



KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLMİŞ *CANDIDA PARAPSILOSIS* SUŞLARININ BİYOFİLM OLUŞTURMA, HEMOLİTİK VE KOAGÜLAZ AKTİVİTELERİ İLE ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

THE CORRELATION OF BIOFILM FORMATION, HEMOLYTIC AND COAGULASE ACTIVITIES AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY AMONG *CANDIDA PARAPSILOSIS* ISOLATES RECOVERED FROM CLINICAL SPECIMENS

Sema Aşkın Keçeli¹, Melike Kurt^{1*}, Didem Özgür², Zehra Feza Otağ³

¹Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye, ²Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

ORCID iD: Sema Aşkın Keçeli: 0000-0002-2014-6395; Melike Kurt: 0000-0001-6592-3701; Didem Özgür: 0000-0002-8320-9453; Feza Otağ: 0000-0002-8627-7937

***Sorumlu Yazar / Corresponding Author:** Melike Kurt, **e-posta / e-mail:** melikesagir1@gmail.com

Geliş Tarihi / Received: 08.08.2020

Kabul Tarihi / Accepted: 22.09.2020

Yayın Tarihi / Published: 02.10.2020

Öz

Amaç: *Candida parapsilosis* suşlarının *in vitro* biyofilm oluşturma, hemoliz ve koagülaz aktiviteleri gibi virülans faktörlerinin araştırılması ve antifungal duyarlılıklarıyla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Kocaeli Üniversitesi'nden 26, Mersin Üniversitesi'nden 14 suş çalışmaya alınmıştır. Hemolitik aktivite %3 glikozlu koyun kanlı agar da 37°C'de 48 saatlik, koagülaz aktivite tüp test metodu ile 37°C'de 4 saatlik, biyofilm oluşumu ise modifiye Christensen makro tüp metodu ile %8 glikozlu Sabouraud Dekstroz sıvı besiyerinde 37°C'de 48-72 saatlik inkübasyon sonrasında değerlendirilerek belirlenmiştir. Flukonazol, kaspofungin, mikafungin, vorikonazol ve amfoterisin B'ye karşı MİK değerleri VİTEK-2 otomatize sistem ile belirlenmiştir.

Bulgular: Suşların 23'ü periferik kandan, 7'si damar içi kateterden, 3'er adet periton ve idrardan, 2 adet tırnak örneğinden, 1'er adet plevra ve balgam örneklerinden izole edilmiştir. Biyofilm aktivitesi tüm suşların 32'sinde (%80) saptanmış olup, 13'ü (%32,5) zayıf, 12'si (%30) orta, 7'si (%17,5) ise güçlü pozitif olarak skorlanmıştır. Suşların yarısı alfa hemoliz, 13'ü (%32,5) beta hemoliz gösterirken, 7'sinde (%17,5) hemoliz saptanmamıştır. Koagülaz aktivitesi tüm suşlarda negatif bulunmuştur. Tüm suşlar vorikonazol ve amfoterisin B'ye duyarlı saptanmıştır. Biyofilm aktivitesi zayıf olan iki suşa flukonazol direncine rastlanmıştır. Periferik kandan izole edilmiş 7 suş ile 2'si periton ve biri idrar suşu olmak üzere toplam 10 suşa (%25) kaspofungin direnci saptanmıştır. Bu suşların 4'ünde aynı zamanda mikafungin direnci, 7'sinde hemolitik aktivite ve biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Antifungal direnci ile virülans faktörleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Sonuç: Biyofilm oluşturma ve hemolitik aktivite *C. parapsilosis*'in başlıca virülans faktörleridir ve sıklıkla bu faktörlere bağlı olarak kandidemi ve kateter enfeksiyonları oluşabilmektedir. Bu enfeksiyonların tedavi protokolleri epidemiyolojik ve antifungal duyarlılık paterni verilerine göre değişim gösterebilir. Daha fazla *C. parapsilosis* suşu kullanarak ileri çalışmalar yapılması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: *C. parapsilosis*, hemoliz, biyofilm, koagülaz, VİTEK-2 AFT, kaspofungin

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the virulence factors such as *in vitro* biofilm production, hemolytic and coagulase activity of *Candida parapsilosis* isolates and to compare these factors with antifungal susceptibilities.

Methods: Twenty six isolates from Kocaeli University and 14 isolates from Mersin University were included into this study. Haemolytic activity was tested by sheep blood agar with 3% glucose. Coagulase activity was tested by tube test method. Biofilm production was determined by modified Christensen macrotube method and scored as weak, intermediate or strong positive. The MIC values of the strains against fluconazole, caspofungin, micafungin, voriconazole and amphotericin B were measured with the automated system VITEK-2.

