



T.C.

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN ELDE EDİLEN *CANDIDA*
PARAPSİLOSİS İZOLATLARI ARASINDAKİ KLONAL İLİŞKİLERİN
ARAŞTIRILMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Elif Seren TANRIVERDİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Barış OTLU

MALATYA

2022

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Taksonomi	4
2.3. Morfoloji.....	5
2.4. Genom Özellikleri.....	5
2.5. Epidemiyoloji	6
2.6. Antijenik Yapı.....	7
2.7. Virülans Özellikleri	8
2.8. Patogenez	8
2.9. Laboratuvar Tanısı.....	10
2.9.1. Klinik Örneklerin Toplanması	10
2.9.2. Direkt Mikroskopi	11
2.9.3. Kültür	11
2.9.4. Morfolojik İdentifikasyon.....	11
2.9.5. Hızlı İdentifikasyon Testleri	12
2.9.6. Biyokimyasal Testler	13
2.9.7. Serolojik Testler.....	14
2.9.8. Kütle Spektrofotometrisi ile İdentifikasyon	14
2.9.9. Moleküler İdentifikasyon.....	15
2.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürününün Restriction Fragment Length Polymorphism Analizi ile Alt Türlerin Belirlenmesi	15
2.11. Klonal İlişkiyi Araştıran Yöntemler	16
2.11.1. Arbitrarily Primer PCR	16
2.11.2. Pulsed- Field Jel Elektroforez Sistemi	17
2.11.3. PFGE- Elektroforetik Karyotiplendirme.....	18
2.11.4. PFGE- Restriksiyon Enzim Analizi	18
2.11.5. <i>Microsatellite Genotyping</i>	19
2.12. Antifungal Duyarlılığı	19

2.13.	Antifungallerin Etki ve Direnç Mekanizmaları	20
3.	<i>GEREÇ VE YÖNTEM</i>.....	22
3.1.	Hastalar ve <i>Candida parapsilosis</i> İzolatlarının Tanımlanması	22
3.1.1.	Epidemiyolojik İlişki ve Risk Faktörlerine İlişkin Bilgilerin Toplanması.....	22
3.2.	İzolatların Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi	23
3.3.	İzolatların Alt Tür Tayininin Yapılması	23
3.3.1.	DNA İzolasyonu	23
3.3.2.	SADH Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Restriksiyon Endonükleaz Enzimiyle Kesimi.....	24
3.3.3.	Amplifikasyon Ürünlerinin Dizi Analizi ile Doğrulanması	25
3.4.	İzolatlar Arasındaki Klonal İlişkilerin Araştırılması.....	27
3.4.1.	<i>Arbitrarily Primed</i> Polimeraz Zincir Reaksiyonu	27
3.4.2.	PFGE- Restriksiyon Enzim Analizi.....	29
3.4.3.	PFGE-Elektroforetik Karyotiplendirme	29
3.5.	Yöntemlerin Ayrım Gücü (Diskriminasyon).....	31
3.6.	Klonal İlişkilerin Araştırılmasında Kullandığımız AP-PCR, PFGE- RFLP, PFGE-EK Yöntemlerinin Karşılaştırılması.....	32
4.	<i>BULGULAR</i>.....	33
4.1.	Hastalar ve <i>C. parapsilosis</i> kompleks İzolatlarının Tanımlanması.....	33
4.1.1.	Epidemiyolojik İlişki ve Risk Faktörlerine İlişkin Bilgilerin Toplanması.....	35
4.2.	İzolatların Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi	36
4.3.	<i>C. parapsilosis</i> kompleks İzolatlarının Alt Tür Düzeyinde Tanımlanması.....	42
4.3.1.	SADH Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Restriksiyon Endonükleaz Enzimiyle Kesimi Sonuçları	42
4.3.2.	Amplifikasyon Ürünlerinin Dizi Analizi Sonuçları.....	46
4.4.	<i>Candida parapsilosis</i> kompleks İzolatları Arasındaki Klonal İlişkilerin Belirlenmesi	47

4.4.1.	<i>Candida parapsilosis</i> kompleks izolatlarının AP-PCR sonuçları ..	47
4.4.2.	<i>C. parapsilosis</i> kompleks izolatlarının PFGE-restriksiyon enzim analizi sonuçları.....	56
4.4.3.	<i>C. parapsilosis</i> kompleks izolatlarının PFGE-EK sonuçları	66
4.5.	Yöntemlerin Ayrım Gücü (Diskriminasyon).....	77
4.6.	Klasik epidemiyolojik bilgiler, AP-PCR, PFGE-EK ve PFGE-REA yöntemlerinin karşılaştırılması.....	77
5.	TARTIŞMA.....	79
6.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	90
7.	KAYNAKLAR.....	91
	EKLER.....	99
	<i>Ek-1. Etik Kuruk Onayı.....</i>	<i>99</i>

ÖZET

Candida parapsilosis kompleks izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların klinik önemi bilinmesine karşın kolonizasyon, enfeksiyonun patogenezi ve epidemiyolojisi hakkında bilgiler halen sınırlıdır. Moleküler tiplendirme yöntemleri *Candida* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin değerlendirilmesinde önemlidir. Çalışmamızın amacı; hastanemizde kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının sıklığının belirlenmesi, suşlara ait antifungal duyarlılıkların tespit edilmesi, izolatlar arasında alt tür tayini yapılması ve izolatlar arasındaki klonal ilişkilerin araştırılmasıdır.

Bu amaçla hastanemizde 2016-2022 tarihleri arasında yatan hastalardan laboratuvarımıza gönderilen kan kültürü örneklerinden izole edilen 115 adet *C. parapsilosis* kompleks izolatı çalışmaya dahil edildi. İzolatların flukonazol duyarlılığı gradient E test yöntemiyle belirlenmiş olup, minimum inhibitör konsantrasyon değerleri *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* önerilerine göre değerlendirildi. *Candida parapsilosis* kompleks izolatlarının alt tür tayini polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)- *restriction fragment length polymorphism* yöntemiyle araştırılmıştır. İzolatlar arasındaki klonal ilişkileri araştırmak amacıyla *arbitrarily primed* -PCR, *pulsed field gel electrophoresis*- elektroforetik karyotiplendirme (PFGE-EK), PFGE-restriksiyon enzim analizi (PFGE-REA) yöntemleri kullanıldı. Yöntemlerin ayırım gücü Hunter ve Gaston'un geliştirdiği formül ile hesaplandı.

Çalışmamızda 115 *C. parapsilosis* kompleks izolatının AP-PCR yöntemi ile 34 farklı genotip, 15 kümeye; PFGE-REA ile 39 farklı genotip, 20 kümeye; PFGE-EK yöntemi ile 69 farklı genotip, 25 kümeye ayrıldığı saptandı. Yöntemlerin ayırım gücü AP-PCR için $D=0.9393$, PFGE-REA için $D=0.9492$, PFGE-EK için $D=0.9875$ olarak belirlendi. Sonuç olarak PFGE-EK yönteminin ayrılabilirlik indeksinin daha yüksek olduğu ve bu yöntemle daha fazla genotip tanımlandığı görülmüştür. Bu sonuçlar ile *C. parapsilosis*'e bağlı salgınlarından şüphelenildiği durumlarda salgın analizinde PFGE-EK yönteminin uygun bir seçenek olarak düşünülebileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Candida parapsilosis* kompleks, kandidemi, PCR-RFLP, AP-PCR, PFGE-REA, elektroforetik karyotiplendirme.

ABSTRACT

Candida parapsilosis (*C. parapsilosis*) complex isolates are known to cause clinically serious infections. However, information about colonization, pathogenesis and epidemiology is limited. Molecular typing methods have an important place in the epidemiological evaluation of *Candida* infections. The aim of our study was to determine the frequency of *C. parapsilosis* complex isolates isolated in our hospital as a bloodstream infection agent, to determine the antifungal susceptibility of the strains, to determine the subspecies among the isolates and to investigate the clonal relationships between the isolates.

For this purpose, 115 *C. parapsilosis* complex isolates isolated from blood culture samples sent to our laboratory from inpatient clinics of our hospital between 2016-2022 were included in the study. The fluconazole susceptibility of the isolates was determined by the gradient E test method and the minimum inhibitory concentration values were evaluated according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Subspecies determination of *C. parapsilosis* complex isolates was investigated by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism method. Arbitrarily primed-PCR, pulsed field gel electrophoresis-electrophoretic karyotyping (PFGE-EK), PFGE-restriction enzyme analysis (PFGE-REA) methods were used to determine clonal relationships among isolates. The discriminatory power of the methods was calculated with the formula developed by Hunter and Gaston.

In our study, 34 different genotypes of 115 *C. parapsilosis* complex isolates were differentiated into 15 clusters by AP-PCR method; 39 different genotypes into 20 clusters with PFGE-REA whereas 69 different genotypes were determined to be analysed into 25 clusters with the PFGE-EK method. The discriminatory power of the methods was determined as $D=0.9393$ for AP-PCR, $D=0.9492$ for PFGE-REA, and $D=0.9875$ for PFGE-EK. The separability index of the PFGE-EK method was higher than the other methods and more genotypes were identified with the PFGE-EK. In conclusion, PFGE-EK method can be considered as a suitable and reliable option in epidemic analysis in cases where outbreaks due to *C. parapsilosis* are suspected.

Keywords: *Candida parapsilosis* complex, candidemia, PCR-RFLP, AP-PCR, PFGE-REA, electrophoretic karyotyping.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	santigrat derece
µl	mikrolitre
µg	mikrogram
AP-PCR	<i>arbitrarily primed polymerase chain reaction</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	baz çifti
CLP	kromozom uzunluk polimorfizmi (<i>chromosome length polymorphism</i>)
CLR	C tipi lektin reseptörü
ddH ₂ O	çift distile su
EK	elektroforetik karyotiplendirme
EtBr	ethidyum bromid
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
KOH	potasyum hidroksit
LMA	<i>low melting agarose</i>
MALDI-TOF MS	matriks aracılı lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi
MAT	çiftleşme tipi (<i>mating-type</i>)
mg	miligram
MİK	minimum inhibitör konsantrasyon
ml	mililitre
MLST	<i>multi locus sequence typing</i>
mM	milimolar

MOPS	morfolinopropan sülfonik asit
MTL	çiftleşme tipi benzeri lokus (<i>mating-type-like</i>)
PAMP	patojenle ilişkili moleküler kalıplar (<i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PCR	polimeraz zincir reaksiyonu
PCR-RFLP	polimeraz zincir reaksiyonu ürününün <i>restriction fragment lenght polymorphism</i> analizi
PFGE	<i>pulsed field gel electrophoresis</i>
pmol	pikomol
PRR	kalıp tanıma reseptörü (<i>pathogen recognition receptor</i>)
RAPD	<i>random amplified polymorphic DNA</i>
REA	restriksiyon enzim analizi
SADH	sekonder alkol dehidrogenaz
SDA	Sabouraud dekstroza agar
SNP	tek nükleotid polimorfizmi
TLR	Toll benzeri reseptörü
U	ünite
UPGMA	<i>unweighthed pairwise grouping matematical avenaging</i>
YBÜ	yoğun bakım ünitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. 1-5 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.	42
Şekil 4.2. 6-19 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.	43
Şekil 4.3. 20-33 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.	43
Şekil 4.4. 34-42 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.	43
Şekil 4.5. 43-56 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.	44
Şekil 4.6. 57-65 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.	44
Şekil 4.7. 66-79 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.	44
Şekil 4.8. 80-88 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.	45
Şekil 4.9. 89-102 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.	45
Şekil 4.10. 103-111 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.	45
Şekil 4.11. 113-115 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.	46
Şekil 4.12. Tekrarlanan izolatlara ait PCR-RFLP sonuçları.	46
Şekil 4.13. PCR- RFLP yöntemiyle alt türü saptanamayan dördüncü izolatın elektroferogram verileri.	47
Şekil 4.14. PCR- RFLP yöntemiyle alt türü saptanamayan dördüncü izolatın BLAST sonucu.	47
Şekil 4.15. 1-17 numaralı izolatlara ait AP-PCR sonuçları.	48
Şekil 4.16. 18-34 numaralı izolatlara ait AP-PCR sonuçları.	49
Şekil 4.17. 35-51 numaralı izolatlara ait AP-PCR sonuçları.	49
Şekil 4.18. 52-68 numaralı izolatlara ait AP-PCR sonuçları.	50
Şekil 4.19. 69-85 numaralı izolatlara ait AP-PCR sonuçları.	50
Şekil 4.20. 86-102 numaralı izolatlara ait AP-PCR sonuçları.	51
Şekil 4.21. 103-115 numaralı izolatlara ait AP-PCR sonuçları.	51
Şekil 4.22. İzolatların GelCompar ile <i>Dice Similarity Coefficient</i> esas alınarak elde edilen dendogramı.	54
Şekil 4.23. 1-13 numaralı izolatlara ait PFGE- REA sonuçları.	57
Şekil 4.24. 14-25 numaralı izolatlara ait PFGE- REA sonuçları.	57
Şekil 4.25. 26-37 numaralı izolatlara ait PFGE- REA sonuçları.	58
Şekil 4.26. 38-49 numaralı izolatlara ait PFGE- REA sonuçları.	58
Şekil 4.27. 50-61 numaralı izolatlara ait PFGE- REA sonuçları.	59
Şekil 4.28. 62-73 numaralı izolatlara ait PFGE- REA sonuçları.	59

Şekil 4.29. 74-85 numaralı izolatlara ait PFGE- REA sonuçları.	60
Şekil 4.30. 86-97 numaralı izolatlara ait PFGE- REA sonuçları.	60
Şekil 4.31. 98-109 numaralı izolatlara ait PFGE- REA sonuçları.	61
Şekil 4.32. 110-115 numaralı izolatlar ve önceki denemelerde sonuç alınamayan izolatların tekrarına ait PFGE- REA sonuçları.	61
Şekil 4.33. İzolatların GelCompar ile <i>Dice Similarity Coefficient</i> esas alınarak elde edilen dendogramı.	64
Şekil 4.34. 1-13 numaralı izolatlara ait PFGE-EK sonuçları.	66
Şekil 4.35. 14-25 numaralı izolatlara ait PFGE-EK sonuçları.	67
Şekil 4.36. 26-37 numaralı izolatlara ait PFGE-EK sonuçları.	67
Şekil 4.37. 38-49 numaralı izolatlara ait PFGE-EK sonuçları.	68
Şekil 4.38. 50-61 numaralı izolatlara ait PFGE-EK sonuçları.	68
Şekil 4.39. 62-73 numaralı izolatlara ait PFGE-EK sonuçları.	69
Şekil 4.40. 74-85 numaralı izolatlara ait PFGE-EK sonuçları.	69
Şekil 4.41. 86-97 numaralı izolatlara ait PFGE-EK sonuçları.	70
Şekil 4.42. 98-109 numaralı izolatlara ait PFGE-EK sonuçları.	70
Şekil 4.43. 111-115 numaralı izolatlar ve önceki denemelerde sonuç alınamayan izolatların tekrarına ait PFGE-EK sonuçları.	71
Şekil 4.44. İzolatların GelCompar ile <i>Dice Similarity Coefficient</i> esas alınarak elde edilen dendogramı.	74
Şekil 4.45. Epidemiyolojik olarak ilişki kurulamayan merkezlere ait <i>C. parapsilosis</i> kompleks izolatlarının PFGE-EK yöntemiyle karşılaştırılması.	78

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Taksonomik sınıflandırma.....	4
Tablo 2.2. <i>Candida parapsilosis</i> kompleksinin karbonhidratları asimilasyon ve fermentasyon yeteneği.....	13
Tablo 3.1. SADH gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan ısı döngü profili.....	24
Tablo 3.2. D1/D2 gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan ısı döngü profili.....	25
Tablo 3.3. Dizi analizi tepkimesi için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	26
Tablo 3.4. Big Dye prespitasyon için kullanılan stok solüsyonları ve konsantrasyonları.....	26
Tablo 3.5. 2x amplifikasyon karışımının hazırlanması.....	27
Tablo 3.6. 50 µl olan amplifikasyon karışımının hazırlanması.....	28
Tablo 3.7. AP-PCR için kullanılan ısı döngü profili.....	28
Tablo 3.8. PFGE- REA yöntemi elektroforez koşulları.....	29
Tablo 3.9. PFGE-EK yöntemi elektroforez koşulları.....	31
Tablo 4.1. <i>Candida parapsilosis</i> izolatlarının saptandığı kliniklere göre dağılımı.....	34
Tablo 4.2. İzolatların klasik epidemiyolojik gruplaması.....	35
Tablo 4.3. İzolatların ürettiği hastaların klinik, epidemiyolojik bulguları ve antifungal duyarlılıkları.....	37
Tablo 4.4. AP-PCR ile aynı genotipte yer alan izolatlar.....	55
Tablo 4.5. PFGE-REA ile aynı genotipte yer alan izolatlar.....	65
Tablo 4.6. PFGE-EK ile aynı genotipte yer alan izolatlar.....	75

1. GİRİŞ

Son yıllarda önem kazanan enfeksiyon etkenleri arasında *Candida* türleri ön sırada yer almaktadır. En sık görülen sistemik fungal hastane enfeksiyonu invaziv kandidiyazis olarak bildirilmektedir. Özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış olan hastalar, hastane kaynaklı enfeksiyonlar için yüksek risk altında olup *Candida parapsilosis* kompleks bu hastalardan izole edilen *Candida* türleri içinde ikinci yada üçüncü sırada yer almaktadır (1).

Candida parapsilosis kompleks, santral venöz kateterler ve tıbbi olarak implante edilen cihazlar üzerinde biyofilm oluşturabilmesi ve dolayısıyla invaziv tıbbi girişim geçirmiş hastaları tehdit etmesi bakımından özellikle önemlidir. Neden olduğu enfeksiyonlar bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde çok kısa sürede hayatı tehdit eden klinik tablolar oluşturabildikleri için hızla tür düzeyinde tanımlanmalı ve antifungal duyarlılık testleri çalışılmalıdır.

Candida türleri arasında virülans, antifungal direnç mekanizmaları, genetik özellikler, oluşturdukları klinik tablo, morbidite ve mortalite gibi pek çok konuda farklılıklar bulunmaktadır. Türler arasındaki farkların yanında, aynı türe ait olan fakat farklı genotipik ve fenotipik özellikleri bulunan suşlar da tanımlanmaktadır. Bu nedenle genotipik yöntemler kullanılarak tür tanımının yanında alt tür tayini yapılması önerilmektedir.

Candida türlerinin klonal ilişkilerinin araştırılması amacıyla *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) yöntemi referans yöntem olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem; kısaca restriksiyon enzimleri ile kesim yapılmadan direkt elektroforeze tabi tutulması olarak tariflenen elektroforetik karyotiplendirme ya da restriksiyon enzimleri ile kesim yapılarak *macrorestriction mapping* şeklinde uygulanmaktadır.

Bu tezin amacı;

-2016-2022 arasında çeşitli kliniklerde takip edilen hastaların kan kültürlerinden izole edilen *Candida parapsilosis* kompleks suşlarının sıklığının belirlenmesi,

-suşlara ait antifungal duyarlılıkların tespit edilmesi,

-izolatlar arasındaki alt tür tayininin yapılması ve

-izolatlar arasındaki klonal ilişkilerin araştırılmasıdır.

Bu amaçla *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının tür tayini için matriks aracılı lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS), antifungal duyarlılıkların tespiti için gradient E test yöntemi kullanılmıştır. *C. parapsilosis* kompleks suşlarının alt tür tayini için polimeraz zincir reaksiyonu ürününün *restriction fragment length polymorphism* analizi (PCR-RFLP) yöntemi uygulanmıştır. Klonal ilişkilerin belirlenmesinde *arbitrarily primed polymerase chain reaction* (AP-PCR), PFGE-restiriksiyon enzim analizi ve karyotiplendirme yöntemleri kullanılmış ve yöntemlerin ayırım gücü hesaplanarak ideal yöntemin tespiti amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Klinik mikrobiyolojinin başlangıcı kabul edilen on dokuzuncu yüzyılın ikinci yarısına kadar mantarların insanlar üzerindeki patojenik etkileri bilinmemekteydi. Bu yıllara kadar mantarların fermentatif özellikleri ilgi çekmiştir. Bu nedenle daha çok süt ve bira endüstrisi alanındaki çalışmaların konusu olmuştur (2). Bununla birlikte; özellikle yenidoğanları etkileyen pamukçuk hastalığı, 1665 yılında Galen ve Pepy tarafından tanımlanmıştır. Langanbeck ise 1839'da tifüslü bir hastanın ağzındaki lezyondan mantarı izole etmiş ancak bunun tifüs etkeni olduğunu varsayarak etkeni tanımlayamamıştır. Pamukçuk etkeni; ilk kez 1853'te Robin tarafından *Oidium albicans* ve daha sonra 1890 yılında Zopf tarafından *Monilia albicans* olarak isimlendirilmiştir (3). Bundan yaklaşık yetmiş yıl sonra, 1923 yılında Christine Marie Berkhout, bu isimlendirmeyi reddederek, *Candida albicans* tanımlamasını kullanmıştır (4). Özellikle yirminci yüzyılın başından itibaren tüm dünyada *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar giderek artan bir sıklıkta bildirilmiş ve ilgi odağı haline gelmiştir. Ülkemizde de benzer şekilde bu alan üzerine çalışmalar bu tarihlerde yoğunlaşmış, ilk kandidiyazis olgusu 1911'de enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji alanında özel hekim olarak çalışan Reşat Rıza tarafından bildirilmiştir (5).

Candida türleri, 1980'lerden bu yana özellikle bağışıklığı baskılanmış ve altta yatan ciddi hastalıkları nedeniyle hastanede yatan hastalarda mortalite ve morbiditenin başlıca etkenlerinden biri olarak tespit edilmiştir (6). Son yıllarda *Candida* türleri içerisinde, *albicans* dışı *Candida* türlerinin neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarında belirgin bir artış gözlenmiştir. *Albicans* dışı *Candida* türlerinden *C. parapsilosis* 1990'dan bu yana insidansı en fazla artan *Candida* türü olarak karşımıza çıkmaktadır (7).

Candida parapsilosis izolatu ilk olarak 1928 yılında Ashford tarafından Porto Riko'da ishalli bir hastanın dışkılarından elde edilmiştir (8). Başlangıçta patojen olmadığı düşünülse de 1940 yılında bir intravenöz ilaç bağımlısında ölümcül bir endokardit etkeni olarak tespit edilmiştir. Bu tarihten itibaren araştırmacılar, *C. parapsilosis*'in invaziv tıbbi girişim ve hiperalimentasyon solüsyonları ile ilişkili enfeksiyonlara sebep olabileceğini ifade etmişlerdir (9, 10).

2.2. Taksonomi

Candida parapsilosis, mantarlar alemi içerisinde *Ascomycota* şubesinin *Saccharomycetales* takımında yer alan ve insan enfeksiyonlarında en sık izole edilen *Candida* türlerinden birisidir (Tablo 2.1). *Candida* cinsi içerisinde yaklaşık 200 tür bulunmakla birlikte bunların içinde yalnızca yirmi tanesinin insanda patolojik belirtilerden sorumlu olduğu bilinmektedir (11). Bu türlerin içerisinde *C. parapsilosis* kompleksi, yenidoğan hastalarda invaziv kandidiyazisin %33'ünden fazlasına neden olan bir tür olup (12); neden olduğu sistemik enfeksiyonlar yüksek morbidite ve mortalite oranları ile ilişkilidir. Bu nedenlerle *C. albicans*'ın neden olduğu enfeksiyonlar kadar önemli kabul edilmektedir (13).

Tablo 2.1. Taksonomik sınıflandırma.

Alem: <i>Fungi</i>
Alt alem: <i>Dikarya</i>
Şube: <i>Ascomycota</i>
Alt şube: <i>Saccharomycotina</i>
Sınıf: <i>Saccharomycetes</i>
Alt sınıf: <i>Saccharomycetidae</i>
Takım: <i>Saccharomycetales</i>
Aile: <i>Saccharomycetaceae</i>
Cins: <i>Candida</i>

Moleküler biyolojik yöntemlerde yaşanan önemli gelişmeler sayesinde *C. parapsilosis* izolatlarının genetik çeşitliliği araştırılmıştır. *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) gibi tekniklerin uygulanmasıyla, *C. parapsilosis* kompleksi Grup I, II ve III olarak adlandırılan üç farklı grupta incelenmiştir (14-16). Ancak Tavanti ve arkadaşlarının 2005 yılında *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) tekniğini kullanarak yaptıkları çalışmayla birlikte *C. parapsilosis* kompleksinin moleküler incelemesi derinleştirilmiş ve bu tür kompleksini oluşturan grupların birbirinden bağımsız tür olarak kabul edilebilecek şekilde farklı oldukları gösterilmiştir. Bu çalışmayla birlikte birbirlerinden makroskopik ve mikroskopik olarak ayırt edilmesi mümkün olmayan bu üç tür yeniden adlandırılmıştır. *C. parapsilosis* Grup I'in ismi *C. parapsilosis sensu stricto*, Grup II'nin ismi *C. orthopsilosis* ve Grup III'ün ismi *C. metapsilosis* olarak güncellenmiştir (7).

2.3. Morfoloji

Candida parapsilosis türleri tek hücreli, tomurcuklanarak (blastokonidyum) veya ikiye bölünerek çoğalan maya mantarlarıdır. Klinik örneklerde ve kültürlerde 3-6 µm boyutlarında, küre şeklinde, ovalimsi veya silindirik şekillerde olabilen organizmalardır (17). Bu türler çoğalırken oluşan blastokonidyumlar ana hücrenin aynısı olup, bölünme sırasında ana hücreden ayrılamazsa ve birbiri ardına zincir şeklinde uzarsa psödohif oluşturabilirler.

Candida parapsilosis sensu stricto ve *C. orthopsilosis* türlerinde psödohif oluşumu görülebilmekteyken *C. metapsilosis* türlerinde ise psödohif oluşumu görülmemektedir. Bununla birlikte, *C. parapsilosis sensu stricto* ve *C. orthopsilosis* izolatları arasında hem psödohif üretenler hem de üretmeyenler tespit edilmiştir (18-20). Psödohif oluşturmayan *C. orthopsilosis* izolatlarının, psödohif oluşturanlara kıyasla J774.2 murin makrofajları tarafından daha efektif şekilde öldürüldüğü gösterilmiştir. Bu durum psödohif oluşumunun *C. parapsilosis* izolatları için konak patojen etkileşiminde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (19).

Candida parapsilosis izolatları özel besiyerlerine ihtiyaç duymadan yaygın kullanılan besiyerlerinde ve kan kültürü şişelerinde rahatlıkla üreyebilirler. Bunun yanında Sabouraud Dextroz Agarda (SDA pH. 5.5), 25-37 °C ve 24-48 saat içinde kirli beyaz veya krem renkte, düzgün yüzeyli ya da göbekli, tipik olarak maya kokulu koloniler oluştururlar. Mısır unlu Tween-80 agarda ise çoklu morfogenetik formlarda bulunabilen *C. albicans* ve *C. tropicalis*'in aksine, *C. parapsilosis* gerçek hif oluşturmaz ve maya ya da psödohif formunda bulunur (21, 22).

2.4. Genom Özellikleri

Candida parapsilosis kompleksinin ilk tam genom dizilemesi *C. parapsilosis sensu stricto* suşuna aittir. CDC317 olarak isimlendirilen bu klinik suş Amerika Birleşik Devletlerinde sağlık çalışanlarının elinden izole edilmiş ve tüm genomu 2009 yılında dizilenmiştir (23). Ardından sırasıyla 2012 ve 2015 yıllarında *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* izolatlarının tam genom dizilemesi tamamlanmıştır (24, 25).

Candida parapsilosis kompleksine ait izolatların genom boyutu yaklaşık 13 Mbp olup; boyutları 0,9 ile 3,0 Mbp arasında değişen sekiz kromozomu ile diploid mayalardır. Kromozomları her iki uçta 23 nükleotid uzunluğundaki bir motifin (5'-GGTCCGGATGTTGATTATACTGA-3') telomerik tekrarlarının tandem dizileriyle

sonlanır (26). *C. parapsilosis sensu lato* kompleksinde sınıflandırılan *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis*'te telomerik diziler, sırasıyla 6. ve 8. nükleotid pozisyonunda bu motiften farklıdır.

Candida parapsilosis'in üç alt türünde çiftleşme ya da mayoz bölünme gözlenmemiştir. Maya mantarlarında çiftleşme *Saccharomyces cerevisiae*'de iyi tanımlanmış olup zıt çiftleşme tipine sahip iki hücre gerektirir ve çiftleşme tipi (*Mating-type*, MAT) lokus tarafından belirlenir (27). *C. parapsilosis* tür kompleksinde MAT lokusunun idiomorflarının homolog dizileri bulunur ve bunlar çiftleşme tipi benzeri lokus (*Mating-type-like*, MTL) olarak adlandırılırlar (28). *C. parapsilosis sensu stricto* genomunun ilk analizleri bu türdeki MTLa2'nin bir psödogen olduğunu yani işlevsel olmadığını doğrulamıştır. Bu nedenle genetik olarak çiftleşme şansı yoktur. Kompleks içindeki türlerden *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis* kompleksinde çiftleşme lokusunu koruyan tek genomdur (29). Ayrıca bu türde 15.553 baz başına sadece 1 heterozigot tek nükleotid polimorfizmi (SNP) tespit edilmiştir. Bu heterozigotluk seviyesi, diğer diploid *Candida* türlerine oranla 25 ila 70 kat daha düşüktür (30). Pek çok kaynak, *C. parapsilosis sensu stricto* klinik izolatları arasında zayıf genetik değişkenlikle birlikte bu türün yüksek oranda klonal olduğunu bildirmiştir. Bu durum, çevresel türlerin konakçıya bir kez adapte olduğunu, kusurlu bir çiftleşme sistemine sahip virulent bir klonun küresel yayılımını düşündürmektedir (23, 30, 31).

2.5. Epidemiyoloji

Candida parapsilosis kompleksi, diğer *Candida* türlerine göre doğada oldukça geniş bir yayılıma sahiptir. *C. parapsilosis* türleri; evcil hayvanlar, böcekler, toprak ve deniz gibi insan dışı ortamlardan da izole edilebilirler. Bu türler genellikle insanda kommensal olarak kabul edilir ve parmakların subungual bölgesinden en sık izole edilen mantarlardandır (32). Bunun yanında *C. parapsilosis*, total parenteral nütrisyon sıvılarında üremesi, kateterler ve diğer implante edilmiş cihazlar üzerinde biyofilm oluşturması, eller aracılığıyla nozokomiyal yayılması ve hastane ortamındaki kalıcılığı ile bilinmektedir (33, 34).

Son 20 yıldır tüm dünyada mukokutanöz ve derin fungal enfeksiyonların arttığı bildirilmektedir. Patojenik mantarlara bağlı enfeksiyonların sayısındaki artış, günümüzde artan polifarmasi kullanımı, immünsupresif tedavi sürelerinin uzunluğu ve artan duyarlı hasta popülasyonu ile doğrudan ilişkilidir (35).

Candida parapsilosis kompleksi, bazı coğrafi bölgelerde ikinci en sık fungemi etkeni olarak görülmekte, özellikle çocuk hastalarda fungemi etkenleri arasında ilk sıraya yerleşebilmektedir. Birleşik Krallık'ta düşük doğum ağırlıklı bebeklerde görülen tüm invaziv mantar enfeksiyonlarının dörtte birinden fazlasında (36), Kuzey Amerika'da ise yenidoğan kandidemilerinin üçte birinde etken mikroorganizma olarak tespit edilmiştir (37). SENTRY Antimikrobiyal Sürveyans Programından 2003 yılına ait elde edilen verilerde, *C. parapsilosis* hastanede yatan hastaların steril vücut bölgelerinden izole edilen en sık ikinci *Candida* türü olarak bildirilmiştir (38).

Candida parapsilosis kompleksinin alt türleri her ne kadar kompleks içinde yer alsalar da alt türler arasında klinik prevalans, virülans faktörlerinin etkinliği ve neden oldukları enfeksiyonun prognozu açısından bazı farklılıklar gözlenmiştir. Bu durum, türler arasındaki farklılıkların daha iyi araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

2.6. Antijenik Yapı

Konak-patojen etkileşiminin ilk aşamasında yer alan mantar hücre duvarı dört ana bileşenden oluşmaktadır. Bu yapı β -1,3 ve β -1,6 glukanlarla sarılmış şekildedir. Mannoproteinler ve zengin bir mannan tabakasıyla kaplanmış bir kitin tabakasından oluşur. Mannanlar; hücre duvarı bütünlüğünün sağlanması, konak dokulara yapışma, virülans ve koruyucu konak immün yanıtın kurulmasında önemli roller oynar. Bununla birlikte N-bağlı (asparagine bağlı oligosakkaritler) ve O-bağlı (serin/treonine bağlanan oligosakkaritler) mannanların hücre yapışması ve hücre duvarı bütünlüğüne olan katkılarının farklı olduğu gösterilmiştir (39).

Candida parapsilosis kompleks suşlarının hücre duvarında, aglütin benzeri sekans adezinleri ve hifal hücre proteinleri gibi klasik hücre duvar proteinlerine ek olarak, atipik proteinler (gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, Hsp70 şaperonlar, enolaz 1 ve endo-1,3-beta-glukanaz) de bulunur (40). Bu hücre duvar proteinlerinin hücrenin şeklinin korumasında yapısal görevleri olmasının yanında mantarın farklı konaklara adaptasyonunda da önemli rol oynadığı bildirilmiştir (41).

Candida parapsilosis'in hücre duvarında bulunan en yaygın immünojenik proteinler arasında; translasyon başlatma faktörü eIF4A subuniti, ATP sentaz subunit beta, enolaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, ısı şok proteini 70, piruvat dekarboksilaz, ATP sentaz subunit alfa, fosfoglisarat kinaz, alkol dehidrogenaz, fruktozbisfosfat aldolaz ve izositrat dehidrogenaz bulunur. Hücre duvarı ile ilişkili bu

immünojenik proteinlerin konakçı-patojen etkileşimlerinde söz konusu mantarın patojenitesini artıran önemli unsurlar olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (42).

