

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Candida parapsilosis* Kompleks Türlerinin (*C.parapsilosis sensu stricto*, *C.metapsilosis* ve *C.orthopsilosis*) Genotipik Olarak Tanımlanması ve Dağılımlarının Belirlenmesi*

Genotypic Identification and Distribution Patterns of *Candida parapsilosis* Complex Species (*C.parapsilosis sensu stricto*, *C.metapsilosis* and *C.orthopsilosis*) Isolated from Clinical Samples

Nejla CEBECİ GÜLER, İlknur TOSUN, Gülçin BAYRAMOĞLU, Kurtuluş BURUK, Faruk AYDIN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Trabzon, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 04.02.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 01.07.2011

* Bu çalışma XXXIV. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (07-11 Kasım 2010)'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

ÖZET

Son yıllarda önemi giderek artan *Candida parapsilosis*, klinik örneklerden en yaygın izole edilen ikinci fungal patojen olarak karşımıza çıkmaktadır. Genetik heterojenite gösteren *C.parapsilosis* suşları önceleri üç farklı gruba ayrılırken (Grup I, II, III), son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar ile bu grupların farklı türler olduğu anlaşılmış ve bu türler; *C.parapsilosis sensu stricto* (Grup I), *C.orthopsilosis* (Grup II) ve *C.metapsilosis* (Grup III) olarak adlandırılmıştır. Fenotipik yöntemler ve biyokimyasal testlerle birbirinden ayıramayan bu türler, sekonder alkol dehidrogenaz proteinini kodlayan genin (*SADH*) restriksiyon polimorfizm analiziyle ayırt edilebilmektedir. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *C.parapsilosis* kompleks suşlarının PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) yöntemiyle tanımlanması ve yeni türlerin dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, Ekim 2005-Temmuz 2009 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen çeşitli klinik örneklerden (44 kan, 10 idrar, 5 yara, 2 parasetez mayı, 2 kulak ve birer adet olmak üzere beyin omurilik sıvısı, periton sıvısı, ameliyat materyali, ağız içi lezyonu ve tırnak) izole edilen ve API 20C AUX (bioMérieux, Fransa) sistemiyle *C.parapsilosis* olarak tanımlanan 68 suş dahil edilmiştir. İzolatlardan DNA izo-

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. İlknur Tosun, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 61080 Trabzon, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 462 377 7770, **E-posta (E-mail):** itosun@ktu.edu.tr

lasyonu "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche Diagnostic, ABD) ile yapılmış ve *SADH* gen bölgesi özgül primerler (S1-F sens; 5'-GTTGATGCTGTTGGATTGT-3' ve S1-R antisens; 5'-CAATGCCA-AATCTCCCAA-3') kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri (716 bp) *BanI* enzimi (Fermentas, ABD) ile kesilerek RFLP yöntemi uygulanmıştır. Çalışmamızda, PCR-RFLP yöntemi ile izolatların %98.5 (67/68)'i *C.parapsilosis sensu stricto*; 1 (%1.5)'i ise *C.orthopsilosis* olarak tanımlanmış; *C.metapsilosis* türüne rastlanmamıştır. *C.orthopsilosis* olarak tanımlanan suşun idrar izolatu olduğu belirlenmiş, kan kültürlerinden izole edilen tüm suşların *C.parapsilosis sensu stricto* olduğu izlenmiştir. Sonuç olarak, *C.parapsilosis* kompleks türlerinin fenotipik ve rutin testler ile ayırımının yapılamaması, bu mayaların klinik önemi, izolasyon oranları ve coğrafi dağılımları ile ilgili bilgilerin yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla klinik örneklerden izole edilen *C.parapsilosis* kompleks suşlarının genotipik olarak ayırt edilmesi, bu konuda yapılacak olan ileri çalışmaların ilk basamağını oluşturacaktır.