Results: Study isolates were from peripheral blood 23, blood catheter 7, urine 3, periton 3, nail samples 2, pleura and sputum samples each one. Of 40 isolates, biofilm production was detected in 32 (80%) and scored as 13 (32.5%) weak, 12 (30%) intermediate and 7 (17.5%) strong positive. In 50% of isolates alpha hemolysis and in 32.5% beta hemolysis was detected and 17.5% were nonhemolytic. Coagulase activity was negative in all isolates. All isolates were susceptible to voriconazole and amphotericin B. Fluconazole resistance was determined in two isolates having weak biofilm production. Caspofungin resistance was determined in 10 of isolates and 4 of them were also resistant to micafungin; 7 of them had haemolytic activity and 7 of them produced biofilm as well. Of these resistant 10 isolates 7 were from peripheral blood, 2 were from periton and one was from urine.

Conclusion: Biofilm production and haemolytic activity were the main virulence factors of *C. parapsilosis* and due to these factors it causes candidemia and intravenous catheter related infections. The treatment protocols of these infections may alter in parallel with changing epidemiology or antifungal susceptibility profiles. Studies included more isolates are needed.

Keywords: *C. parapsilosis*, hemolysis, biofilm, coagulase, VİTEK-2 AFT, caspofungin

Giriş

Son yıllarda özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde *Candida* türleri nedeniyle oluşan enfeksiyonlarda artış gözlenmektedir. Klinik örneklerden en sık izole edilen tür *Candida albicans* (*C.albicans*) olmasına rağmen, non-*albicans Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda dramatik bir artış görülmektedir.¹⁻³ Non-*albicans Candida* türlerinden *Candida parapsilosis* (*C.parapsilosis*), tüm dünyada yaygın olarak özellikle el tırnaklarını etkileyen onikomikozdan başlayarak, ölümlü sonuçlanabilen yaygın enfeksiyonlara veya invaziv kandidiyazise yol açabilmektedir.⁴ *C. parapsilosis* yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde meydana gelen kandidemi sonucu geç sepsise ve böylece yüksek mortalite ve morbiditeye yol açmaktadır.⁵ Özellikle kandidemi, *C. parapsilosis*'in biyofilm oluşturma ve total parenteral nutrisyon gibi zengin içerikli solüsyonlarda çoğalması ile yakından ilişkilidir. İnvaziv kandidiyaz, *C. parapsilosis*'in daha önce kolonizasyon olmaksızın hastane ortamı, santral venöz kateterler gibi tıbbi gereçler ve sağlık personelinin elleri gibi kontamine dış ortamlardan bulaşma nedeni ile de oluşabilir.⁶

Candida türlerinin neden olduğu bu enfeksiyonların patogenezi fungal hücrelerin konak savunma mekanizmasından kaçmasını sağlayacak farklı virülans faktörlerine bağlıdır. Bu faktörler arasında konak hücreye ve/veya dokuya aderans, fenotipik anahtarlama, biyofilm oluşturma, hemolitik aktivite ve birçok hidrolitik enzim sekresyonu yer almaktadır.^{4,7} Bu virülans faktörleri *C. albicans*'da yaygın olarak çalışılmasına rağmen, *C. parapsilosis*'in virülans faktörlerine dair bilgiler kısıtlıdır. Bununla birlikte, biyofilm oluşturma ve fosfolipaz, proteinaz ve koagülaz gibi ekstrasellüler enzimlerin patogenezi önemli rol oynadığı düşünülmektedir.⁸

C. parapsilosis'in virülans faktörleri, bu faktörlerin antifungal direnci ile olan ilişkisi ve patojenitesine yönelik çalışmalar bulunmaktadır,^{9,10} fakat hala *C. parapsilosis*'in enfeksiyonlarının patofizyolojisi ile ilgili aydınlatılacak çok durum olduğu düşünülmektedir.¹¹

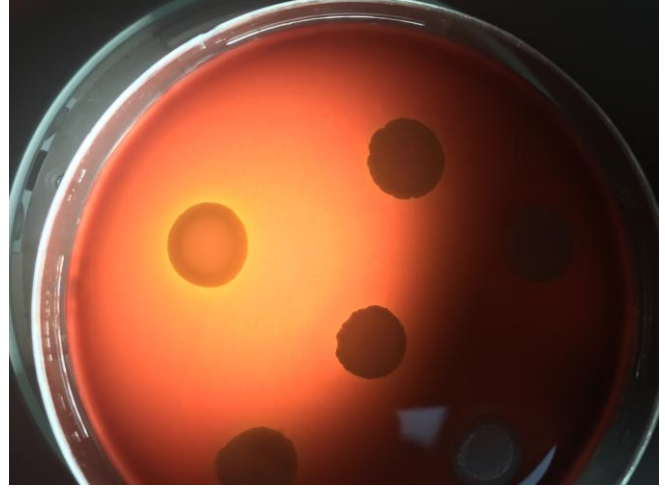
Bu çalışmada, değişik klinik örneklerden izole edilen *C. parapsilosis* suşlarının biyofilm oluşturma, hemoliz ve koagülaz aktiviteleri gibi virülans faktörlerinin araştırılması ve bu virülans faktörlerinin *in vitro* flukonazol, vorikonazol, kaspofungin, mikafungin ve amfoterisin B'ye karşı duyarlılıkları ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem

