

Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida parapsilosis* Kompleks Türlerinin Eşey Tipi (MTL) Genotiplerinin Belirlenmesi

Identification of The Mating Type (MTL) Genotypes of Clinical *Candida parapsilosis* Complex Species isolated from Blood Cultures

Banu Metin*[©], Melike Yaşar**[©], Tuğrul Hoşbul***[©], Aylin Döğen****[©]
Süleyha Hilmioğlu Polat**[©], Macit İlkit*****[©]

*İstanbul Sabahattin Zaim Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye
**Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
***Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
****Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye
*****Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Adana, Türkiye

Atf/Cite as: Metin B, Yaşar M, Döğen A, Hilmioğlu Polat S, İlkit M. Kan kültürlerinden izole edilen *Candida parapsilosis* kompleks türlerinin eşey tipi (MTL) genotiplerinin belirlenmesi. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2021;51(1):11-4.

Öz

Amaç: *Candida parapsilosis*, sistemik kandidoz etkenleri arasında *Candida albicans*'tan sonra en sık rastlanan *Candida* türlerinden biridir. *Candida* türlerinde eşey tipinin belirlenmesi ve eşeyli üremenin gerçekleştirilmesi, eşey tipi (MTL) gen bölgesi kontrolünde gerçekleşir. Bu bölge, iki farklı eşey tipinde (**a** ve **α**) tamamen farklı dizilimlerde olup idiomorf olarak adlandırılır. *MTLa* idiomorfu **a1** ve **a2** transkripsiyon faktörlerini kodlarken, *MTLa*, **a1** ve **a2** proteinlerini kodlar. Bu genler haricinde her iki idiomorfta da eşeyli üreme ile ilgili işlevleri bilinmeyen *PAB*, *OBP* ve *PIK* genlerinin **a** ya da **α** versiyonları vardır. *Candida parapsilosis* ve yakın ilişkili *Candida orthopsilosis* ile *Candida metapsilosis* türlerinde ise, bugüne kadar eşeyli üreme döngüsüne bugüne kadar rastlanmamıştır. Gerçekleştirilen incelemelerde, *C. orthopsilosis*'in *MTLa* ve *MTLa* homozigot ve *MTLa/MTLa* heterozigot genotiplerini içeren karışık bir popülasyon yapısına sahip olduğu, *C. metapsilosis* izolatlarının çoğunluğunun ise *MTLa/MTLa* heterozigot olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık, şimdiki kadar incelenen *C. parapsilosis* izolatlarının hepsinin tek bir eşey tipinde (*MTLa*) olduğu görülmüştür.

Yöntem: Sunulan çalışmada, Türkiye kaynaklı *C. parapsilosis* kökenlerinin MTL genotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır ve bu amaçla 167 kan izolatu incelenmiştir. ITS bölgesinin PCR'da çoğaltılarak sekanslanması ile *C. parapsilosis* olarak tanımlanan izolatlar, *MTLa1*, *MTLa2*, *MTLa1* ve *MTLa2* genleri yönünden taranmıştır.

Bulgular: PCR sonucunda yalnızca *MTLa1* ve *MTLa2* genlerine rastlanmıştır; dolayısıyla tüm izolatların *MTLa* genotipine sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Bulgular önceki çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde, *C. parapsilosis*'in *MTLa* eşey tipinin zaman içerisinde yok olduğu veya henüz araştırılmamış coğrafi bölgelerde varlığını sürdüreceği şekilde seyrek olduğu sonucuna varılmıştır.

Ahahtar kelimeler: *Candida parapsilosis*, MTL lokus, *MTLa* idiomorf

ABSTRACT

Objective: *Candida parapsilosis* is one of the most common species after *Candida albicans* among the causative factors of systemic candidosis. In *Candida* species, determination of the cell identity and the sexual reproduction process take place under the control of the mating type (*MTLa*) locus. This region has completely different sequences in two different mating types (**a** and **α**) and is called an idiomorph. While the *MTLa* idiomorph encodes the transcription factors **a1** and **a2**, *MTLa* encodes **a1** and **a2** proteins. Apart from these genes, both idiomorphs have a or α versions of *PAB*, *OBP*, and *PIK* genes, whose functions in sexual reproduction are unknown. On the other hand, up to now neither *Candida parapsilosis* nor the closely related species *Candida orthopsilosis* or *Candida metapsilosis* has been reported to have sexual cycles. While *C. orthopsilosis* was found to have a mixed population structure harboring *MTLa* and *MTLa* homozygous and *MTLa/MTLa* heterozygous genotypes in realized studies, the majority of *C. metapsilosis* isolates were *MTLa/MTLa* heterozygotes. Nevertheless, all *C. parapsilosis* isolates analyzed were found to be of a single mating type (*MTLa*).

Method: This study was aimed to determine the MTL genotypes of *C. parapsilosis* isolates of Turkey origin, and 167 blood isolates were used for this purpose. The isolates identified as *C. parapsilosis* by PCR-amplifying and sequencing the ITS region were screened for *MTLa1*, *MTLa2*, *MTLa1* and *MTLa2* genes.

Results: Only *MTLa1* and *MTLa2* genes were detected in PCR; therefore, all isolates were determined to have the *MTLa* genotype.

Conclusion: When the results are assessed with previous findings, it could be inferred that the *MTLa* mating type of *C. parapsilosis* has been lost or extremely rare in yet unanalyzed geographical regions.