Anahtar sözcükler: *Candida parapsilosis* kompleks; *C.parapsilosis sensu stricto*; *C.metapsilosis*; *C.orthopsilosis*; klinik örnek; izolasyon sıklığı.

ABSTRACT

Candida parapsilosis, which has recently gained increasing importance, is the second most common fungal pathogen isolated from clinical specimens. *C.parapsilosis* strains exhibiting genetic heterogeneity were previously considered as a complex of three genetically different groups (group I, II, III). However, they have recently been reclassified as new species and named as *C.parapsilosis sensu stricto* (Grup I), *C.orthopsilosis* (Grup II) and *C.metapsilosis* (Grup III). In the present study we aimed to identify *C.parapsilosis* complex species by PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-Restriction fragment length polymorphism) method and to determine the distribution of new species isolated from clinical specimens. A total of 68 samples (44 blood, 10 urine, 5 wound, 2 paracentesis fluids, 2 tympanocentesis samples and one of each cerebrospinal fluid, peritoneal fluid, surgical material, oral lesion and nail sample) in which *C.parapsilosis* had been isolated and identified with API 20C AUX (bioMérieux, France) between October 2005 - July 2009 in the Microbiology Laboratory of Karadeniz Technical University Hospital, in Trabzon, Turkey, were included in the study. Yeast genomic DNA was extracted using the "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche Diagnostic, USA) and amplification of *SADH* gene was performed by using specific primers (S1-F sense; 5'-GTTGATGCTGTTGGATTGT-3' ve S1-R antisense; 5'-CAATGCCAATCTCCCAA-3') with PCR. RFLP method was then applied by digesting PCR product (716 bp) with *BanI* enzyme (Fermentas, USA). In our study 98.5% (67/68) of the isolates were identified as *C.parapsilosis sensu stricto*, and 1.5% (1/68) was identified as *C.orthopsilosis*, whereas no *C.metapsilosis* strains were detected. The strain identified as *C.orthopsilosis* was from a urine specimen and all the blood culture isolates were *C.parapsilosis sensu stricto*. In conclusion, the inability to differentiate *C.parapsilosis* complex species by phenotypical and routine tests leads to lack of knowledge in the clinical importance, isolation rates and geographical distribution of these species. Thus, genotypical identification of *C.parapsilosis* complex species will be the initial step for the arrangement of further studies in that area.

Key words: *Candida parapsilosis* complex; *C.parapsilosis sensu stricto*; *C.metapsilosis*; *C.orthopsilosis*; clinical samples; isolation rate.

GİRİŞ

Candida parapsilosis çevrede yaygın olarak bulunan ve su, toprak ve bitkilerden sıklıkla izole edilen bir mikroorganizmadır¹. Bu maya türü ayrıca kan, deri, tırnak (sağlık çalışanlarının ellerini içeren), tıbbi plastik ve prostetik aygıtların yüzeylerinden de izole edil-

mektedir. *C.parapsilosis*, fungemi, vajinit, endokardit, endoftalmit, septik artrit ve peritonit gibi enfeksiyonlarla ilişkilendirildiğinden önemi giderek artan bir fungal patojen olarak değerlendirilmektedir². 2003 SENTRY Antimikrobiyal Sürveyans Programına göre, hastanede yatan hastaların steril vücut bölgelerinden ikinci sıklıkla izole edilen maya türü *C.parapsilosis*'tir³.

C.parapsilosis izolatları fenotipik olarak ayırt edilememekle birlikte genotipik olarak heterojendir. Genetik farklılık gösteren suşlar 2005 yılına kadar *C.parapsilosis* kompleks içinde üç grupta toplanırken (Grup I, II, III), son yıllarda yapılan moleküler çalışmalarla bu grupların farklı türler olduğu anlaşılmıştır. Bu türler, PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) ve ITS gen dizi analizi gibi moleküler yöntemlerle ayrılarak; *C.parapsilosis sensu stricto* (Grup I), *C.orthopsilosis* (Grup II) ve *C.metapsilosis* (Grup III) olarak adlandırılmışlardır^{2,4}. Fenotipik yöntemler ve biyokimyasal testlerle birbirinden ayıramayan bu türler, *C.parapsilosis* kompleks için özgül olan sekunder alkol dehidrogenaz proteinini kodlayan genin (*SADH*) restriksiyon polimorfizm analiziyle tanımlanabilmektedir^{4,5}.