C. parapsilosis suşları: Çalışmamıza, 2007-2018 yılları arasında çeşitli polikliniklerden ve servislerden gönderilen hasta örneklerinden izole edilen 26 ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından gönderilen 14 adet olmak üzere toplam 40 adet *C. parapsilosis* suşu dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen *C. parapsilosis* suşları konvansiyonel yöntemle; Sabouraud Dekstroz agar'da (SDA) koloni morfolojileri, mısır unu-tween 80'li jelozda klamidospore, blastospore, gerçek ve yalancı hif oluşumları, çimlenme borusu deneyi, CHROMagar *Candida* (Becton Dickinson, İngiltere) besiyerindeki pigment oluşumu ile değerlendirilmiş ve sonuçlar üretici firmanın talimatları doğrultusunda MALDI-TOF MS (bioMérieux, Fransa) otomatize sistem ile doğrulanmıştır. *C. parapsilosis* olarak tanımlanan suşlar, ileri çalışmalara alınana kadar -80°C'de stok besiyerinde saklanmıştır.

Hemolitik aktivite: Farklı hemolitik aktivitelerin ve hemolizin üretimini saptanmasında Luo ve ark.'nın

2001'de tanımladığı protokol¹² değiştirilerek uygulanmıştır. Bunun için, stoktan çıkarılan *C. parapsilosis* suşları SDA'da 37°C'de 48 saat inkübe edilerek iki kez pasajlanmıştır. Üreyen kolonilerden McFarland 2 bulanıklığında süspansiyonlar hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan 10 µl %3 glikoz içeren %5 koyun kanlı agara (pH=5,6) spot (noktasal) ekimler yapılmıştır. Beş gün 37°C'de %5 CO₂'li ortamda bekletilen petrilerdeki noktasal ekimlerin etrafında oluşan şeffaf hale beta hemoliz, yeşil renkli hale alfa hemoliz, renksiz ise gama hemoliz olarak değerlendirilmiştir (Çizim 1). Beta-hemolitik *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



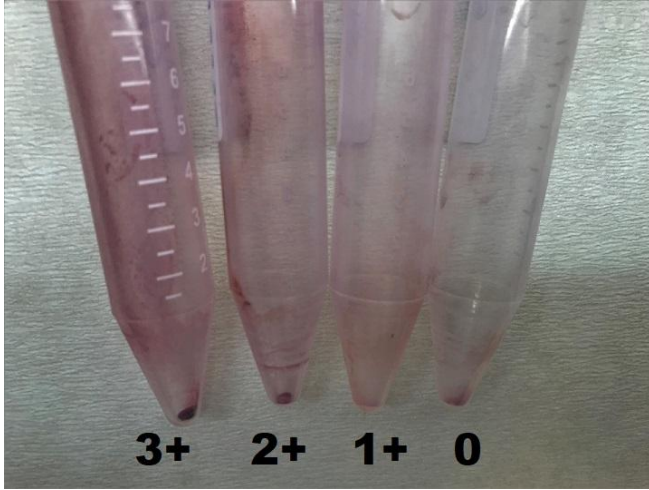
Çizim 1. %3 glikozlu koyun kanlı agarda beta hemoliz zonu oluşturan *C. parapsilosis* suşlarının gözlenmesi

