samples of inpatients and outpatients which were sent to the Laboratory of Clinical Microbiology in Karadeniz Technical University, Faculty of Medicine. Isolates were identified to species level by non production of germ tube, microscopic evaluation on cornmeal-*Tween* 80 agar, determination of colour of colonies on CHROMagar and API 20C AUX identification kits. Separation of *C. parapsilosis* complex was performed by PCR-RFLP. Esterase activity of the *C. parapsilosis* complex strains were determined by using *Tween*-80 opacity test. The capability of growth in TPN solution was assessed. Biofilm production was determined by using 96 well plate-based method that is based on reduction of a tetrazolium salt. *SAPP* gene profile of the isolates were determined by using PCR with primers of *SAPP1*, *SAPP2* and *SAPP3*.

Of the total 42 *C. parapsilosis* complex isolates, 38 (%90.5) were identified as *C. parapsilosis* sensu stricto, 3 (%7.1) *C. metapsilosis* and 1 (%2.4) *C. orthopsilosis*, respectively. %78.9 of *C. parapsilosis* sensu stricto and all of the *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* isolates (%100) yielded with positive esterase activity. While *C. parapsilosis* sensu stricto isolates generally showed increased growth, *C. metapsilosis* and *C. orthopsilosis* isolates did not show as markedly growth in TPN solution. Of *C. parapsilosis* sensu stricto isolates, %28.9 produced biofilm. *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* isolates did not produce biofilm. *C. parapsilosis* sensu stricto and *C. orthopsilosis* were positive for

all of *SAPP* genes. Among to the *C. metapsilosis* isolates, all of them had *SAPP3*, but presence of *SAPP1* and *SAPP2* genes were not determined.

In conclusion, it was found that the distribution of *C. parapsilosis* complex species was in paralel with other studies. Difference among virulance factors of the species can notbe determined at statistically significant level because of small number of the newly described isolates. For this reason, additional study is required which much isolates will be used. Additionally, because of *SAPP1* and *SAPP2* genes were not determined in 2 *C. metapsilosis* isolates, sequence analysis of this genes must be performed.

Key Words: *C. parapsilosis* complex, *SADH* gene, virulance factors.

9. KAYNAKLAR

1. Ekşi F, Bayram A, Karşılıgil T, Balcı İ: Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Candida*'ların tür dağılımı. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 37 (1) : 26-30, 2007.
2. Ekşi F, Sözen E, Bayram A, Karşılıgil T, Balcı İ: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Candida* suşlarında slime üretimi ve hemolitik aktivitenin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 38 (1) : 27-32, 2008.
3. Trofa D, Gacser A and Nosanchuk J. D: *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clin Microbiol Rev, 21(4): 606–625, 2008.
4. Yakupoğulları Y, Aşçı Toraman Z: Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan *Candida* kökenlerinde slime faktörü üretiminin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 34 (3):178-181, 2004.
5. Kocsube S, Toth M, Vagvolgyi C, Doczi I, Pesti M, Pocsi I, Szabo J and Varga J: Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. J Med Microbiol, 56 (Pt 2):190–195, 2007
6. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L: Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. Curr Genet, 55 (5): 497–509, 2009.
7. Van Asbeck E.C, Clemons K.V, Stevens D.A: *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. Crit Rev Microbiol, 35(4): 283–309, 2009.
8. Tavanti A, Davidson A. D, Gow N. A. R, Maiden M. C. J and Odds F. C: *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol, 43 (1): 284–292, 2005.
9. Tavanti A, Hensgens L. A. M, Ghelardi E, Campa M and Senesi S: Genotyping of *Candida orthopsilosis* clinical isolates by amplification fragment length polymorphism reveals genetic diversity among independent isolates and strain maintenance within patients. J Clin Microbiol, 45 (5): 1455–1462, 2007.
10. Yıldırım M, Mumcuoğlu İ, Kurşun Ş, Koldaş K, Yetener V, Balaban N: İnfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Candida albicans* ve non-*albicans* *Candida* suşlarındaki bazı virulans faktörlerinin karşılaştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 39 (3-4): 62-68, 2009.