2.7. Virülans Özellikleri

Candida parapsilosis kompleksine ait virülans faktörlerinin kolonizasyonu başlatma, özgül bağışıklık yanıtından kaçınma ve konakta hastalık yapma potansiyelini arttırdığı bilinmektedir. *C. parapsilosis* ile ilişkili virülans faktörleri çeşitli prostetik yüzeylere yapışma, implante edilmiş tıbbi cihazlar üzerinde biyofilm oluşturma kabiliyetini ve konakta doku hasarına neden olabilen hidrolik enzimlerin salgılanmasını kapsamaktadır. Son çalışmalar, *C. parapsilosis* enfeksiyonlarının patogeneğinde yağ asidi sentezi ve depolanmasının önemini de vurgulamıştır (34).

Biyofilm oluşumu *Candida* türlerinde antifungal ilaçlara karşı duyarlılığını azaltan, patojeniteyi artıran klinik olarak önemli bir virülans faktörüdür. *C. albicans* biyofilmlerine kıyasla, *C. parapsilosis* biyofilmleri çok daha ince olup hücre dışı matriksi daha çok karbonhidrat ağırlıklıdır (43). Özellikle glikoz ve lipid içeriği yüksek ortamlara, protez materyallerine yüksek afinite göstermektedir. Bu özelliklerin *C. parapsilosis* enfeksiyonunun total parenteral nütrisyon alan hastalardaki yüksek prevalansıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (44).

Candida parapsilosis kompleksin; salgısal aspartil proteaz, fosfolipaz, lipaz ve hemolizin dahil olmak üzere virülans ile ilişkili hidrolitik enzimler salgıladığı bilinmektedir. Yapılan insan doku modellemesi çalışmalarında bu enzimlerin inhibisyonunun doku hasarını azalttığı gösterilmiştir (45, 46).

Yapılan çalışmalar *C. parapsilosis* virülansında yağ asidi sentezi ve depolanmasının da önemini vurgulamıştır. Şaşırtıcı bir şekilde bu genlerin konak bağışıklık yanıtından kaçınma, biyofilm oluşumu ve virülansın artışında rol oynadığı bildirilmiştir (47).

2.8. Patogenezi

Candida türlerinin neden olduğu enfeksiyonlar genellikle kolonizasyonu takiben gelişmekte olup yüzeysel mikozlar, kronik mukokutanöz kandidoz ve ciddi invaziv hastalık gibi tablolar ile seyredebilmektedir. Enfeksiyonun şiddeti ve patogenezi primer olarak konak immün yanıtının durumuna göre şekillenmektedir. Özellikle nötropenik hastaların kandidoz gelişimi açısından risk altında olmaları *Candida*'lara karşı konak savunmasında nötrofillerin önemini vurgulamaktadır (48).

Yapılan deneysel çalışmalar *C. parapsilosis* suşlarının virülansının *C. albicans* ve *C. tropicalis* suşlarına kıyasla oldukça düşük olduğunu göstermiştir. İntravenöz *C. parapsilosis* enjekte edilen ratlardan; deneysel olarak indüklemiş diyabeti olanların öldüğü, sağlıklı ratların ise sağ kaldığı görülmüştür (8). Görece düşük virülansına rağmen intravenöz kateter kullanımı, antibiyotikler, nötropeni, HIV enfeksiyonu, kanser tedavisi ve uzun süreli hastanede yatış gibi predispozan faktörlere sahip hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir.

Candida albicans'a karşı konak savunması üzerine pek çok çalışma yapılmış olmasına karşın *C. parapsilosis*'e karşı spesifik konak savunma mekanizmaları hakkında sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır (49). Konağın bağışıklık sisteminin *C. parapsilosis* enfeksiyonuna ilk yanıtı; doğumdan itibaren oluşturulabilen, özgül olmayan ve konağın kendisine ait olmayan antijenleri tanıma kapasitesine sahip doğal bağışık yanıttır. *Candida*'ların hücre duvar bileşenleri, doğal immün sistem hücrelerinin yüzeyinde bulunan kalıp tanıma reseptörü (*Pathogen Recognition Receptor*, PRR) tarafından tanınan patojenle ilişkili moleküler kalıplar (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) olarak görev yapmaktadır. Nötrofil ve makrofajların yüzeyindeki PRR'ler tarafından PAMP olarak tanındıklarında fagositozu başlatırlar (13). Doğal bağışık yanıtın bu bileşenleri *C. parapsilosis* enfeksiyonlarında çok önemli rol oynasa da *C. parapsilosis*'in; *C. albicans*, *Blastomyces dermatitidis* ve *Paracoccidioides brasiliensis* gibi diğer bazı patojenik mantarlara kıyasla makrofajlar tarafından daha kolay öldürülebildiği tespit edilmiştir (50).

Candida'ların tanınması için Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ve C tipi lektin reseptörleri (CLR) dahil olmak üzere çeşitli PRR sınıfları tanımlanmıştır. *Candida* hücrelerinin TLR'lere bağlanması, nükleer faktör kappa B ve aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü gibi transkripsiyon faktörlerini etkinleştirerek sitokinlerin üretilmesiyle sonuçlanır. TLR1, TLR2, TLR4 genlerinde, sitokinlerde ve sitokin reseptörlerini kodlayan genlerdeki mutasyonların *Candida* enfeksiyonlarına yatkınlığı artırdığını bildiren çalışmalar mevcuttur (51-53).

Neden olduğu enfeksiyonların patogenezinin anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, hala yanıtlanmamış pek çok soru bulunmaktadır. *C. parapsilosis sensu stricto*'nun, Th1/Th17 konak yanıtını inhibe ederek ve konakçı

bağışıklık sisteminden saklanmak için antijen üretimini indükleyerek konakçı bağışıklık yanıtını modüle edebileceğini ileri süren çalışmalar mevcuttur (54).

2.9. Laboratuvar Tanısı

Candida türleri insanlarda üst solunum yolu ve gastrointestinal sistemde normal flora üyesi olarak bulunur ve endojen yolla enfeksiyon yaptıkları bilinmektedir. Özellikle balgam, trakea ve bronş salgıları, boğaz, dışkı gibi kendine özgü florası olan bölgelerden izole edildikleri durumlarda klinik ve laboratuvar bulgularının birlikte değerlendirilmesi önerilmektedir (55). Steril olduğu kabul edilen kan, beyin omurilik sıvısı, eklem, plevra ve perikard sıvılarından izole edilmeleri halinde ise enfeksiyonla direkt ilişkili oldukları kabul edilmektedir (56).

Candida parapsilosis kompleksin laboratuvar tanısında kullanılan yöntemler direkt ve indirekt olarak ikiye ayrılmaktadır. Direkt yöntemler, klinik örneklerin direkt mikroskopik incelenmesi ve kültürde etkenin üretilmesidir (57). İndirekt yöntemlerde ise hücre duvar komponentlerinin gösterilmesi, özgün nükleik asitlerinin saptanması, biyokimyasal ve üreme özelliklerine dayalı testler sıklıkla kullanılmaktadır (56).

2.9.1. Klinik Örneklerin Toplanması

Klinik örneklerden *Candida* türlerinin doğru tanımlanabilmesi için uygun klinik örneklerin alınıp laboratuvara uygun koşullarda iletilmesi gerekmektedir (58). Preanalitik parametrelerde meydana gelebilecek bir hata, başarısızlığa ya da etkenin izole edilmesinde gecikmelere neden olabilmektedir. Bu aşamalarda klinisyen ve laboratuvar arasında kurulacak işbirliği oldukça önem taşımaktadır (59).

Yüzeyel mantar enfeksiyonlarının tanısı için deri ve tırnak kazıntı örnekleri ile mukoza sürüntüleri alınırken sistemik kandidoz tanısı için kan, beyin omurilik sıvısı, balgam, idrar, doku biyopsisi, kornea ve damar içi katater uçlarından alınan örnekleri kullanılmaktadır. Klinisyenin, laboratuvara ilgili örneği göndermeden önce -eğer varsa- hastayla ilgili kritik bilgi ya da fizik muayene bulgularını mikrobiyolog ile paylaşması en hızlı ve uygun test seçimi konusunda yönlendirici olacaktır (56, 60).

Örneklerin laboratuvara taşınması sırasında sıvı ve ıslak bir materyal gönderilecekse mutlaka kapaklı ve steril kaplar kullanılması önerilmektedir. Kullanılacak örnek kapları sızdırmaz olmalı ve kontaminasyona neden olmayacak şekilde uygun koşullarda taşınmalıdır. Kan kültürü örneği gönderilmesi durumunda standart kan kültürü şişelerine, serolojik testler istemleri için antikoagülansız tüplere

alınmalıdır. Yara ve doku örneklerinde ise mümkün olabildiğince aspirasyon veya biyopsi materyali tercih edilmelidir (60).

2.9.2. Direkt Mikroskopi

Candida enfeksiyonlarının laboratuvar tanısında ilk işlem klinik örneklerin direkt mikroskopik incelenmesidir. Direkt bakı için hazırlanan yaş preparatta tomurcuklanan maya hücrelerinin görülmesi çok hızlı bir şekilde *Candida* enfeksiyonuna yönlendirmektedir.

Potasyum hidroksit (KOH) ve kalkoflor preparatları laboratuvarda sıklıkla kullanılan direkt inceleme yöntemleridir. Özellikle keratinize örneklerin KOH ile muamele edilmesi numunede bulunan deri hücrelerini ve protein artıklarını sindirmektedir. Böylece *Candida* türlerine ait karakteristik blastosporları, tomurcuklanan maya, psödomiselyum ve miselyumun görselleştirilmesini kolaylaştırmaktadır (61). Bunun yanında Gram, Wright ve metilen mavisi gibi boyalar ile hazırlanan preparatlar yaygın şekilde kullanılmaktadır. Doku biyopsilerinin incelenmesinde ise periyodik asit-schiff, metenamin gümüş boyaları uygulanmaktadır (62).

2.9.3. Kültür

Candida türlerinin kültürü için sıklıkla standart mikolojik besiyeri olan SDA tercih edilmektedir. Tipik olarak kloramfenikol ve gentamisin içeren besiyerinin pH'sı 6,9'dur. Bunun yanında kanlı agar, beyin kalp infüzyon agar, patates dekstroz agar, fluoroplate *Candida* agar, CHROMagar, Tween 80 agar, ve triptoz agar *Candida* türlerinin izolasyonu ve tanımlanması amacıyla yaygın kullanılan besiyerleridir (63).

Kültür için SDA besiyerine ekilen örnekler iki farklı sıcaklıkta (22-26°C ve 37°C'de) inkübe edilmektedir. Patojen türler her iki sıcaklıkta üreyebilirken, saprofit türler genellikle 37°C'de üreyememektedir (64).

2.9.4. Morfolojik İdentifikasyon

Hastadan alınan klinik örneğin direk mikroskopik incelemesi ve kültürü sonrasında, enfeksiyon etkeni mikroorganizmanın tanımlanması genellikle mikrobiyal kolonilerin makroskopik olarak gözlemlenmesiyle başlamaktadır. Kültür için kullanılan besiyerinin tipine göre mikroorganizmanın koloni morfolojisi, boyutu ve pigmentasyonu gibi karakteristik özellikleri değerlendirilmektedir. *C. parapsilosis* kompleksine ait izolatlar SDA besiyerinde genellikle 24-48 saat içerisinde kirli beyaz

renkte, pürüzsüz, kaygan, hafif kubbeli ve hamur kıvamında maya kokulu koloniler oluşturmaktadır. Mısır unlu- Tween 80 agarda çalı görünümüne benzeyen, ekim çizgilerine bitişik, çok sayıda fokal alanı olan satellit üreme paterninin gözlenmesi *C. parapsilosis* için tipiktir. CHROMagar besiyeri gibi kromojenik besiyerlerinde ise *C. parapsilosis* kolonileri parlak beyaz renkli koloniler şeklinde görülmektedir (60).

Makroskopik incelemenin ardından *Candida* türlerine ait izolatlarda mikroskopik olarak blastokonidia, psöдохифа, hifa, blastospor, germ tüp ve klamidospor gözlemlenebilmektedir. Mısır unlu- Tween 80 agarda inkübasyondan sonra *C. parapsilosis* izolatları mikroskopik olarak incelendiğinde blastokonidya, psöдохифа, hif ve blastospor yapıları gözlemlenebilir. Fakat özellikle klamidospor yapısının varlığı *C. albicans* ve *C. dubliniensis* izolatları için tipik olup *C. parapsilosis* kompleksine ait izolatlarda görülmemektedir. *Candida* türlerinin mikroskopik olarak birbirinden ayırımında klamidospor dışında çok tipik bir bulgu olmamasından dolayı ileri testlere gereksinim duyulmaktadır (65).

2.9.5. Hızlı İdentifikasyon Testleri

Hızlı identifikasyon testleri temel olarak immünolojik ve enzimatik yöntemler olarak ikiye ayrılmaktadır. İmmünolojik yöntemler, farklı türlerin hücre duvarındaki bir antijeni spesifik olarak tanıyan monoklonal antikörler tarafından duyarlı hale getirilen lateks parçacıklarının aglütinasyonu ilkesine dayanmaktadır. Henüz *C. parapsilosis* için immünolojik temelli testler yaygınlaşmamıştır. Bichro-latex® *albicans* (Fumouze Diagnostics, Fransa) testi *C. albicans* / *C. dubliniensis* kompleksini ayırmak amacıyla kullanılan birkaç dakika içerisinde sonuç veren immünolojik temelli bir hızlı identifikasyon testidir (66).

Enzimatik yöntemler, spesifik enzimlerin saptanmasına veya mayanın belirli bir substratı hidrolize etme yeteneğine dayanmaktadır. BactiCard™ *Candida* Kiti (Thermo Scientific, ABD) L-Prolin aminopeptidaz ve B-galaktosaminidaz enzimlerini tespit ederek *C. albicans*'ı diğer *Candida* türlerinden ayırmaktadır. Glabrata RTT® (Fumouze Diagnostics, Fransa) testi *C. glabrata*'nın trehalozu hidrolize etme kabiliyetini kullanarak tanımlamaktadır (67). Fungiscreen® testi (Bio-rad, ABD), 5 spesifik enzimin tespitiyle 37°C'de 4 saat içerisinde *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *Cryptococcus neoformans*'ı tanımlamayı mümkün kılmaktadır (68).

2.9.6. Biyokimyasal Testler

Biyokimyasal testler, mayanın karbonhidrat asimilasyon veya fermentasyon özelliğinin değerlendirilmesine dayanır. Bu şekerler glikoz, laktoz, sükroz, ksiloz, selobiyoz gibi mono veya polisakkaritler olabilir. Test edilecek karbonhidrat, karbon kaynağından yoksun bir besiyerine eklendikten sonra izolat kültür ortamına ekilir ve inkübe edilir. Besiyerinde üremenin varlığı şekeri asimile etme kapasitesini gösterir. Bir diğer yöntem ise karbon kaynağından yoksun bir besiyerine izolatın ekilmesi ve içerisine karbonhidrat eklenmiş disk kağıtlarının bırakılmasıdır. Benzer şekilde diskin üzerinde veya çevresinde mikroorganizma üremesi, şeker asimilasyonunu gösterir (68).

Karbonhidrat fermentasyonunun değerlendirilmesi, fermentasyon ürünlerinin tespitine dayanır. Bu bozunma ürünleri asit ise renkli indikatörler kullanılarak, gaz ise Durham tüpü ile reaksiyon ortamında tespit edilebilir. Bu testler asimilasyon testlerine göre daha az duyarlıdır (60).

Asimilasyon ve fermentasyon testleri oldukça zaman alıcı ve zahmetli olduğundan günümüzde bu prensiple çalışan API 20C AUX (bioMerieux, France), Fungichrom (International microbio, Fransa), Auxacolor (Sanofi Diagnostics Pasteur, Fransa), Fungifast (ELITech Microbiology Reagents, Fransa) gibi kullanıma hazır kitler mevcuttur. Bu yöntemler *C. parapsilosis* kompleksini ve diğer *Candida* türlerini ayırt edebilmektedir. Kullanımları deneyimli personel gerektirmez, hızlı ve uygulanması kolaydır (60, 68). *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının çeşitli karbonhidratları asimilasyon ve fermentasyon yeteneği Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. *Candida parapsilosis* kompleksinin karbonhidratları asimilasyon ve fermentasyon yeteneği.

Asimilasyon		Fermentasyon	
Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
Glukoz	Galaktilol	Glukoz	Laktoz
Melezitoz	Laktoz	Galaktoz ±	Sükroz
D-Ksiloz	Mellobiyoz		Trehaloz
Galaktoz	Sellobiyoz		Maltoz
D-Mannitol	D-arabinoz		
Maltoz	Raffinoz		
Sükroz	Laktat		
Gliserol	Nişasta		

2.9.7. Serolojik Testler

İnvaziv kandidiyazisin klinik bulgularının spesifik olmaması, kan kültürlerinin duyarlılığının düşük olması ve inkübasyon süresinin uzun olmasından dolayı erken ve doğru tanı için kültür dışı yaklaşımlara ihtiyaç bulunmaktadır. Serolojik yöntemler ile hasta serumunda mannan, β -(1,3)-D-glukan gibi antijenler ve anti-mannan antikorları araştırılmaktadır. Mannan ve β -(1,3)-D-glukan *Candida* hücre duvarının önemli bileşenleri olup kandidemide kan dolaşımında bulunan temel antijenlerdir. Bu antijenler, monoklonal anti-*Candida* antikorları kullanılarak enzime bağlı immünosorbent ve lateks aglütinasyon gibi tekniklerle serumda saptanabilir (62).

Serolojik yöntemler ile *Candida* türlerinin metaboliti olan D-arabinitol de araştırılabilir. D-arabinitol'ün kan plazması, BOS ve idrardaki fizyolojik konsantrasyonları 0-5 Mm aralığındadır. İnvaziv kandidiyazisli hastaların serum veya idrarında D-arabinitol'ün artışı gaz kromatografisi veya enzimatik analiz kullanılarak belirlenebilir. Serolojik testler sadece enfeksiyonu saptamak için değil, aynı zamanda hastayı klinik belirtileri beklemeden tedavi etmek için ve enfeksiyon riskini değerlendirmek için de kullanılır (69).

2.9.8. Kütle Spektrofotometrisi ile İdentifikasyon

Son yıllarda geliştirilen kütle spektrofotometrisi temelli yöntemler bakteri ve mantarların hızlı ve doğru bir şekilde identifikasyonunu sağlamaktadır. Matriks aracılı lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi, laboratuvar pratiğinde “devam eden bir devrim” olarak nitelendirilmektedir (70).

Mikroorganizmaları tanımlarken MALDI-TOF MS ile elde edilen pikler, cihazın veri tabanındaki referans spektraların pikleriyle karşılaştırılmaktadır. Bu yöntem rutin tanımlama yöntemlerine göre daha hızlı olup deneyimli personele ihtiyaç duymayan basit bir yöntemdir. *Candida* türlerinin ayrımında başarılı sonuçlar vermektedir. *C. parapsilosis* kompleksinin tanımlanmasında MALDI-TOF MS yönteminin rutin identifikasyon yöntemlerine göre oldukça duyarlı olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (71, 72). Bunun yanında kütle spektrofotometrik yöntemlerin, *C. parapsilosis* kompleks türlerinin birbirinden ayırt edilmesinde ve antifungal direncin araştırılmasında kullanımı da umut vaat etmektedir (73).

2.9.9. Moleküler İdentifikasyon

Candida parapsilosis kompleksinin moleküler identifikasyonu amacıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PCR, *polymerase chain reaction*) temelli ve hibridizasyon temelli yöntemler kullanılmaktadır. PCR temelli yöntemler içerisinde yeni geliştirilen T2 *Candida* tam kan örneğinden etkeni yakalayan ve alt tür tayini yapan gelecek yıllarda laboratuvarlarda sıkça kullanılmaya aday bir yöntemdir. Bu yöntem ile çoğu merkezde kandidemilerin >%95'ini oluşturan en yaygın beş *Candida* türünün (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* ve *C. glabrata*) tanımlanmaktadır (74). Hibridizasyon temelli yöntemlerde ise floresan ile işaretli nükleik asit problemleri kullanılmaktadır. Hibridizasyon temelli PNA-FISH Yeast Traffic Light (*Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization*) (AdvanDx, ABD) yöntemi yeni geliştirilmiş bir yöntem olup en yaygın beş *Candida* türünü tespit edebilmekte ve flukonazol duyarlılıklarını yeşil, sarı ve kırmızı olarak gösterebilmektedir (75).

Moleküler identifikasyon için en sık kullanılan yöntem PCR olup bu yöntem ile kandan, doku örneklerinden ve kültürden *C. parapsilosis* kompleksine ait nükleik asit saptanabilmektedir. Özellikle dokudan direkt izolasyon yapılabilmesi PCR yönteminin süre açısından önemli bir avantajıdır. Bu yöntemde en yaygın kullanılan hedef bölgeleri 5S, 5.8S, 18S ve 25S rRNA alt birimlerini kodlayan rRNA gen operonu, bir diğer adıyla *internal transcribed spacer* (ITS)1, ITS2 ve ITS4 'tür. Bunun yanında 28S rRNA geninin D1/D2 bölgesinin dizilenmesi *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının tanımlanmasında sık kullanılmaktadır (76, 77)

2.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürününün Restriction Fragment Length Polymorphism Analizi ile Alt Türlerin Belirlenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonu ürününün RFLP analizi, restriksiyon endonükleaz enziminin ampikonların kesilmesinde kullanılması temeline dayanmaktadır.

Polimeraz zincir reaksiyonu ürününün RFLP analizi 1990'lardan beri *Candida* türlerinin genotiplendirilmesinde kullanılmaktadır. Bu yöntemde öncelikle özel bir gen bölgesinin amplifiye edilir. Amplifiye edilen bölge restriksiyon enzimleri ile kesilir ve sonrasında agaroz jel elektroforezine tabi tutulur.

Polimeraz zincir reaksiyonu ürününün RFLP analizi yönteminde kullanılacak restriksiyon enzimleri, ampikonun maya kromozomuna oranla daha küçük olması ve daha az rastlantısal restriksiyon bölgesi içermesi sebebiyle dikkatle seçilmelidir.

Amplikon büyüklüğü ve olası restriksiyon bölgelerinin sayısı, yöntemin ayırt edici gücüne etki etmektedir. *C. parapsilosis* kompleks türlerini ayırt etmek için uygulanan PCR-RFLP analizinde sıklıkla sekonder alkol dehidrogenaz (SADH), FKS1 genleri ve rDNA geninin ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi hedeflenmekte; restriksiyon enzimi olarak BanI tercih edilmektedir. Bu tekniğin temel avantajı yüksek güvenilirlikte, hızlı, kolay ve nispeten ucuz bir yöntem olmasıdır (62). Bunun yanında PCR-RFLP yönteminde SADH genine ait genetik polimorfizmler nedeniyle restriksiyon endonükleaz enziminin kesim bölgesi etkilenebilmekte ve bu yöntemle sonuç alınamayan izolatların tür ayrımının dizi analizi ile yapılması gerektiği bildirilmektedir (49, 78).

2.11. Klonal İlişkiyi Araştıran Yöntemler

Klonal ilişkiyi araştıran genotipik yöntemler; hastalığın evrimi, coğrafi yayılımı bunun yanında özellikle hastane salgınlarının araştırılması, kaynak tespiti, direnç yayılımının izlenmesi gibi birçok alanda kullanılmakta olan önemli moleküler biyolojik araçlar olarak karşımıza çıkmaktadır.

Candida parapsilosis kompleks izolatları arasındaki klonal ilişkileri araştırmak için standardize edilmiş, tekrarlanabilirliği yüksek, stabil, ucuz ve hızlı uygulanabilir olma özelliklerini taşıyan ideal bir yöntem henüz bulunmamaktadır. Birçok yöntem kullanılmakla birlikte her yöntemin kendi içerisinde avantajlarının ve dezavantajlarının olması dikkat çekmektedir.

Bu yöntemlerle elde edilen sonuçlar, taksonomik ve filogenetik çalışmalar ile karşılaştırıldığında suşların başka cins adı altında isimlendirilmesine olanak vermekle birlikte, aynı zamanda farklı isimlendirilen suşların aynı genotipik özellikleri gösterebildiği bildirilmiştir. Ayrıca suşlar arası genotipik farklılıklar antifungal duyarlılığa da etki edebilmektedir (31). İzolatlar arasındaki klonal ilişkiyi araştırmak için kullanılan AP-PCR, PFGE-EK, PFGE-REA, *microsatellite genotyping* yöntemleri açıklanacaktır.

2.11.1. Arbitrarily Primer PCR

Arbitrarily Primer PCR yöntemi, uygulamadaki küçük farklılıklarla *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) olarak da adlandırılmaktadır. Bu yöntem hedef bölge olmaksızın rastgele belirlenmiş 9-10 bazlık kısa primerler kullanılarak benzer genomik bölgelerin amplifikasyonu esasına dayanmaktadır. *C. parapsilosis* kompleksinin AP-PCR ile genotiplendirilmesinde %60-70 G+C içeren primerlerin

kullanılması yöntemin başarısını arttırmaktadır. Primerlerin bağlanma ısıları düşürülerek hem kendilerine özgü bölgelere hem de daha az özgül olan bölgelere bağlanmaları sağlanmaktadır. Primerlerin rastgele bağlanma yerlerinin birbirine uzaklıkları ve sayıları, aynı tür içindeki farklı suşların ayrılmasını sağlamaktadır. Çoğaltılan ürünlerin görüntülenmesi ile türe özgü DNA band paternleri *finger print*'ler oluşmaktadır. Uygulama kolaylığı ve kısa sürede sonuç vermesi yöntemin avantajıdır. En önemli dezavantajı ise standardizasyonun sağlanamaması ve kullanılan Taq DNA polimeraz, ısı döngü cihazı gibi pek çok faktörden etkilenmesi nedeniyle tekrarlanabilirliğinin düşük olmasıdır (57).

Haploid mikroorganizmalarda AP-PCR yöntemiyle hem dominant aleller hem de boş aleller, sırasıyla bant varlığı veya yokluğu şeklinde görselleştirilmektedir. Bu sebeple haploidlerde klonal çeşitliliği göstermede başarılıdır. Fakat *C. parapsilosis* kompleksi gibi diploidlerde dominant aleller ve boş aleller AP-PCR yöntemini karmaşık hale getirmektedir. Bu yöntem ile dominant alelin hem homozigot hem de heterozigot olan genotipleri tek bir bant olarak görüldüğünden dolayı ayırım güçleşmektedir (79).

2.11.2. Pulsed- Field Jel Elektroforez Sistemi

İlk kez 1984 yılında maya kromozomlarını ayırt etmek amacıyla geliştirilen PFGE sistemi ile 5 Mb boyutundaki DNA parçaları jel üzerinde görüntülenebilmektedir. *Candida* suşlarında PFGE, özellikle küçük kromozomların görüntülenmesini sağladığı için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem ile sıvı veya katı besiyerinde üretilen suşlar düşük erime ısıli agaroz ile karıştırılır. Zimolaz ya da litikaz enzimi ile hücre duvarı lizise uğrattılır ve total DNA deterjan ve proteinaz K enzimiyle açığa çıkarılır. Daha sonra por büyüklüğü geniş özel bir agaroz jelde pulsed field elektroforeze tabi tutulur. Büyük DNA molekülleri farklı açılardan gelen elektrik akımının etkisiyle agaroz jel üzerinde çözülerek göç eder. Bu yöntem ile elektroforetik karyotiplendirme ve restriksiyon enzim analizi yapılabilir. (60).

Pulsed- field jel elektroforez sistemi tekrarlanabilirliği ve yüksek ayırım gücü nedeniyle moleküler epidemiyolojide oldukça önemli bir araç olmasına karşın, zaman alıcı, emek yoğun ve pahalı özel ekipmanlar gerektiren bir yöntem olması dezavantajlarıdır. (60).

2.11.3. PFGE- Elektroforetik Karyotiplendirme

Candida parapsilosis kompleks türlerinin de içerisinde bulunduğu birçok mantar türü, eşit olmayan kromozomal yeniden düzenlemeler (*chromosomal rearrangements*), genomik dizi tekrarlarının daralması veya genişlemesi olarak tanımlanabilen kromozom uzunluk polimorfizmi (CLP, *chromosome length polymorphism*), delesyonlar, karşılıklı translokasyonlar gibi genetik çeşitliliklere sahiptirler. Bu çeşitlilikler; yeni kromozom boyutlarına, translokasyonlara ve hatta bazı genom bölgelerinin kaybına yol açabilmektedir. Eşit olmayan yeniden düzenlemelere neden olan dizilimler, homolog olmayan kromozomlar arasındaki rekombinasyon için substrat görevi gören yer değiştirebilir elementler ve diğer dağılmış tekrar dizileridir. Özellikle rDNA kromozomunun CLP özelliği göstermesi ve diğer kromozomlara göre yaklaşık iki kat sıklıkla gözlenen değişkenliği dikkat çekicidir. Elektroforetik karyotip analizi (EK) ile restriksiyon endonükleaz enzimi olmaksızın alternatif yönelimli elektrik akımları kullanılarak kromozom uzunluk polimorfizmleri değerlendirilebilmektedir.

Elektroforetik karyotip analizi, *C. parapsilosis* kompleks suşlarının genotiplendirilmesinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. *C. parapsilosis* izolatlarının epidemiyolojik tiplendirilmesi için tek başına EK'nin yeterli olabileceği öne sürülmektedir. Fakat bu yöntemde yüksek homoplazi ve aynı boyuttaki bantların homolog olmaması olasılığı bulunmaktadır. Bunun yanında oldukça pahalı ekipman gerektiren ve üç ile beş gün arasında çalışma süreleri olan bir yöntemdir (80).

2.11.4. PFGE- Restriksiyon Enzim Analizi

Pulsed field jel elektroforez- Restriksiyon Enzim Analizi (PFGE-REA) analizi uzun, çift iplikli DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesilmesi sonrası PFGE ile kesilen parçaların ayrıştırılması ve jelde görüntülenen bant paternlerinin karşılaştırılması prensibine dayanmaktadır. Kısaca bu yöntem ile sıvı veya katı besiyerinde üretilen suşlar düşük erime ısıli agaroz ile karıştırılır. Zimolaz ya da litikaz gibi bir enzim ve deterjan ile hücre duvarı lizise uğratılır (*in situ lysis*) ve DNA restriksiyon enzimleri ile kesilir (*in situ digestion*). Daha sonra por büyüklüğü geniş özel bir agaroz jelde pulsed field elektroforeze tabi tutulur. Büyük DNA molekülleri farklı açılardan gelen elektrik akımının etkisiyle agaroz jel üzerinde çözülerek göç eder. Bu yönüyle organizmanın tüm genomu restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesildiğinden bu yöntem *macrorestriction mapping* olarak da adlandırılır.

Aynı türdeki genomik farklılıklar restriksiyon enzimleri ile kesildikleri bölgelerin de farklı olmasına neden olur. Bu enzimler genellikle DNA'yı 4-6 nükleotidlik bölgelerden keserler. Jeldeki bant yoğunluğu DNA parçasının uzunluğu ile orantılıdır. Yöntemin ayırım gücü kullanılan restriksiyon enzimine bağlı olup *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının ayırımında en sık kullanılan enzimler BssHII, SfiI ve EcoRI'dır (61, 80).

2.11.5. Microsatellite Genotyping

Mikrosatellitler 1989 yılında Tautz tarafından keşfedilmiş olup 2-6 nükleotit uzunluğunda kısa ve tekrarlayan DNA dizileri olarak tanımlanmaktadır (81). Basit dizi tekrarları veya kısa bitişik tekrarlar (*short tandem repeats*) olarak da ifade edilirler ve çoğunlukla kodlayıcı olmayan bölgelerde bulunurlar. Bu tekrarlayan nükleotit dizilerinin yüksek derece polimorfik olduğundan dolayı genetik çeşitlilik belirleme, gen haritalama, popülasyonlar arası genetik benzerlik ve farklılıkların belirlenmesinde kullanılmaktadır (82). Mikrosatellitler, tekrarlanabilir olmaları, yüksek ayırım güçleri ve az miktarda DNA gerektirmeleri gibi avantajları sebebiyle *C. parapsilosis* kompleks türlerinin moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesinde tercih edilen genetik markırlardır. Yöntemin eksikliği ise genom bilgisi, sekans analizi gerektirmesi, zor ve maliyetli bir yöntem olmasıdır (83).

2.12. Antifungal Duyarlılığı

Uzun yıllar mantarların patojenik özellikleri çok iyi bilinmediğinden antifungal ajanlar antibiyotiklere kıyasla nispeten daha yavaş gelişim göstermiştir. Günümüzde ise *Candida* izolatlarının tür tayininin yapılması ve antifungal duyarlılığının belirlenmesinin ampirik antifungal tedavi uygulamaları için yol göstericidir. Bunun yanında antifungal direnç sürveyans programları ile antifungal direncin kontrolüne yönelik programların tasarlanması önerilmektedir (38).

Candida izolatlarının antifungal duyarlılığının belirlenmesinde *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) ve *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) tarafından önerilen referans yöntem sıvı mikrodilüsyon yöntemidir (84). Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, üremenin olmadığı en düşük antifungal konsantrasyonunun bir diğer deyişle minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) ölçülmesine dayanır. Ancak sıvı mikrodilüsyon yönteminin zaman alıcı olması ve klinik laboratuvarlarda antifungal duyarlılığının ölçülmesi için

pratik olmaması nedeniyle gradient E test yöntemi, otomatize sistemler ve Sensititre YeastOne (SYO; Thermo Fisher Scientific, MA, ABD) gibi ticari sistemler de sıklıkla tercih edilmektedir. Ayrıca bu yöntemlerin doğruluk ve tekrarlanabilirlik açısından sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle mükemmel uyum gösterdiği bilinmektedir (85).

Candida parapsilosis kompleks izolatlarının polienler (amfoterisin B) ve azoller (flukonazol, ketokonazol, itrakonazol, vorikonazol ve posakonazol) dahil olmak üzere çoğu sistemik antifungal ajana karşı oldukça duyarlı olduğu bilinmektedir. Global sürveyans çalışmaları fungemi etkeni *C. parapsilosis* izolatlarında flukonazol direncinin yaygın olmadığını göstermektedir (86).

Candida parapsilosis kompleksi alt türlerinin antifungal duyarlılıklarındaki farklılıklar da önem arz etmektedir. *C. metapsilosis*, *C. parapsilosis* kompleks türleri arasında flukonazole en az duyarlı olanıdır. Bunun yanında diğer *Candida* türlerine göre, *C. parapsilosis* kompleks izolatlarında ekinokandin minimum inhibitör konsantrasyon sınır değerleri daha yüksektir. *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis*'e göre daha yüksek kaspofungin ve anidulafungin MİK sınır değerlerine sahiptir. *C. parapsilosis sensu stricto* ve *C. orthopsilosis*'in kaspofungin MİK sınır değerleri diğer iki ekinokandine göre daha düşüktür (49).