Koagülaz aktivitesi: Koagülaz aktivitesi, Rodrigues ve ark.'nın standart tüp test metoduna göre çalışılmıştır.¹³ SDA besiyerinde üretilmiş *C. parapsilosis* kolonilerinden bir koloni alınarak, 500 µl etilendiamintetraasetik asit ve insan plazması içeren tüplere inoküle edilmiş, 37°C'de 4 saatlik inkübasyondan sonra pıhtı oluşumu açısından değerlendirilmiştir. Pıhtı oluşumu gözlenmeyen tüpler tekrar inceleme için 24 saat daha bekletilmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 suşları sırasıyla pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Biyofilm oluşumu: Biyofilm oluşumunun saptanmasında modifiye Christensen makro tüp metodu (ağzı kapaklı/kapaksız, "V" dipli deney tüpü, 15 cm, steril) kullanılmıştır.¹⁴ *C. parapsilosis* suşlarının SDA besiyerinde üretilmiş olan kolonilerinden bir öze dolusu alınıp 10 ml %8 glikozlu Sabouraud dekstroz sıvı besiyeri aktarılmış steril polistiren falkon tüplere inoküle edilerek 37°C'de 48-72 saat bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyeri pipet yardımıyla nazikçe (sıvı ortamı sarsmadan) uzaklaştırılarak, tüpler iki kez distile su ile yıkanmış ve ardından tüplere %1 safranin boyası (distile suda hazırlanmış) eklenerek 10 dakika oda ısısında bekletilmiştir. Sürenin sonunda bu kez boyalı solüsyon ortamdan uzaklaştırılmış ve tüpün duvarında oluşan boyalı yapışkan tabaka-biyofilm görsel olarak değerlendirilmiştir. Deney tüpünün cidarındaki renk yoğunluğuna göre negatif, zayıf (1+), orta (2+) ve güçlü (3+) pozitif şeklinde değerlendirilmiştir (Çizim 2). *S. epidermidis* ATCC 35984 suşu pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Antifungal duyarlılık testi: Antifungal duyarlılık testleri için Vitek 2 (Biomérieux) otomatize sistem kullanılmıştır. Flukonazol, vorikonazol, kaspofungin, mikafungin ve amfoterisin B için antifungal duyarlılıkları VITEK 2

Compact sistem AST YS06 kartı (BioMérieux, Fransa) kullanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar üretici firmanın önerileri doğrultusunda Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-S4 kılavuzunda belirtilen sınır değerler baz alınarak değerlendirilmiştir.¹⁵ Buna göre minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri flukonazol ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$, vorikonazol ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$, kaspofungin ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$, mikafungin ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ ve amfoterisin B ≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ olan suşlar duyarlı kabul edilmiştir. Kalite kontrol suşu olarak C. parapsilosis ATCC 22019 kullanılmıştır.



Çizim 2. Biyofilm oluşturma özelliğinin Christensen tüp metodu ile gösterilmesi

Bulgular

C. parapsilosis suşlarının 23'ü periferik kandan, 7'si damar içi kateterden, 3'er adet idrar ve periton örneklerinden, 2 adet tırnak örneğinden, 1'er adet plevra ve balgam örneklerinden izole edilmiştir (Çizelge 1).

Biyofilm aktivitesi suşların 32 (%80)'sinde saptanmıştır. Tüm suşlar içerisinde sırasıyla 13 (%32,5)'ü zayıf (1+), 12 (%30)'si orta (2+), 7 (%17,5)'si ise güçlü pozitif (3+) şeklinde değerlendirilmiştir. Sadece 8 suşta (%20) biyofilm oluşturma özelliğine rastlanmamıştır (Çizelge 2).

Çizelge 1. C. parapsilosis suşlarının klinik örneklere göre dağılımı

Klinik Örnek Türü	Sayı	%
Kan	23	57,5
Dolaşım yolu kateteri	7	17,5
İdrar	3	7,5
Periton	3	7,5
Tırnak	2	5
Plevra	1	2,5
Balgam	1	2,5
Toplam	40	100

Suşların 20'sinde alfa, 13'ünde beta hemoliz oluşumu gözlenirken 7'sinde hemoliz saptanmamıştır (Çizelge 2). Koagülaz aktivitesi tüm suşlarda negatif bulunmuştur.

Vorikonazol ve amfoterisin B'ye direnç saptanmamıştır. Sadece biyofilm aktivitesi zayıf olan iki suşta (plevra ve kan) flukonazol direncine rastlanmıştır. Periferik kandan izole edilmiş 7 suş ile 2'si periton ve biri idrar suşu olmak üzere toplam 10 suşta (%25) kaspofungin direnci saptanmıştır. İncelendiğinde bu suşların 7'sinde hemolitik aktivite (Çizelge 4) ve biyofilm oluşumu vardır, ayrıca 4'ünde aynı zamanda mikafungin direnci de saptanmıştır. Kalan suşlarda mikafungin duyarlılığı mevcuttur. Tüm

suşların, test edilen antifungallere karşı MİK 50 ve MİK 90 değerleri Çizelge 3'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. C. parapsilosis suşlarının biyofilm ve hemoliz özelliklerine göre dağılımı

Biyofilm oluşturma n (%)				Hemoliz özelliği n (%)		
Zayıf 1(+)	Orta 2(+)	Güçlü 3(+)	Negatif	Alfa	Beta	Gama
13 (32,5)	12 (30)	7 (17,5)	8 (20)	20 (50)	13 (32,5)	7 (17,5)

Çizelge 3. C. parapsilosis suşlarının flukonazol, vorikonazol, kaspofungin, mikafungin ve amfoterisin B ye karşı MİK aralığı, MİK 50 ve MİK 90 değerleri