11. Tumbay E : *Candida* türleri. Ed: Ustaçelebi Ş., Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. s. 1081-1086, Günes Kitabevi, Ankara, 1999.
12. Segal E, Elad D: Candidiasis; laboratory diagnosis. Ed: Merz W.G, Hay R.J., Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections CD-rom, version 10.0, Edward Arnold (Publishers) Ltd, ASM Press, 2006.
13. Tay S. T, Na S. L and Chong J: Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. J Med Microbiol, 58 (Pt 2): 185–191, 2009.
14. Bonassolia L. A, Bertolia M, Svidzinskib T. I. E: High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. J Hosp Infect, 59 (2): 159–162, 2005.
15. Weems J.J.Jr: *Candida parapsilosis*: Epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. Clin Infect Dis, 14 (3):756-66, 1992.
16. Nosek J, Adamikova L, Zemanova J, Tomaska L, Zufferey R, Mamoun C.B: Genetic manipulation of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. Curr Genet, 42(1): 27-35, 2002.
17. Pfaller M.A, Messer S.A, and Hollis R.J: Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*: Diagn Microbiol Infect Dis, 21 (1):9-14, 1995.
18. Van Asbeck E.C, Huang Y.C, Markham A.N, Clemons K.V, Stevens D.A: *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. Mycopathologia, 164 (6): 287–293, 2007.
19. Gonçalves S.S, Amorim C.S, Nucci M, Padovan A.C.B, Briones M.R.S, Melo A.S.A and Colombo A.L: Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. Clin Microbiol Infect, 16 (7): 885–887, 2010.
20. Dizbay M, Fidan I, Kalkancı A, Sarı N, Yalcın B, Kuştimur S & Arman D: High incidence of *Candida parapsilosis* candidaemia in non-neutropenic critically ill patients: Epidemiology and antifungal susceptibility. Scand J Infect Dis, 42 (2):114–120, 2010.
21. Lin D, Wu L. C, Rinaldi M. G, and Lehmann P. F: Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. J Clin Microbiol, 33 (7):1815–1821, 1995.
22. Zancope-Oliveira R. M., James M. J, Derossi A. P, Sampaio J. L, Muniz M. M, Li R. K, Nascimento A. S, Peralta J. M, and Reiss E: Strain characterization of *Candida parapsilosis* fungemia by molecular typing methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 19 (7):514–520, 2000.

23. Lockhart S.R, Messer S.A, Pfaller M.A and Diekema D.J: Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol, 46 (8): 2659–2664, 2008.
24. Van Asbeck E C, Clemons K V, Markham A N, Stevens D A, The *Candida parapsilosis* Global Epidemiology Group: Molecular epidemiology of the global and temporal diversity of *Candida parapsilosis*. Scand J Infect Dis, 40 (10): 827–834, 2008.
25. Marrie T J and Costerton J W: Scanning and transmission electron microscopy of in situ bacterial colonization of intravenous and intraarterial catheters. J Clin Microbiol 19 (5): 687-693, 1984.
26. Kojic E M and Darouiche R O: Comparison of adherence of *Candida albicans* and *C. parapsilosis* to silicone catheters in vitro and in vivo. Clin Microbiol Infect, 9(7): 684-690, 2003.
27. Levy I, Rubin L G, Vasishtha S, Tucci V and Sood S K: Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. Clin Infect Dis, 26(5): 1086–8, 1998.
28. De Bernardis F, Mondello F, San Millan R, Ponton J and Cassone A: Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol, 37(11): 3481–3486, 1999.
29. Dagdeviren M, Cerikcioglu N and Karavus M: Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalised patients. Mycoses, 48 (5): 321–326, 2005.
30. Jain N, Hasan F and Fries B C: Phenotypic switching in fungi. Curr Fungal Infect, 2(3): 180–188, 2008.
31. Baillie G S, Douglas L J: Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. J Med Microbiol, 48 (7): 671-679, 1999.
32. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J: In vitro biofilm activity of Non-*Candida albicans* *Candida* species. Curr Microbiol, 61(6): 534–540, 2010.
33. Cocuau C, Rodier M H, Daniault G and Imbert C: Anti-metabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. J Antimicrob Chemother, 56 (3): 507–512, 2005.
34. Seneviratne C J, Jin L, Samaranayake L P: Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. Oral Dis, 14 (7):582–590, 2008.
35. Laffey S F and Butler G: Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. Microbiology, 151(Pt 4):1073–1081, 2005.
36. Lott T J, Kuykendall R J, Welbel S F, Pramanik A. & Lasker B A: Genomic heterogeneity in the yeast *Candida parapsilosis*. Curr Genet 23 (5-6): 463–467, 1993.