2.13. Antifungallerin Etki ve Direnç Mekanizmaları

Candida türlerinin tedavisinde kullanılmakta olan antifungal ilaçlar temel olarak hücre zarındaki ergosterolü ve hücre duvarındaki beta glukani hedef almaktadır. En yaygın kullanılmakta olan antifungal ilaç grubu azoller olup ekinokandinler ve amfoterisin B de sıklıkla tercih edilmektedir. Antifungal ilaçlara direnç, giderek önem kazanmakta olan bir konudur. Klinik olarak, ilacın tolere edilebilir düzeyde varlığına rağmen enfeksiyonun belirti ve semptomlarının devam etmesi olarak tanımlanabilir. Antifungal direnç; doğal ya da edinilmiş (daha önce duyarlı bir organizmada ajana maruz kaldıktan sonra direncin gelişmesi) şekilde görülebilir.

Antifungal ilaçlar etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır. Azoller, lanosterol demetilaz enzimiyle etkileşime girerek ergosterol biyosentezini engelleyerek *Candida* türlerine karşı fungistatik veya fungisidal etkiye sahip olabilir. En sık kullanılan azol türevleri flukonazol, vorikonazol, itrakonazol'dür. Azol grubu ilaçlara karşı direnç gelişimi lanosterol demetilaz enzimindeki değişiklik, ilacın aşırı eksprese olmuş effluks pompa sistemiyle dışarı atılımı, ERG11 ve ERG3 gen bölgesindeki nokta

mutasyonlar ile meydana gelmektedir. *C. parapsilosis* kompleks suşlarında azoller etkili olmasına karşın son yıllarda azol dirençli izolatların arttığı bildirilmektedir (87).

Amfoterisin B, hücre zarındaki ergosterol ile etkileşime girerek porlar oluşturur. Polien grubunda yer alır. Fungisidal etkilidir ve hücre zarında sızıntıya neden olarak sitoplazmik içerik kaybına neden olur. Bu ilaca karşı direnç gelişimi ERG 1-4, 6, 11 genlerindeki mutasyonlar sebebiyle hücre zarındaki ergosterol miktarının azalmasıyla oluşmaktadır.

5-Flusitozin, bir nükleosit analogu olup DNA ve protein sentezini inhibe eder. Sitozin permeaz yoluyla mantar hücre zarından içeri girer ve mantar tarafından 5-florourasil'e dönüştürülür.

Ekinokandinler, mantar hücre duvarının önemli bir bileşeni olan b-1,3-D-glukan sentezini engelleyerek etki gösterirler. Bu gruptan kaspofungin, mikofungin ve anidulafungin *Candida* türlerine karşı antifungal aktivite göstermektedir. Ekinokandinlere direnç glukan sentezini düzenleyen FKS gen bölgesinde oluşan mutasyonlarla ilişkilidir (11) .

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hastalar ve *Candida parapsilosis* İzolatlarının Tanımlanması

Bu araştırma, toplam 317'si yoğun bakım yatağı olmak üzere 1585 yatak kapasitesine sahip olan İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi'nde yapıldı. Hastanemiz Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 01.01.2016- 01.01.2022 tarihleri arasında gönderilen kan kültürü örnekleri BACT /ALERT 3D (Becton Dickinson, Maryland, USA) otomatize sisteminde inkübe edildi. Pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerinden steril bir enjektör yardımıyla her bir şişeden aspire edilen kan örnekleri kanlı, *Eosin Methylene Blue* ve SDA besiyerlerine ekildi.

Örneklerdeki maya üremeleri öncelikle Gram boyama yöntemi ile incelendi. Üreyen izolatların saf kültür olup olmadığı kontrol edildi. Karışık kültür üremesi olan besiyerlerinden SDA besiyerine subkültürler alınarak saflaştırıldı. Ardından SDA'da üreyen maya kolonilerinin taze pasajından özenin ucuyla alınıp Vitek MS (Bio Mérieux, Fransa) MALDI-TOF MS cihazının tanımlama slaytları üzerine her bir kuyucuğa bir maya kolonisi gelecek şekilde ince bir tabaka halinde sürüldü. Üzerine 0,5 µl %25 formik asit eklenerek kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra 1 µl *α-cyano-4-hydroxycinnamic* asit matriks solüsyonu eklendi. Kalibrasyon için *Escherichia coli* ATCC 8739 suşu kullanıldı. Slayt üzerine damlatılan matriks solüsyonları kuruduktan sonra MALDI-TOF MS cihazı kullanılarak *In Vitro Diagnostic* modülü V3.0 veri tabanı ile tür düzeyinde tanımlandı.

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu'nun 29.03.2022 tarih ve 2022/3281 sayılı onayıyla yürütülmüştür.

3.1.1. Epidemiyolojik İlişki ve Risk Faktörlerine İlişkin Bilgilerin Toplanması

Çalışmaya alınan her hasta için epidemiyolojik çalışma formu dolduruldu. Hastaların cinsiyeti, yaşı, yatış yeri ve *C. parapsilosis* kompleks suşlarının izolasyon tarihi örnek çalışma formuna eklendi. *Candida parapsilosis* özellikle plastik yüzeylerde olmak üzere biyofilm oluşturma yeteneği sebebiyle tıbbi cihazlarda en az dört hafta kolonize olabilmektedir (88). Bu sebeple izolatların klasik epidemiyolojik verilere göre gruplandırılmasında bir aylık sürede aynı serviste yatan hastalar aynı epidemiyolojik gruba dahil edildi.

3.2. İzolatların Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzolatların tamamına antifungal duyarlılık testleri çalışıldı. Bu amaçla *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının flukonazol duyarlılığı E test (Biomerieux, France) yöntemiyle belirlendi. 0.016-256 µg/ml arasında değişen dilüsyonlarda flukonazol içeren E test stribi kullanıldı. Bu yöntemde 0.165 M morfolinopropan sülfonik asit (MOPS) (MerckKGaA, Almanya) ile tamponlanmış, %0,2 glikoz ilave edilmiş RPMI 1640 (Sigma Chemical CO, StLois, MO, ABD) katı besiyeri kullanıldı. MOPS tamponlu RPMI 1640 agar besiyerinin hazırlanışı için 34,53 gram (0,165 M) MOPS 1 litre distile suda çözüldü. Son hacim 500 ml ve pH=7.0 olacak şekilde 450 ml MOPS çözeltisinde 15 gr agar eritildi. Ayrı bir mezurda son hacim 500 ml ve pH=7.0 olacak şekilde 10,4 g RPMI 1640 toz besiyeri ve 18 g glukoz 450 ml MOPS çözeltisine eklendi. İki çözelti karıştırılıp besiyeri otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. Doksan mm çapındaki petri kaplarına yüksekliği 4-5 mm olacak şekilde yaklaşık 25'er ml dağıtıldı. Kullanılincaya kadar +4 °C'de saklandı.

Test edilecek izolat 0.5 Mc Farland bulanıklığında hazırlanıp besiyeri üzerine steril pamuk uçlu eküvyon ile yayıldı. Daha sonra azalan dilüsyonlarda flukonazol emdirilmiş strip besiyerinin ortasına yerleştirildi. Besiyerleri 35°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra üremenin %80 inhibe olduğu zon ile E test stribinin kesiştiği nokta MİK sınır değeri olarak belirlendi.

3.3. İzolatların Alt Tür Tayininin Yapılması

Candida parapsilosis kompleks izolatlarının alt tür tayini için PCR-RFLP yöntemi kullanıldı. Bu yöntem ile sonuç alınamayan izolatlar dizi analizi yapıldı.

3.3.1. DNA İzolasyonu

Kültürde 24 saat üreyen taze maya kolonilerinden, üretici talimatları izlenerek küçük modifikasyonlarla BioRobot EZ1 (Qiagen, Almanya) otomatize izolasyon cihazında EZ1 DNA Tissue Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Maksimum verimde DNA eldesi için 190 µL ddH₂O içerisinde bir öze dolusu maya kolonisi süspanse edildi. Ardından 10 µL litikaz (SigmaAldrich, ABD) enzimi ilave edilerek 30°C'de 30 dakika inkübe edildi. Tamponlarda ya da pcr reaktiflerinde DNA kontaminasyonu olup olmadığının anlaşılması için her reaksiyona bir negatif kontrol eklendi. DNA konsantrasyonları UV spektrofotometre (MaestroNano, Maestrogen, Taiwan) ile ölçüldü.

3.3.2. SADH Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Restriksiyon Endonükleaz Enzimiyle Kesimi

Candida parapsilosis kompleks izolatlarının nükleik asit ekstraksiyonu yapıldıktan sonra kompleks içindeki türlerin ayrımı için PCR-RFLP yöntemi uygulandı. Bu amaçla ilk olarak SADH gen bölgesine özgü primerler [(SADH-F GTTGATGCTGTTGGATTGT) ve (SADH-R CAATGCCAAATCTCCCAA)] kullanılarak hedef bölge amplifiye edildi. SADH gen bölgesinin amplifikasyonu için PCR karışımı; 10x PCR tamponundan (MgCl₂ içermeyen) 2.5 µl, 25 mM MgCl₂'den 1.5 µl, 10mM dNTP karışımından 0.5 µl, 10 pmol/µl sulandırılmış primerlerden 1'er µl, 5 U/µl Taq polimeraz enziminden 0.125 µl ve 2 µl ekstrakte DNA içerecek şekilde toplamda 25 µl olarak hazırlandı. Amplifikasyon GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) ısı döngü cihazında Tablo 3.1'de gösterilen koşullarda gerçekleştirildi (7).

Tablo 3.1. SADH gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan ısı döngü profili.

	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön denatürasyon	94 °C	7 dk	1 siklus
Denatürasyon	94 °C	1 dk	
Primer bağlanması	50 °C	1 dk	30 siklus
Primer uzaması	74 °C	1 dk	
Son uzama	74 °C	10 dk	1 siklus

Amplifikasyon sonrası elde edilen 10 µl SADH-PCR ürünü (716 bp), 1 µl BanI (20 U) restriksiyon enzimi (Biolabs, UK), 2 ml reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde 37°C'de 90 dakika inkübe edildi. Ardından 0.05 µg/ml ethidyum bromid (EtBr) eklenen %2'lik agaroz jelde 100V'da 1 saat olacak şekilde elektroforeze tabi tutuldu. Amplikonlar elektroforez sonrası Gel Logic 2200 görüntüleme sistemi (Kodak Co., Rochester, NY, ABD) ile fotoğraflandı. Restriksiyon paternlerine göre; 196 ve 521 bp'de iki bant oluşması *C. parapsilosis sensu stricto*, 370, 188, 93, 60 bp'de 4 bant oluşması *C. metapsilosis*, 716 bp'de tek bant oluşması *C. orthopsilosis* olarak değerlendirildi (7). Bu yöntem ile bant oluşturmayan izolatlar tekrarlandı. Tekrarlandığında sonuç alınamayan izolatlar için dizi analizi ile alt tür ayrımı yapıldı.

3.3.3. Amplifikasyon Ürünlerinin Dizi Analizi ile Doğrulanması

SADH gen bölgesinin amplifikasyonu ve Ban-I enzim kesimi sonucunda bant elde edilmeyen izolatlar dizi analizine tabi tutuldu. Bu amaçla öncelikle *large subunit* rRNA (D1/D2 bölgesi) bölgesi NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') ve NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') primerleri ile amplifiye edildi. D1/D2 gen bölgesinin amplifikasyonu için PCR karışımı; 10x PCR tamponundan (MgCl₂ içermeyen) 2.5 µl, 25 mM MgCl₂'den 1.5 µl, 10mM dNTP karışımından 0.5 µl, 10 pmol/µl sulandırılmış primerlerden 0.5'er µl, 5 U/µl Taq polimeraz enziminden 0.5 µl ve 2 µl kalıp DNA içerecek şekilde toplamda 25 µl olarak hazırlandı (89). Amplifikasyon GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) ısı döngü cihazında Tablo 3.2'de gösterilen koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 3.2. D1/D2 gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan ısı döngü profili.

	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön denatürasyon	95 °C	10 dk	1 siklus
Denatürasyon	95 °C	15 sn	
Primer bağlanması	60 °C	1 dk	35 siklus
Primer uzaması	72 °C	30 sn	
Son uzama	72 °C	5 dk	1 siklus

Elde edilen amplifikasyon ürünleri, DNA saflaştırma işlemine alındı. Bu amaçla ticari bir saflaştırma kiti (Qiaquick PCR purification Kit, Qiagen, Almanya) kullanıldı. Protokol üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulandı. İşlem sonunda elde edilen ürünlerin saflığı %1,5'luk agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak kontrol edildi ve yeterli miktarda DNA içeren saflaştırılma ürünleri sekans reaksiyonunda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı. DNA dizi analizi için sekans reaksiyonu; çift yönlü olarak her iki primerle yapıldı. Dizi analizi tepkimesi için kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.3'te gösterildi.

Tablo 3.3. Dizi analizi tepkimesi için kullanılan bileşenler ve miktarları.

Komponent	Miktar
5x Cycle Sequencing Buffer (AB)	3 µl
BigDye	2 µl
Primer (10 pmol/ µl)	0,32 µl
H ₂ O	12,68 µl
DNA	2 µl
Toplam Hacim	20 µl

Bu şekilde hazırlanan karışım Qiagen Rotor Gene cihazına yüklendi ve amplifikasyon 60 siklus 95°C’de 5 sn denatürasyon, 50°C’de 20 sn primerlerin bağlanması, 60°C’de 4 dk primerlerin uzaması olacak şekilde gerçekleştirildi. Ardından BigDye prepsitasyon yapmak için Tablo 3.4’teki stok solüsyonları uygun miktarlarda kullanıldı.

Tablo 3.4. Big Dye prepsitasyon için kullanılan stok solüsyonları ve konsantrasyonları.

Komponent	Konsantrasyon
A	Su
	Sodyum asetat pH 4.6
	Na-EDTA
	Glikojen
B	Sekans karışımı
C	Etanol (-20 °C)
	%99

- 1- B, buz üzerinde 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alındı.
- 2- B’nin üzerine 12.39 µl A’dan ilave edildi.
- 3- Daha sonra mikrosantrifüj tüpüne soğuk etanol eklenir eklenmez >18 k x g ivmesi ile 45 dakika santrifüj edildi, ardından süpernatant uzaklaştırıldı.
- 4- İki defa 200 µl %70 etanol (-20 °C) ile yıkama yapıldı, süpernatant uzaklaştırıldı.
- 5- Pellet kurutuldu.
- 6- Pellet 40 µl deiyonize formamid ile çözülür.

- 7- Çöktürülen ve kapiller jel elektroforezine hazır hale getirilen DNA, dizi analizi için cihaza yüklenmeden hemen önce 95 °C’de 5 dakika bekletilerek denatürasyon sağlandı.

Örnekler ABI Prism 310 Genetic Analyzer'a (Applied Biosystems, ABD) yüklendi. Suşlardan elde edilen tüm diziler Ugene yazılım kullanılarak (<http://ugene.unipro.ru>) hizalandı. Bunun yanında *National Centre for Biotechnology Information* içinde yer alan GenBank ve Temel Yerel Hizalama Aracı sunucularında karşılaştırmalar yapıldı.

3.4. İzolatlar Arasındaki Klonal İlişkilerin Araştırılması

Candida parapsilosis kompleks izolatları arasındaki klonal ilişkilerin araştırılması için AP-PCR, PFGE-REA ve PFGE-EK yöntemleri kullanıldı.

3.4.1. Arbitrarily Primed Polimeraz Zincir Reaksiyonu

C. parapsilosis kompleks izolatlarının AP-PCR ile genotiplendirilmesinde M13 primeri kullanıldı. DNA izolasyonu yapıldıktan sonra UV spektrofotometre ile ölçülen DNA süspansiyonları 50 ng/ µL olacak şekilde sulandırıldı.

AP-PCR yöntemi için daha önce Durmaz ve arkadaşları tarafından standardize edilmiş M13 primerinin kullanıldığı protokol uygulandı. Öncelikle 2x amplifikasyon karışımı Tablo 3.5’te gösterildiği şekilde hazırlandı. Ardından her bir izolat için 25 µL 2x amplifikasyon karışımına; M13 primeri (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3'), Taq DNA polimeraz, ddH₂O ve DNA Tablo 3.6’da belirtildiği şekilde eklenerek 50 µL pcr karışımı hazırlandı.

Tablo 3.5. 2x amplifikasyon karışımının hazırlanması.

10 x Amplifikasyon tamponu	5 µl
dNTP miks (10 mM)	1 µl
MgCl ₂ (50 mM)	4 µl
Steril DNaz ve RNaz içermeyen su	15 µl
Toplam hacim	25 µl

Tablo 3.6. 50 µl olan amplifikasyon karışımının hazırlanması.

2 x Amplifikasyon karışımı	25 µl
Primer M13 (100 pmol/µl)	1 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.5 µl
Steril Dnaz ve Rnaz içermeyen su	21.5 µl
Ekstraksiyon ürünü DNA (50 ng/µl)	2 µl
Toplam hacim	50 µl

Hazırlanan PCR karışımı ile termal döngü cihazında Tablo 3.7’de belirtilen ısı döngüsü kullanılarak M13 primerine özgü DNA bölgeleri amplifiye edildi.

Tablo 3.7. AP-PCR için kullanılan ısı döngü profili.

	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	94°C	5 dk	2 siklus
Primer bağlanması	40°C	5 dk	
Primer uzaması	72°C	5 dk	
Denatürasyon	94°C	1 dk	40 siklus
Primer bağlanması	40°C	1 dk	
Primer uzaması	72°C	2 dk	

Amplifikasyon sonrasında 12 µl amplifikasyon ürününe $\frac{3}{4}$ oranında bromfenol mavisi eklendikten sonra %2 agaroz jel içinde 1x TBE buffer (0.089M Tris, 0.089M borate, 2mM EDTA, pH 8.2-8.4) ile 250 dakika 120 V’ta elektroforeze tabi tutuldu. Gel Logic 2200 görüntüleme sistemi (Kodak Co., Rochester, NY, ABD) ile fotoğrafları çekilerek suşların bant profilleri karşılaştırıldı. Bant profilleri GelCompar II yazılım sistemi (version 6.5; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak analiz edildi. Bant analizleri için benzerlik hesaplarının yapılmasında Dice Korelasyon katsayısı ve kümeleşme analizi için de *Unweighthed Pairwise Grouping Matematical Avenaging* (matematiksel ortalamayla ağırlıksız çiftlerin gruplandırılması, UPGMA) yöntemi kullanıldı.

3.4.2. PFGE- Restriksiyon Enzim Analizi

Elektroforetik karyotiplendirme için tarif edildiği şekilde hazırlanan ve içerisinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz pluglar steril bistüri ile ¼ oranında kesilerek restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesime hazır hale getirildi. *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının klonal ilişkisinin PFGE-REA yöntemiyle değerlendirilmesi için daha önce etkinliği araştırılmış olan BssHII enzimi (Promega Corporation, WI, USA) kullanıldı.

Kesilen agaroz plug 20 U BssHII enzimi tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 37°C’de 15 dakika inkübe edildi. Enzim tamponu aspire edildikten sonra her bir örnek için; 10 µl 10x BssHII tamponu, 2 µl BssHII enzimi (10 U/µl), 87 µl steril ultra saf su eklenerek 37°C’de 1 gece çalkamalı su banyosunda bekletildi.

İnkübatörden çıkarılan diskler elektroforez için hazır hale getirildi. Agaroz %0,7 (*pulsed-field certified agarose*, Bio-Rad Laboratories) konsantrasyonda olacak şekilde 100 ml 0.5x TBE tamponu içinde hazırlandı. Yaklaşık 1900-2000 ml 0.5x TBE tamponuyla doldurulan PFGE tankına yerleştirildi. CHEF DR II (Bio-Rad laboratories, Nazareth, Belgium) sisteminde Tablo 3.8’te belirtilen elektroforez koşulları uygulandı.

Tablo 3.8. PFGE- REA yöntemi elektroforez koşulları.

Başlangıç vuruş süresi	90 sn
Bitiş vuruş süresi	360 sn
Elektroforez süresi	36 saat
Akım	3.5 V/cm ²
Sıcaklık	12°C

Elektroforez tamamlandıktan sonra PFGE tankından çıkarılan jel 5 µg/ml EtBr içeren ultra saf su içinde boyandı. Ardından görüntüleme için Gel Logic 2200 (Kodak Co., Rochester, NY, ABD) sistemi kullanıldı. TIFF formatında kaydedilen fotoğraflardaki bant profilleri GelCompar II yazılım sistemi (version 6.5; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak analiz edildi. Bant analizleri için benzerlik hesaplarının yapılmasında Dice Korelasyon katsayısı ve kümeleşme analizi için de UPGMA yöntemi kullanıldı.

3.4.3. PFGE-Elektroforetik Karyotiplendirme

Elektroforetik karyotiplendirme yöntemi için gerekli çözeltiler şunlardır:

-Hücre süspansiyon tamponu (100 mM Tris HCl, 100 mM EDTA, pH=8.0)

-Hücre lizis solüsyonu-1 (50 mM EDTA, %1 sodyum lauroil sarcosinate, pH=7.5)

-Hücre lizis solüsyonu-2 (50 mM EDTA, %10 sodyum lauroil sarcosinate, 1 mg/ml proteinaz K, pH=7.5)

-50 mM EDTA (pH=7.5)

-0.5x TBE tamponu (44.5 mM tris HCl, 44.5 mM borik asit, 1 mM EDTA, pH=8.0)

Laboratuvarımız kültür koleksiyonunda -80°C’de stoklanmış izolatlar SDA’a ekilerek 24 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Maya kolonilerinden bir öze dolusu alınarak 1 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) içinde yavaşça süspanse edildi. Hazırlanan süspansiyonlar 2500x g’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pellete tekrar 1 ml HST eklendi. Kısa bir vorteks yapıldıktan sonra 2500 U litikaz enziminden örnek başına 25 µl ilave edilerek 37°C’de 30 dakika süreyle ısı bloğunda bekletildi.

Ardından %2’lik *low melting agarose* (LMA) hazırlanarak 1:1 olacak şekilde maya süspansiyonu ile karıştırıldı. Hazırlanan hücre- agaroz- litikaz karışımı dikkatli bir şekilde kalıplara dökülerek 15 dakika +4 C buzdolabında bekletildi. Her bir plug 500 µl hücre lizis solüsyonu-1 eklenen cam tüplere alınarak 37°C’de 1 gece yavaş şekilde çalkalayarak inkübe edildi.

Hücre lizis solüsyonu-1 dikkatle döküldükten sonra her bir plug 50 mM EDTA solüsyonuna alınarak 50°C’de 15 dakika yıkandı. Ardından 1 ml hücre lizis solüsyonu-2 eklenerek 55°C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Pluglar 3 kez 50 mM EDTA solüsyonu ile 50°C’de 15 dakika yıkandı. Kullanılmayacak pluglar 50 mM EDTA içerisinde +4°C’de saklandı.

Steril bistüri yardımıyla ¼ oranında kesilen pluglar elektroforez tırağının uç kısmına yerleştirildi. 100 ml 0.5x TBE tamponu içinde %0,8’lik PFGE grade agaroz (*pulsed-field certified agarose*, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı. Yatay halde duran elektroforez tırağı dikey hale getirildikten sonra 45-50°C’ye soğutulan agaroz yavaşça döküldü. Tarak yeterince soğuyan jelden çıkarılıp CHEF DR II (Bio-Rad laboratories,

Nazareth, Belgium) cihazında Tablo 3.9’da belirtilen koşullarda elektroforeze tabi tutuldu.

Tablo 3.9. PFGE-EK yöntemi elektroforez koşulları.

Başlangıç vuruş süresi	90 sn
Bitiş vuruş süresi	325 sn
Elektroforez süresi	48 saat
Akım	6 V/cm ²
Sıcaklık	12°C

Elektroforezden sonra jel 5 µg/ml EtBr içeren 400 ml ultra saf su içinde 30 dakika bekletildi. Ardından Gel Logic 2200 görüntüleme sistemi (Kodak Co., Rochester, NY, ABD) ile jel görüntüsü fotoğraflandı. Resimler TIFF formatında kayıt edilerek saklandı. Bant profilleri GelCompar II yazılım sistemi (version 6.5; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak analiz edildi. Bant analizleri için benzerlik hesaplarının yapılmasında Dice Korelasyon katsayısı ve kümeleşme analizi için de UPGMA yöntemi kullanıldı.

3.5. Yöntemlerin Ayrım Gücü (Diskriminasyon)

Elektroforetik karyotiplendirme, PFGE-REA ve AP-PCR yöntemleri ile suşların ayrılabilirlik indeksini belirlemek ve yöntemin ayrım gücünün tespiti için Hunter ve Gaston’un geliştirdikleri matematiksel formül kullanıldı (90).

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s x_j(x_j - 1)$$

D= Ayrılabilirlik indeksi

N= Çalışmada test edilen suş sayısı

S= Belirlenen toplam tip sayısı

nJ= J’inci tipe ait suş sayısı

Ayrılabilirlik indeksi 0 ile 1 arasında değişmektedir. Bu değerin 1’e yakın olması yöntemin ayrım gücünün yüksek olduğunu göstermektedir.

3.6. Klonal İlişkilerin Araştırılmasında Kullandığımız AP-PCR, PFGE- RFLP, PFGE-EK Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Her üç yöntemde elde edilen klonal ilişki verileri izolatlara ait klasik epidemiyolojik veriler ile birlikte karşılaştırıldı. Bu amaçla hastanemiz izolatlarıyla epidemiyolojik olarak ilişkili olmayan iki farklı şehirdeki beşer izolata ait bant profil analizleri karşılaştırma amaçlı olarak eklendi.



4. BULGULAR

4.1. Hastalar ve *C. parapsilosis* kompleks İzolatlarının Tanımlanması

Turgut Özal Tıp Merkezi çeşitli kliniklerinden 01.01.2016-01.01.2022 tarihleri arasında tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına toplam 25396 kan kültürü gönderildi. Gelen kan kültürü örneklerinden 2160 tanesi (%8,5) BACT /ALERT 3D (Becton Dickinson, Maryland, USA) otomatize kan kültürü sistemi ile pozitif sinyal verdi. Pozitif sinyal veren şişelerden steril bir enjektör yardımıyla her bir şişeden aspire edilen kandaki maya üremeleri öncelikle Gram boyama yöntemi ile doğrulandı ve toplam 506 adet *Candida spp.* üremesi tespit edildi. Araştırmaya dahil edilen tüm izolatların tür düzeyinde tanımlaması Vitek MS (Bio Mérieux, Fransa) MALDI-TOF MS cihazı ile gerçekleştirildi.

Pozitif sinyal veren kan kültür şişelerinden yapılan ekimlerde tüm kan kültürü pozitiflikleri içerisinde kandidemilerin oranının %23,4 olduğu görüldü. Kandidemi etkenlerinin dağılımına bakıldığında 170'i *C. albicans*, 167'si *C. parapsilosis* kompleks, 67'si *C. glabrata*, 37'si *C. tropicalis*, 19'u *Candida spp.*, 18'i *C. keyfr*, 7'si *C. krusei*, 6'sı *C. lusitaniae*, 6'sı *C. guillermoidii*, 5'i *C. dubliniensis*, 2'si *C. inconspicua*, 1'i *C. parakrusei* ve 1'i *C. pelliculosa* olduğu belirlendi.

Kan kültürü pozitif örnekler incelendiğinde 2016 yılında iki, 2017 yılında 55, 2018 yılında 49, 2019 yılında 100, 2020 yılında 121 ve 2021 yılında 179 hastada *Candida* türleri tespit edildi. *Candida parapsilosis* kompleks izolatlarının yıllara göre dağılımına bakıldığında 2016 yılında iki, 2017 yılında 21, 2018 yılında 23, 2019 yılında 40, 2020 yılında 26 ve 2021 yılında 55 hastada kandidemi etkeni olarak izole edildiği belirlendi. Çalışmamız kapsamında laboratuvarımız kültür koleksiyonu stoğundan canlandırabilen toplam 109 hastaya ait 115 *C. parapsilosis* kompleks izolatı dahil edildi. Bu kapsamda altı hastanın ardışık üremeleri de çalışma kapsamına alındı.

Hastaların yatış yapıldığı klinikler incelendiğinde üçünün beyin cerrahi yoğun bakım ünitesi (YBÜ), birinin beyin cerrahi servisi, 12'sinin COVID YBÜ, üçünün çocuk hematoloji servisi, üçünün çocuk YBÜ, birinin enfeksiyon hastalıkları YBÜ, on tanesinin erişkin yanık ünitesi, ikisinin genel cerrahi YBÜ, ikisinin genel cerrahi servisi, ikisinin genel dahili YBÜ, bir tanesinin göğüs cerrahisi servisi, ikisinin göğüs hastalıkları YBÜ, ikisinin hematoloji servisi, birinin hematoloji YBÜ, altı tanesinin karaciğer nakil enstitüsü, ikisinin kemik iliği nakil ünitesi, sekizinin medikal onkoloji

servisi, beşinin medikal onkoloji YBÜ, birinin nefroloji servisi, dördünün nefroloji YBÜ, beşinin nöroloji inme ünitesi, dördünün organ nakli YBÜ, 33 tanesinin reanimasyon servisi, birinin romatoloji servisi ve bir tanesinin yenidoğan YBÜ yatışı olduğu belirlendi (Tablo 4-1). Reanimasyon servisi 33 (%28,6) hasta ile kandidemi etkeni olarak *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının tespit edildiği servis idi. *Candida parapsilosis* kompleks izolatlarının ikinci en sık izole edildiği servisin COVID YBÜ, ardından erişkin yanık ünitesi olduğu görüldü.

Tablo 4.1. *Candida parapsilosis* izolatlarının saptandığı kliniklere göre dağılımı.

Klinik	Sayı (%)
Beyin Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi	3 (%2,6)
Beyin Cerrahi Servisi	1 (%0,8)
COVID Yoğun Bakım Ünitesi	12 (%10,4)
Çocuk Hematoloji Servisi	3 (%2,6)
Çocuk Yoğun Bakım Servisi	3 (%2,6)
Enfeksiyon Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesi	1 (%0,8)
Erişkin Yanık Ünitesi	10 (%8,6)
Genel Cerrahi Yoğun Bakım	2 (%1,7)
Genel Cerrahi Servisi	2 (%1,7)
Genel Dahili Yoğun Bakım Servisi	2 (%1,7)
Göğüs Cerrahisi Servisi	1 (%0,8)
Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Servisi	2 (%1,7)
Hematoloji Servisi	2 (%1,7)
Hematoloji Yoğun Bakım Servisi	1 (%0,8)
Karaciğer Nakil Enstitüsü	6 (%5,2)
Kemik İliği Nakil Ünitesi	2 (%1,7)
Medikal Onkoloji Servisi	8 (%6,9)
Medikal Onkoloji Yoğun Bakım Servisi	5 (%4,3)
Nefroloji Servisi	1 (%0,8)
Nefroloji Yoğun Bakım Servisi	4 (%3,4)
Nöroloji İnme Ünitesi	5 (%4,3)
Organ Nakli Yoğun Bakım Ünitesi	4 (%3,4)
Reanimasyon Servisi	33 (%28,6)
Romatoloji Servisi	1 (%0,8)
Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi	1 (%0,8)

Çalışmamızda hastaların yaş ortalaması 52,2 (min-maks 0-101)'dir. Hastaların 9'u 18 yaş altı, 6'sı 18-24 yaş arası, 15'i 25-34 yaş arası, 9'u 35-44 yaş arası, 9'u 45-54 yaş arası, 25'i 55-64 yaş arası, 24'ü 65-74 yaş arası, 17'si 75 yaş ve üzeri hastalardır.

4.1.1. Epidemiyolojik İlişki ve Risk Faktörlerine İlişkin Bilgilerin Toplanması

Çalışmaya alınan suşlar klasik epidemiyolojik verilerine göre gruplandırıldı. Bu suşlardan aynı ay içerisinde izole edilen ve aynı serviste yatan hastalara ait *C. parapsilosis* izolatları aynı epidemiyolojik gruba dahil edildi (Tablo 4.2). Tabloda her bir rakam epidemiyolojik olarak farklı bir suşu temsil etmektedir.

Tablo 4.2. İzolatların klasik epidemiyolojik gruplaması.

Suş	Epidemiyolojik grup	Suş	Epidemiyolojik grup
1	1	49, 50, 51, 52, 54	39
2	2	53	40
3	3	55, 56, 58, 59, 63, 66, 70	41
4	4	57	42
5	5	60,65	43
6	6	61	44
7, 8, 9	7	62	45
10	8	64	46
11	9	67	47
12	10	68	48
13	11	69	49
14, 17	12	71, 72, 76, 81, 82, 86	50
15, 16	13	73	51
18	14	74	52
19, 20	15	75, 78, 79	53
21	16	77	54
22	17	80	55
23	18	83	56
24	19	84, 87, 89, 94	57

Suş	Epidemiyolojik grup	Suş	Epidemiyolojik grup
25, 26, 30	20	85, 93	58
27	21	88	59
28	22	90	60
29	23	91, 98	61
31	24	92	62
32	25	95, 97	63
33	26	96	64
34	27	99	65
35, 38	28	100	66
36, 42	29	101	67
37	30	102, 103, 110, 112	68
39	31	104	69
40, 43	32	105, 107, 115	70
41	33	106	71
44	34	108	72
45	35	109	73
46	36	111	74
47	37	113	75
48	38	114	76

4.2. İzolatların Antifungal Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Toplam 115 *C. parapsilosis* kompleks izolatının flukonazol için antifungal duyarlılığı gradient E test yöntemiyle belirlendi. On yedi izolatın flukonazol MİK değeri >4 olarak ölçüldü ve hastanemizde altı yıllık süre boyunca kandidemi etkeni *C. parapsilosis* kompleks suşlarında azol direnci %14,7 olarak hesaplandı. Toplam altı izolatta ise ölçülen MİK değeri 2'den büyük fakat 4'ten yüksek olmaması sebebiyle flukonazole yüksek dozda duyarlı (I) olarak belirlendi. İzolatların antifungal duyarlılıkları ve flukonazol MİK değerleri Tablo 4-3'te gösterildi.