C.parapsilosis hastanemizde albikans-dışı türler içerisinde kan örneklerinden ilk sırada izole edilmektedir⁶. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *C.parapsilosis* kompleks suşlarının PCR-RFLP yöntemiyle tanımlanması ve dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ekim 2005-Temmuz 2009 tarihleri arasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Hasta Hizmetleri Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden izole edilen ve API 20C AUX (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) sistemiyle *C.parapsilosis* olarak tanımlanan 68 suş çalışmaya dahil edildi.

İzolatların DNA izolasyonu "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche Diagnostic, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. *SADH* gen polimorfizminin belirlenmesi için Tavanti ve arkadaşlarının⁴ önerdiği primerler (S1-F sens; 5'-GTTGATGCTGTTGGATTGT-3' ve S1-R antisens; 5'-CAATGCCAAATCTCCCAA-3') kullanılarak PCR uygulandı ve *SADH* gen bölgesine ait 716 baz çifti (bp) büyüklüğündeki bölgenin amplifikasyonu yapıldı. PCR ürünleri (716 bp) *BanI* (Fermentas, ABD) enzimiyle 50°C'de iki saat kesim işlemine bırakıldı. Kesim ürünleri %7.5'lik poliakrilamid jele yüklendi ve 100 V'de 45 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Etidyum bromür ile boyanmış DNA bantları UV ilüminatör ile görüntüldü.

Değerlendirmede, jelde dört bant gözlenen suşlar *C.metapsilosis* (370, 188, 93, 60 bp); 2 bant (521 ve 196 bp) gözlenenler *C.parapsilosis*; tek bant görülenler ise *C.orthopsilosis* (716 bp; kesim bölgesi olmadığından kesilmemiş PCR ürünü) olarak tanımlandı⁴.

Çalışmada referans suşlar olarak; *C.parapsilosis* ATCC 22019 ve Aberdeen, İngiltere (FC Odds & DM MacCallum)'den temin edilen *C.parapsilosis* AM 2001/0013 (Grup I), *C.metapsilosis* J 96/0161 (Grup III) ve *C.orthopsilosis* J 98/226 standart suşları kullanıldı.

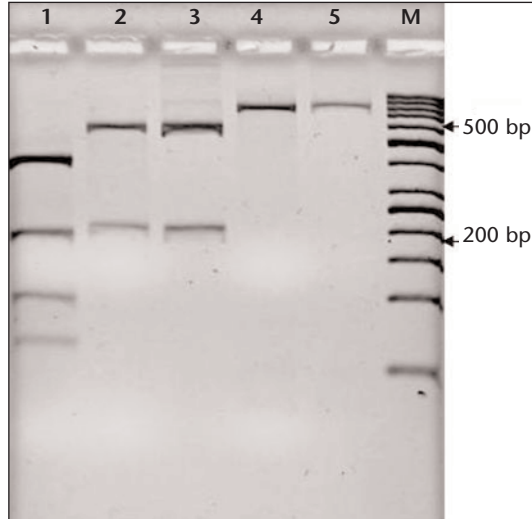
BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 68 *C.parapsilosis* kompleks izolatının 44'ü kan, 10'u idrar, beşi yara, ikisi parasetez mayi, ikisi kulak ve birer adedi olmak üzere beyin omurilik sıvısı, periton sıvısı, ameliyat materyali, ağız içi lezyonu ve tırnak örneklerinden izole edilmiştir. Suşların %72 (49/68)'sinin steril vücut bölgelerinden izole edildiği dikkati çekmiştir.