37. Enger L, Joly S, Pujol C, Simonson P, Pfaller M & Soll D R: Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. J Clin Microbiol 39 (2): 658–669, 2001.
38. Yücel A, Kantarcıoğlu A.S: *Candida*'ların patojenlik belirtgenleri. Cerrahpaşa Tıp Fak Derg, 30(3):172-186, 2000.
39. Wu T and Samaranayake L P: The expression of secreted aspartyl proteinases of *Candida* species in human whole saliva. J Med Microbiol, 48 (8): 711-720, 1999.
40. Ruchel R, Boning B and Borg M: Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of the enzyme during infection in vitro. Infect Immun, 53 (2): 411-419, 1986.
41. De Viragh P A, Sanglard D, Togni G, Falchetto R and Monod M: Cloning and sequencing of two *Candida parapsilosis* genes encoding acid proteases. J Gen Microbiol, 139 (2): 335-342, 1993.
42. Parra-Ortega B, Cruz-Torres H, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C: Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 104(3): 505-512, 2009.
43. Dostál J, Brynda J, Hruskova Heidingsfeldová O, Siegllová I, Pichová I, Rezácová P: The crystal structure of the secreted aspartic protease 1 from *Candida parapsilosis* in complex with pepstatin A. J Struct Biol, 167 (2):145–152, 2009.
44. Fusek M, Smith E A, Monod M and Foundling S I: *Candida parapsilosis* expresses and secretes two aspartic proteinases. FEBS Lett., 327 (1): 108-112, 1993.
45. Merkerova M, Dostal J, Hradilek M, Pichova I & Hruskova-Heidingsfeldova O: Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from *Candida parapsilosis*. FEMS Yeast Res, 6 (7):1018–1026, 2006.
46. Ghannoum M A: Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev, 13 (1): 122–143, 2000.
47. Costa, A., C. Costa, A. Misefari, and A. Amato. 1968. On the enzymatic activity of certain fungi. VII. Phosphatidase activity on media containing sheep's blood of pathogenic strains of *Candida albicans*. Atti Soc. Sci. Fis. Mat. Nat. XIV:93–101.
48. Werner, H. Untersuchungen über die Lipase-Aktivität bei Hefen und Hefeähnlichen Pilzen Zentbl Bakteriöl Mikrobiol Hyg 1 Abt Orig A, 200 (1):113-24, 1966.
49. Clancy et al. (C. J. Clancy, M. A. Ghannoun, and M. H. Nguyen, Programs Abstr. 36th Annu Meet Infect Dis Soc Am, abstr. 317, 1998)
50. Gacser A, Trofa D, Schafer W and Nosanchuk J D: Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. J Clin Invest, 117(10): 3049-3058, 2007.