Tablo 4.3. İzolatların ürettiği hastaların klinik, epidemiyolojik bulguları ve antifungal duyarlılıkları.

No	Cinsiyet	Yaş	İzolasyon Tarihi	Klinik	Antifungal Duyarlılığı
1	E	4	5.04.2016	Çocuk Hem Servisi	Flukonazol:S:2
2	E	19	9.06.2016	Rea 2 Servisi	Flukonazol:S:0,50
3	K	53	12.09.2017	Rea 2 Servisi	Flukonazol:S:1,5
4	E	62	09.10.2017	Rea 1 Servisi	Flukonazol:S:0,38
5	K	63	26.10.2017	Romatoloji Servis	Flukonazol:S:1
6	E	1	31.10.2017	Rea 2 Servisi	Flukonazol:S:2
7	E	37	19.01.2018	KC Nakil Ens. Srv.2	Flukonazol:S:2
8	E	53	21.03.2018	KC Nakil Ens. Srv.2	Flukonazol:S:0,38
9	E	37	19.01.2018	KC Nakil Ens. Srv.2	Flukonazol:S:2
10	E	22	09.01.2018	Rea 1 Servisi	Flukonazol:S:1,5
11	E	59	03.01.2018	Beyin Cerrahi Servisi	Flukonazol:S:0,50
12	E	58	14.01.2018	Nöroloji İnme Ünitesi	Flukonazol:S:1,5
13	E	62	27.08.2018	Beyin Cerrahi YBÜ	Flukonazol:S:1,5
14	E	8	31.08.2018	Rea 2 Servisi	Flukonazol:S:2
15	E	34	31.08.2018	Erişkin Yanık Ünitesi	Flukonazol:S:1,5
16	E	34	8.09.2018	Erişkin Yanık Ünitesi	Flukonazol:S:1,5
17	E	8	10.12.2018	Rea 2 Servisi	Flukonazol:I:4
18	E	69	17.09.2018	Nefroloji YBÜ	Flukonazol:S:1,5
19	K	33	15.10.2018	Rea 1 Servisi	Flukonazol:S:0,50
20	E	63	22.10.2018	Rea 1 Servisi	Flukonazol:S:0,50
21	E	20	31.12.2018	Genel Cerrahi Servisi	Flukonazol:I:3
22	E	75	13.02.2019	Rea 1 Servisi	Flukonazol:S:0,50
23	K	18	28.03.2019	Erişkin Yanık Ünitesi	Flukonazol: I:4

No	Cinsiyet	Yaş	İzolasyon Tarihi	Klinik	Antifungal Duyarlılığı
24	E	67	01.07.2019	Rea 1 Servisi	Flukonazol: R:16
25	K	28	22.09.2019	Organ Nakli YBÜ	Flukonazol: I:4
26	E	60	10.08.2019	Organ Nakli YBÜ	Flukonazol:S:1
27	E	52	29.08.2019	Erişkin Yanık Ünitesi	Flukonazol:S:2
28	E	80	04.09.2019	Nöroloji İnme Ünitesi	Flukonazol:S:0,19
29	E	68	19.09.2019	Genel Cerrahi YBÜ	Flukonazol:S:0,75
30	K	28	22.09.2019	Organ Nakli YBÜ	Flukonazol:I:4
31	E	48	28.09.2019	Beyin Cerrahi YBÜ	Flukonazol:S:0,125
32	K	68	31.10.2019	Nefroloji Servisi	Flukonazol:R:12
33	E	63	11.11.2019	Rea 1 Servisi	Flukonazol:S:2
34	K	19	11.11.2019	Hematoloji Servis-1	Flukonazol:S:0,50
35	E	65	02.01.2020	Rea 2 Servisi	Flukonazol:R:8
36	E	80	03.12.2019	Nöroloji İnme Ünitesi	Flukonazol:S:0,25
37	E	44	9.12.2019	Nefroloji YBÜ	Flukonazol:S:2
38	E	65	02.01.2020	Rea 2 Servisi	Flukonazol:R:8
39	K	28	13.01.2020	Erişkin Yanık Ünitesi	Flukonazol:S:0,38
40	E	75	13.01.2020	Rea 2 Servisi	Flukonazol:S:1,5
41	K	28	09.01.2020	KC Nakil Ens. Srv.2	Flukonazol:S:0,50
42	K	46	25.02.2020	Nöroloji İnme Ünitesi	Flukonazol:S:0,75
43	E	75	12.02.2020	Rea 2 Servisi	Flukonazol:S:1,5
44	K	54	16.02.2020	Göğüs Cer Servisi	Flukonazol:R:12
45	K	66	25.02.2020	Rea 2 Servisi	Flukonazol:R:8
46	K	39	06.03.2020	Genel Dahili YBÜ	Flukonazol:R:12
47	K	56	11.03.2020	Enfeksiyon Has YBÜ	Flukonazol:S:1,5

No	Cinsiyet	Yaş	İzolasyon Tarihi	Klinik	Antifungal Duyarlılığı
48	E	93	14.03.2020	Genel Cerrahi Servisi	Flukonazol:S:0,19
49	E	45	09.06.2020	Med Onk D Servisi	Flukonazol:S:1,5
50	E	65	02.08.2020	Med Onk D Servisi	Flukonazol:S:1
51	E	59	29.09.2020	Med Onk D Servisi	Flukonazol:S:0,5
52	K	66	26.09.2020	Med Onk D Servisi	Flukonazol:R:256
53	K	37	09.10.2020	Rea 2 Servisi	Flukonazol:S:0,75
54	E	72	23.10.2020	Med Onk D Servisi	Flukonazol:S:0,25
55	E	55	24.11.2020	Covid YBÜ-2	Flukonazol:S:0,5
56	E	67	30.11.2020	Covid YBÜ-2	Flukonazol:S:0,16
57	K	57	10.12.2020	Med Onk YBÜ	Flukonazol:S:0,5
58	E	101	3.12.2021	Covid YBÜ-2	Flukonazol:S:0,19
59	E	77	14.12.2020	Covid YBÜ-2	Flukonazol:S:0,064
60	E	59	12.12.2020	Rea 1 Servisi	Flukonazol:S:0,125
61	E	62	20.12.2020	Erişkin Yanık Ünitesi	Flukonazol:S:0,094
62	E	68	17.12.2020	Rea 2 Servisi	Flukonazol:S:0,47
63	K	44	15.12.2020	Covid YBÜ-3	Flukonazol:S:0,125
64	E	3	29.12.2020	Çocuk Hem Servisi	Flukonazol:S:0,50
65	E	41	29.01.2021	Rea 1 Servisi	Flukonazol:S:0,75
66	K	90	11.02.2021	Covid YBÜ-2	Flukonazol:S:1,5
67	K	47	05.02.2021	Med Onk D Servisi	Flukonazol:S:1
68	E	56	11.02.2021	Beyin Cerrahi YBÜ	Flukonazol:S:0,50
69	E	60	10.02.2021	Hematoloji YBÜ	Flukonazol:S:0,38
70	K	74	18.02.2021	Covid YBÜ-2	Flukonazol:S:1
71	K	68	09.03.2021	Rea 2 Servisi	Flukonazol:S:0,75

No	Cinsiyet	Yaş	İzolasyon Tarihi	Klinik	Antifungal Duyarlılığı
72	K	72	08.03.2021	Rea 2 Servisi	Flukonazol:S:0,50
73	E	21	24.03.2021	Kİ Nakil Ünitesi	Flukonazol:S:0,5
74	K	0	30.03.2021	Çocuk YBÜ	Flukonazol:S:1,5
75	E	59	22.03.2021	Med Onk YBÜ	Flukonazol:S:1,5
76	E	61	18.03.2021	Rea 2 Servisi	Flukonazol:R:6
77	E	68	06.04.2021	Nöroloji İnme Ünitesi	Flukonazol:R:8
78	K	33	18.04.2021	Med Onk D Servisi	Flukonazol:R:6
79	E	56	06.04.2021	Med Onk YBÜ	Flukonazol:S:0,75
80	E	31	14.04.2021	Kİ Nakil Ünitesi	Flukonazol:R:8
81	E	70	20.04.2021	Rea 2 Servisi	Flukonazol:S:2
82	K	71	28.04.2021	Rea 2 Servisi	Flukonazol:S:0,19
83	E	55	10.05.2021	Covid YBÜ-1	Flukonazol:S:0,75
84	E	17	6.05.2021	Erişkin Yanık Ünitesi	Flukonazol:S:0,38
85	K	9	27.05.2021	Çocuk YBÜ	Flukonazol:R:256
86	E	65	11.05.2021	Rea 2 Servisi	Flukonazol:R:256
87	E	27	09.05.2021	Erişkin Yanık Ünitesi	Flukonazol:S:1,5
88	K	88	02.06.2021	Rea 1 Servisi	Flukonazol:S:0,38
89	K	58	12.06.2021	Erişkin Yanık Ünitesi	Flukonazol:S:1,5
90	E	68	01.07.2021	KC Nakil Ens. Srv.1	Flukonazol:S:0,75
91	E	58	05.07.2021	Med Onk YBÜ	Flukonazol:S:0,032
92	E	49	09.07.2021	Hematoloji Servis-1	Flukonazol:S:0,125
93	E	2	11.07.2021	Çocuk YBÜ	Flukonazol:S:0,064
94	E	34	26.07.2021	Erişkin Yanık Ünitesi	Flukonazol:S:0,38
95	E	87	24.07.2021	Nefroloji YBÜ	Flukonazol:S:0,38

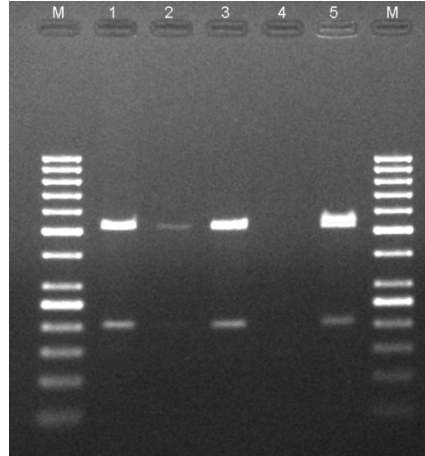
No	Cinsiyet	Yaş	İzolasyon Tarihi	Klinik	Antifungal Duyarlılığı
96	K	86	27.07.2021	Organ Nakli YBÜ	Flukonazol:S:1,5
97	E	87	24.07.2021	Nefroloji YBÜ	Flukonazol:S:0,38
98	K	35	24.07.2021	Med Onk YBÜ	Flukonazol:S:2
99	E	29	15.09.2021	Rea 1 Servisi	Flukonazol:S:0,5
100	E	74	25.08.2021	Göğüs Has YBÜ	Flukonazol:S:0,25
101	E	63	29.08.2021	Med Onk B Servisi	Flukonazol:S:1
102	E	70	30.08.2021	Covid YBÜ-2	Flukonazol:S:2
103	E	64	02.09.2021	Covid YBÜ-2	Flukonazol:S:0,75
104	K	71	03.09.2021	Genel Dahili YBÜ	Flukonazol:S:1
105	E	33	08.09.2021	Rea 1 Servisi	Flukonazol:I:3
106	E	92	15.09.2021	Rea 2 Servisi	Flukonazol:S:0,25
107	K	77	18.10.2021	Rea 1 Servisi	Flukonazol:R:256
108	E	17	21.09.2021	Çocuk Hem Servisi	Flukonazol:R:32
109	K	79	19.10.2021	Genel Cerrahi YBÜ	Flukonazol:S:0,38
110	E	61	27.10.2021	Covid YBÜ-2	Flukonazol:S:2
111	K	78	04.11.2021	Göğüs Has YBÜ	Flukonazol:S:2
112	E	72	18.11.2021	Covid YBÜ-2	Flukonazol:S:1
113	K	0	15.11.2021	Yenidoğan YBÜ-2	Flukonazol:S:0,50
114	E	32	26.11.2021	KC Nakil Ens. Srv.2	Flukonazol:S:0,75
115	K	5	31.12.2021	Rea 1 Servisi	Flukonazol:R:6

4.3. *C. parapsilosis* kompleks İzolatlarının Alt Tür Düzeyinde Tanımlanması

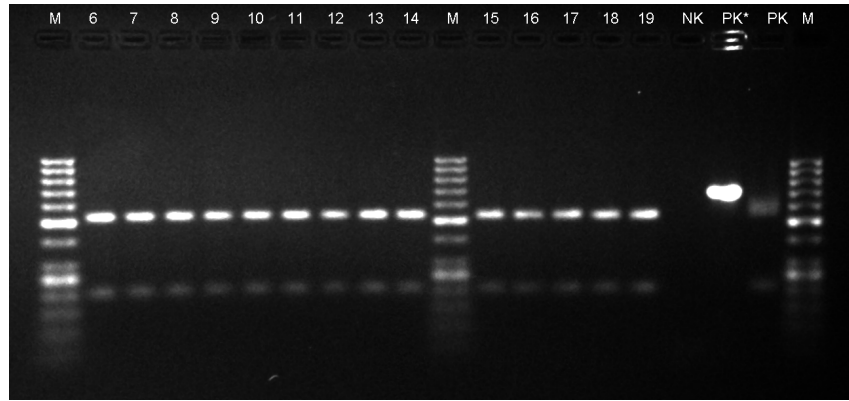
4.3.1. SADH Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Restriksiyon Endonükleaz Enzimiyle Kesimi Sonuçları

Çalışmamız kapsamında incelenen izolatlardan 4 ve 42 numaralı izolatlar haricinde 196 ve 521 bp büyüklüğünde iki bant oluşması sebebiyle *C. parapsilosis sensu stricto* olarak tanımlandı.

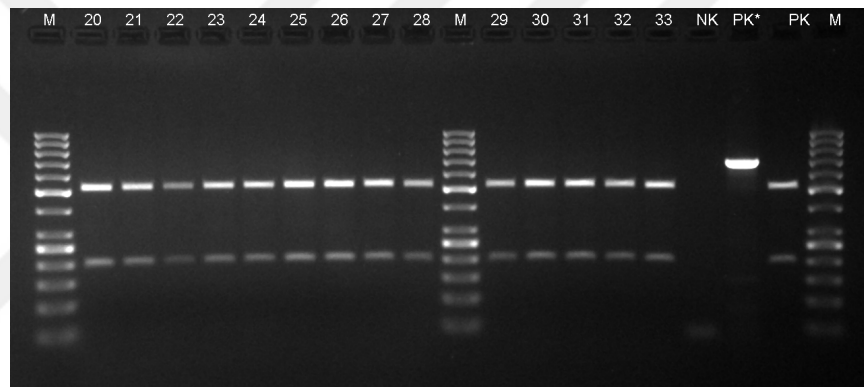
Şekil 4.1 1-5 numaralı izolatlara, Şekil 4.2 6-19 numaralı izolatlara, Şekil 4.3 20-33 numaralı izolatlara, Şekil 4.4 34-42 numaralı izolatlara, Şekil 4.5 43-56 numaralı izolatlara, Şekil 4.6 57-65 numaralı izolatlara, Şekil 4.7 66-79 numaralı izolatlara, Şekil 4.8 80-88 numaralı izolatlara, Şekil 4.9 89-102 numaralı izolatlara, Şekil 4.10 103-111 numaralı izolatlara, Şekil 4.11 113-115 numaralı izolatlara ait PCR-RFLP sonuçlarını göstermektedir. Şekil 4.12’de ise sırasıyla ilk laboratuvar uygulamasında sonuç alınamamış olan 4, 34, 37, 38, 39, 40, 42, 44, 46, 49, 69, 102, 104 ve 112 numaralı izolatlara ait PCR-RFLP sonucu görülmektedir. Jel görüntülerinde NK olarak belirtilenler negatif kontrol, PK* olarak belirtilenler *C. parapsilosis American Type Culture Collection* (ATCC) 22019 suşunun SADH gen amplifikasyonunu, PK olarak belirtilenler ise *C. parapsilosis* ATCC 22019 suşunun PCR-RFLP sonucudur.



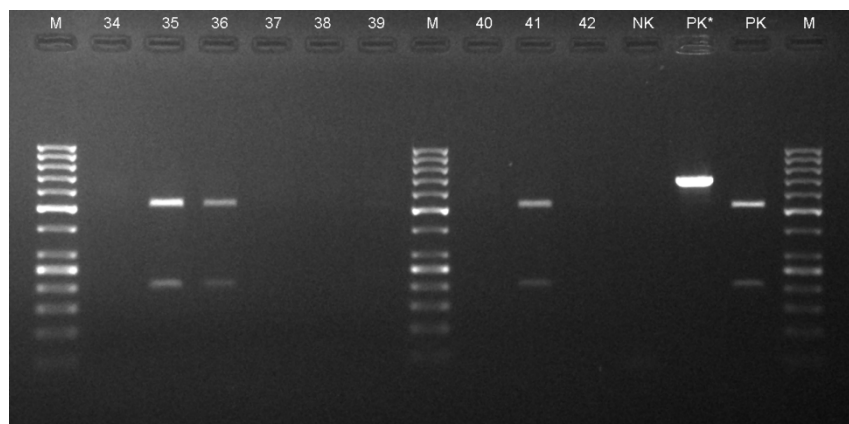
Şekil 4.1. 1-5 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.



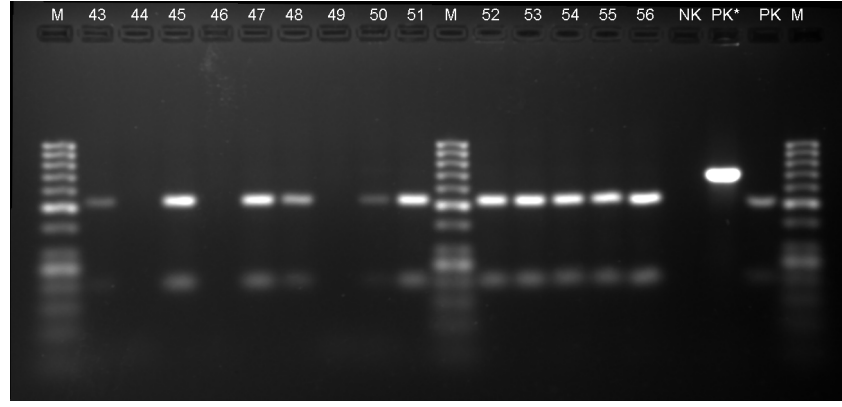
Şekil 4.2. 6-19 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.



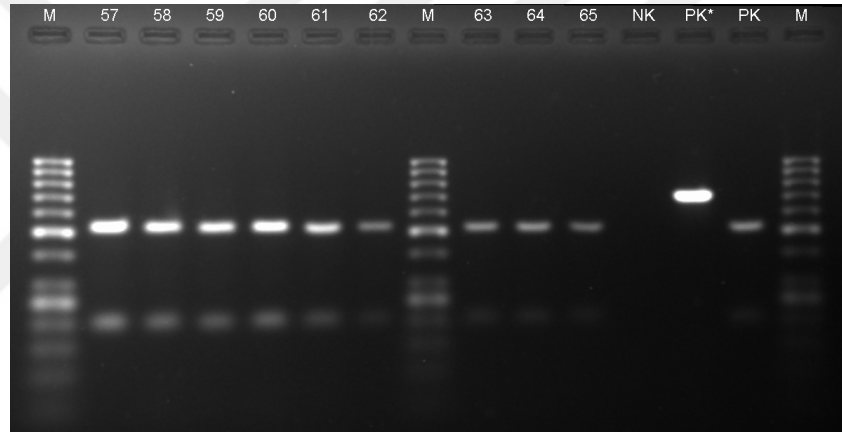
Şekil 4.3. 20-33 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.



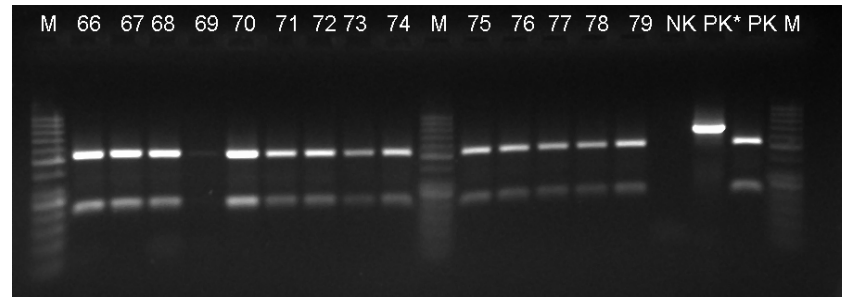
Şekil 4.4. 34-42 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.



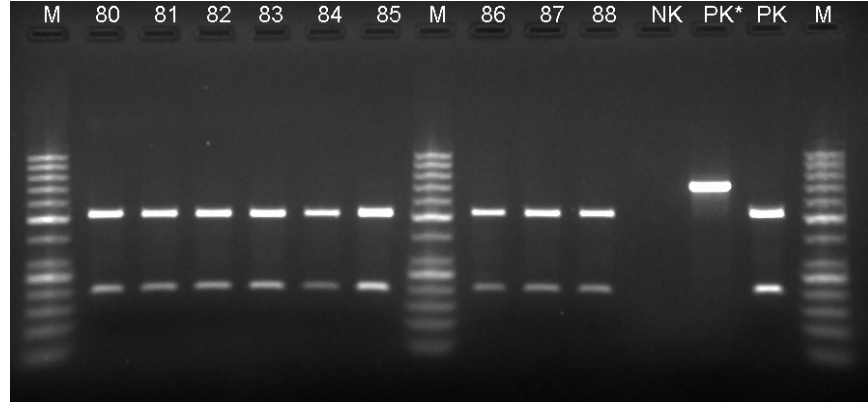
Şekil 4.5. 43-56 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.



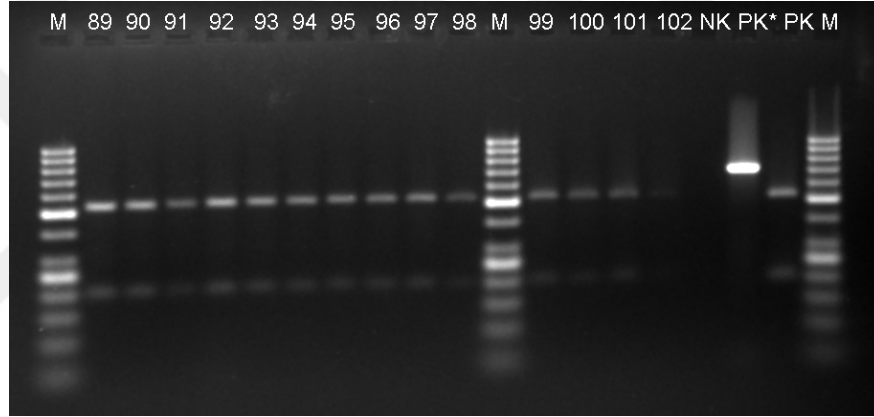
Şekil 4.6. 57-65 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.



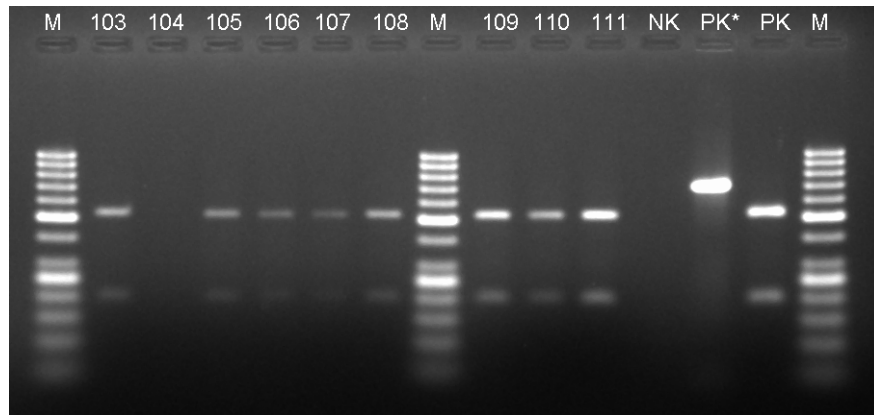
Şekil 4.7. 66-79 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.



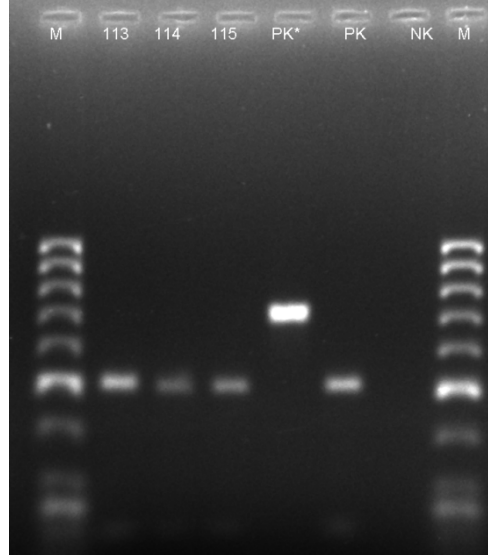
Şekil 4.8. 80-88 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.



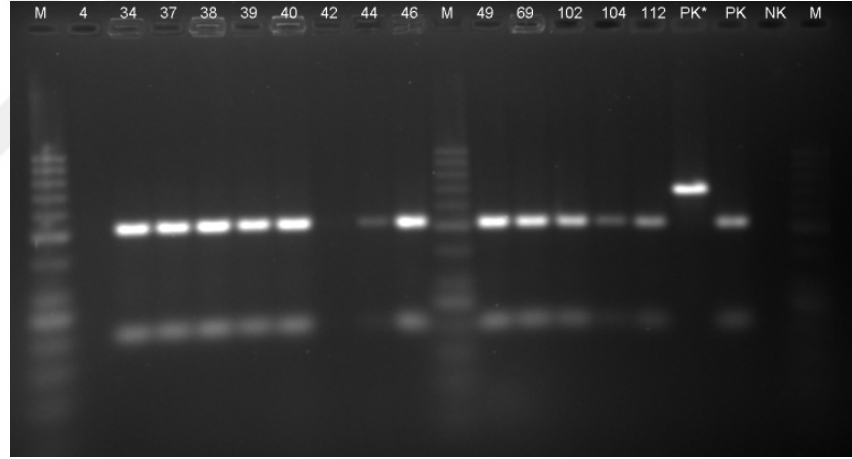
Şekil 4.9. 89-102 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.



Şekil 4.10. 103-111 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.



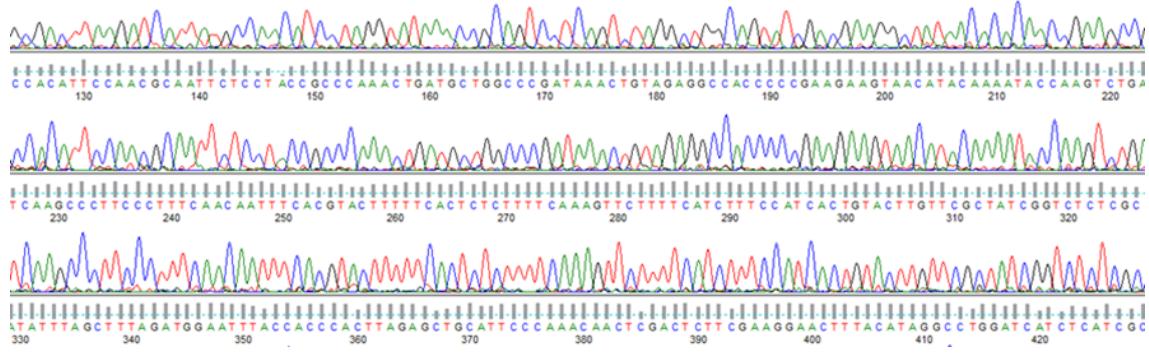
Şekil 4.11. 113-115 numaralı izolatların PCR-RFLP sonuçları.



Şekil 4.12. Tekrarlanan izolatlara ait PCR-RFLP sonuçları.

4.3.2. Amplifikasyon Ürünlerinin Dizi Analizi Sonuçları

Tüm denemelere rağmen sonuç alınamayan 4 ve 42 nolu izolatların D1/D2 gen bölgesi çoğaltılarak DNA dizi analizleri yapıldı. Buna göre 4 nolu izolat *C. tropicalis* olarak tespit edildi. 42 nolu izolat ise *C. orthopsilosis* olarak saptandı.



Şekil 4.13. PCR- RFLP yöntemiyle alt türü saptanamayan dördüncü izolatin elektroferogram verileri.

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show

100

select all

100 sequences selected

GenBank

Graphics

Distance tree of results

MSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Candida tropicalis isolate PPA13 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	490	MT543182.1
☒	Candida sp. (in Saccharomycetales) strain SLDY011 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Candida sp. (in...	869	869	100%	0.0	100.00%	1296	MT510543.1
☒	Candida tropicalis strain MYA-3404 chromosome R	Candida tropicalis	869	2607	100%	0.0	100.00%	2097371	CP047875.1
☒	Candida tropicalis YSP-543 gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	558	LC533777.1
☒	Candida tropicalis YSP-496 gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	544	LC533731.1
☒	Candida tropicalis YSP-471 gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	538	LC533707.1
☒	Candida tropicalis YSP-78 gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	558	LC533602.1
☒	Candida tropicalis YSP-69 gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	552	LC533593.1
☒	Candida tropicalis YSP-59 gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	556	LC533583.1
☒	Candida tropicalis YSP-55 gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	553	LC533579.1
☒	Candida tropicalis YSP-50 gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	556	LC533574.1
☒	Candida tropicalis YSP-22 gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	552	LC533546.1
☒	Candida tropicalis YSP-19 gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	552	LC533543.1
☒	Candida tropicalis YSP-16 gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	556	LC533540.1
☒	Candida tropicalis YSP-14 gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	569	LC533538.1
☒	Candida tropicalis YSP-9 gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	555	LC533533.1
☒	Candida tropicalis YSP-1 gene for large subunit ribosomal RNA, partial sequence	Candida tropicalis	869	869	100%	0.0	100.00%	560	LC533525.1

Şekil 4.14. PCR- RFLP yöntemiyle alt türü saptanamayan dördüncü izolatin BLAST sonucu.

4.4. Candida parapsilosis kompleks İzolatları Arasındaki Klonal İlişkilerin Belirlenmesi

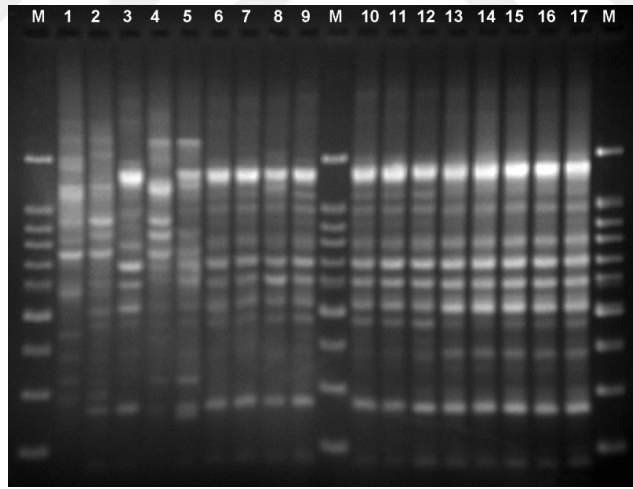
4.4.1. Candida parapsilosis kompleks izolatlarının AP-PCR sonuçları

İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin tespiti için AP-PCR yöntemi kullanıldı. Bant analizleri için benzerlik hesaplarının yapılmasında Dice korelasyon katsayısı ve kümeleşme analizi için de UPGMA yöntemi kullanıldı. İzolatlar benzerlik katsayıları göz önüne alınarak birbirleriyle %95'in üzerinde benzerlik gösteren suşlar aynı klonda

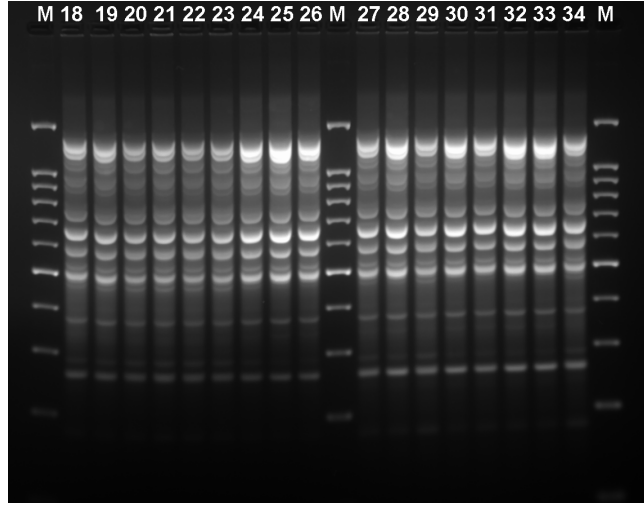
kabul edildi. Benzerlik oranları %95'in altında olan suşlar ise diğerlerinden farklı olarak değerlendirildi.

Toplam 115 *C. parapsilosis* kompleks izolatının çalışmaya dahil edildiği AP-PCR yöntemi ile izolatlar arasında 34 farklı genotip tespit edilmiş olup izolatlar 15 farklı küme içerisinde toplanmıştır (optimizasyon 3.0, tolerans 1.0, cutoff %95). İzolatların 96'sı herhangi bir küme içerisinde yer almakta olup, kümeleşme oranı %83,4'tür. En büyük küme; 16 izolatın yer aldığı genotip 18 kümesidir. Ardından 12'şer izolatın yer aldığı genotip 17 ve genotip 28 kümeleri, 10 izolatın yer aldığı genotip 1 kümesi, dokuz izolatın yer aldığı genotip 6 kümesi, sekiz izolatın yer aldığı genotip 20 kümesi, beş izolatın yer aldığı genotip 22 kümesi, dörder izolatın yer aldığı genotip 8, 12 ve 26 kümeleri, üçer izolatın yer aldığı genotip 11 ve 21 kümeleri, ikişer izolatın yer aldığı genotip 4, 10, 13 kümeleri bulunmaktadır.