PCR-RFLP sonuçlarına göre, izolatların %98.5 (67/68)'i *C.parapsilosis sensu stricto*; biri (%1.5) ise *C.orthopsilosis* olarak tanımlanırken; *C.metapsilosis* türüne rastlanmamıştır. *C.orthopsilosis* olarak tanımlanan suşun idrar izolatu olduğu belirlenmiş, kan kültürlerinden izole edilen tüm suşların *C.parapsilosis sensu stricto* olduğu izlenmiştir (Resim 1).

TARTIŞMA

Günümüzde giderek artan bir öneme sahip olan *C.parapsilosis* kompleks türleri rutin mikrobiyolojik yöntemlerle birbirlerinden ayırt edilemediği için, klinik örneklerden izolasyon sıklıkları ve kommensal olarak bulundukları çevreler hakkında henüz yeterli veri oluşmamıştır. Bu konuda yapılan çalışmalarda, yeni türlerin düşük oranlarda da olsa (%1.8-6.8) klinik örneklerden izole edildiği belirtilmektedir^{4,5,7-10}. Ülkemizde ise *C.orthopsilosis* ve *C.metapsilosis* izolasyon oranları ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, laboratuvarımızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve *C.parapsilosis* olarak tanımlanan suşların PCR-RFLP yöntemiyle ayırt edilmesi ve yeni türlerin dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda değerlendirilen 68 izolat içerisinde sadece 1 (%1.5)'i *C.orthopsilosis* olarak tanımlanmış, bu suşun idrar örneğinden izole edildiği belirlenmiştir. Kan kültür izolatları da dahil olmak üzere diğer tüm izolatların *C.parapsilosis sensu stricto* (%98.5) olduğu izlenmiş; *C.metapsilosis* izolatına rastlanmamıştır.



Resim 1. SADH geni PCR ürünlerinin BanI kesim profilleri. Hat 1: *C.metapsilosis* J960161; Hat 2: *C.parapsilosis* AM2001/0013; Hat 3: Klinik örnek (*C.parapsilosis sensu stricto*); Hat 4: *C.orthopsilosis* J98/226; Hat 5: Klinik örnek/idrar (*C.orthopsilosis*); M: DNA ladder (50 bp).

Lochart ve arkadaşları⁶ tarafından yapılan bir çalışmada, 2001-2006 yılları arasında izole edilen tüm *C.parapsilosis* kompleks suşları içinde %6.1'inin *C.orthopsilosis*, %1.8'inin ise *C.metapsilosis* olduğu bildirilmiş ve bu türlerin kan kültürlerinden de üretilmiş oldukları vurgulanmıştır. İskoçya'da yapılan bir başka çalışmada bu yeni türlere hiç rastlanmazken, Tayvan'da çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş *C.parapsilosis* izolatları içerisinde %8.5 oranında *C.orthopsilosis* ve %5.6 oranında *C.metapsilosis* gösterilmiştir^{7,10}. Gomez-Lopez ve arkadaşları⁹ tarafından İspanya'da yapılan bir kandidemi sürveyans çalışmasında ise *C.metapsilosis* %6.9 ve *C.orthopsilosis* %5.7 oranında tespit edilmiştir. Mirhendi ve arkadaşları⁵, kandidemisi olan Danimarkalı hastalardan izole edilen *C.parapsilosis* suşlarının %5.1 (4/79)'inin *C.orthopsilosis* olarak tanımlandığını bildirmiştir. Ayrıca Macaristan ve Brezilya'dan bildirilen çalışmalarda da kan izolatları arasında her üç türün de görüldüğü rapor edilmektedir^{11,12}. Buna karşı bazı araştırmacılar sadece *C.parapsilosis* sensu stricto izolasyonu yaptıklarını ifade etmektedir^{4,6,13}. Dolayısıyla tüm bu çalışmalar, farklı ülke ve bölgelerden izole edilen *C.parapsilosis* suşlarının yeniden tiplendirilmesi gereğini ortaya koymakta ve elde edilecek verilerin, izolatların coğrafi farklılıkları na ışık tutacağı düşünülmektedir.