51. Gacser A, Schafer W, Nosanchuk J S, Salomon S, Nosanchuk J D: Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol*, 44 (12): 1336–1341, 2007.
52. Tsuboi R, Komatsuzaki H and Ogawa H: Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infect Immun*, 64 (8): 2936–2940, 1996.
53. Sierra G: A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 23(1): 15-22, 1957.
54. Rudek W: Esterase activity in *Candida* Species. *J Clin Microbiol*, 8 (6): 756-759, 1978.
55. Slifkin M: *Tween* 80 Opacity Test responses of various *Candida* Species. *J Clin Microbiol*, 38 (12): 4626–4628, 2000.
56. Branchini M L, Pfaller M A, Rhine-Chalberg J, Frempong T and Isenberg H D: Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, 32(2):452-456, 1994.
57. Chen K H, Chang C T, Yu C C, Huang J Y, Yang C W, and Hung C C: *Candida parapsilosis* peritonitis has more complications than other *Candida* peritonitis in peritoneal dialysis patients. *Ren Fail*, 28 (3): 241–6, 2006.
58. Helvacı S., Gedikoğlu S., Mistik R.: *Candida albicans* tanısında germ tüp testi. *İnfeksi Derg*, 6: 141-143, 1992.
59. Pierce C G, Uppuluri P, Tristan A R, Wormley F L, Mowat E, Ramage G and Lopez-Ribot J L: A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*, 3(9): 1494–1500, 2008.
60. María D T, José T M, Maite1 R and Javier A: Distribution, biofilm production and antifungal susceptibility profile of Clinical isolates of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in a South Spain Tertiary Care Hospital. *Clin Microbiol Infect*, 2010.
61. Silva A P, Miranda I M, Lisboa C, Pina-Vaz C and Rodrigues A G: Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol*, 47(8): 2392–2397, 2009.
62. Lin D, Wu L C, Rinaldi M G and Lehmann P F: Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol*, 33(7):1815–1821, 1995.
63. Roy B and Meyer S A: Confirmation of the distinct genotype groups within the form species *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol*, 36(1): 216–218, 1998.

64. Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N and Khan Z U: Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. *J Med Microbiol*, 58 (Pt 6):745–752, 2009.
65. De Toro M, Torres M J, Maitel R and Aznar J: Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin Microbiol Infect*, 17 (3): 418-24, 2011.
66. Tavanti A, Hensgens L A, Mogavero S, Majoros L, Senesi S, Campa M: Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis* sensu strictu strains isolated from different geographic regions and body sites. *BMC Microbiol*, 28;10:203, 2010.
67. Hensgens L A, Tavanti A, Mogavero S, Ghelardi E, Senesi S: AFLP genotyping of *Candida metapsilosis* clinical isolates: Evidence for recombination. *Fungal Genet Biol*, 46 (10): 750–758, 2009.
68. Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, Almirante B, Pahissa A, Rodriguez-Tudela J L, Cuenca-Estrella M and the Barcelona Candidemia Project Study Group: Prevalence and susceptibility profile of *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*: Results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 52 (4): 1506–1509, 2008.
69. Borman A M, Linton C J, Oliver D, Palmer M D, Szekely A, Odds F C and Johnson E M: Pyrosequencing analysis of 20 nucleotides of internal transcribed spacer 2 discriminates *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. *J Clin Microbiol*, 47 (7): 2307–2310, 2009.
70. Mirhendi H, Bruun B, Schønheyder H C, Christensen J J, Fursted K, Gahrn-Hansen B, Johansen H K, Nielsen L, Knudsen J D and Arendrup M C: Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. *J Med Microbiol*, 59 (Pt 4): 414–420, 2010.
71. Chen Y C, Linc Y H, Chenc K W, Lii J, Tengc H J, Li S Y: Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu stricto, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 68 (3): 284–292, 2010.
72. Kuhn D M, Mukherjee P K, Clark T A, Pujol C, Chandra J, Hajjeh R A, Warnock D W, Soil D, Rand Ghannoum M A: *Candida parapsilosis* characterization in an outbreak setting. *Emerg Infect Dis*, 10 (6): 1074-81, 2004.
73. Yücesoy M, Karaman M: *Candida* türlerinin biyofilm üretimi ve antifungal duyarlılık paternleri. *Mikrobiyol Bült*, 38:91-98, 2004.
74. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A: Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia*, 164 (6): 265–269, 2007.