Antifungaller	MİK* aralığı $\mu\text{g/ml}$	MİK 50 $\mu\text{g/ml}$	MİK 90 $\mu\text{g/ml}$
Flukonazol	0,25-4	$\leq 0,5$	2
Kaspofungin	0,03-8	0,5	≥ 8
Mikafungin	0,03-8	0,5	≥ 8
Vorikonazol	$\leq 0,03-0,25$	$\leq 0,12$	$\leq 0,12$
Amfoterisin B	0,12-1	$\leq 0,25$	0,5

* Minimum inhibitör konsantrasyon

Kaspofungin dirençli suşlarda biyofilm oluşturma özelliği 4/7 (%57,1)'inde saptanmış, zayıf (n=2); orta (n=1) ve güçlü (n=1) pozitif şeklinde dağılım göstermiştir (Çizelge 4). Antifungal direnci ile virülans faktörleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Tartışma

Candida parapsilosis doğal çevrede her yerde bulunabilen bir mikroorganizmadır. Yüksek glikoz konsantrasyonu olan ortamlarda hızlı çoğalması ve tıbbi plastik ve prostetik aygıtların yüzeylerine daha iyi penetre olması nedeni ile enfeksiyon potansiyeli fazladır. Hiperalbumantasyon sıvılarının glikoz açısından zengin olması nedeni ile bu sıvılarda kolayca çoğalabilir. Çoğunlukla deride kolonize olabilmesi nedeniyle invaziv girişimler sırasında kan akımına karışması ile kandan izole edilebilir.¹⁶ Türkiye'de, C. parapsilosis kandideminin en önemli etkenlerinden

Çizelge 4. Kaspofungin dirençli suşların biyofilm, hemoliz ve koagülaz özellikleri

Suş No	Klinik Örnek	Biyofilm Oluşturma	Hemoliz Özelliği	Koagülaz
1	Kan	1+	Beta	neg
2	Kan	neg	Beta	neg
3	Kan	3+	Alfa	neg
4	Kan	neg	Alfa	neg
5	Kan	neg	Alfa	neg
6	Kan	2+	Gama	neg
7	Kan	1+	Gama	neg
8	Periton	1+	Beta	neg
9	Periton	1+	Beta	neg
10	İdrar	2+	Gama	neg

biridir.¹⁷⁻¹⁹ Bu enfeksiyonların patogenezinin C. parapsilosis'in biyofilm aktivitesi, enzim üretimi, hemolizin ve koagülaz aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, C. parapsilosis'in virülans faktörleri ile ilgili çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmektedir. Bu çalışmaların çoğu C. parapsilosis kompleksi (C.

parapsilosis sensu stricto, *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis*) ile yapılmıştır. Bizim çalışmamızda klinik örneklerden izole edilen *C. parapsilosis* kompleksindeki türlerin tanımlanması yapılamamış olmakla birlikte, *C. parapsilosis* suşlarında virülans faktörlerinden hemoliz, koagülaz ve biyofilm oluşturma özellikleri araştırılmıştır.

Hemolitik aktivite patojenik mikroorganizmaların demir ihtiyacını konağın hemoglobininin karşıladıklarını göstermektedir. Atades ve ark.'nın 87 *C. parapsilosis* kompleks suşunda yapmış olduğu bir çalışmada %82,8 oranında hemolitik aktivite saptamışlardır.²⁰ Benzer şekilde, bizim çalışmamızda da bu oran 32/40 (%80) olarak saptanmıştır. Çalışmaya alınan suşların %57'sinin kandan izole edilmiş olması kandidemi oluşumunda hifal invazyon açısından hemolitik aktivitenin önemli olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, Luo ve ark, *Candida* türlerinde hemoliz aktivitesi araştırdıkları çalışmalarında glikoz içeren ve içermeyen kanlı agardeki deneylerinde hemoliz aktivitesi saptayamamışlardır.¹² Bazı çalışmalarda ise çalışmaya alınan tüm *C. parapsilosis* suşlarında hemolitik aktivite saptanmış ancak zayıf hemolitik aktivite olduğu vurgulanmıştır.^{10,21} Çalışmamızda %50 oranında alfa hemoliz saptanması bu sonucu desteklemektedir. Furlanetto ve ark. sonuçlarının koyun kanlı agarda, kanlı sıvı besiyerinde ve hücre içermeyen besiyeri üst sıvısında denediklerinde aynı suşlarda farklı hemolitik aktivite sonuçları elde etmişlerdir.²² Bu sonuç, hemolitik faktör üretiminin farklı kültür şartlarında değişebildiğini göstermektedir.