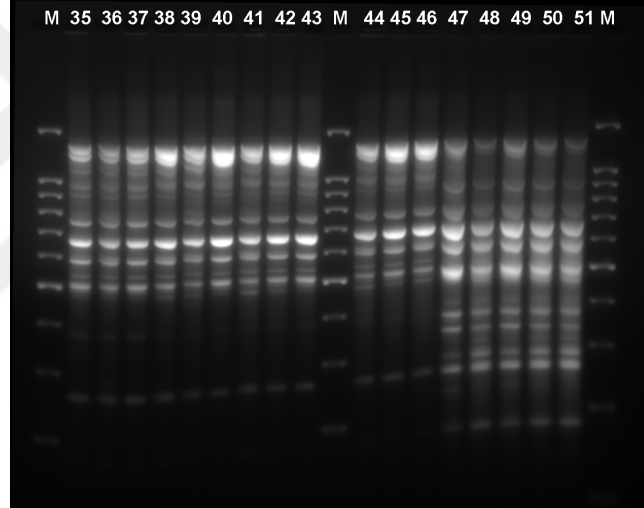
İzolatlara ait AP-PCR sonuçları Şekil 4.15 (1-17 numaralı izolatlar), Şekil 4.16 (18-34 numaralı izolatlar), Şekil 4.17 (35-51 numaralı izolatlar), Şekil 4.18 (52-68 numaralı izolatlar), Şekil 4.19 (69-85 numaralı izolatlar), Şekil 4.20 (86-102 numaralı izolatlar) ve Şekil 4.21 (103-115 numaralı izolatlar) gösterildi.



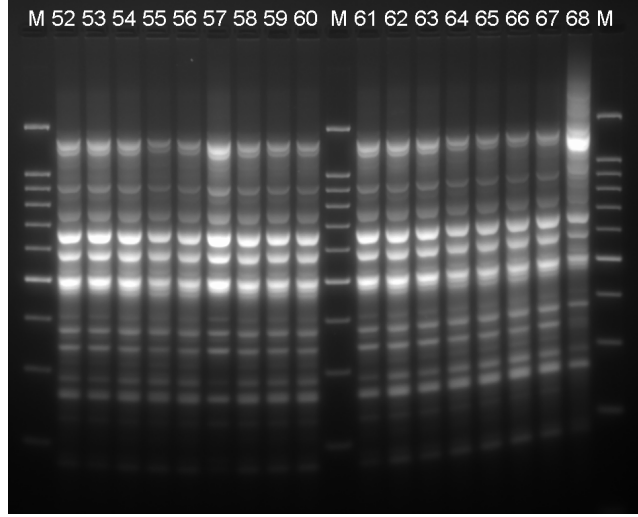
Şekil 4.15. 1-17 numaralı izolatlara ait AP-PCR sonuçları.



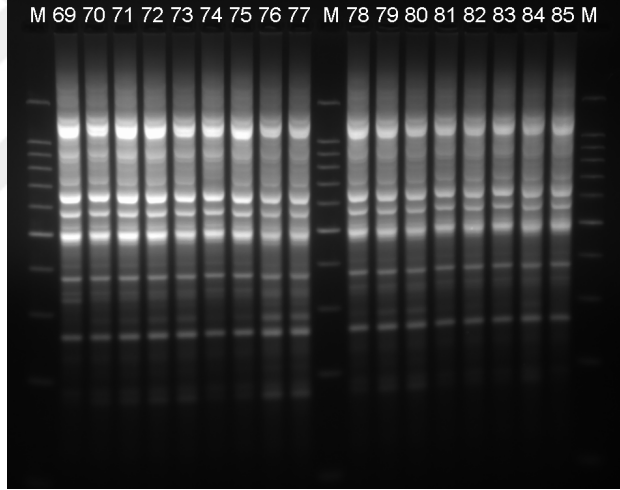
Şekil 4.16. 18-34 numaralı izolatlarla ait AP-PCR sonuçları.



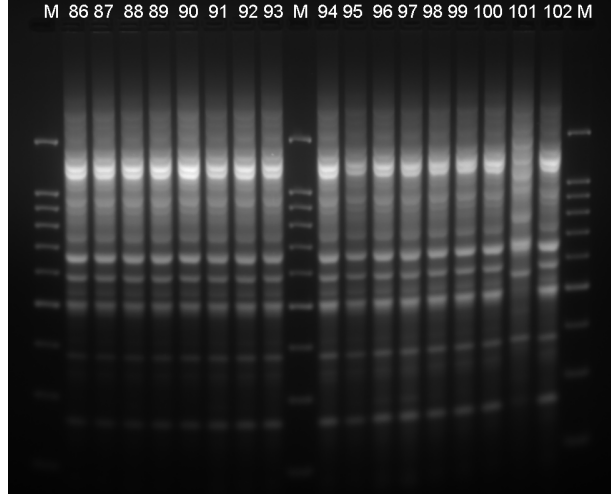
Şekil 4.17. 35-51 numaralı izolatlarla ait AP-PCR sonuçları.



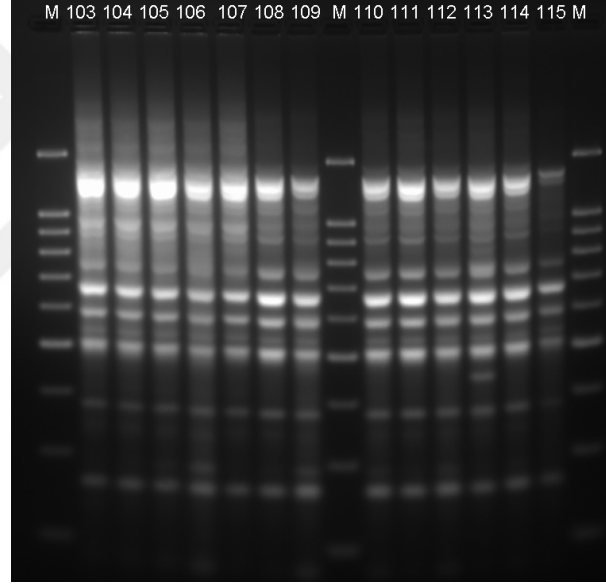
Şekil 4.18. 52-68 numaralı izolatlara ait AP-PCR sonuçları.



Şekil 4.19. 69-85 numaralı izolatlara ait AP-PCR sonuçları.



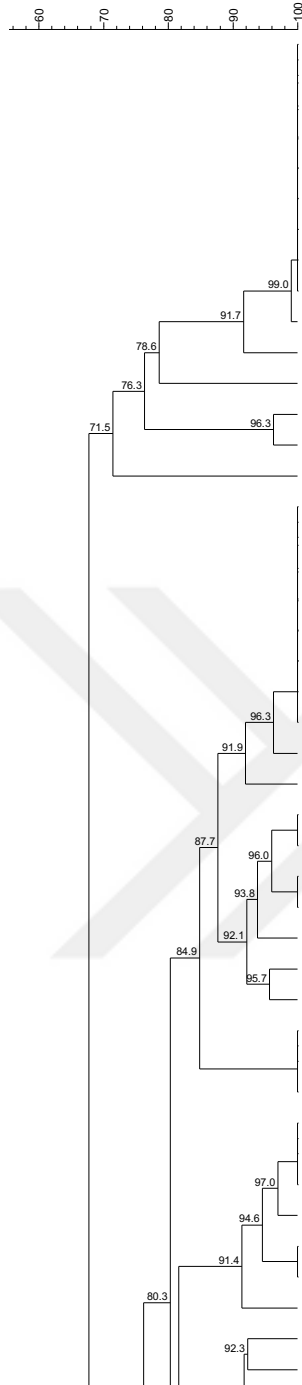
Şekil 4.20. 86-102 numaralı izolatlarla ait AP-PCR sonuçları.



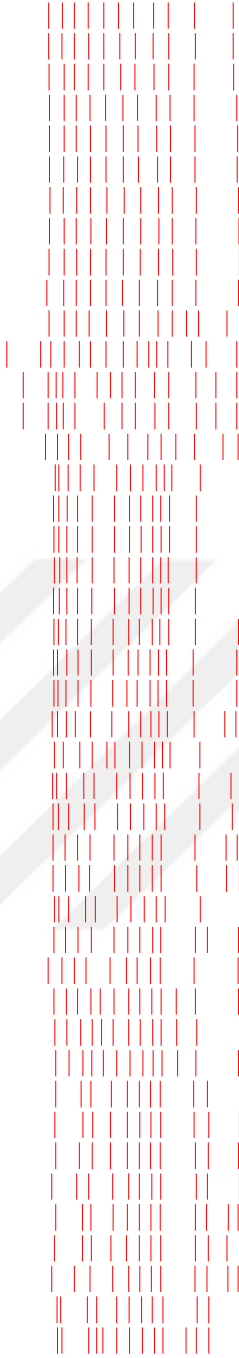
Şekil 4.21. 103-115 numaralı izolatlarla ait AP-PCR sonuçları.

Candida parapsilosis izolatlarının GelCompar sistemiyle *Dice similarity coefficient* (benzerlik katsayısı) esas alınarak yapılan analizleri Şekil 4.22’de görülmektedir.

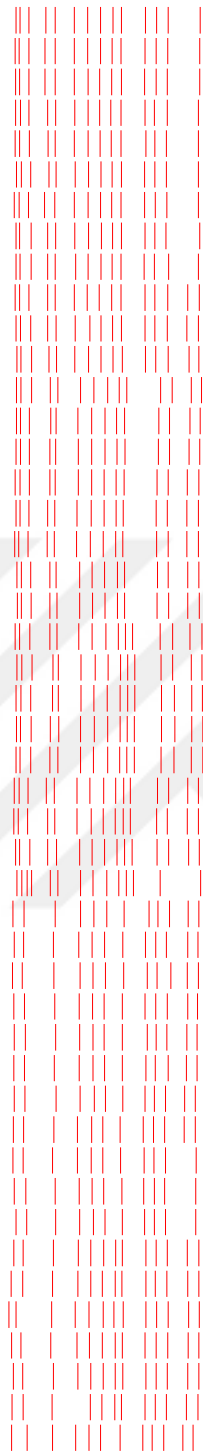
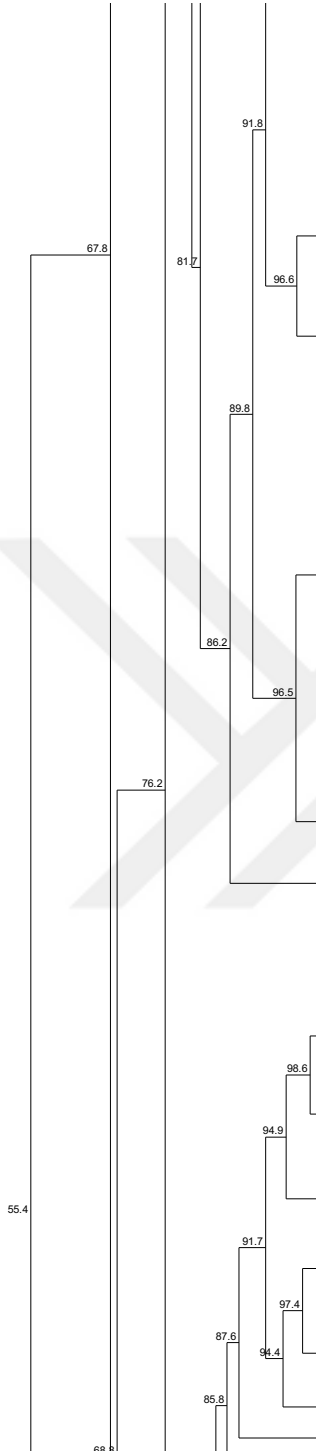
C parapsilosis M13 AP-PCR



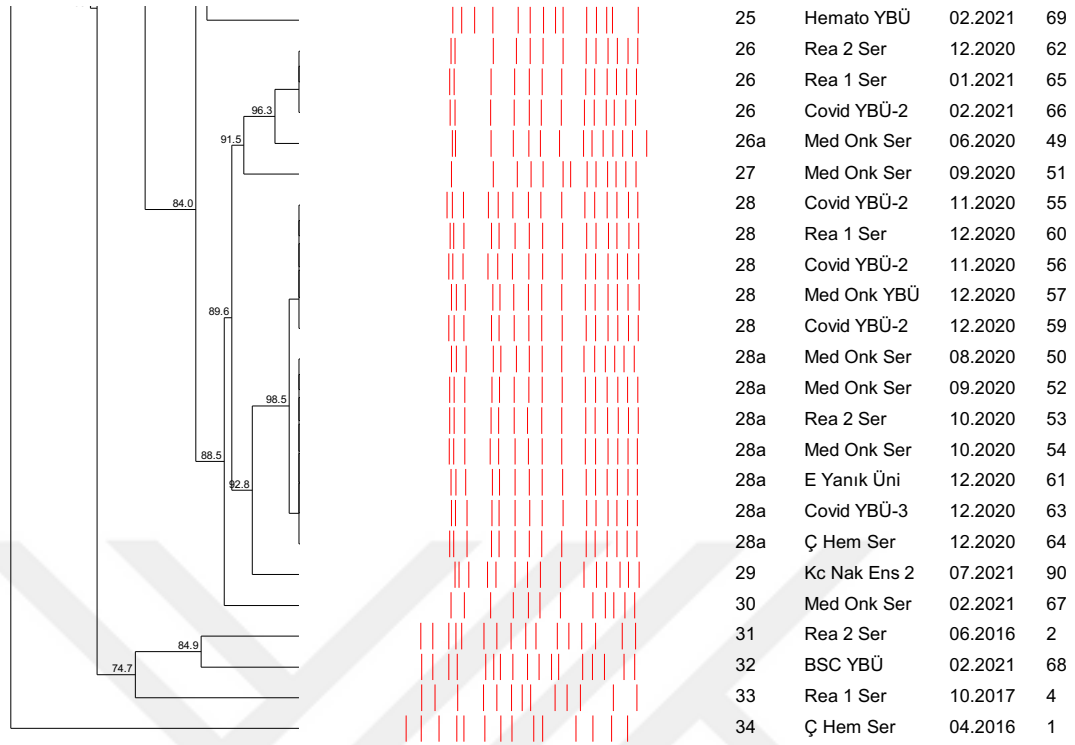
C parapsilosis M13 AP-PCR



Genotip	Servis	Tarih	İzolat
1	Kc Nak Ens 2	01.2018	7
1	Kc Nak Ens Z	03.2018	8
1	Kc Nak Ens 2	01.2018	9
1	Rea 1 Ser	01.2018	10
1	BSC Ser	01.2018	11
1	BSC YBÜ	08.2018	13
1	Rea 2 Ser	08.2018	14
1	E Yanık Üni	08.2018	15
1	E Yanık Üni	09.2018	16
1a	Rea 2 Ser	12.2018	17
2	Nör İnme Üni	01.2018	12
3	Rea 2 Ser	09.2017	3
4	Rom Ser	10.2017	5
4a	Rea 2 Ser	10.2017	6
5	Med Onk Ser	08.2021	101
6	Rea 2 Ser	01.2020	38
6	Rea 2 Ser	01.2020	40
6	Kc Nak Ens 2	01.2020	41
6	Nör İnme Üni	02.2020	42
6	Rea 2 Ser	02.2020	43
6	Göğ Cer Ser	02.2020	44
6	Rea 2 Ser	02.2020	45
6	Dahili YBÜ	03.2020	46
6a	G Cer Ser	03.2020	48
7	E Yanık Üni	01.2020	39
8	Rea 2 Ser	01.2020	35
8	Nör İnme Üni	12.2019	36
8a	Covid YBÜ-2	10.2021	110
8a	Covid YBÜ-2	11.2021	112
9	Nefro YBÜ	12.2019	37
10	Kc Nak Ens 2	11.2021	114
10a	Rea 1 Ser	12.2021	115
11	Göğ Has YBÜ	11.2021	111
11	YD YBÜ	11.2021	113
11	Covid YBÜ-2	08.2021	102
12	Covid YBÜ-2	09.2021	103
12	Dahili YBÜ	09.2021	104
12	Rea 1 Ser	10.2021	107
12a	Ç Hem Ser	09.2021	108
13	Rea 1 Ser	09.2021	105
13	Rea 2 Ser	09.2021	106
14	G Cer YBÜ	10.2021	109
15	E Yanık Üni	05.2021	87
16	Rea 1 Ser	09.2021	99



17	Rea 2 Ser	05.2021	86
17	Rea 1 Ser	06.2021	88
17	E Yanık Üni	06.2021	89
17	Hem Ser	07.2021	92
17	Ç YBÜ	07.2021	93
17	E Yanık Üni	07.2021	94
17	Nefro YBÜ	07.2021	95
17	Med Onk YBÜ	07.2021	98
17	Göğ Has YBÜ	08.2021	100
17a	Med Onk YBÜ	07.2021	91
17a	ONYBÜ 3	07.2021	96
17a	Nefro YBÜ	07.2021	97
18	E Yanık Üni	03.2019	23
18	ONYBÜ 2	09.2019	25
18	ONYBÜ 2	08.2019	26
18	Nör İnme Üni	09.2019	28
18	ONYBÜ 2	09.2019	30
18	BSC YBÜ	09.2019	31
18	Nefro Ser	10.2019	32
18	Rea 1 Ser	11.2019	33
18a	Nefro YBÜ	09.2018	18
18a	Rea 1 Ser	10.2018	19
18a	Rea 1 Ser	10.2018	20
18a	G Cer Ser	12.2018	21
18a	Rea 1 Ser	02.2019	22
18a	E Yanık Üni	08.2019	27
18a	G Cer YBÜ	09.2019	29
18a	Hemato Ser	11.2019	34
19	Rea 1 Ser	07.2019	24
20	Nör İnme Üni	04.2021	77
20	Med Onk YBÜ	03.2021	75
20	Rea 2 Ser	03.2021	76
20	Med Onk Ser	04.2021	78
20	Med Onk YBÜ	04.2021	79
20	Kİ Nak Üni	04.2021	80
20a	E Yanık Üni	05.2021	84
20a	Covid YBÜ-1	05.2021	83
21	Rea 2 Ser	04.2021	81
21	Rea 2 Ser	04.2021	82
21	Ç YBÜ	05.2021	85
22	Rea 2 Ser	03.2021	72
22	Kİ Nak Üni	03.2021	73
22a	Covid YBÜ-2	12.2020	58
22a	Covid YBÜ-2	02.2021	70
22a	Rea 2 Ser	03.2021	71
23	Ç YBÜ	03.2021	74
24	Enf Has YBÜ	03.2020	47



Şekil 4.22. İzolatların GelCompar ile *Dice Similarity Coefficient* esas alınarak elde edilen dendogramı.

Çalışmaya dahil edilen *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının AP-PCR yöntemiyle 15 küme içerisinde yer aldığı görüldü. Kümeler ve aynı kümelerde yer alan izolatlar Tablo 4.4'te gösterildi. Genotip 1 kümesinin tamamının 2018, genotip 6 ve 28 kümesinin 2020, genotip 10, 11, 12, 13, 17, 20 ve 21'in 2021 yılına ait izolatlardan oluştuğu görüldü. Genotip 4'te yer alan izolatların 2017 yılının aynı ayı içerisinde iki farklı klinikte yatan hastalardan izole edildiği belirlendi. Genotip 8 içerisinde yer alan izolatların ikisi bir aylık zaman dilimi içerisinde Covid YBÜ-2 kliniğinde yatan hastalar idi. Genotip 18 içerisinde yer alan izolatların dördü reanimasyon 1 servisinde, üçü organ nakli YBÜ-2 servisinde yatan hastalardan izole edilmiş olduğu görüldü.

Tablo 4.4. AP-PCR ile aynı genotipte yer alan izolatlar.

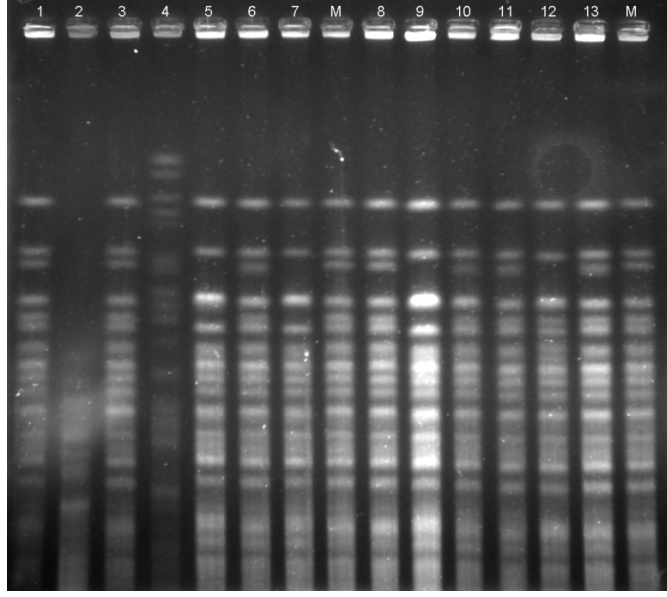
İzolat	AP-PCR Genotip
7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17	1
5,6	4
35, 36, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48	6
110, 112	8
114, 115	10
102, 111, 113	11
103, 104, 107, 108	12
105, 106	13
86, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 100	17
18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31,	18
32, 33, 34	
75, 76, 77, 78, 79, 80, 83, 84	20
81, 82, 85	21
58, 70, 71, 72, 73	22
49, 62, 65, 66	26
50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 63, 64	28

4.4.2. *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının PFGE-restriksiyon enzim analizi sonuçları

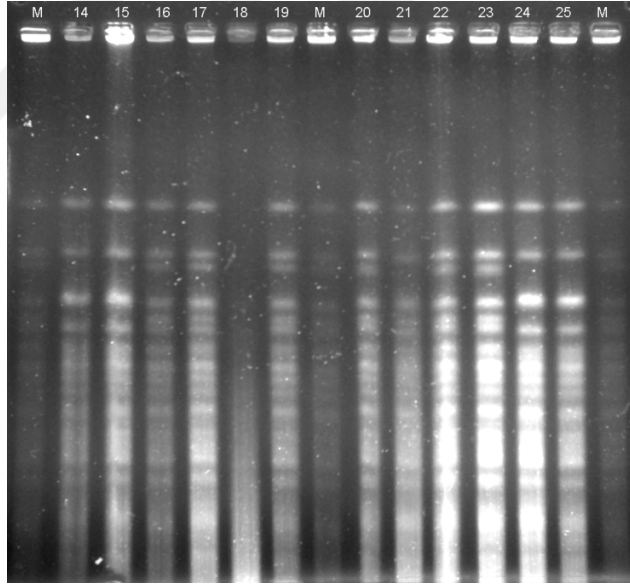
İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin tespiti için PFGE-REA yöntemi kullanıldı. Bant analizleri için benzerlik hesaplarının yapılmasında Dice korelasyon katsayısı ve kümeleşme analizi için de UPGMA yöntemi kullanıldı. İzolatlar benzerlik katsayıları göz önüne alınarak birbirleriyle %95'in üzerinde benzerlik gösteren suşlar aynı klonda kabul edildi. Benzerlik oranları %95'in altında olan suşlar ise diğerlerinden farklı olarak değerlendirildi.

Toplam 115 *C. parapsilosis* kompleks izolatının çalışmaya dahil edildiği PFGE-REA yöntemi ile izolatlar arasında 39 farklı genotip tespit edilmiş olup izolatlar 20 farklı küme içerisinde toplanmıştır (optimizasyon 3.0, tolerans 1.0, cutoff %95). İzolatların 96'sı herhangi bir küme içerisinde yer almakta olup, kümeleşme oranı %83,4'tür. En büyük küme; 18 izolatın yer aldığı genotip 1 kümesidir. Ardından 12 izolatın yer aldığı genotip 3, sekiz izolatın yer aldığı genotip 15, altışar izolatın yer aldığı genotip 2 ve 4, beş izolatın yer aldığı genotip 8, dörder izolatın yer aldığı genotip 5, 16, 17, 18, 24 ve 34, üç izolatın yer aldığı genotip 22, ikişer izolatın yer aldığı genotip 9, 10, 12, 13, 26, 27 ve 28 kümeleri bulunmaktadır.

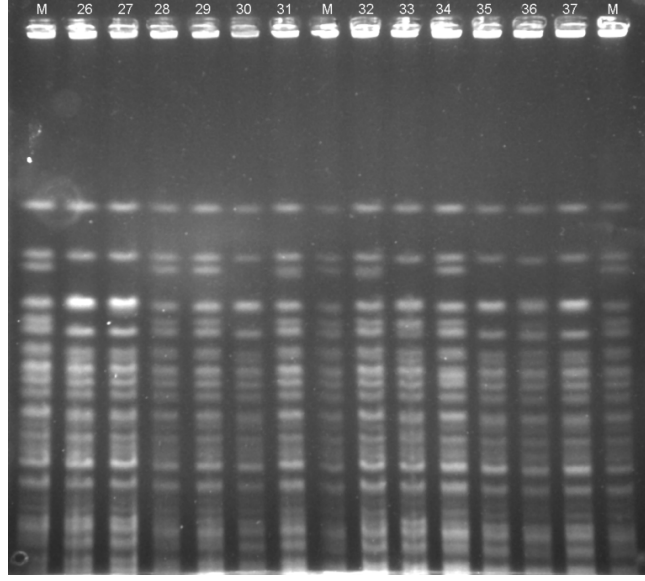
İzolatlara ait PFGE-REA sonuçları Şekil 4.23 (1-13 numaralı izolatlar), Şekil 4.24 (14-25 numaralı izolatlar), Şekil 4.25 (26-37 numaralı izolatlar), Şekil 4.26 (38-49 numaralı izolatlar), Şekil 4.27 (50-61 numaralı izolatlar), Şekil 4.28 (62-73 numaralı izolatlar), Şekil 4.29 (74-85 numaralı izolatlar), Şekil 4.30 (86-97 numaralı izolatlar), Şekil 4.31 (98-109 numaralı izolatlar) ve Şekil 4.32'de (110-115, 18, 80, 82, 102, 103, 24 numaralı izolatlar) gösterildi.



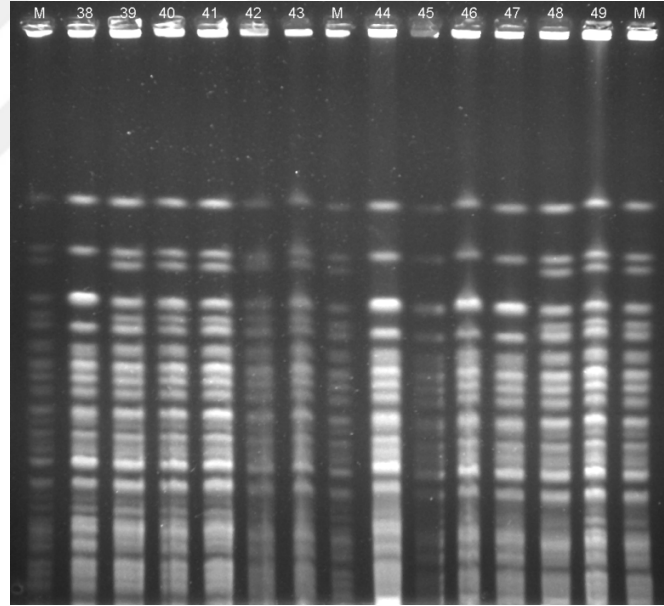
Şekil 4.23. 1-13 numaralı izolatlara ait PFGE- REA sonuçları.



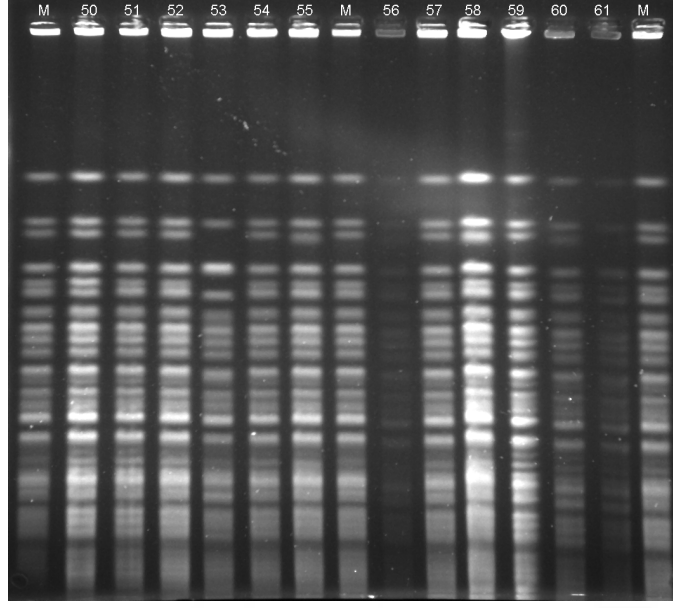
Şekil 4.24. 14-25 numaralı izolatlara ait PFGE- REA sonuçları.



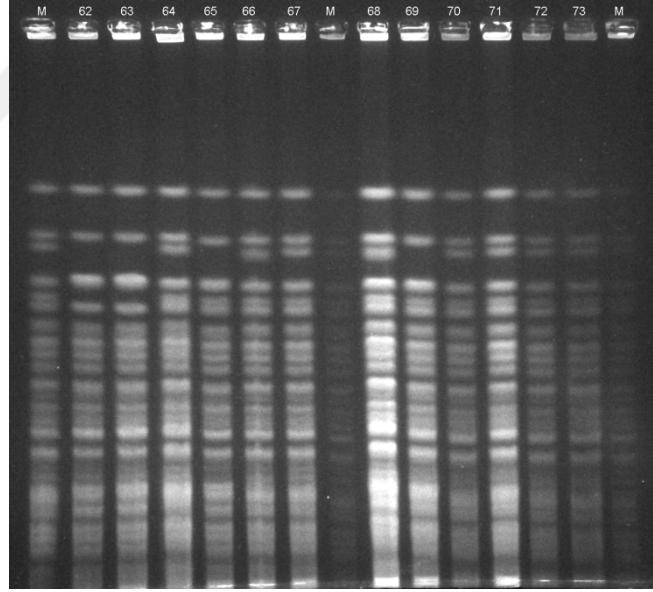
Şekil 4.25. 26-37 numaralı izolatlarla ait PFGE- REA sonuçları.



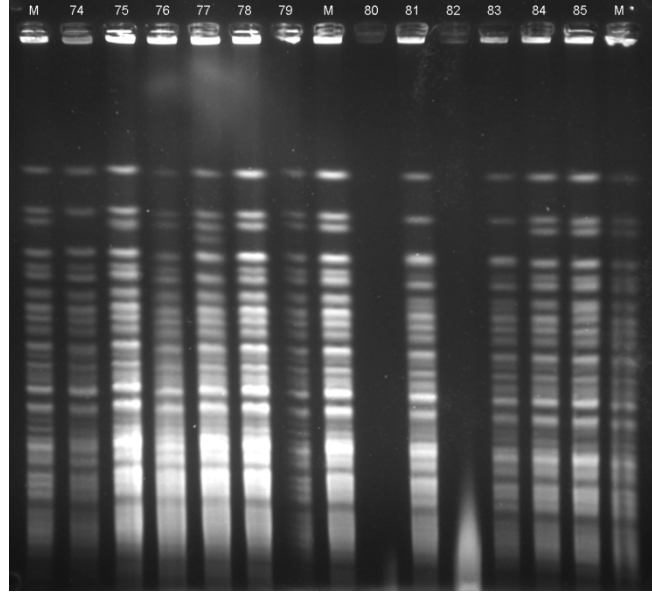
Şekil 4.26. 38-49 numaralı izolatlarla ait PFGE- REA sonuçları.



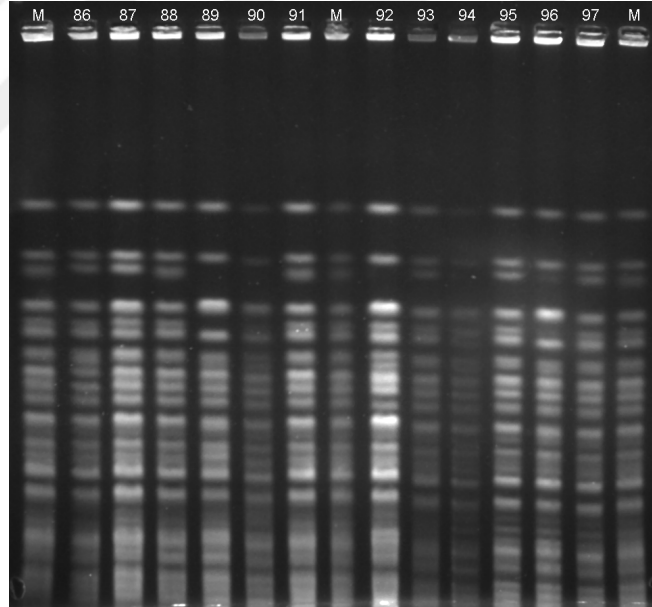
Şekil 4.27. 50-61 numaralı izolatlarla ait PFGE- REA sonuçları.



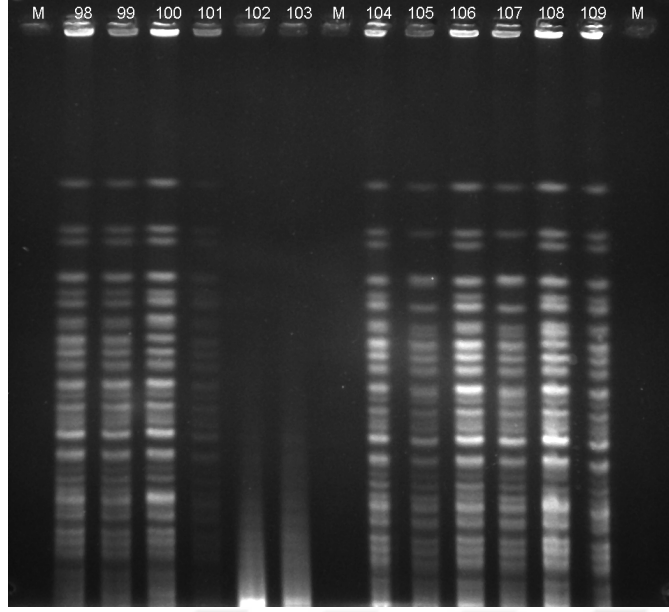
Şekil 4.28. 62-73 numaralı izolatlarla ait PFGE- REA sonuçları.



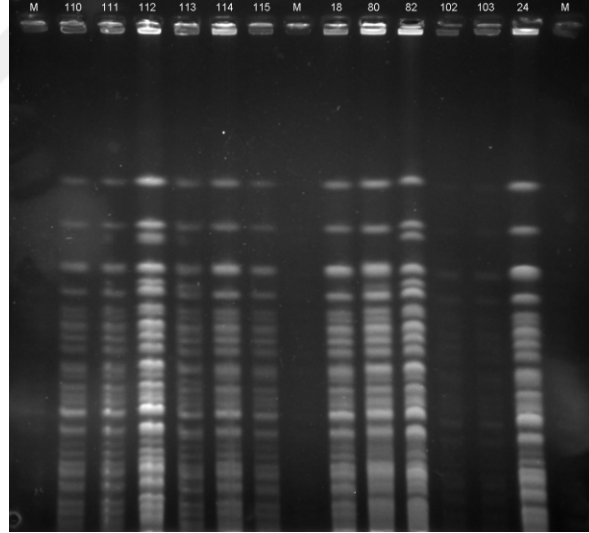
Şekil 4.29. 74-85 numaralı izolatlara ait PFGE- REA sonuçları.