75. Ozkan S, Kaynak F, Kalkanci A, Abbasoglu U, Kustimur S: Slime production and proteinase activity of *Candida* species isolated from blood samples and the comparison of these activities with minimum inhibitory concentration values of antifungal agents. Mem Inst Oswaldo Cruz, 100(3): 319-324, 2005.
76. Shin J H, Kee S J, Shin M G, Kim S H, Shin D H, Lee S K, Suh S PandRyang D W: Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: Comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J Clin Microbiol, 40 (4): 1244–1248, 2002.
77. Song J W, Shin J H, Shint D H, Jung S I, Cho D, Kee S J, Shin M G, Suh S P, Ryang D W: Differences in biofilms production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. Med Mycol, 43 (7): 657–661, 2005.
78. Lattif A A, Mukherjee P K, Chandra J, Swindell K, Lockhart S R, Diekema D J, Pfaller M A, Ghannoum M A: Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. Int J Med Microbiol, 300 (4): 265–270, 2010.
79. Yücesoy M, Marol S: *Candida* türlerinin esteraz aktivitesinin belirlenmesi. Mikrobiyol Bült, 37:59-63, 2003.
80. Akyol V, Çerikçioğlu N: *Candida parapsilosis* klinik izolatlarının morfolojilerinin, genotiplendirilmesi ve farklı morfolojilerde bazı virülans faktörlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bült, 44 (4): 605-617, 2010.
81. Kumar C P, Menon T, Sundararajan T, Nalini S, Thirunarayan M A, Rajasekaran S, Venkateshkalu M: Esterase activity of *Candida* species isolated from immunocompromised hosts. Rev Iberoam Micol, 23 (2): 101-103, 2006.
82. Dolapçı İ, Tekeli A, Arıkan S: Çeşitli *Candida* türlerinin lipolitik aktivitelerinin saptanmasında Tween 80 Opaklaşma testinin değerlendirilmesi ve *C. albicans* ile *C. dubliniensis* ayırımındaki yeri. Mikrobiyol Bült, 38:429-433, 2004.
83. A. Keçeli S, Budak F: *Candida* türlerinin esteraz aktivitesi. Mikrobiyol Bült, 38: 99-103, 2002.
84. Aktas E, Yığıt N and Ayyıldız A: Esterase activity in various *Candida* species. J Int Med Res, 30 (3): 322 – 324, 2002.
85. Ge Y P, Lu G X, Shen Y N, Liu W D: In vitro evaluation of phospholipase, proteinase and esterase activities of *Candida parapsilosis* and *Candida metapsilosis*. Mycopathologia, 2011.
86. Cassone A, De Bernardis F, Pontieri E, Carruba G, Girmenia C, Martino P, Fernandez-Rodriguez M, Quindos G and Ponton J: Biotype diversity of *Candida parapsilosis* and its relationship to the clinical source and experimental pathogenicity. J Infect Dis, 171 (4):967-75, 1995.

87. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J, Malic S, Hooper S J, Williams D W: Characterization of *Candida parapsilosis* infection of an in vitro reconstituted human oral epithelium. *Eur J Oral Sci*, 117 (6): 669–675, 2009.
88. Opilla M: Epidemiology of bloodstream infection associated with parenteral nutrition. *Am J Infect Control*, 36 (10): S173.e5-8., 2008.
89. Kuwahara T, Shimono K, Kaneda S, Tamura T, Ichihara M, Nakashima Y: Growth of microorganisms in total parenteral nutrition solutions containing lipid. *Int J Med Sci*, 18; 7(3):101-109, 2010.
90. Llop J, Badià M B, Comas D, Tubau M, Joèdar R: Colonization and bacteremia risk factors in parenteral nutrition catheterization. *Clin Nutr*, 20(6): 527-534, 2001.
91. Clark T A, Slavinski S A, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs B A, Brandt M E, Webb R M, Currier M, Flowers R H, Fridkin S K and Hajjeh R A: Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J Clin Microbiol*, 42 (10): 4468–4472, 2004.
92. Almirante B, Rodriguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, Alonso-Tarres C, Rodriguez-Tudela J L, Pahissa A and the 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, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*, 44 (5): 1681–1685, 2006.