Biyofilm oluşumu ise fungal hücrelerin konağın savunma mekanizmasından kaçmasını sağlamak ve antifungal dirence neden olmaktadır.²³ Ayrıca biyofilm *Candida* türlerinin dokularda ve damar içi tıbbi gereçlerdeki kolonizasyonuna adapte olmasını sağlamaktadır.²⁴ Çalışmamıza alınan *C. parapsilosis* suşlarının %80'i biyofilm oluşturmuş ve biyofilm aktivitesi olan suşların 19'unda (%59,4) orta ve güçlü derecede bulunurken, sadece 13'ünde (%40,6) zayıf biyofilm oluşturma özelliği saptanmıştır. Biyofilm oluşturma özelliği *C. parapsilosis* kompleksindeki türlerde farklılık göstermektedir. Neji ve ark. tüm *C. parapsilosis* suşlarında biyofilm aktivitesi saptamış, fakat *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis*'de daha az olduğunu bildirmiştir.²¹ Bazı çalışmalarda ise bu iki türün biyofilm oluşturma özelliğinin olmadığı ileri sürülmektedir.^{25,26} Bununla birlikte, çalışmamızdaki tüm suşlar içerisinde zayıf biyofilm aktivitesi gösteren suşların *C. metapsilosis* veya *C. orthopsilosis* olabileceğini düşündürmektedir. Bu farklılıklar, *C. parapsilosis* kompleksindeki türlerin farklı biyofilm matriks oluşumu gibi fizyolojik farklılıklarına ve farklı patojenik potansiyellerine bağlıdır.²⁷ *C. parapsilosis* kompleksindeki türlere göre değişen biyofilm oluşturmadaki bu farklılıklar genetik çalışmalarla kanıtlanmalıdır.

Plazma koagülaz enzimi, plazma fibrinojenini bağlayan ve plazmanın pıhtı oluşturmaya için seri birtakım reaksiyonları tetiklemektedir, ayrıca *Staphylococcus aureus* tanımlanmasına yardımcı testlerden biridir. Rodriguez ve ark.'nın çalışmasında, *C. albicans* suşlarında %88,5, *C. tropicalis* suşlarında ise %82,5 oranında koagülaz aktivitesi olduğunu bildirilmiş, 29 *C. parapsilosis* suşunun %6,9 unda Pastorex latex testi ile %34,5'ünde ise tüp koagülaz testi ile koagülaz aktivitesi saptanmıştır.¹³ Her iki test *S. aureus* tanısında kullanılan testler olduğuna göre, *C. parapsilosis* ile elde edilen pozitif sonuçlar *S. aureus* ile antijen benzerliğini göstermektedir.

Başka bir çalışmada, tavşan plazması ile yapılan tüp test kullanıldığında *C. parapsilosis* suşlarının 3/67 (4.5%)'inde koagülaz aktivitesi saptanmıştır.¹³ Yiğit ve ark.'nın çalışmasında ise tavşan plazması kullanılan tüp testinde 6/18 (%33,3) ve koyun plazması kullanıldığında ise 3/18 (%16,6) oranında koagülaz aktivitesi saptamışlar fakat insan plazması ile koagülaz aktivitesi gösterememişlerdir. *C. parapsilosis*'in koagülaz aktivitesinin test edilmesinde insan, tavşan ve koyun plazmaları kullanıldığında test sonuçlarının karşılaştırılmasına yönelik çalışmalara ihtiyaç olduğunu ileri sürmüşlerdir.²⁸ Bizim çalışmamızda tüp testi insan plazması ile yapıldığından tüm suşlarda negatif sonuç elde edilmesine yol açmıştır.

Çalışmamızda flukonazol, vorikonazol, kaspofungin, mikafungin ve amfoterisin B'ye karşı antifungal duyarlılık test sonuçları elde edilmiştir. Buna göre 2 flukonazol, 4 mikafungin ve 10 (%25) kaspofungin dirençli suş saptanmıştır.

Ekinokandin grubu invaziv kandidemde ilk önerilen antifungallerdir. Ekinokandinlerin artan kullanımı *C. parapsilosis*'e bağlı artan kandidemi insidansı ile ilişkilendirilmektedir. Öte yandan bu antifungallerle uzun süreli tedavi gören immün sistemi baskılanmış hastalardan izole edilen *Candida* suşlarında ekinokandin direnci bildirilmektedir.^{29,30}