Şekil 4.30. 86-97 numaralı izolatlara ait PFGE- REA sonuçları.

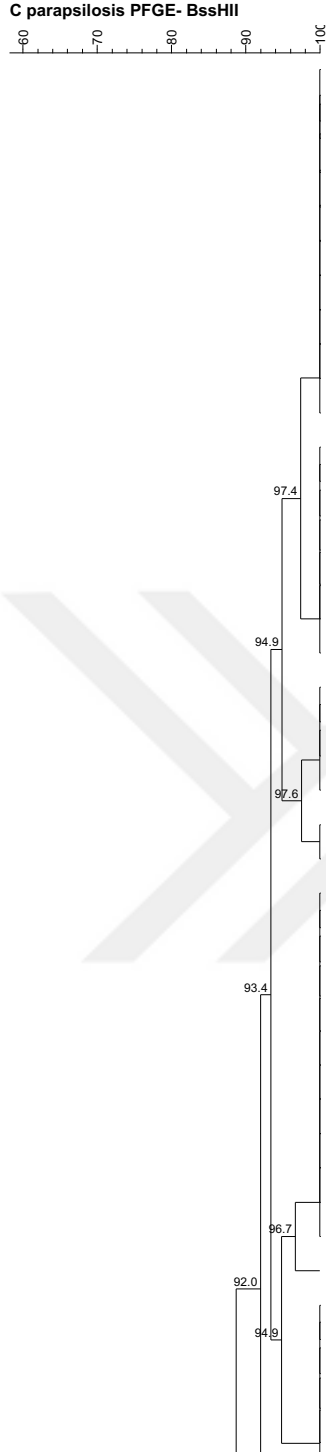


Şekil 4.31. 98-109 numaralı izolatlar a ait PFGE- REA sonuçları.

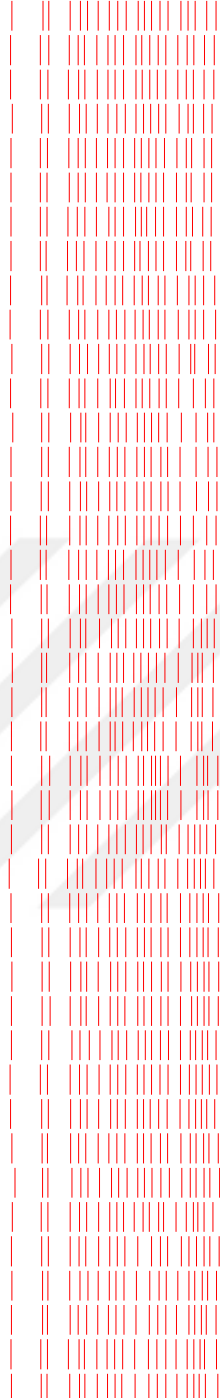


Şekil 4.32. 110-115 numaralı izolatlar ve önceki denemelerde sonuç alınamayan izolatların tekrarına a ait PFGE- REA sonuçları.

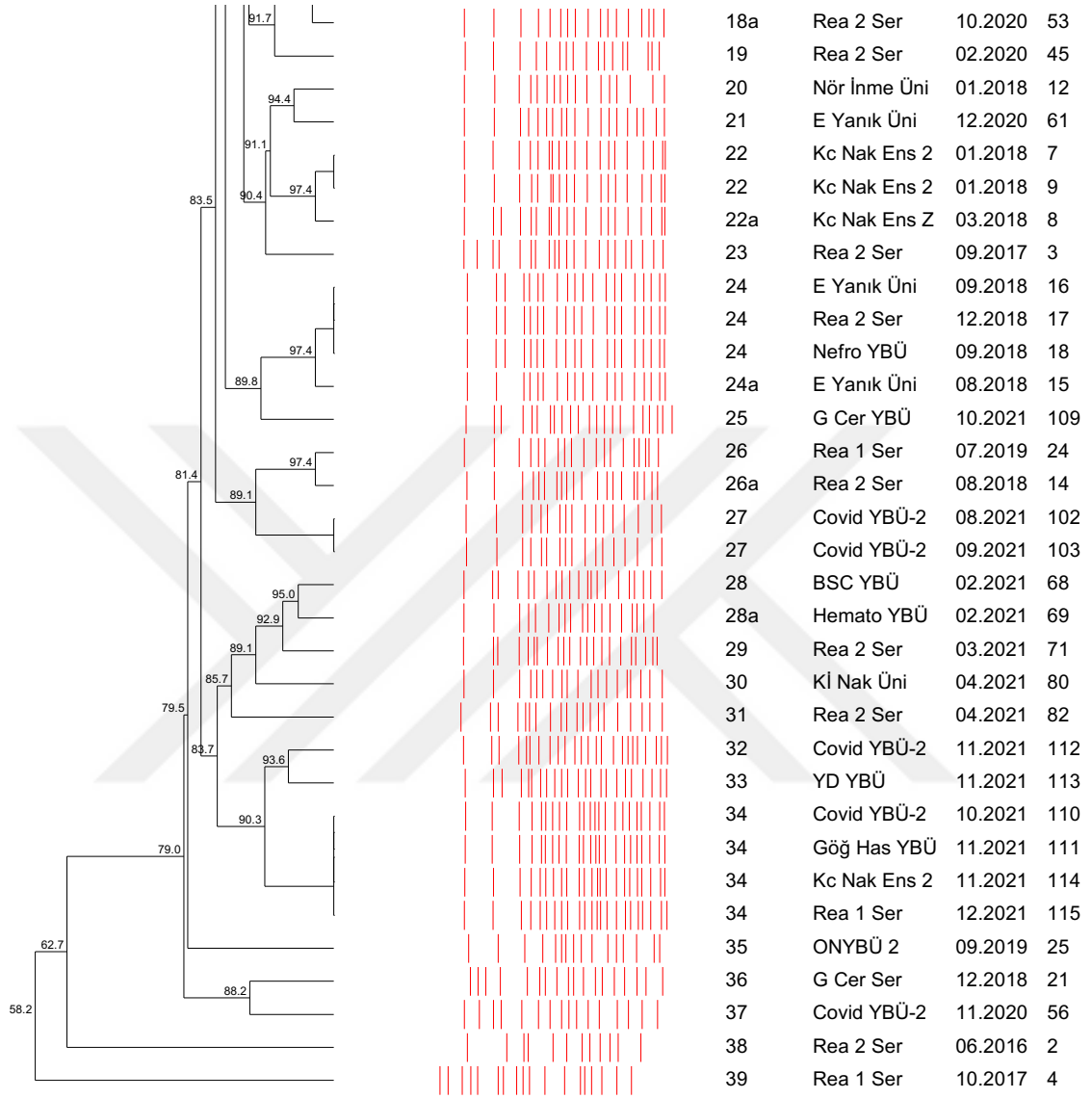
Candida parapsilosis izolatlarının GelCompar sistemiyle *Dice similarity coefficient* (benzerlik katsayısı) esas alınarak yapılan analizleri Şekil 4.33'te görölmektedir.



C parapsilosis PFGE- BssHII



Genotip	Servis	Tarih	İzolat
1	Nör İnme Üni	12.2019	36
1	BSC YBÜ	09.2019	31
1	Nefro Ser	10.2019	32
1	E Yanık Üni	01.2020	39
1	Rea 2 Ser	01.2020	40
1	Kc Nak Ens 2	01.2020	41
1	Nör İnme Üni	02.2020	42
1	Rea 2 Ser	02.2020	43
1	Covid YBÜ-2	12.2021	58
1	Covid YBÜ-2	12.2020	59
1	Med Onk Ser	04.2021	78
1a	Hem Ser	11.2019	34
1a	G Cer Ser	03.2020	48
1a	Med Onk Ser	09.2020	51
1a	Med Onk YBÜ	12.2020	57
1a	Rea 2 Ser	05.2021	86
1a	E Yanık Üni	05.2021	87
1a	Rea 1 Ser	06.2021	88
2	Nör İnme Üni	09.2019	28
2	Covid YBÜ-2	02.2021	70
2	Rea 2 Ser	03.2021	72
2	Kİ Nak Üni	03.2021	73
2a	Rom Ser	10.2017	5
2a	Rea 2 Ser	10.2017	6
3	G Cer YBÜ	09.2019	29
3	Med Onk Ser	06.2020	49
3	Med Onk Ser	08.2020	50
3	Med Onk Ser	09.2020	52
3	Med Onk Ser	10.2020	54
3	Covid YBÜ-2	11.2020	55
3	Rea 2 Ser	03.2021	76
3	Med Onk YBÜ	04.2021	79
3	E Yanık Üni	05.2021	84
3	Nefro YBÜ	07.2021	95
3	Nefro YBÜ	07.2021	97
3a	Covid YBÜ-2	02.2021	66
4	Rea 1 Ser	12.2020	60
4	Med Onk YBÜ	07.2021	98
4	Rea 1 Ser	09.2021	99
4	Göğ Has YBÜ	08.2021	100
4	Med Onk Ser	08.2021	101



Şekil 4.33. İzolatların GelCompar ile *Dice Similarity Coefficient* esas alınarak elde edilen dendogramı.

Çalışmaya dahil edilen *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının PFGE-REA yöntemiyle 20 küme içerisinde yer aldığı görüldü. Kümeler ve aynı kümelerde yer alan izolatlar Tablo 4.5'te gösterildi. Genotip 1 kümesi içerisinde yer alan izolatların 2019 Kasım ile 2021 Aralık ayı arasında dağılım gösterdiği belirlendi. Genotip 2 içerisinde yer alan izolatların ikisi 2017 yılına ait idi. Genotip 3 içerisindeki izolatların dördü iki

aylık süre içinde medikal onkoloji servisinde yatan hastalardan izole edildiği görüldü. Genotip 8 içerisindeki iki izolat 2018 yılına ait olup biri beyin sinir cerrahisinde yatan bir hastadan diğeri ise beyin sinir cerrahisi YBÜ’nde yatan bir hastadan izole edildi. Genotip 10, 13, 27 içerisinde yer alan iki izolatın da aynı ay içerisinde aynı serviste yatan hastalardan izole edildiği görüldü. Genotip 34 içerisinde yer alan izolatlar iki aylık süre içerisinde hastanemizin farklı servislerinde yatan hastalardan izole edilmiş idi, dolayısıyla klasik epidemiyolojik verilerle uyum göstermedi.

Tablo 4.5. PFGE-REA ile aynı genotipte yer alan izolatlar.

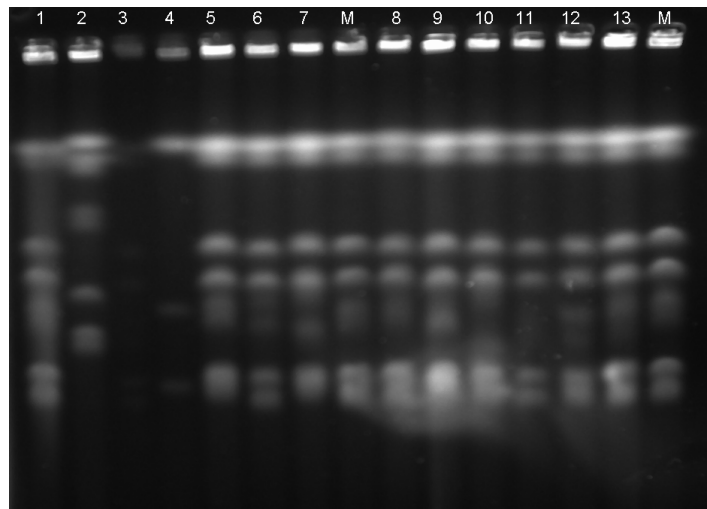
İzolat	PFGE-REA Genotip
31, 32, 34, 36, 39, 40, 41, 42, 43, 48, 51, 57, 58, 59, 78, 86, 87, 88	1
5, 6, 28, 70, 72, 73	2
29, 49, 50, 52, 54, 55, 66, 76, 79, 84, 95, 97	3
60, 98, 99, 100, 101, 106	4
64, 67, 75, 85	5
10, 11, 13, 91, 93	8
22, 23	9
19, 20	10
74, 108	12
105, 107	13
26, 27, 30, 37, 38, 46, 63, 96	15
33, 35, 81, 83	16
44, 62, 65, 92	17
47, 53, 89, 94	18
7, 8, 9	22
15, 16, 17, 18	24
14, 24	26
102, 103	27
68, 69	28
110, 112, 114, 115	34

4.4.3. *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının PFGE-EK sonuçları

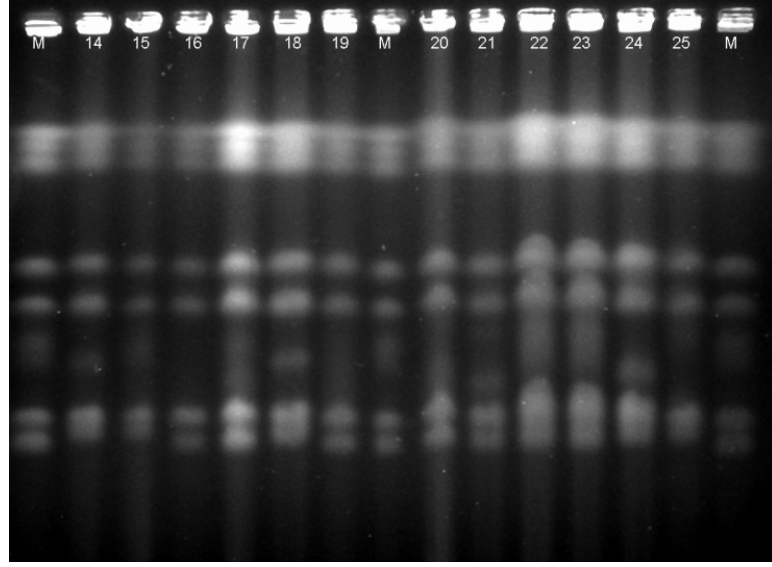
İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin tespiti için PFGE-EK yöntemi kullanıldı. Bant analizleri için benzerlik hesaplarının yapılmasında Dice korelasyon katsayısı ve kümeleşme analizi için de UPGMA yöntemi kullanıldı. İzolatlar benzerlik katsayıları göz önüne alınarak birbirleriyle %95'in üzerinde benzerlik gösteren suşlar aynı klonda kabul edildi. Benzerlik oranları %95'in altında olan suşlar isec diğerlerinden farklı olarak değerlendirildi.

Toplam 115 *C. parapsilosis* kompleks izolatu çalışmaya dahil edildi. Elektroforetik karyotiplendirme yöntemi ile 115 *C. parapsilosis* izolatu arasında 69 farklı genotip tespit edilmiş olup izolatlar 25 farklı küme içerisinde toplanmıştır (optimizasyon 3.0, tolerans 1.0, cutoff %95). İzolatların 70'i herhangi bir küme içerisinde yer almakta olup, kümeleşme oranı %60,8'dir. En büyük küme; yedi izolatu yer aldığı genotip 1 kümesidir. Ardından beş izolatu yer aldığı genotip 13, dörder izolatu yer aldığı genotip 15, 19, 27, 30 kümeleri, üçer izolatu yer aldığı genotip 3, 4, 24, 45 kümeleri, ikişer izolatu yer aldığı 2, 5, 6, 8, 9, 10, 16, 20, 26, 29, 42, 48, 54, 55 ve 59 kümeleri bulunmaktadır.

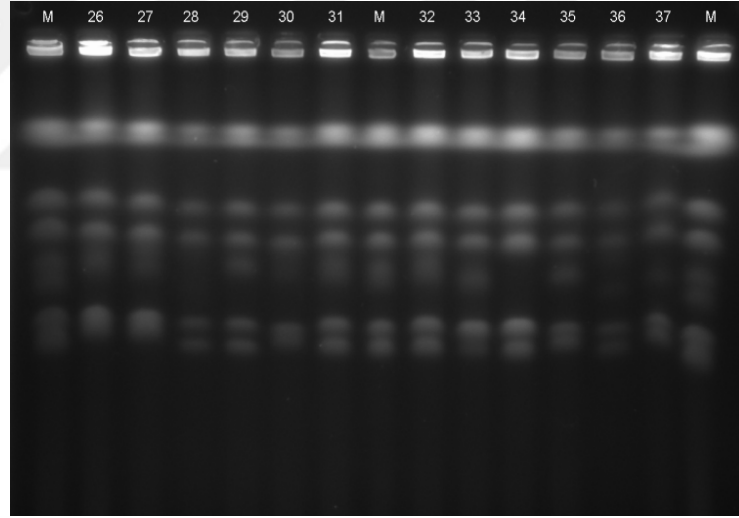
İzolatlara ait EK sonuçları Şekil 4.34 (1-13 numaralı izolatlar), Şekil 4.35 (14-25 numaralı izolatlar), Şekil 4.36 (26-37 numaralı izolatlar), Şekil 4.37 (38-49 numaralı izolatlar), Şekil 4.38 (50-61 numaralı izolatlar), Şekil 4.39 (62-73 numaralı izolatlar), Şekil 4.40 (74-85 numaralı izolatlar), Şekil 4.41 (86-97 numaralı izolatlar), Şekil 4.42 (98-109 numaralı izolatlar), Şekil 4.43'te (110-115, 3, 4, 36, 45, 56, 2 ve 101 numaralı izolatlar) gösterildi.



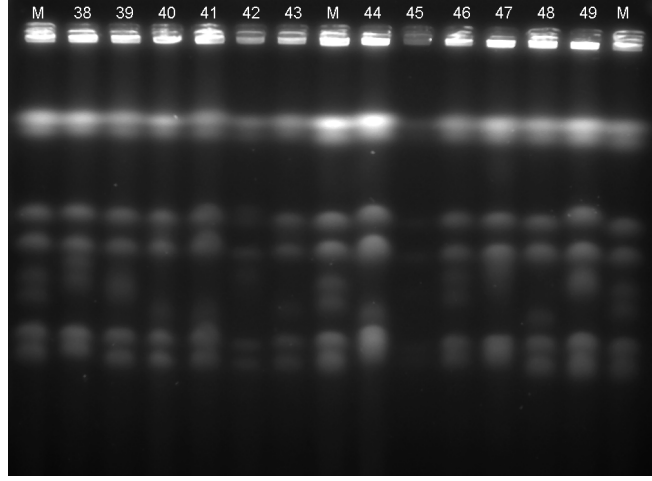
Şekil 4.34. 1-13 numaralı izolatlara ait PFGE-EK sonuçları.



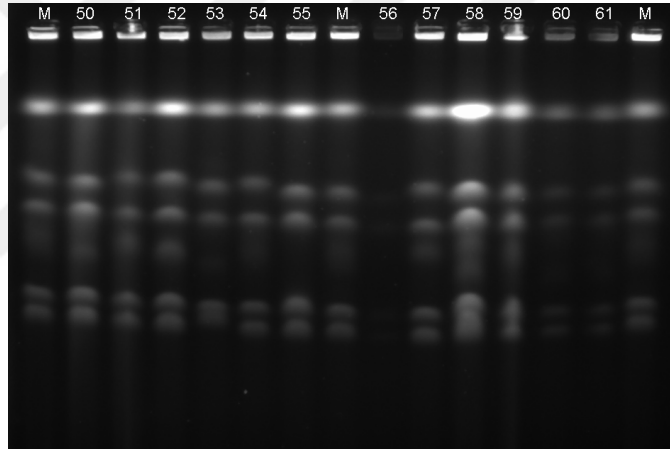
Şekil 4.35. 14-25 numaralı izolatlarla ait PFGE-EK sonuçları.



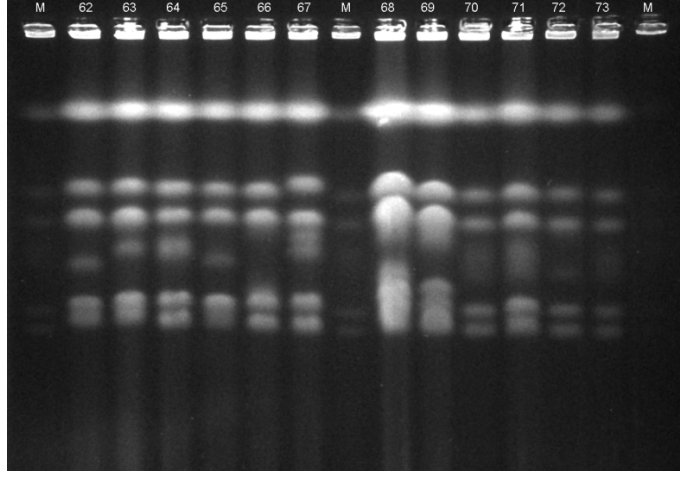
Şekil 4.36. 26-37 numaralı izolatlarla ait PFGE-EK sonuçları.



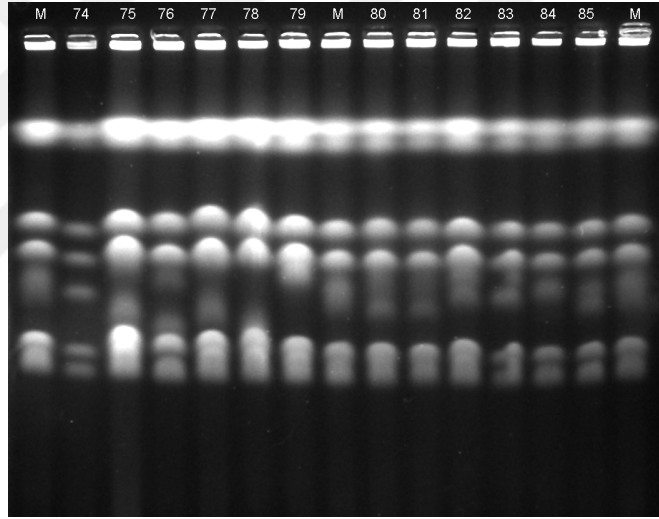
Şekil 4.37. 38-49 numaralı izolatlara ait PFGE-EK sonuçları.



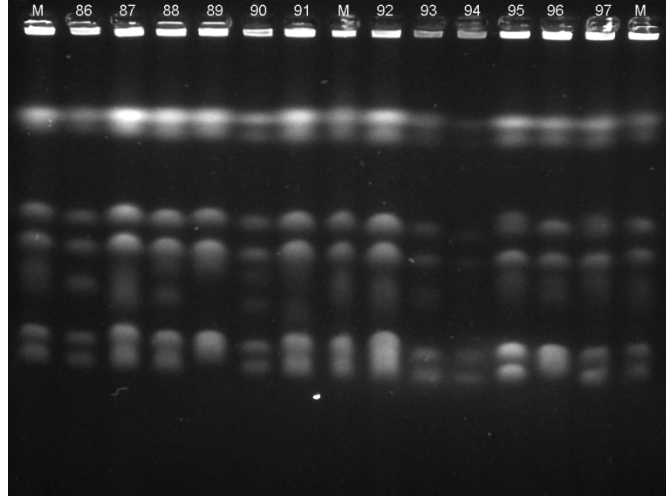
Şekil 4.38. 50-61 numaralı izolatlara ait PFGE-EK sonuçları.



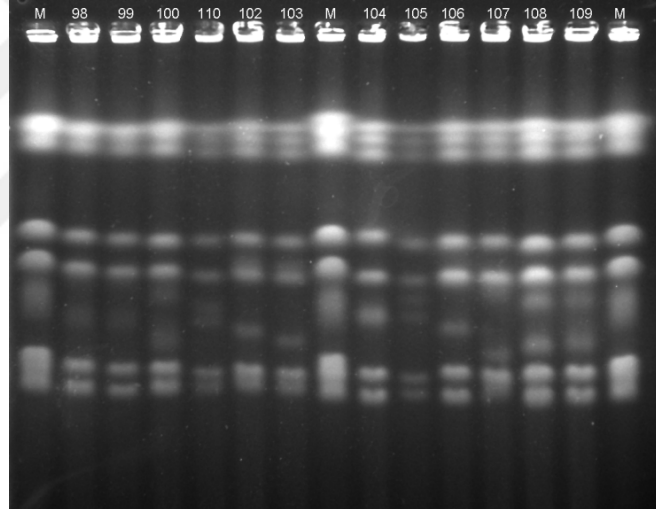
Şekil 4.39. 62-73 numaralı izolatlara ait PFGE-EK sonuçları.



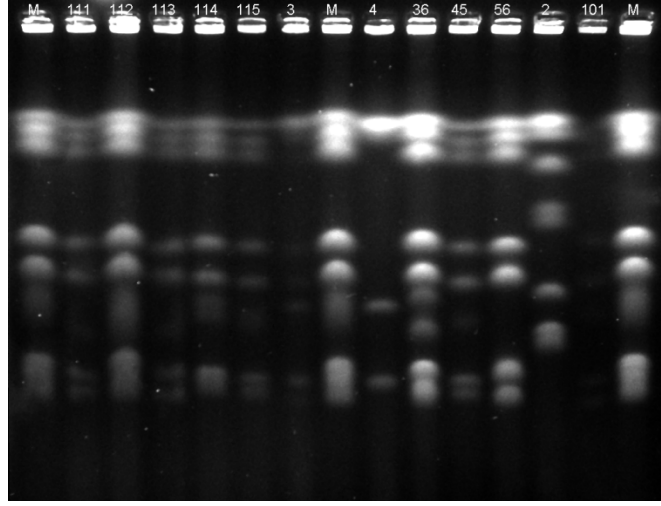
Şekil 4.40. 74-85 numaralı izolatlara ait PFGE-EK sonuçları.



Şekil 4.41. 86-97 numaralı izolatlarla ait PFGE-EK sonuçları.



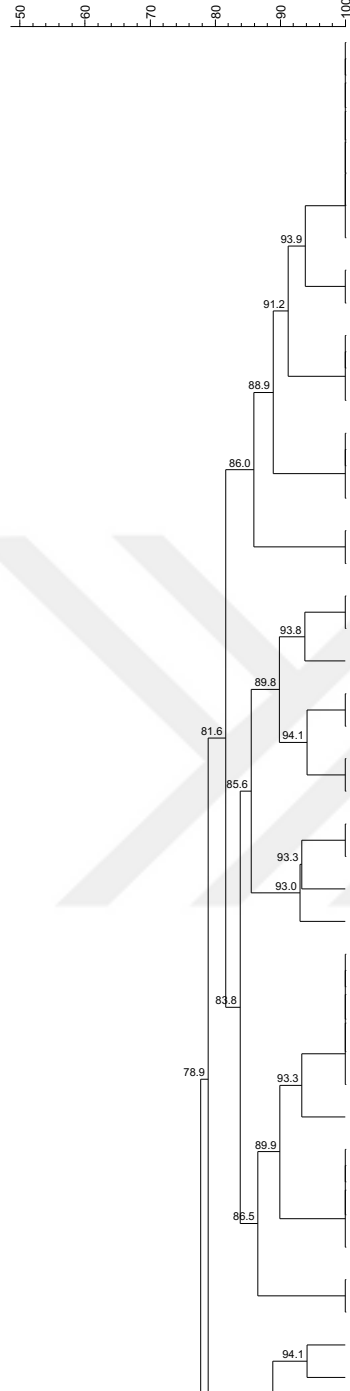
Şekil 4.42. 98-109 numaralı izolatlarla ait PFGE-EK sonuçları.



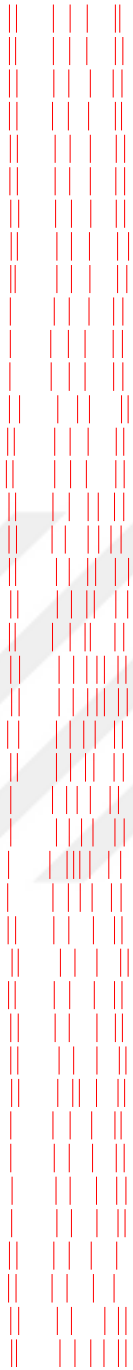
Şekil 4.43. 111-115 numaralı izolatlar ve önceki denemelerde sonuç alınamayan izolatların tekrarına ait PFGE-EK sonuçları.

Candida parapsilosis izolatlarının GelCompar sistemiyle *Dice similarity coefficient* (benzerlik katsayısı) esas alınarak yapılan analizleri Şekil 4.44'te görülmektedir.

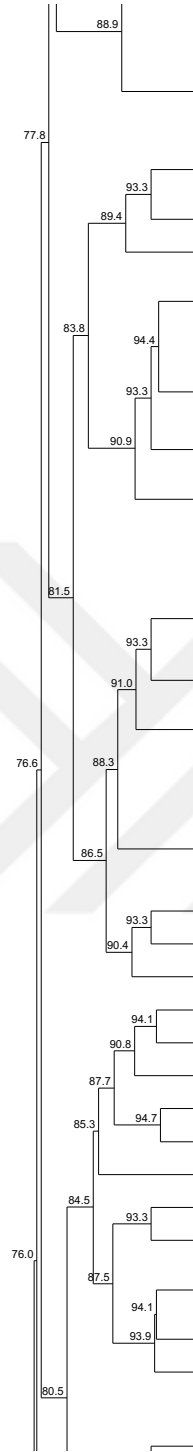
C parapsilosis PFGE- EK



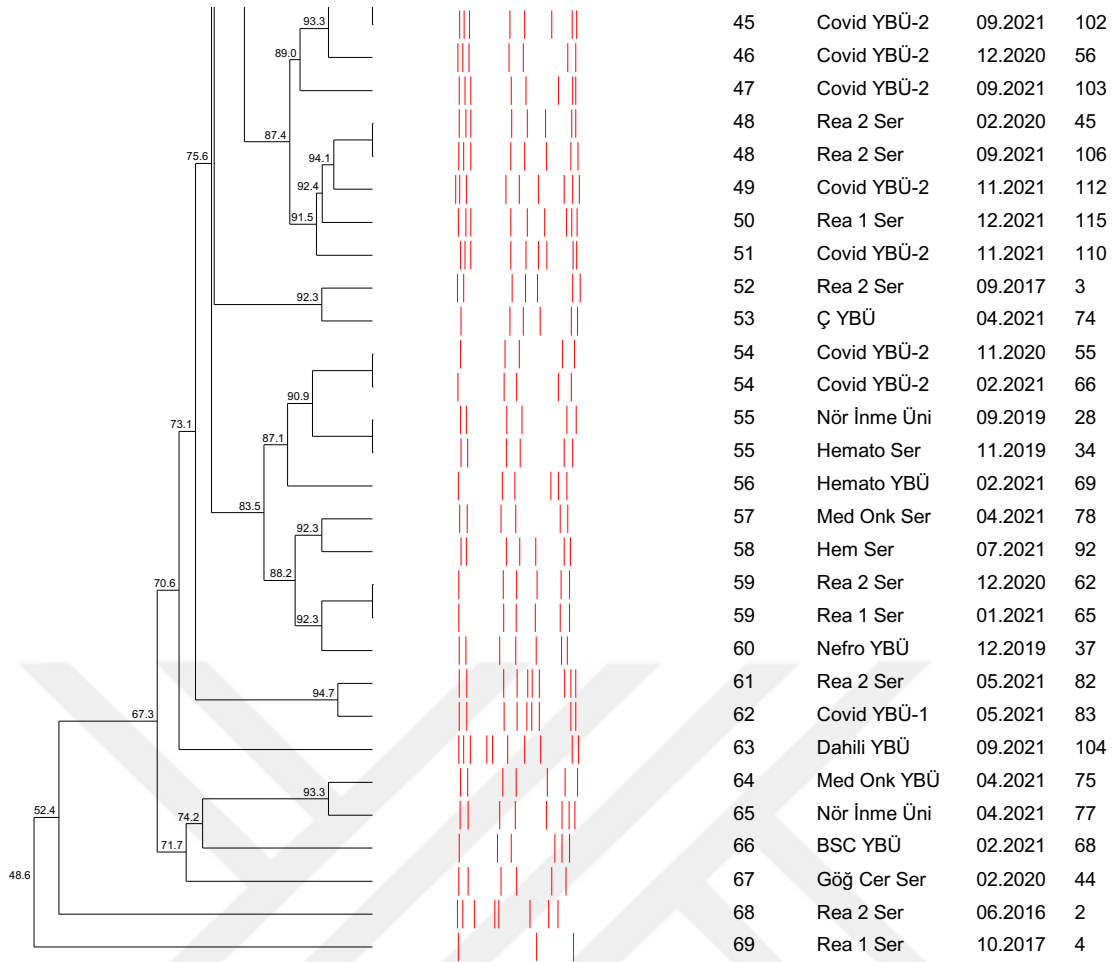
C parapsilosis PFGE- EK



Genotip	Servis	Tarih	İzolat
1	E Yanık Üni	08.2018	15
1	E Yanık Üni	09.2018	16
1	Rea 2 Ser	09.2018	17
1	Nefro YBÜ	09.2018	18
1	Kc Nak Ens 2	12.2017	7
1	Kc Nak Ens Z	01.2018	8
1	Kc Nak Ens 2	01.2018	9
2	Rea 2 Ser	05.2021	86
2	Rea 1 Ser	06.2021	88
3	Med Onk Ser	08.2020	50
3	Med Onk Ser	09.2020	52
3	Med Onk Ser	09.2020	54
4	Med Onk Ser	09.2021	101
4	E Yanık Üni	01.2020	39
4	E Yanık Üni	05.2021	84
5	Rea 1 Ser	10.2018	19
5	Rea 1 Ser	10.2018	20
6	Ç YBÜ	05.2021	85
6	Ç YBÜ	07.2021	93
7	Ç Hem Ser	04.2016	1
8	BSC Ser	01.2018	11
8	BSC YBÜ	10.2017	13
9	Nör İnme Üni	12.2019	36
9	E Yanık Üni	05.2021	87
10	Covid YBÜ-2	12.2020	58
10	Covid YBÜ-2	02.2021	70
11	Med Onk Ser	02.2021	67
12	Rea 2 Ser	02.2021	71
13	Kİ Nak Üni	04.2021	80
13	Rea 1 Ser	08.2021	99
13	Rea 2 Ser	04.2021	81
13	Med Onk YBÜ	07.2021	91
13	Med Onk YBÜ	07.2021	98
14	Kc Nak Ens 2	07.2021	90
15	Rea 2 Ser	09.2020	53
15	Rea 2 Ser	03.2021	72
15	Rea 1 Ser	12.2020	60
15	E Yanık Üni	12.2020	61
16	Rea 2 Ser	08.2018	14
16	Rea 1 Ser	07.2019	24
17	Rea 1 Ser	01.2018	10
18	Nör İnme Üni	01.2018	12



19	Rea 2 Ser	01.2020	40
19	Kc Nak Ens 2	01.2020	41
19	Rea 2 Ser	02.2020	43
19	G Cer Ser	03.2020	48
20	Rom Ser	10.2017	5
20	Rea 2 Ser	11.2017	6
21	G Cer YBÜ	09.2019	29
22	Nör İme Üni	02.2020	42
23	E Yanık Üni	08.2019	27
23	Rea 1 Ser	11.2019	33
24	ONYBÜ 2	07.2019	25
24	ONYBÜ 2	08.2019	26
24	Enf Has YBÜ	03.2020	47
25	ONYBÜ 2	10.2019	30
26	E Yanık Üni	06.2021	89
26	E Yanık Üni	07.2021	94
27	E Yanık Üni	03.2019	23
27	BSC YBÜ	10.2019	31
27	Nefro Ser	10.2019	32
27	Rea 2 Ser	11.2019	35
28	Rea 1 Ser	02.2019	22
29	Covid YBÜ-3	12.2020	63
29	Ç Hem Ser	01.2021	64
30	Med Onk Ser	09.2020	51
30	Kİ Nak Üni	03.2021	73
30	Med Onk YBÜ	12.2020	57
30	Covid YBÜ-2	12.2020	59
31	Med Onk Ser	06.2020	49
32	Nefro YBÜ	07.2021	95
33	Rea 2 Ser	04.2021	76
34	G Cer Ser	12.2018	21
35	Ç Hem Ser	10.2021	108
36	Göğ Has YBÜ	09.2021	100
37	Rea 1 Ser	09.2021	105
38	G Cer YBÜ	10.2021	109
39	Rea 1 Ser	10.2021	107
40	Med Onk YBÜ	04.2021	79
41	Nefro YBÜ	07.2021	97
42	Rea 2 Ser	12.2019	38
42	Dahili YBÜ	02.2020	46
43	Kc Nak Ens 2	12.2021	114
44	ONYBÜ 3	07.2021	96
45	Göğ Has YBÜ	11.2021	111
45	YD YBÜ	11.2021	113



Şekil 4.44. İzolatların GelCompar ile *Dice Similarity Coefficient* esas alınarak elde edilen dendrogramı.