C.parapsilosis kompleks içinde yer alan türlerin virülans özelliklerinin araştırılması ile ilgili de az sayıda çalışma vardır. Bu çalışmalarda, *C.metapsilosis* ve *C.orthopsilosis*'in daha ziyade mukoza, deri, solunum yolu ve idrar örneklerinden izole edildiği bildirilmekte^{8,13,14}; en az virülans türün *C.metapsilosis* olduğu ileri sürülmektedir^{15,16}. Bu durum, çalışmamızda değerlendirilen izolatlar arasında *C.metapsilosis*'e rastlanmamış olmasını açıklayabilir.

Sonuç olarak, *C.parapsilosis* kompleks içinde yer alan ve yeni tanımlanan türlerin (*C.parapsilosis* sensu stricto, *C.orthopsilosis*, *C.metapsilosis*) fenotipik ve rutin testler ile ayırımının yapılamaması, bu mayaların patogenezi, klinik önemleri, izolasyon oranları, özel hasta grupları için risk oluşturup oluşturmadıkları ve bölgesel farklılık gösterip göstermedikleri ile ilgili bilgilerin yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla klinik örneklerden izole edilen *C.parapsilosis* kompleks suşlarının genotipik olarak ayırt edilmesi, ülkemizde bu konuda yapılacak olan ileri çalışmaların ilk basamağını oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

1. Lupetti A, Tavanti A, Davini P, et al. Horizontal transmission of *Candida parapsilosis* candidemia in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol 2002; 40(7): 2363-69.
2. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. Curr Genet 2009; 55(5): 497-509.
3. Trofa D, Gacser A, Nosanchuki JC. *Candida parapsilosis*: an emerging fungal pathogen. Clin Microbiol Rev 2008; 21(4): 606-25.
4. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* Groups I, II and III. J Clin Microbiol 2005; 43(1): 284-92.
5. Mirhendi H, Bruun B, Schønheyder HC, et al. 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 2010; 59(Pt 4): 414-20.

6. Aydın F, Bayramoglu G, Guler NC, Kaklıkkaya N, Tosun I. Bloodstream yeast infections in a university hospital in Northeast Turkey: a 4-year survey. *Med Mycol* 2011; 49(3): 316-9.
7. Odds FC, Hanson MF, Davidson AD, et al. One year prospective survey of candida bloodstream infections in Scotland. *J Med Microbiol* 2007; 56(Pt 8): 1066-75.
8. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. 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*, 2008; 46(8): 2659-64.
9. Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez D, et al. Prevalence and susceptibility profile of *C.metapsilosis* and *C.orthopsilosis*: results from population-based surveillance of candidemia in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(4): 1506-9.
10. Chen Y, Lin Y, Chen K, Lii J, Teng H, Li S. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* sensu stricto, *C.orthopsilosis*, and *C.metapsilosis* in Taiwan. *Diag Microbiol Infect Dis* 2010; 68(4): 284-92.
11. Kocsube S, Toth M, Vaguölgyi C, et al. Occurrence and genetic variability of *Candida parapsilosis* sensu lato in Hungary. *J Med Microbiol* 2007; 56(2): 190-5.
12. Gonçalves SS, Amorim CS, Nucci M, et al. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(7): 885-7.
13. Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C.orthopsilosis*, and *C.metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* 2009, 47(8): 2392-7.
14. De Toro M, Torres MJ, Maite R, Aznar J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(3): 418-24.
15. Gacser A, Schafer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genet Biol* 2007; 44(12): 1336-41.
16. Orsi FC, Colombari B, Blasi E. *C.metapsilosis* as the least virulent member of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol* 2010; 48(8): 1024-33.