Çalışmamızda kaspofungin direnci saptadığımız suşların büyük çoğunluğunun periferik kandan izole edilmiş olması uzun süreli antifungal tedavi alan hastalardan kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir.²⁹ Daha düşük olasılıkla ardışık inokülasyonlar sırasında mutasyonel değişiklikler olabileceğini düşünebiliriz. Bir diğer yöntem ise epidemiyolojik eşik değer (ECV) belirlediğimiz mikrodilüsyon yöntemi olabilirdi. Kaspofungin dirençli bulduğumuz suşların "MİK>ECV" sonucu saptanması mutasyonel ya da "vahşi olmayan tip" ayrımı yapılabilirdi.²⁹ Canto'n ve ark. *C. parapsilosis sensu stricto* suşlarının amfoterisin B, ekinokandinler ve flukonazole, *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis*'den daha az duyarlı olduğunu bildirmiştir.³¹ Bununla birlikte, diğer çalışmalarda *C. parapsilosis* kompleksinin amfoterisin B, vorikonazol ve kaspofungine genellikle duyarlı olduğu ve düşük seviyede flukonazol direnci gösterdiği bildirilmiştir.^{9,21,26,32} Brillhante ve ark.'nın 49 *C. parapsilosis* suşuyla yaptıkları çalışmada 19'unun *C. parapsilosis* olduğu ve sadece bir suşta kaspofungin direnci saptandığı gösterilmiştir.¹¹ Yirmidokuz ülkenin katılımıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, 3557 *Candida* suşunun 7 antifungal ajana karşı duyarlılıklarının araştırılmasında çok düşük oranda ekinokandin direncine rastlanmış ve bunun *fkS-1* gen mutasyonundan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.³⁵

Virülans faktörleri ile antifungal direnci karşılaştırdığımızda, sadece iki suşta rastlanan flukonazol direnci zayıf hemolitik aktivite ile; kaspofungin direnci ise %71,4 hemoliz ve %57,1 oranında biyofilm oluşturma özelliği ile ilişkili bulunmuştur. Tüm *Candida* türlerinde olduğu gibi, *C. parapsilosis* suşlarında da özellikle biyofilm oluşturma kapasitesi antifungal direnç ile ilişkilidir. Yapılan bir çalışmada, polistiren yüzeylerde biyofilm oluşturan *C. parapsilosis sensu stricto* ve *C. orthopsilosis* suşlarında azollere ve ekinokandinlere dirençli olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda kaspofungin dirençli suşların büyük çoğunluğu periferik kandan izole ve biyofilm oluşturan suşlardı.

Her merkezde mikrodilüsyon testi ve mutasyonu saptayabileceğimiz genetik analizler rutin olarak yapılmadığından özellikle kan kültüründen *C. parapsilosis*

izolasyonunda ekinokandin MİK değerlerinin gradient test veya otomatize yöntemlerle belirlenmesinin, tedavi başarısı açısından çok önemli olduğu kanaatindeyiz. Her ne kadar ekinokandinler tarafından C. parapsilosis'e karşı sergilenen doğal olarak yüksek MİK değeri, bu antifungal ajanların ilk ortaya çıkışından beri bilinmekte ise de klinik başarısızlıklar bildirilmemiştir ve halen Candida enfeksiyonlarının tedavisinde ilk basamak olarak tercih edilmektedir.

Sonuç

Özellikle kandan ve kateterden izole edilen C. parapsilosis suşlarının hemolitik aktivite ve biyofilm oluşturma özelliklerinin olduğu gösterilmiş ve bu virülans faktörlerinin ekinokandin direnci veya yüksek MİK değerlerine yol açabileceği düşünülmüştür. Antifungal duyarlılık paternleri ve virülans faktörlerinin varlığı farklı merkezlere göre değişmekle birlikte, C. parapsilosis'e ait yıllara göre değişebilen bu verilerin epidemiyolojik olarak belirlenmesi özellikle invazif kandidiyaz ve kandidemi tanısı ve tedavisi açısından yol gösterici olacaktır. Bu çalışmanın, daha fazla C. parapsilosis suşu ile ve ayrıca C. parapsilosis sensu stricto, C. metapsilosis ve C. orthopsilosis türleri tanımlanarak yapılması aydınlatıcı olacaktır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar arasında çıkar çatışması tarif eden herhangi bir kişi bulunmamaktadır.

Etik Onay/Hasta Onamı

Çalışma için etik kurul onayına ihtiyaç bulunmamaktadır.

Maddi Destek

Bu çalışmada herhangi bir fon veya destekten yararlanılmamıştır.

Yazar Katkıları

SK, MK, FO, DÖ: Çalışma fikri/Hipotez; Çalışmanın tasarımı; SK, MK: Veri toplanması; Analiz ve sonuçların yorumlanması; Biyolojik materyal taşıma/toplam; SK, MK, FO, DÖ: Kaynak taraması; Makale yazılması; Eleştirel inceleme; Yayınlama süreci

Kaynaklar

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(1):133-163.
2. Trofa D, Ga'cser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):606-625.
3. Horasan ES, Ersöz G, Göksu M, ve ark. Increase in *Candida parapsilosis* fungemia in critical care units: a 6-years study. *Mycopathologia.* 2010;170(4):263-268.
4. Sav H, Baris A, Turan D, Altınbas R, Sen S. The frequency, antifungal susceptibility and enzymatic profiles of *Candida* species in cases of onychomycosis infection. *Microb Pathog.* 2018;116:257-262.
5. da Silva RL, Montelli AC, Sugizaki Mde F, ve ark. Outbreak of fungemia caused by *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: molecular investigation through microsatellite analysis. *Rev Iberoam Micol.* 2013;30(2):112-115.
6. Magobo RE, Naicker SD, Wadula J, ve ark. Detection of neonatal unit clusters of *Candida parapsilosis* fungemia by microsatellite genotyping: results from laboratory based sentinel surveillance, South Africa, 2009-2010. *Mycoses.* 2017;60(5):320-327.
7. Treviño-Rangel Rde J, González JG, González GM. Aspartyl proteinase, phospholipase, esterase and hemolysin activities of