Çalışmaya dahil edilen *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının PFGE-EK yöntemiyle 25 küme içerisinde yer aldığı görüldü. Kümeler ve aynı kümelerde yer alan izolatlar Tablo 4.6'da gösterildi. Genotip 1 kümesi içerisinde yer alan izolatların tamamının 2018 yılına ait olduğu, 7, 8, 9 numaralı izolatların Karaciğer Nakil Enstitüsü'nde, 15 ve 16 numaralı izolatların Erişkin Yanık Ünitesi'nde, 17 numaralı izolatın Reanimasyon servisinde, 18 numaralı izolatın Nefroloji YBÜ'nde yatan hastalardan izole edildiği görüldü. Genotip 2, 3, 5, 6, 8, 10, 16, 26, 54 ve 59'da yer alan izolatların aynı servislerde aynı ay içerisinde yatan hastalardan izole edildiği belirlendi. Genotip 4'te yer alan 39 ve 84 numaralı izolatlar 16 ay arayla Erişkin Yanık Ünitesi'nden izole edilirken, 101 numaralı izolatın klasik epidemiyolojik verilerle uyumluluk göstermediği saptandı. Genotip 9'da yer alan 36 ve 87 numaralı izolatlar bir buçuk yıl arayla farklı kliniklerde yatan hastalardan izole edilmişti dolayısıyla klasik epidemiyolojik verilerle uyum göstermedi. Genotip 13 içerisinde yer alan izolatların

tamamı 2021 yılına ait fakat farklı kliniklerden izole edilen örneklerdi. Genotip 15 içerisinde yer alan izolatların üçünün Reanimasyon servisinden, bir tanesinin Erişkin Yanık Ünitesi'nde yatan hastalardan izole edildiği belirlendi. Genotip 19 içerisinde bulunan izolatların 2020 yılının ilk üç ayı içerisinde hastanemizin farklı kliniklerinden izole edildiği saptandı. Genotip 20 içerisinde yer alan izolatların 2017 yılında beş gün arayla Romatoloji ve Reanimasyon servislerinden izole edildiği görüldü. Genotip 24 içerisindeki iki izolat aynı ay içerisinde Organ Nakli YBÜ'nden, bir izolat ise farklı tarihte Enfeksiyon Hastalıkları YBÜ'nden izole edilmişti. Genotip 27 ve 55 içerisinde yer alan izolatların 2019 yılında farklı kliniklerden izole edildiği, genotip 29 içerisinde yer alan izolatların 2020 yılında aynı ay içerisinde farklı servislerden izole edildiği belirlendi. Genotip 30 içerisinde yer alan 51 ve 57 numaralı izolatlar Medikal Onkoloji servisinden, 59 numaralı izolat COVID YBÜ'den, 73 numaralı izolat Kemik İliği Nakil ünitesi'nden izole edildi. Genotip 42 içerisinde yer alan izolatların iki ay arayla Reanimasyon servisi ve Genel Dahili YBÜ'nde yatan iki hastadan izole edildiği fakat her iki izolatın da flukonazole dirençli olduğu saptandı. Genotip 45'te yer alan izolatlar 2021 yılının ikinci yarısında hastanemizin farklı servislerinden yatan hastalardan gelen örneklerden izole edildiği belirlendi. Genotip 48'te yer alan izolatların 19 ay arayla Reanimasyon servisinden izole edildiği görüldü.

Tablo 4.6. PFGE-EK ile aynı genotipte yer alan izolatlar.

İzolat	PFGE-EK Genotip
7, 8, 9, 15, 16, 17, 18	1
86, 88	2
50, 52, 54	3
39, 84, 101	4
19, 20	5
85, 93	6
11, 13	8
36, 87	9
58, 70	10
80, 81, 91, 98, 99	13
53, 60, 61, 72	15
14, 24	16
40, 41, 43, 48	19

İzolat	PFGE-EK Genotip
5, 6	20
25, 26, 47	24
89, 94	26
23, 31, 32, 35	27
63, 64	29
51, 57, 59, 73	30
38, 46	42
102, 111, 113	45
45, 106	48
55, 66	54
28, 34	55
62, 65	59

4.5. Yöntemlerin Ayrım Gücü (Diskriminasyon)

Hunter ve Gaston'un geliştirdikleri matematiksel formül kullanılarak, AP-PCR, PFGE-EK ve PFGE-REA yöntemlerinin ayırım güçleri hesaplandı. Yapılan hesaplama sonucunda ayırım gücü "D" ile gösterildi. Yöntemlerin ayırım gücü AP-PCR için $D=0.9393$, PFGE-REA için $D=0.9492$, PFGE-EK için $D=0.9875$ olarak belirlendi.

4.6. Klasik epidemiyolojik bilgiler, AP-PCR, PFGE-EK ve PFGE-REA yöntemlerinin karşılaştırılması

İncelenen suşların AP-PCR, PFGE-EK, PFGE-RFLP ve klasik epidemiyolojik gruplandırma sonuçları karşılaştırıldı. Çalışmamızda toplam 115 *C. parapsilosis* kompleks izolatının AP-PCR yöntemi ile 34 farklı genotip, 15 kümeye; PFGE-REA ile 39 farklı genotip, 20 kümeye; PFGE-EK yöntemi ile 69 farklı genotip, 25 kümeye ayrıldığı saptandı. Kullandığımız yöntemlerden AP-PCR ve PFGE-REA ile izolatların kümeleşme oranı %83,4 olarak bulunurken PFGE-EK ile izolatların kümeleşme oranı %60,8 olarak hesaplandı.

İzolatlar incelendiğinde dizi analiziyle *C. tropicalis* olduğu belirlenen dört numaralı izolat her üç yöntemde de unique izolat olarak belirlendi. Bunun yanında dizi analiziyle *C. orthopsilosis* olduğu doğrulanan 42 numaralı izolatın AP-PCR ve PFGE-REA yöntemiyle sırasıyla genotip 6 ve genotip 1 kümelerinde yer aldığı görüldü. Yöntemler arasında yalnızca PFGE-EK yönteminde *C. orthopsilosis* izolatının band paterni *C. parapsilosis sensu stricto* izolatlarından ayrıldı. Çalışmaya dahil edilen altı hastaya ait tekrarlayan izolatlar incelendiğinde AP-PCR yöntemiyle aynı hastaya ait tekrarlayan ikinci izolatın ilk izolat ile aynı genotipte olduğu saptandı. Diğer yandan PFGE-REA ve PFGE-EK yöntemlerinde üç hastaya ait tekrarlayan izolatın ilk izolattan farklı band paternine sahip olduğu görüldü.

Klasik epidemiyolojik veriler ile karşılaştırıldığında AP-PCR yönteminde genotip 1 kümesinin tamamının 2018, genotip 4'ün 2017, genotip 6 ve 28'in 2020, genotip 10, 11, 12, 13, 17, 20 ve 21'in 2021 yılına ait izolatlardan oluştuğu görüldü. Genotip 8 içerisinde yer alan izolatların ikisi bir aylık zaman dilimi içerisinde Covid YBÜ-2 kliniğinde yatan hastalar idi.

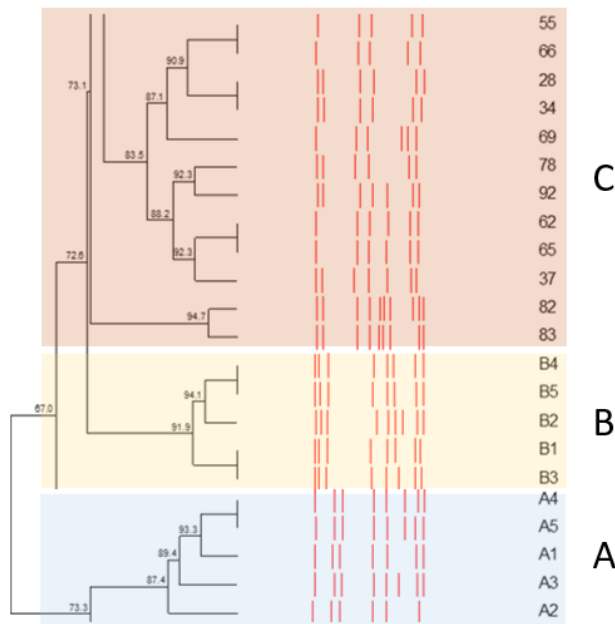
Klasik epidemiyolojik veriler ile karşılaştırıldığında PFGE-REA yönteminde genotip 2, 2017 yılına ait izolatlardan oluşmakta idi. Genotip 3 içerisindeki izolatların dördü medikal onkoloji servisinde yatan hastalardan izole edilmişti. Genotip 8

içerisindeki iki izolat 2018 yılına ait olup biri beyin sinir cerrahisinde yatan bir hastadan diğeri ise beyin sinir cerrahisi YBÜ’nde yatan bir hastadan izole edildi. Genotip 10, 13, 27 içerisindeki hastaların aynı serviste aynı ay içinde yatmakta olup klasik epidemiyolojik verilerle ilişkili olduğu görüldü.

Klasik epidemiyolojik veriler ile karşılaştırıldığında PFGE-EK yönteminde genotip 2, 3, 5, 6, 8, 10, 16, 26, 54 ve 59’da yer alan izolatların aynı servislerde aynı ay içerisinde yatan hastalardan izole edildiği dolayısıyla klasik epidemiyolojik verilerle yüksek uyum gösterdiği görüldü. Genotip 1’de ise tüm izolatlar 2018 yılında izole edilmişti.

Tüm yöntemler birlikte değerlendirildiğinde 5,6 numaralı izolatların; 7, 8, 9 numaralı izolatların; 11, 13 numaralı izolatların; 50, 52, 54 numaralı izolatların; 86,88 numaralı izolatların her üç yöntemde de birbirleri ile aynı kümeler içerisinde yer aldığı görüldü. 19,20 numaralı izolatların ise PFGE-REA ve PFGE-EK yöntemlerinde aynı küme içerisinde yer aldığı fakat AP-PCR ile farklı kümelerde yer aldıkları belirlendi.

Hastanemiz izolatları ile epidemiyolojik olarak ilişkili olmayan iki farklı şehirden beşer adet *C. parapsilosis* kompleks izolatının klonal ilişkileri PFGE-EK yöntemi ile değerlendirildiğinde farklı illerdeki izolatların (epidemiyolojik olarak ilişki kurulamayan) birbiriyle kümeleşmediği görüldü (Şekil 4.45).



Şekil 4.45. Epidemiyolojik olarak ilişki kurulamayan merkezlere ait *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının PFGE-EK yöntemiyle karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Klinik mikoloji, mikrobiyolojinin pek çok dalı gibi özellikle son otuz yılda sürekli gelişim göstermiştir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaşanan teknolojik gelişmeler sessiz bir devrim olarak nitelendirilmiştir (91). Modern mikrobiyolojinin gelişimi; 1960'larda Joseph Gall ve Mary Lou Pardue tarafından radyoaktif işaretlenmiş hibridizasyon probunun icat edilmesi, 1970'lerde Carl Woese'nin ribozomal genleri inceleme konusundaki özenli çalışmaları ve 16S rRNA geninin dizilenmesi, 1970'lerde Anhalt ve Fenselau tarafından kütle spektrometrisinin geliştirilmesi, 1983 yılında Kary Mullis tarafından polimeraz zincir reaksiyonunun keşfedilmesi ile birlikte olmuştur. Yirmi birinci yüzyılın başından itibaren, canlı bakteri hücresi gerektirmeyen kültür bağımsız yöntemler gündeme gelmiş; mikrobiyal DNA, RNA veya proteinlerin saptanmasına dayanan moleküler teknikler araştırma laboratuvarlarından çıkıp rutin testlerin arasında yerini almıştır (92, 93).

Bu sayede yeni tedavi kılavuzları ile birlikte özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda (onkohematolojik ve/veya transplant alıcıları) fırsatçı mantar enfeksiyonlarında tedavi başarısının artırılması mümkün kılınmıştır (22). Aynı zamanda daha geniş etki spektrumuna ve daha az yan etkiye sahip yeni antifungallerin geliştirilmiş, daha hızlı teşhis ve daha etkili tedaviler uygulanmaya başlanmıştır. Bu ilerlemelere karşın, bağışıklığı baskılanmış duyarlı hasta grubunun artması ve yeni mikroorganizmaların (*Candida auris*, *Lomentospora prolificans*, *mucorales*) ortaya çıkmasıyla invaziv mantar enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde önemli değişiklikler bildirilmiştir (94).

İnvaziv fungal enfeksiyon insidansı, yılda 100.000 kişi başına yaklaşık altı vakadır. İnvaziv fungal enfeksiyonların en yaygın nedeni *Candida* türleri olmasına rağmen, son zamanlarda non-*Aspergillus* türleri, *Zygomycetes*, *Fusarium*, *Mucorales* ve *Scedosporium* türleri gibi diğer filamentli mantarlara bağlı enfeksiyonların insidansında bir artış olmuştur. Bunun muhtemel nedeninin hematolojik rahatsızlıkları olan hastalarda flukonazol ve diğer geniş spektrumlu antifungaller ile profilaksi uygulanması ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (95). Fransa'da 2004-2010 yılları arasında yapılan ve Fransa'daki hastanelerin %95'inden fazlasının katıldığı bir çalışmada, 35876 invaziv fungal enfeksiyon vakası raporlanmıştır. Bu çalışmadaki invaziv fungal enfeksiyonların dağılımı; kandidemi (%43,4), *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi (%26,1), invaziv aspergilloz (%23,9), kriptokokoz (%5,2) ve mukormikoz (%1,5) olarak bildirilmiştir

(96). Türkiye'de invaziv fungal enfeksiyonların epidemiyolojisi net olarak bilinmemekle birlikte Hilmioğlu-Polat ve arkadaşlarının 1920'den 2017'ye kadarki mevcut epidemiyolojik verilerle yaptığı modelleme çalışmasında ülkemizde ciddi fungal enfeksiyon sıklığı yıllık %2,21 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada invaziv fungal enfeksiyonların dağılımı; kandidemi 4.76/100.000 kişi, *Pneumocystis jirovecii* pnömonisi 0.79/100.000 kişi, invaziv aspergilloz için tahmini yıllık insidans 4.84/100.000 kişi, kriptokokal menenjit için 0.13/100.000 kişi olarak modellenmiştir (97).

İnsanlarda enfeksiyon oluşturabilen en yaygın fungal patojenler *Candida* türleridir (98). Dünya çapında kandidemi insidansı 1000 YBÜ hastası başına 6.87 iken toplumda ise 100.000 kişi başına 2-14 vaka arasında değiştiği ifade edilmiştir (99). İskandinav ülkelerinden Norveç, Finlandiya ve İsveç'te 100.000 nüfus başına 3; Danimarka'da 100.000 nüfus başına 11; Avrupa'nın orta ve güney kesimlerinden İsviçre, Birleşik Krallık, İskoçya, İspanya ve İtalya'da ise 100.000 nüfus başına 1.2-6.4 kandidemi vakası rapor edilmiştir (100, 101). Amerika'da Iowa, San Francisco, Atlanta ve Connecticut'ta 6-14/100.000, Baltimore bölgesinde ise 25/100.000 olarak kandidemi insidansı bildirilmiştir (102). Ülkemizde ise Kılıç ve arkadaşlarının yaptığı altı yıllık retrospektif analizde 1000 taburculuk başına 0.10- 0.34 arasında yıllar içinde artan şekilde değişen kandidemi insidansı bildirmişlerdir. Aynı çalışmada YBÜ'lerde yatan hastalarda invaziv kandidemi insidansı %12,3 olarak belirtilmiştir (103). Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada Hancı ve arkadaşları 23813 hastanın kan kültürünü incelemiş ve 268 hastada (%1,12) etken olarak *Candida* cinsi mayaları izole ettiklerini raporlamışlardır (104). Bizim çalışmamızda Hancı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçlarına uyumlu olarak altı yıllık sürede laboratuvarımıza gönderilen toplam 25396 kan kültürünün 2160 tanesi otomatize kan kültürü sistemi ile pozitif sinyal vermiş olup 506'sının (%1,99) kandidemi olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte kan kültür sistemlerinin duyarlılığının düşük olması, gelişmekte olan ülkelerde sistematik sürveyans çalışmalarının yeterince yapılamaması ve gelişmiş ülkelerde ise özel hasta gruplarında kandidemi sıklığını araştıran çalışmalar arasında standardizasyonun yeterince sağlanamaması nedeniyle ülkelerdeki kandidemi yükünün doğru bir şekilde tahmin edilmesinin mümkün olmadığını düşünmekteyiz.

Hastane enfeksiyonlarının dördüncü en sık nedeni olarak *Candida* türlerinin sebep olduğu kan dolaşımı enfeksiyonları karşımıza çıkmaktadır (105, 106). Öte yandan

sürveyans çalışmalarının sonuçları *Candida* türlerinin ayaktan tedavi gören hastalarda da önemli sayıda sağlık bakımıyla ilişkili kandidemi vakasına neden olduğunu ortaya çıkarmış ve bu nedenle kandideminin artık kritik hastalarla sınırlı olmadığını vurgulamıştır (95). Kandidemi etkenleri arasında *C. albicans* en sık izole edilen tür olmasına karşın, albicans dışı *Candida* türlerinde artış bildirilmektedir. *Candida* türleri içinde *C. parapsilosis* kompleks suşlarının önemi ve prevalansı özellikle son iki dekatta artış göstermiştir. Yapılan bir çalışmada son on yılda *C. albicans* nedenli enfeksiyonların sıklığının azaldığı, albicans dışı etkenlerden *C. glabrata* ve *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının artış gösterdiği belirtilmiştir. Özellikle ABD’de tüm kandidemi etkenleri arasında *C. albicans* sıklığının %50’nin altına düştüğü diğer yandan *C. glabrata*’nın tüm kandidemilerin üçte birinden fazlasının nedeni olduğu ve *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının da %15 sıklıkta etken olarak izole edildiği belirtilmiştir (107). Bizim çalışmamızda da bu veriyle uyumlu şekilde *C. albicans* sıklığı %33,5 olup; albicans dışı *Candida* türleri içerisinde en sık *C. parapsilosis* kompleks, ikinci en sık ise *C. glabrata* izole edildiği görülmüştür. Bu değişikliğin birden çok nedeni olmakla birlikte bunların başında flukonazol kullanımı ve venöz kateterlerin artan popülaritesi başta gelen sebepler olarak düşünülmektedir (6).

Kandidemi etkeni olan türlerin dağılımı merkezler arasında coğrafi bölgelere, hastanın yaşına, cinsiyetine, tıbbi durumuna ve daha önce antifungal tedavi alıp almadığına göre farklılık göstermektedir. Kırk beş ülkede 200’den fazla tıp merkezinin katıldığı SENTRY çalışmasında Latin Amerika dışındaki bölgelerde albicans dışı en sık izole edilen tür *C. glabrata* olmuştur. Latin Amerika’da ise *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* olarak bildirilmiştir (86). Ülkemizden Çalgın ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kandidemi etkenlerinden en sık *C. parapsilosis* (%43) izole ettiklerini bunu *C. albicans* (%32,5) ve *C. tropicalis* (%12,2)’in takip ettiğini bildirmişlerdir (108). Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada Sütçü ve arkadaşları invaziv kandidiyazisli çocuk hastalarda *Candida* türlerinin dağılımını incelemişlerdir. En sık olarak sırasıyla *C. albicans* (%50) ardından sırasıyla *C. parapsilosis* (%24), *C. tropicalis* (%11,1), *C. glabrata* (%5,6), *C. lusitaniae* (%3,7) ve *Candida spp.* (%5,6) şeklinde bildirilmiştir (109). Hancı ve arkadaşlarının yaptığı tek merkezli çalışmada kandidemi olgularında tür dağılımına bakıldığında en yaygın *C. parapsilosis* (%59,7) tespit edilmiş ardından sırasıyla *C. albicans* (%19,8), *C. tropicalis* (%8,2), *C. glabrata* (%7,1) ve *C. krusei* (%1,9) izole edildiği ifade edilmiştir (104). Bizim çalışmamızda irdelediğimiz 2016-2021

yıllarını kapsayan altı yıllık sürede hastanemizde 506 kandidemi olgusu saptanmıştır. Tez kapsamında laboratuvarımız kültür koleksiyonunda bulunan altı yıllık süreyi kapsayan toplam 115 *C. parapsilosis* kompleks izolatı stoklardan uygun şekilde çıkarılarak canlandırılabilir. Yaptığımız çalışmada 01.01.2016- 01.01.2022 tarihleri arasında kapsayan sürede kandidemi etkenlerinin dağılımına bakıldığında 170'i (%33,5) *C. albicans*, 167'si (%33,0) *C. parapsilosis* kompleks, 67'si (%13,2) *C. glabrata*, 37'si (%7,3) *C. tropicalis*, 19'u (%3,7) *Candida spp.*, 18'i (%3,5) *C. kefyr*, 7'si (%1,3) *C. krusei*, 6'sı (%1,1) *C. lusitanae*, 6'sı (%1,1) *C. guilliermondii*, 5'i (%0,9) *C. dubliniensis*, 2'si (%0,3) *C. inconspicua*, 1'i (%0,1) *C. parakrusei* ve 1'i (%0,1) *C. pelliculosa* olduğu tespit edilmiştir. Merkezimizdeki albicans dışı en sık kandidemi etkeni SENTRY çalışmasının Latin Amerika verileri ve ülkemizden Sütçü ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma ile uyumlu şekilde *C. parapsilosis* kompleks olarak tespit edilmiştir.

Candida parapsilosis izolatları özellikle hiperalimentasyon sıvıları ve damar içi cihazlar ile bulaşması, çocuk yoğun bakım ünitesindeki hastalarda salgınlara neden olmasıyla dikkat çekmektedir. Yenidoğanlarda kandidemi salgınlarının %30'undan sorumlu olan *C. parapsilosis* izolatlarına bağlı enfeksiyonların sıklığı yaşla birlikte azalış gösterme eğiliminde olduğu ifade edilmiştir (109). Bizim çalışmamızda ise hastaların yalnızca dokuzu (%7,82) 18 yaş ve altında iken 25'i (%21,7) 55-64 yaş arası, 24'ü (%20,8) 65-74 yaş arası olarak belirlendi. Merkezimizin organ nakli ve onkoloji hastalarının yoğunlukta olduğu üçüncü basamak bir üniversite hastanesi olması, *C. parapsilosis* kompleks izolatlarındaki yaş dağılımının görülmesinin muhtemel sebebi olabilir. Bununla birlikte 29 ülkenin katıldığı ARTEMİS çalışmasında bizim çalışmamız ile uyumlu olarak *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının neden olduğu kandidemde medyan yaş aralığının 40 ile 49 yaş arasında olduğu ve hastaların %30,5'inin 60 yaş üstünde olduğu raporlanmıştır. Ayrıca aynı çalışmada *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* sıklığında bölgesel ve coğrafi farklılıkların önemli olmasına rağmen bu iki türün genel olarak *C. parapsilosis* kompleks izolatlarına bağlı enfeksiyonların %10'undan daha azını oluşturduğunu belirtmişlerdir (110).

Candida türleri invaziv olmayan yüzeysel enfeksiyonlardan, derin dokuları tutan sistemik enfeksiyonlara kadar geniş hastalık spektrumuna neden olabilmektedir. Yüzeysel kandidozlarda özellikle ağız boşluğu, farinks, özofagus, kolon, mesane ve vajende tutulum görülmektedir. Derin kandidozlarda ise enfeksiyon böbrek, karaciğer,

dalak, beyin, kalp ve gözlerde karşımıza çıkmaktadır. *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının sebep olduğu enfeksiyonlar özellikle protez cihazlar ve kateterle ilişkili olarak hastane içinde yayılım göstermektedir. Bizim çalışmamız kapsamındaki izolatların tamamı ise hastaların kan dolaşımı enfeksiyonlarından izole edilmiştir.

Candida parapsilosis izolatlarının bir tür kompleksini temsil ettiğine dair çalışma 2005 yılında Tavanti ve arkadaşları tarafından multilokus sekans tiplemesi yöntemiyle yapılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre *C. parapsilosis* kompleks üç farklı türe ayrılmıştır: eskiden grup I adıyla bilinen *C. parapsilosis sensu stricto*, grup II adıyla bilinen *C. orthopsilosis* ve grup III adıyla bilinen *C. metapsilosis* olarak yeniden isimlendirilmiştir. Ardından ilk kez bir *C. orthopsilosis* suşunun tam genom dizisi, yüksek derecede homozigot bir izolattan rapor edilmiştir. Bununla birlikte daha sonrasında Amerika Birleşik Devletleri ve Singapur'dan elde edilen ek klinik suşların dizilenmesiyle bu türde melez genomların varlığının da altı çizilmiştir (1). Bizim çalışmamızda *C. parapsilosis* kompleks türlerinin ayrımında hızlı, kolay uygulanabilir, az maliyet gerektiren bir yöntem olması nedeniyle sık kullanılan PCR-RFLP tercih edilmiştir. Bu amaçla SADH genine RFLP yöntemi uygulanmıştır. Tez kapsamında dahil edilen 115 *C. parapsilosis* izolatının 113'ü bu yöntemle *C. parapsilosis sensu stricto* olarak başarıyla belirlenmiştir. Bu yöntemle alt tür tayini yapılamayan iki izolata dizi analizi yapılmış olup; birinin *C. orthopsilosis*, diğerinin *C. tropicalis* olduğu saptanmıştır. *Candida* izolatlarının MALDI-TOF MS ile tanımlanmasının hızlı ve güvenilir olması sebebiyle klinik laboratuvarlarda gideren yaygınlaştığı bilinmektedir. Bununla birlikte çalışmalarda albicans dışı *Candida* türlerinde MALDI-TOF MS ile doğru tanımlamanın %95,4- %96,1 arasında değiştiği gösterilmiştir (111, 112). Bizim çalışmamızla uyumlu olarak 135 merkezden 2548 *C. parapsilosis* kompleks izolatının dahil edildiği SENTRY çalışmasında izolatların %95,5'inin *C. parapsilosis sensu stricto* olduğu raporlanmıştır. Bu çalışmada izolatların %3,2'si *C. orthopsilosis* ve %1,3'ü *C. metapsilosis* olarak tanımlanmıştır (86). Lockhart ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 29 ülkeden 89 çalışma merkezinin 2001 ve 2006 yılları arasında katıldığı yaklaşık 1976 *C. parapsilosis* izolatının dahil edildiği ARTEMIS çalışmasının izolatları kullanılmıştır. Bu çalışmada da bizim çalışmamızla uyumlu olarak *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının tür ayrımında SADH geninin RFLP ile incelenmesi sonucu izolatların %91,3'ü *C. parapsilosis sensu stricto*, %6,1'i *C. orthopsilosis* ve %1,8'i *C. metapsilosis* olarak tespit edilmiştir. Çalışmada bölgelere ve ülkelere göre kompleks

türlerinin sıklığında farklılıklar olduğu gözlenmiş Asya'da *C. orthopsilosis*'in en sık (%11) iken ABD'de bu sıklığın %4.9 olduğu raporlanmıştır (110).

Candida parapsilosis kompleks izolatlarının neden olduğu önemli endişe kaynaklarından biri azol ve ekinokandin duyarlılığının azaldığını bildiren son raporlardır (113, 114). Bununla birlikte kompleks türleri arasında da antifungal duyarlılıklarında farklılıklar gözlemlendiği bildirilmiştir. ARTEMIS çalışmasında *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis* izolatları için belirlenen amfoterisin B ve ekinokandin MİK değerlerinin *C. parapsilosis sensu stricto* izolatlarına göre daha düşük olduğu ifade edilmiştir. Aynı çalışmada flukonazol MİK değerleri benzer şekilde *C. parapsilosis sensu stricto* izolatlarında kompleks içinde yer alan diğer iki gruba göre daha yüksek olarak tespit edilmiş ancak çalışmadaki tüm *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının flukonazole duyarlı olduğu görülmüştür (110). Tavanti ve arkadaşları tarafından İtalya'dan 27 *C. orthopsilosis* izolatıyla yapılan bir çalışmada ise flukonazol için ortalama MİK değerleri (5.89 µg/ml), ARTEMIS çalışmasına göre (2.1 µg/ml) daha yüksek olarak raporlanmıştır. Aynı çalışmada ortalama MİK değerleri amfoterisin B için 0.045 µg/ml ve kaspofungin için 0.18 µg/ml olarak bildirmiştir (30). Bizim çalışmamızda flukonazol direnci %14,7 olarak saptanmıştır. Yalnızca bir izolatımız *C. orthopsilosis* idi ve flukonazol MİK değeri 0,75 olarak ölçüldü. *C. parapsilosis* kompleks izolatlarında tanımlanan antifungal duyarlılıktaki farklılıkların kategorik farklılıklar olmadığını, dolayısıyla kompleks içindeki türlerin rutin laboratuvar pratiğinde ayrımının klinik laboratuvarlar için zaruri olmadığını düşünmekteyiz.

Literatürde *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının neden olduğu pek çok salgın karşımıza çıkmaktadır. Corzo-Leon ve arkadaşlarının Meksika'da 2014-2016 yılları arasında yaptığı çalışmada 28 hastada *C. parapsilosis* nedeni invaziv kandidiyazis tespit edildiği ifade edilmiştir. Çalışmada izolatların %54'ünün (15/28) flukonazole dirençli olduğu bunların yedisinde Y132F mutasyonu olduğu belirlenmiş ve *microsatellite genotyping* yöntemi ile klonal olarak ilişkili olarak tespit ettikleri azole dirençli *C. parapsilosis* salgını olarak raporlanmıştır. (115). Arastehfar ve arkadaşları tarafından 2019-2020 yılları arasında Ege Üniversitesi Hastanesi'nde 47 hastayı etkileyen flukonazol dirençli *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının neden olduğu kandidemi salgını raporlanmıştır. İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin araştırılmasında *multilocus microsatellite typing* yöntemi kullanılmıştır. Çalışmada salgının mortalite oranı ise %27,6 olarak hesaplanmıştır (116). *Candida parapsilosis* kompleks

izolatlarının neden olduğu salgınların gösterilmesinde AP-PCR, PFGE- EK, PFGE-REA, *microsatellit genotyping* yöntemlerinin sıkça kullanıldığı rapor edilmiştir (117). Qi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Çin’de 16 yenidoğanın etkilendiğı *C. parapsilosis sensu stricto* fungemisi bildirilmiştir. Aynı çalışmada çevresel kontaminasyonu gösterebilmek adına yer silme bezi, musluk, lavabo, ameliyat masası, banyodaki su birikintileri, vantilatör ve ultrason probu gibi 313 çevre örneğı alınarak içlerinden *C. parapsilosis sensu stricto* üreyen 17 örnek incelenmiştir. Kan dolaşımı ve sürveyans örneklerinden elde edilen tüm *Candida parapsilosis sensu stricto* izolatları RAPD PCR yöntemi ile analiz edilmiş ve tamamının band paternlerinin aynı olduğu görülmüştür. Araştırmacılar salgının tespitinden sonra bir dizi enfeksiyon kontrol önleminin ardından salgının kontrol altına alındığını ifade etmişlerdir (118).

Candida parapsilosis kompleks izolatlarının klonal ilişkilerinin belirlenmesinde ideal bir yöntem henüz bulunmamaktadır. Kullanılan yöntemlerin kendi içinde avantajları ve dezavantajları mevcuttur. *C. parapsilosis* kompleks izolatları için AP-PCR, PFGE- EK, PFGE-REA, *microsatellit genotyping* gibi birçok yöntem kullanılabilmesine karşın henüz altın standart denebilecek standardize edilmiş bir yöntem belirlenememiştir. Bu yöntemlerin başarısı ayırım gücü, tekrarlanabilirliği, kullanım kolaylığı, yorumlama kolaylığı, testin süresi gibi faktörlere bağlıdır. Bununla birlikte epidemiyolojik çalışmalar için birden fazla yöntemin birlikte kullanılması da önerilebilmektedir. Bizim çalışmamızda *C. parapsilosis* izolatları arası klonal ilişkileri araştırmak için AP-PCR, PFGE-REA, PFGE-EK yöntemleri kullanılmıştır.