- clinical isolates of the *Candida parapsilosis* species complex. *Med Mycol.* 2013;51(3):331-335.
8. van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol.* 2009;35(4):283-309.
9. da Silva BV, Silva LB, de Oliveira DB, ve ark. Species distribution, virulence factors, and antifungal susceptibility among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens. *Mycopathologia* 2015;180(5-6):333-343.
10. Abi-Chacra ÉA, Souza LO, Cruz LP, ve ark. Phenotypical properties associated with virulence from Clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. *FEMS Yeast Res.* 2013;13(8):831-848.
11. Brilhante RSN, Sales JA, da Silva MLQ, ve ark. Antifungal susceptibility and virulence of *Candida parapsilosis* species complex: an overview of their pathogenic potential. *J Med Microbiol.* 2018;67(7):903-914.
12. Luo G, Samaranyake LP, Yau JY. *Candida* species exhibit differential in vitro hemolytic activities. *J Clin Microbiol.* 2001;39(8):2971-2974.
13. Rodrigues AG, Pina-Vaz C, Costa-de-Oliveira S, Tavares C. Expression of plasma coagulase among pathogenic *Candida* species. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5792-5793.
14. Christensen GD, Simpson, WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect. Immun.* 1982;37(1):318-326.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; third edition, M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI; 2008.
16. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag.* 2014;10:95-105.
17. Ece G, Samlioglu P, Akkoclu G, Atalay S, Kose S. The evaluation of the distribution of yeast like fungi '*Candida* Species' at a tertiary care center in western Turkey. *Int J Med Sci.* 2012;9(7):617-620.
18. Calgin MK, Cetinkol Y. Distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* species at a university hospital in Northern Turkey. *J Infect Dev Ctries.* 2018 Feb 28;12(2):97-101.
19. Oktay E, Gülbudak H, Özgür D, Otağ F. Yoğun Bakım Ünitesi Hastaları Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida parapsilosis* Suşlarının Mini Epidemiler Bakımından Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2015;45(1):41-47.
20. Pakshir K, Ravandeh M, Khodadadi H, Motamedifar M, Zomorodian K, Alipour S. Evaluation of exoenzyme activities, biofilm formation, and co-hemolytic effect in clinical isolates of *Candida parapsilosis* species complex. *J Global Infect Dis.* 2018;10:163-165.
21. Neji S, Hadrich I, Trabelsi H, ve ark. Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):67.
22. Furlaneto MC, Góes HP, Perini HF, Dos Santos RC, Furlaneto-Maia L. How much do we know about hemolytic capability of pathogenic *Candida* species?. *Folia Microbiol (Praha).* 2018;63(4):405-412.
23. Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, ve ark. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):1843-1850.
24. Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-albicans *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol.* 2009;47(7):681-689.
25. Song JW, Shin JH, Shint DH, ve ark. Differences in biofilm production by three genotypes of *Candida parapsilosis* from clinical sources. *Med Mycol.* 2005;43(7):657-661.
26. Tosun I, Akyuz Z, Guler NC, ve ark. Distribution, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* Complex strains isolated from clinical samples. *Med Mycol.* 2013;51(5):483-492.

27. Melo AS, Bizerra FC, Freymüller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* Complex. *Med Mycol*. 2011;49(3):253–262.
28. Yigit N, Aktas AE, Ayyildiz A. Detection of coagulase activity in pathogenic *Candida* species. *Int Med Res*. 2008;36(6):1378-1382.
29. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(9): 2846-2856.
30. Chassot F, Venturini TP, Piasentin FB, ve ark. Exploring the In Vitro Resistance of *Candida parapsilosis* to Echinocandins. *Mycopathologia*. 2016;181(9-10):663–670.
31. Canto'n E, Pema'n J, Quindo's G, ve ark. Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(12): 5590–5596.
32. Chen YC, Linc YH, Chenc KW, Liic J, Tengc HJ, Lic SY. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68(3):284–292.
33. Castanheira M, Deshpande LM, Davis AP, Rhomberg PR, Pfaller MA. Monitoring Antifungal Resistance in a Global Collection of Invasive Yeasts and Molds: Application of CLSI Epidemiological Cutoff Values and Whole-Genome Sequencing Analysis for Detection of Azole Resistance in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(10):e00906-17.