İzolatlar arasındaki klonal ilişkileri belirlemek için sıkça kullanılan yöntemlerden biri olan AP-PCR tekniğinde mikroorganizmanın DNA’sı, 9-10 bp’lik kısa bir veya daha fazla primerle rastgele çoğaltılır. Sonrasında ortaya çıkan patern farklılıkları değerlendirilir. *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının tiplendirilmesinde AP-PCR yöntemi kolay uygulanabilmesi, sonuç alınma süresinin kısa olması, maliyetinin az olması gibi diğer yöntemlere göre avantajlı özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir (119). Bu yöntemde ayırım gücü kullanılan primerlere göre değişmektedir. Yapılan çalışmalarda *C. parapsilosis* kompleks izolatları için M13, OPA09-OPB11, PAO3, T3B, RP-2, OPC-02, OPC-05, OPC-07, OPC-09, OPC-12, OPC-14, OPC-16, OPC-18, OPC-20, OPD-12, OPE-17, OPG-07, OPG-19, OPH-18, OPK-04, OPM-18, OPR-15, OPW-17, UBC 8, UBC 18 ve UBC 66 primerlerinin kullanıldığı görülmektedir (117). Bizim çalışmamızda *C. parapsilosis* kompleks izolatlarını tiplendirmek için daha

öncesinde *Candida* türleri için ayırım gücü yüksek olduğu bildirilen M13 primeri kullanılmıştır (120). AP-PCR yöntemi klonal ilişkileri belirlemenin yanında *Candida* türlerinin tanımlanması için de önemli bir araç olarak görülmektedir (121). Fakat aynı türün suşları arasında çok az farklılık göstermesi *C. parapsilosis* kompleks suşlarında intraspesifik polimorfizmi tespit edebilen primerleri tanımlamanın zor olduğunu göstermektedir (122). Salazar ve arkadaşlarının 11 *C. parapsilosis* izolatu arasındaki klonal ilişkiyi M13, AP3, T3B ve R108 primerlerini kullanarak RAPD yöntemiyle araştırdıkları çalışmada aynı hastanenin iki farklı servisinden izole edilen izolatların iki farklı klona ayrıldığını raporlamışlardır. Araştırmacılar aynı çalışmada grup I'in invaziv kandidiyazis ile ilişkili beş izolattan oluştuğunu, grup II'nin mukokutanöz kandidiyazis ile ilişkili altı izolattan oluştuğunu ifade etmişlerdir (123).

Çalışmamızda 115 *C. parapsilosis* kompleks izolatu AP-PCR yöntemi ile 34 farklı genotip tespit edilmiştir ve izolatlar 15 farklı küme içerisinde toplanmıştır (optimizasyon 3.0, tolerans 1.0, cutoff %95). En büyük küme 16 izolatın yer aldığı genotip 18 kümesi olup, izolatların kümeleşme oranı %83,4 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin ayırım gücü $D=0.9393$ olarak hesaplanmıştır. AP-PCR yöntemiyle *unique* izolat olarak belirlenen 1, 2, 3, 4, 12, 37, 67, 68, 69, 74, 90 ve 109 numaralı izolatların PFGE-EK yöntemiyle de hiçbir küme içerisinde yer almamasının yöntemin ayırım gücünü gösterdiğini düşünüyoruz. Çalışmamız kapsamındaki altı hastaya ait ikişer izolatın AP-PCR ile klonal ilişkilerine bakıldığında tüm hastaların tekrarlayan izolatlarının ilk izolatu ile aynı kümeye dahil olduğu görülmüştür. Bunun yanında çalışmamızda dizi analiziyle *C. tropicalis* olarak tanımlanan 4 numaralı izolatın bu yöntem ile *unique* izolat olarak diğerlerinden ayrılmıştır. Fakat çalışmamızdaki tek *C. orthopsilosis* izolatu olan 42 numaralı izolatın AP-PCR yöntemi ile genotip 6 kümesinin içinde yer alması dolayısıyla *C. parapsilosis sensu stricto* izolatlarından ayırımının bu yöntemle yapılamadığı görülmüştür.

Çalışmamız kapsamındaki izolatların klonal ilişkisini araştırmak için ikinci yöntem olarak PFGE-REA yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde organizmanın tüm genomu restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesildiğinden bu yöntem *macrorestriction mapping* olarak da adlandırılmaktadır. Bu yöntemin başarısı kullanılan restriksiyon endonükleaz enziminden etkilenmekte olup *C. parapsilosis* kompleks için en sık BssHII, SfiI ve EcoRI enzimleri kullanıldığı bildirilmiştir (124). Branchini ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 31 *C. parapsilosis* izolatu arasındaki klonal ilişki

PFGE-EK, PFGE-REA yöntemleriyle araştırılmıştır. Araştırmacılar, BssHII enziminin SfiI'e göre daha güçlü diskriminasyon yaptığını raporlamışlardır. Aynı çalışmada 31 *C. parapsilosis* izolatı BssHII enzimi kullanılarak gerçekleştirilen PFGE-REA yöntemi ile dört farklı genotip saptamışlardır (125). Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 97 *C. parapsilosis* izolatı BssHII restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak yapılan PFGE-REA yönteminde 83 farklı genotipe ayrılmış, yöntemin ayırım gücü 0,99 olarak raporlanmıştır. Aynı çalışmada yöntemin dendogram analizinin optimizasyon 3.0, tolerans 1.0 kabul edilerek uygulandığı bildirilmiştir (126).

Bizim çalışmamızda da daha iyi diskriminasyon elde edebilmek için PFGE-REA yönteminde BssHII restriksiyon endonükleaz enzimi tercih edilmiştir. İzolatlar arasındaki klonal ilişkiler PFGE-REA yöntemi ile araştırıldığında 39 farklı genotip tespit edilmiş ve izolatların 20 küme içerisinde toplandığı görülmüştür (optimizasyon 3.0, tolerans 1.0, cutoff %95). En büyük küme; 18 izolatın yer aldığı genotip 1 kümesi olup, izolatların kümeleşme oranı %83,4 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin ayırım gücü $D=0,9492$ olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda altı hastaya ait tekrarlayan izolatların PFGE-REA ile klonal ilişkilerine bakıldığında üç hastanın tekrarlayan izolatlarının ilk izolatları ile aynı kümede yer aldığı fakat üç hastanın tekrarlayan izolatlarının ilk izolatlarından farklı band paternlerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte çalışmamızda dizi analiziyle *C. tropicalis* olarak tanımlanan 4 numaralı izolatın AP-PCR yönteminde olduğu gibi PFGE-REA ile de *unique* izolat olarak diğerlerinden ayrıldığı görülmüştür. PFGE-REA yöntemi ile *C. orthopsilosis* izolatı olan 42 numaralı izolatın genotip 1 kümesi içinde yer aldığı görülmüş dolayısıyla yöntemin *C. parapsilosis* kompleks alt türleri arasında diskriminasyonu sağlayamadığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda bir diğer moleküler tiplendirme yöntemi olarak kullanılan elektroforetik karyotiplendirme yöntemi ile elli kb üzerindeki DNA parçaları PFGE sistemi ile genetik olarak ayrılabilir. Suşlar arasındaki tek bir band farklılığı dahi suşların birbirinden tamamen farklı olduğunu göstermektedir (127). Çalışmamızda izolatlar arasındaki klonal ilişkiler PFGE-EK yöntemi ile araştırıldığında 69 farklı genotip tespit edilmiş ve izolatların 25 küme içerisinde toplandığı görülmüştür (optimizasyon 3.0, tolerans 1.0, cutoff %95). En büyük küme; yedi izolatın yer aldığı genotip 1 kümesi olup, izolatların kümeleşme oranı %60,8 olarak hesaplanmıştır. Yöntemin ayırım gücü $D=0,9875$ olarak hesaplanmıştır. Bizim verilerimizi destekleyecek şekilde, Branchini ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 31 *C. parapsilosis*

izolatı arasındaki klonal ilişkileri PFGE-EK yöntemiyle araştırdıklarında bu yöntem ile izolatların 11 farklı genotipe ayrıldığını ve yöntemin ayırım gücünün yüksek olduğunu raporlamışlardır (125). Bununla birlikte çalışmamıza dahil edilen altı hastaya ait tekrarlayan izolatlar incelendiğinde üç hastanın tekrarlayan izolatlarının PFGE-EK yöntemi ile farklı genotiplerde olduğu görülmüştür. Literatürde EK'nin *C. parapsilosis*'in neden olduğu kalıcı veya tekrarlayan fungeminin araştırılmasında yararlı olduğunu gösterilmiştir (124, 128, 129). Shin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *C. parapsilosis*'e bağlı tekrarlayan fungemi atakları olan 17 hastadan alınan kan dolaşımı enfeksiyonları EK yöntemiyle araştırılmış ve tekrarlayan enfeksiyonların genellikle ikinci bir suşla yeniden enfeksiyon sebebiyle meydana geldiğini ifade etmişlerdir (129). Bizim çalışmamızda da PFGE-EK sonuçlarına göre üç hastada tekrarlayan kandidemi atağının ikinci bir *C. parapsilosis* suşuyla yeniden enfeksiyon nedeniyle meydana geldiğini düşünüyoruz. PFGE-EK yöntemiyle dizi analizi ile *C. tropicalis* olduğu belirlenen dört numaralı izolatın ve *C. orthopsilosis* olduğu belirlenen 42 numaralı izolatın da *unique* olduğunun görülmesi yöntemin ayırım gücünün yüksek olduğunu destekleyen veriler olarak karşımıza çıkmıştır.

Çalışmamızda MALDI-TOF MS sonucu *C. parapsilosis* kompleks olan fakat dizi analiziyle *C. tropicalis* olduğu belirlenen dört numaralı izolatın her üç yöntemde de *unique* izolat olarak karşımıza çıktığı görülmüştür. Bu durum her üç yöntemin de tür düzeyinde ayırım gücünü göstermesi yönüyle önemli olduğu düşünülmüştür. Diğer yandan dizi analiziyle *C. orthopsilosis* olduğu doğrulanan 42 numaralı izolatı AP-PCR ve PFGE-REA yöntemlerinde sırasıyla genotip 6 ve genotip 1 kümelerine dahil olduğu görülmüştür. Bu durum PFGE-REA yönteminin *C. parapsilosis* kompleks alt türlerini ayırmada yetersiz olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bununla birlikte PFGE-EK yöntemiyle *C. orthopsilosis* izolatı hiçbir küme içerisinde yer almayan *unique* izolat olduğu belirlenmiştir. Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde çalışmamızda uyguladığımız üç farklı yöntem arasında ayırım gücü en yüksek yöntemin PFGE-EK olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda hastanemiz izolatları ile epidemiyolojik olarak ilişkili olmayan iki farklı şehirden beşer adet *C. parapsilosis* kompleks izolatının klonal ilişkileri PFGE-EK yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde farklı illerden ve epidemiyolojik olarak ilişki kurulamayan izolatların birbiriyle kümeleşmediği

görülmüştür. Sonuçlarımız epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatları belirlemede PFGE-EK yönteminin ayırım gücünün yüksek olduğunu göstermektedir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; hastanemizde 2016-2022 tarihleri arasında kan kültürü pozitiflikleri içerisinde kandidemi oranının %23,4 olduğu görülmüştür. Kandidemi etkenlerinin 170'inin (%33,5) *C. albicans*, 167'sinin (%33,0) *C. parapsilosis* kompleks, 67'si (%13,2) *C. glabrata*, 37'sinin (%7,3) *C. tropicalis*, 19'unun (%3,7) *Candida spp.*, 18'inin (%3,5) *C. keyfr*, 7'sinin (%1,3) *C. krusei*, 6'sının (%1,1) *C. lusitaniae*, 6'sının (%1,1) *C. guillermoidii*, 5'inin (%0,9) *C. dubliniensis*, 2'sinin (%0,3) *C. inconspicua*, 1'inin (%0,1) *C. parakrusei* ve 1'inin (%0,1) *C. pelliculosa* olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre hastanemizde kandidemi etkenlerinden en sık *C. albicans*, ikinci en sık *C. parapsilosis* olduğu belirlenmiştir. İzolatların %85,3'ünün flukonazol duyarlı olduğu görülmüştür. Çalışmamızda *C. parapsilosis* alt türleri PCR-RFLP yöntemiyle araştırılmış, 113 izolatın *C. parapsilosis sensu stricto* olduğu saptanmıştır. İki izolatta bu yöntem ile alt tür tayini yapılamamıştır. Dizi analizi ile izolatların birinin *C. tropicalis*, diğerinin *C. orthopsilosis* olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda *C. parapsilosis* kompleks izolatlarının AP-PCR ile 15 küme, 34 farklı genotipe ayrıldığı, kümeleşme oranının %83,4 olduğu; PFGE-REA ile 20 küme, 39 farklı genotipe ayrıldığı, kümeleşme oranının %83,4 olduğu; PFGE-EK ile 25 küme, 69 farklı genotipe ayrıldığı görülmüştür. Yöntemlerin ayırım gücü AP-PCR için $D=0.9393$, PFGE-REA için $D=0.9492$, PFGE-EK için $D=0.9875$ olarak belirlenmiştir. *C. parapsilosis* için klasik epidemiyolojik veriler göz önüne alındığında çalışmamızdaki her üç yöntemin de kullanışlı ayırım gücü yeterli yöntemler olduğu görülmektedir. Bununla birlikte çalışmamızda PFGE-EK metodu ile daha fazla genotip belirlenmiş en iyi yöntem PFGE-EK olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre;

- *C. parapsilosis* izolatları arasındaki klonal ilişkiler araştırılmadan önce alt türlerin belirlenmesinin yararlı olacağı,
- *C. parapsilosis* izolatları arasındaki klonal ilişkilerin araştırılmasında en az iki yöntemin birlikte kullanılmasının faydalı olacağı,
- Hiçbir genotiplendirme yönteminin klasik epidemiyolojik veriler olmadan yorumlanmaması gerektiği görüşündeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD, et al. *Candida parapsilosis*: from genes to the bedside. *Clinical microbiology reviews*. 2019;32(2):e00111-18.
2. Martin DS, Jones CP. Further studies on the practical classification of the *Monilias*. *Journal of Bacteriology*. 1940;39(5):609-30.
3. Scherer S, Magee PT. Genetics of *Candida albicans*. *Microbiological reviews*. 1990;54(3):226-41.
4. Ledermann W. [Brief history of *Candida*, white but not so much]. *Revista chilena de infectologia : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*. 2017;34(5):429-30.
5. YÜCEL A. TIP MİKROLOJİSİNİN DONÜ VE BUGÜNÜ. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*.30(2):191-8.
6. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(1):133-63.
7. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(1):284-92.
8. Weems JJ, Jr. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1992;14(3):756-66.
9. Conn NK, Crean G, Maccabe A, Maclean N. Systemic candidiasis and endocarditis due to *C. tropicalis*. *British Medical Journal*. 1959;1(5127):944.
10. Joachim H, Polayes SH. Subacute endocarditis and systemic mycosis (monilia). *Journal of the American Medical Association*. 1940;115(3):205-8.
11. Tamo SB. *Candida* Infections: Clinical Features, Diagnosis and Treatment. *Infectious Diseases and Clinical Microbiology*. 2020;2(2):91-103.
12. Pammi M, Holland L, Butler G, Gacser A, Bliss JM. *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. *The Pediatric infectious disease journal*. 2013;32(5):e206.
13. Navarro-Arias MJ, Pérez-García LA, Mellado-Mojica E, López MG, Csonka K, Gacser A, et al. Members of the *Candida parapsilosis* complex and *Candida albicans* are differentially recognized by human peripheral blood mononuclear cells. *Frontiers in microbiology*. 2016;6:1527.
14. Zervos MJ, Vazquez JA. DNA analysis in the study of fungal infections in the immunocompromised host. *Clinics in laboratory medicine*. 1996;16(1):73-88.
15. Nosek J, Tomáška Lur, Rycovská A, Fukuhara H. Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen *Candida parapsilosis*. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(4):1283-9.
16. Rycovska A, Valach M, Tomaska L, Bolotin-Fukuhara M, Nosek J. Linear versus circular mitochondrial genomes: intraspecies variability of mitochondrial genome architecture in *Candida parapsilosis*. *Microbiology*. 2004;150(5):1571-80.
17. Guarro J, GenéJ, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(3):454-500.
18. Sabino R, Sampaio P, Carneiro C, Rosado L, Pais C. Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. *BMC microbiology*. 2011;11:180.

19. Németh T, Tóth A, Szenzenstein J, Horváth P, Nosanchuk JD, Grózer Z, et al. Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis* sensu lato species. *PloS one*. 2013;8(7):e68704.
20. Gago S, García-Rodas R, Cuesta I, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. *Virulence*. 2014;5(2):278-85.
21. Laffey SF, Butler G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology (Reading, England)*. 2005;151(Pt 4):1073-81.
22. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(4):606-25.
23. Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*. 2009;459(7247):657-62.
24. Pryszcz LP, Németh T, Saus E, Ksiezopolska E, Hegedúsová E, Nosek J, et al. The genomic aftermath of hybridization in the opportunistic pathogen *Candida metapsilosis*. *PLoS genetics*. 2015;11(10):e1005626.
25. Riccombeni A, Vidanes G, Proux-Wéra E, Wolfe KH, Butler G. Sequence and analysis of the genome of the pathogenic yeast *Candida orthopsilosis*. *PloS one*. 2012;7(4):e35750.
26. Gunisova S, Elboher E, Nosek J, Gorkovoy V, Brown Y, Lucier J-F, et al. Identification and comparative analysis of telomerase RNAs from *Candida* species reveal conservation of functional elements. *Rna*. 2009;15(4):546-59.
27. Haber JE. Mating-Type Genes and MAT Switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2012;191(1):33-64.
28. Sai S, Holland LM, McGee CF, Lynch DB, Butler G. Evolution of mating within the *Candida parapsilosis* species group. *Eukaryotic cell*. 2011;10(4):578-87.
29. Logue ME, Wong S, Wolfe KH, Butler G. A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a defective MTL a 1 allele at its mating type locus. *Eukaryotic cell*. 2005;4(6):1009-17.
30. Tavanti A, Hensgens LA, 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 microbiology*. 2010;10(1):1-11.
31. Lasker BA, Butler G, Lott TJ. Molecular genotyping of *Candida parapsilosis* group I clinical isolates by analysis of polymorphic microsatellite markers. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(3):750-9.
32. Fell J, Meyer SA. Systematics of yeast species in the *Candida parapsilosis* group. *Mycopathologia et mycologia applicata*. 1967;32(3):177-93.
33. Clark TA, Slavinski SA, Morgan J, Lott T, Arthington-Skaggs BA, Brandt ME, et al. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(10):4468-72.
34. Chow BD, Linden JR, Bliss JM. *Candida parapsilosis* and the neonate: epidemiology, virulence and host defense in a unique patient setting. *Expert review of anti-infective therapy*. 2012;10(8):935-46.
35. Kohler J, Casadevall A, Perfect J. The spectrum of fungi that infects humans. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 5: a019273.
36. Clerihew L, Lamagni T, Brocklehurst P, McGuire W. *Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*. 2007;92(2):F127-F9.

37. Fridkin SK, Kaufman D, Edwards JR, Shetty S, Horan T, Hospitals NNIS. Changing incidence of *Candida* bloodstream infections among NICU patients in the United States: 1995–2004. *Pediatrics*. 2006;117(5):1680-7.
38. Messer SA, Jones RN, Fritsche TR. International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(5):1782-7.
39. Pérez-García LA, Csonka K, Flores-Carreón A, Mellado-Mojica E, Németh T, López-Ramírez LA, et al. Role of protein glycosylation in *Candida parapsilosis* cell wall integrity and host interaction. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:306.
40. Kozik A, Karkowska-Kuleta J, Zajac D, Bochenska O, Kedracka-Krok S, Jankowska U, et al. Fibronectin-, vitronectin- and laminin-binding proteins at the cell walls of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* pathogenic yeasts. *BMC microbiology*. 2015;15(1):1-15.
41. Serrano-Fujarte I, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M. Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. *Microbial pathogenesis*. 2016;90:22-33.
42. Lee P, Gam L, Yong V, Rosli R, Ng K, Chong P. Identification of immunogenic proteins of *Candida parapsilosis* by serological proteome analysis. *Journal of applied microbiology*. 2014;116(4):999-1009.
43. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends in microbiology*. 2011;19(5):241-7.
44. Laffey SF, Butler G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*. 2005;151(4):1073-81.
45. Gácsér A, Schäfer W, Nosanchuk JS, Salomon S, Nosanchuk JD. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. *Fungal Genetics and Biology*. 2007;44(12):1336-41.
46. Silva S, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J, Malic S, Hooper SJ, et al. Characterization of *Candida parapsilosis* infection of an in vitro reconstituted human oral epithelium. *European journal of oral sciences*. 2009;117(6):669-75.
47. Nguyen LN, Gacsér A, Nosanchuk JD. The stearyl-coenzyme A desaturase 1 is essential for virulence and membrane stress in *Candida parapsilosis* through unsaturated fatty acid production. *Infection and immunity*. 2011;79(1):136-45.
48. Marodi L, Korchak H, Johnston R. Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *The Journal of Immunology*. 1991;146(8):2783-9.
49. van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Critical reviews in microbiology*. 2009;35(4):283-309.
50. Aybay C, Imir T. Tumor necrosis factor (TNF) induction from monocyte/macrophages by *Candida* species. *Immunobiology*. 1996;196(4):363-74.
51. Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, Van De Vosse E, Velez Edwards DR, Smith PB, et al. Toll-like receptor 1 polymorphisms increase susceptibility to candidemia. *Journal of Infectious Diseases*. 2012;205(6):934-43.
52. Smeeckens SP, van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, Netea MG. Genetic susceptibility to *Candida* infections. *EMBO molecular medicine*. 2013;5(6):805-13.
53. Plantinga TS, Johnson MD, Scott WK, Joosten LA, Van Der Meer JW, Perfect JR, et al. Human genetic susceptibility to *Candida* infections. *Medical mycology*. 2012;50(8):785-94.

54. Speakman EA, Dambuza IM, Salazar F, Brown GD. T cell antifungal immunity and the role of C-type lectin receptors. *Trends in immunology*. 2020;41(1):61-76.
55. Pfeiffer CD, Samsa GP, Schell WA, Reller LB, Perfect JR, Alexander BD. Quantitation of *Candida* CFU in initial positive blood cultures. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(8):2879-83.
56. Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing invasive candidiasis. *Journal of clinical microbiology*. 2018;56(5):e01909-17.
57. Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clinical infectious diseases*. 2013;56(9):1284-92.
58. Ener B. *Candida* infeksiyonlarında epidemiyoloji ve laboratuvar tani. *Ankem Derg*. 2008;22:264-9.
59. Richardson MD, Warnock DW. *Fungal infection: diagnosis and management*: John Wiley & Sons; 2012.
60. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 2018.
61. McGinnis MR. *Laboratory handbook of medical mycology*: Elsevier; 2012.
62. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of clinical microbiology: Volume 1*: ASM press; 2006.
63. Aslanzadeh J, Roberts GD. Direct microscopic examination of clinical specimens for the laboratory diagnosis of fungal infections. *Clinical Microbiology Newsletter*. 1991;13(24):185-8.
64. Madhavan P, Jamal F, Chong PP. Laboratory isolation and identification of *Candida* species. *Journal of applied Sciences*. 2011;11(16):2870-7.
65. Pincus D, Orenga S, Chatellier S. Yeast identification—past, present, and future methods. *Medical mycology*. 2007;45(2):97-121.
66. Quindos G, San Millan R, Robert R, Bernard C, Ponton J. Evaluation of Bichro-latex albicans, a new method for rapid identification of *Candida albicans*. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(5):1263-5.
67. Fraser M, Borman AM, Johnson EM. Evaluation of the commercial rapid trehalose test (GLABRATA RTT) for the point of isolation identification of *Candida glabrata* isolates in primary cultures. *Mycopathologia*. 2012;173(4):259-64.
68. Brun S, Bouchara J-P, Chabasse D. Diagnostic au laboratoire des mycoses profondes. *Revue française des laboratoires*. 2004;2004(359):33-8.
69. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Critical care*. 2010;14(6):1-14.
70. Yaman G, Akyar I, Can S. Evaluation of the MALDI TOF-MS method for identification of *Candida* strains isolated from blood cultures. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2012;73(1):65-7.
71. Hendrickx M, Goffinet J-S, Swinne D, Detandt M. Screening of strains of the *Candida parapsilosis* group of the BCCM/IHEM collection by MALDI-TOF MS. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2011;70(4):544-8.
72. Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011;17(9):1359-65.
73. Chao Q-T, Lee T-F, Teng S-H, Peng L-Y, Chen P-H, Teng L-J, et al. Comparison of the accuracy of two conventional phenotypic methods and two MALDI-

TOF MS systems with that of DNA sequencing analysis for correctly identifying clinically encountered yeasts. *PloS one*. 2014;9(10):e109376.

74. Monday LM, Parraga Acosta T, Alangaden G. T2Candida for the diagnosis and management of invasive candida infections. *Journal of Fungi*. 2021;7(3):178.

75. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: Ch. 8. In Vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

76. Romeo O, Scordino F, Pernice I, Passo CL, Criseo G. A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. *Journal of microbiological methods*. 2009;79(1):117-20.

77. Carvalho A, Costa-De-Oliveira S, Martins M, Pina-Vaz C, Rodrigues A, Ludovico P, et al. Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. *Medical Mycology*. 2007;45(7):619-27.

78. Mirhendi H, Bruun B, Schönheyder HC, Christensen JJ, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, 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. *Journal of medical microbiology*. 2010;59(4):414-20.

79. Dassanayake R, Samaranayake L. Characterization of the genetic diversity in superficial and systemic human isolates of *Candida parapsilosis* by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Apmis*. 2000;108(2):153-60.

80. Gil-Lamaignere C, Roilides E, Hacker J, Müller F-M. Molecular typing for fungi—a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clinical Microbiology and Infection*. 2003;9(3):172-85.

81. Schlötterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic acids research*. 1992;20(2):211-5.

82. Zhang L, Yu S-Y, Chen SC-A, Xiao M, Kong F, Wang H, et al. Molecular characterization of *Candida parapsilosis* by microsatellite typing and emergence of clonal antifungal drug resistant strains in a multicenter surveillance in China. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:1320.

83. Badali H, Rezaie S, Meis JF, Afshari SAK, Modiri M, Hagen F, et al. Microsatellite genotyping of clinical *Candida parapsilosis* isolates. *Current medical mycology*. 2017;3(4):15.

84. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W, EUCAST-AFST. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(7):E246-E7.

85. Lindberg E, Hammarström H, Ataollahy N, Kondori N. Species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-6.

86. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN, editors. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997–2016. *Open forum infectious diseases*; 2019: Oxford University Press US.

87. Sabatelli F, Patel R, Mann P, Mendrick C, Norris C, Hare R, et al. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(6):2009-15.

88. Thomaz DY, de Almeida Jr JN, Lima GME, Nunes MdO, Camargo CH, Grenfell RdC, et al. An azole-resistant *Candida parapsilosis* outbreak: clonal persistence

in the intensive care unit of a Brazilian teaching hospital. *Frontiers in microbiology*. 2018;2997.

89. Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara J-P, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(3):693-9.

90. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of clinical microbiology*. 1988;26(11):2465-6.

91. Mutters N. Laboratory automation in clinical microbiology: a quiet revolution. *Austin J Infect Dis*. 2014;1(1):2.

92. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(11):5088-90.

93. Brooks HJ. Modern microbiology—a quiet revolution with many benefits. *The Australasian Medical Journal*. 2013;6(7):378.

94. Silva JT, Ruiz-Camps I, Aguado JM. Invasive fungal infection over the last 30 years. *Revista iberoamericana de micologia*. 2021.

95. Caston-Osorio J, Rivero A, Torre-Cisneros J. Epidemiology of invasive fungal infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008;32:S103-S9.

96. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001–2010. *Emerging infectious diseases*. 2014;20(7):1149.

97. Hilmioğlu-Polat S, Seyedmousavi S, Ilkit M, Hedayati MT, Inci R, Tumbay E, et al. Estimated burden of serious human fungal diseases in Turkey. *Mycoses*. 2019;62(1):22-31.

98. von Lilienfeld-Toal M, Wagener J, Einsele H, Cornely OA, Kurzai O. Invasive fungal infection: new treatments to meet new challenges. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2019;116(16):271.

99. Kaur H, Chakrabarti A. Strategies to reduce mortality in adult and neonatal candidemia in developing countries. *Journal of Fungi*. 2017;3(3):41.

100. Arendrup MC, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, Knudsen JD, Lundgren B, et al. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(9):4434-40.

101. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *International journal of antimicrobial agents*. 2006;27(5):359-66.

102. Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Current opinion in critical care*. 2010;16(5):445-52.

103. Ulu Kilic A, Alp E, Cevahir F, Ture Z, Yozgat N. Epidemiology and cost implications of candidemia, a 6-year analysis from a developing country. *Mycoses*. 2017;60(3):198-203.

104. Hancı SY, Derici YK, Ağuş N, Yılmaz N, Bayram A, Koçyiğit S. Evaluation Of The Species Distribution And Antifungal Susceptibility Of Candida Bloodstream Isolates In a Tertiary Care Hospital In West Of Turkey. *The Medical Journal Of Haydarpaşa Numune Training and Research Hospital*. 55(2):107-15.

105. Brunetti G, Navazio AS, Giuliani A, Giordano A, Proli EM, Antonelli G, et al. Candida blood stream infections observed between 2011 and 2016 in a large Italian University Hospital: A time-based retrospective analysis on epidemiology, biofilm

- production, antifungal agents consumption and drug-susceptibility. *PloS one*. 2019;14(11):e0224678.
106. Pfaller M, Jones R, Messer S, Edmond M, Wenzel R. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1998;31(1):327-32.
 107. Lamothe F, Lockhart SR, Berkow EL, Calandra T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(suppl_1):i4-i13.
 108. Calgin MK, Cetinkol Y. Distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* species at a university hospital in Northern Turkey. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2018;12(02):97-101.
 109. Sütçü M, Acar M, Genç GE, Kökçü İ, Aktürk H, Atay G, et al. Evaluation of *Candida* species and antifungal susceptibilities among children with invasive candidiasis. *Turkish Archives of Pediatrics/Türk Pediatri Arşivi*. 2017;52(3):145.
 110. 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*. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(8):2659-64.
 111. Westblade LF, Jennemann R, Branda JA, Bythrow M, Ferraro MJ, Garner OB, et al. Multicenter study evaluating the Vitek MS system for identification of medically important yeasts. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(7):2267-72.
 112. Spampinato C, Leonardi D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *BioMed research international*. 2013;2013.
 113. Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, et al. 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. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(5):1681-5.
 114. Brito LR, Guimarães T, Nucci M, Rosas RC, Paula Almeida L, Da Matta DA, et al. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Medical Mycology*. 2006;44(3):261-6.
 115. Corzo-Leon DE, Peacock M, Rodriguez-Zulueta P, Salazar-Tamayo GJ, MacCallum DM. General hospital outbreak of invasive candidiasis due to azole-resistant *Candida parapsilosis* associated with an *Erg11 Y132F* mutation. *Medical Mycology*. 2021;59(7):664-71.
 116. Arastehfar A, Hilmioğlu-Polat S, Daneshnia F, Pan W, Hafez A, Fang W, et al. Clonal candidemia outbreak by *Candida parapsilosis* carrying Y132F in Turkey: Evolution of a persisting challenge. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11.
 117. Cano M, Perz J, Craig A, Liu M, Lyon G, Brandt M, et al. Candidemia in pediatric outpatients receiving home total parenteral nutrition. *Medical mycology*. 2005;43(3):219-25.
 118. Qi L, Fan W, Xia X, Yao L, Liu L, Zhao H, et al. Nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis sensu stricto* fungaemia in a neonatal intensive care unit in China. *Journal of Hospital Infection*. 2018;100(4):e246-e52.
 119. Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y, Kırdar S, Aydın N. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida* suşlarında antifungal duyarlılığın ve bazı virülans faktörlerinin araştırılması ve RAPD-PCR ile genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*. 2011;45(2):306-17.

120. Csutak O, Cîrpici I, Ionescu R, Stoica I, Vassu T. Anti-Candida Activity of *Kluyveromyces lactis* CMGB 226 from dairy products. *Innovative Romanian Food Biotechnology*. 2015;17:46.
121. Valério HM, Weikert-Oliveira RdCB, Resende MAd. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006;39:174-8.
122. Prandini THR, Theodoro RC, Bruder-Nascimento AC, Scheel CM, Bagagli E. Analysis of inteins in the *Candida parapsilosis* complex for simple and accurate species identification. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(9):2830-6.
123. García-Salazar E, Duarte-Escalante E, López-Álvarez MdR, Martínez-Herrera E, Acosta-Altamirano G, Reyes-Montes MdR, et al. Variabilidad genética de aislados del complejo *Candida parapsilosis* en dos servicios de un hospital terciario de la Ciudad de México. *Investigación Clínica*. 2017;58(3):227-37.
124. Pontieri E, Gregori L, Gennarelli M, Ceddia T, Novelli G, Dallapiccola B, et al. Correlation of SfiI macrorestriction endonuclease fingerprint analysis of *Candida parapsilosis* isolates with source of isolation. *Journal of medical microbiology*. 1996;45(3):173-8.
125. Branchini M, Pfaller M, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg H. Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *Journal of clinical microbiology*. 1994;32(2):452-6.
126. Chen Y-C, Lin Y-H, Chen K-W, Lii J, Teng H-J, Li S-Y. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2010;68(3):284-92.
127. Dib JC, Dube M, Kelly C, Rinaldi MG, Patterson JE. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a typing system for *Candida rugosa*: comparison of karyotype and restriction fragment length polymorphisms. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(6):1494-6.
128. Pfaller MA, Messer S, Hollis RJ. Variations in DNA subtype, antifungal susceptibility, and slime production among clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1995;21(1):9-14.
129. Shin JH, Shin DH, Song JW, Kee SJ, Suh SP, Ryang DW. Electrophoretic karyotype analysis of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(4):1258-63.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