Keywords: *Candida parapsilosis*, MTL locus, *MTLa* idiomorph

Alındığı tarih / Received:
11.06.2020 / 11.June.2020

Kabul tarihi / Accepted:
08.10.2020 / 08.October.2020

Yayın tarihi / Publication date:
31.03.2021 / 31.March.2021

ORCID Kayıtları

B. Metin 0000-0002-3203-0058
M. Yaşar 0000-0001-8913-2314
T. Hoşbul 0000-0002-0150-4417
A. Döğen 0000-0002-0388-306X
S. Hilmioğlu Polat 0000-0001-8850-2715
M. İlkit 0000-0002-1174-4182

✉ aylinats@mersin.edu.tr

GİRİŞ

Candida türleri yoğun bakım ünitelerinde rastlanan sistemik mantar enfeksiyonlarının tüm dünyada en sık nedenidir⁽¹⁾. *Candida albicans*'tan sonra en sık rastlanan türlerden birisi de *Candida parapsilosis*'tir⁽²⁾. Her ne kadar sıklıkla *C. albicans*'dan daha az virülen olarak değerlendirilse de, 1990'lardan sonra olgu sayısı en çok artış gösteren *Candida* türüdür⁽³⁾. *C. albicans* ve *Candida tropicalis* gibi zorunlu insan patojeni değildir; ev hayvanları, böcekler, toprak, su ve ev aletleri gibi başka kaynaklardan da izole edildiği bildirilmiştir⁽³⁻⁵⁾. Sağlıklı insanların mukoza yüzeyleri, deri ve tırnaklarından da izole ediliyor olması normal vücut florasının bir parçası olduğunu göstermektedir⁽⁶⁾.

Moleküler analizler, *C. parapsilosis*'in birbiriyle yakın ilişkili bir türler kompleksi olduğunu göstermiş ve bu kompleksteki türler *C. parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* ve *Candida metapsilosis* olarak tanımlanmıştır⁽⁷⁾. Ancak, klinik izolatların çoğunluğu *C. parapsilosis* oluşturmaktadır^(3,6).

Candida türleri, mantarlar içerisinde en çok inceleme yapılan şube olan Ascomycota'nın Saccharomycotina alt şubesine dâhildirler⁽⁸⁾. Bu alt şube içerisinde hücre kimliği eşey tipi lokusu (mating type locus, *MAT* veya *MTL*) tarafından belirlenir. Bu lokus birbiri ile dizilimleri tamamen farklı olan α veya α idiomorfalarını içerir ve eşeyli üreme, α hücreler ile α hücreler arasında olur^(8,9). *Candida albicans*'da *MTLa*, bir homeodomin transkripsiyon faktörü olan *a1* proteinini ve HMG (high mobility group) domaini içeren *a2* proteinini kodlayan iki gen içerir; *MTLa* ise $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ proteinlerini kodlar⁽¹⁰⁾. Bu anahtar genler haricinde her iki idiomorf da eşeyli üreme ile ilgisi tam olarak bilinmeyen *PAB*, *OBP* ve *PIK* genlerinin α ya da α şekillerini içerirler^(11,12). *C. albicans* istisnai durumlar haricinde, diploid ve hem *MTLa*, hem de *MTLa*'yı içerecek şekilde heterozigot olarak bulunur. Belirli şartlar altında indüklenebilen homozigot *a/a* ve α/α *C. albicans* hücreleri birleşerek tetraploid bir yapı oluşturduktan sonra rastgele kromozom kaybı ile diploid veya anöplid yapıya dönüşebilirler ve bu şekilde paraseksüel olarak adlandırılan bir üreme döngüsünü tamamlayabilirler⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Candida parapsilosis, *C. albicans* gibi diploid bir mikroorganizmadır⁽¹¹⁾. Bugüne kadar, eşeyli üremesinin olduğuna dair bir bulgu bildirilmemiştir. Ayrıca, *C. albicans*'ın aksine, şimdiye kadar analiz edilen izolatların hepsi *MTLa/MTLa* homozigot olup *MTLa* idiomorfuna rastlanmamıştır^(11,15-18). Bu çalışmada, 167 Türkiye kaynaklı *C. parapsilosis* izolatının *MTL* genotiplerinin ülkemizde ilk kez belirlenmesi, araştırma verilerinin literatür verileri ile karşılaştırılması ve sonuçların tartışılması amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEM

***Candida parapsilosis* izolatları:** Çalışmada, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında 2006-2014 yılları arasında stoklanan 167 *C. parapsilosis* kan izolatu kullanıldı. Çalışma öncesi *C. parapsilosis* tanımlı izolatlar YEPD (maya ekstraktı pepton dekstroz agar; Difco, Detroit, MI, ABD) besiyerinde 37°C'de 2-3 gün süre ile inkübe edildi ve saf üreme varlığı kontrol edildi. Jerm tüp testi ve mısır-unu Tween 80 agar morfolojileri yanında tüm izolatlar ITS (internal transcribed spacer) bölgeleri sekanslanarak identifiye edildi. Çalışma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'na onaylandı.

DNA izolasyonu ve PCR: Genomik DNA izolasyonu, YEPD besiyerinde 3 günlük inkübasyon sonunda üreyen *C. parapsilosis* kolonileri doğrudan petriden alınarak ve "MasterPure Yeast DNA Purification Kit" (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, ABD) kullanılarak kit kılavuzunda anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyonları PTC-200 ısı döngü cihazı (BioRad, Hercules, CA, ABD) kullanılarak yapıldı. Reaksiyon 25 mL'lik hacimde, 2.5 mL 10' "Ex Taq buffer", 0.125 mL "ExTaq polymerase" (TaKaRa, Shiga, Japonya), her bir primer 10 pM, nükleotitler (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP) 2 mM olacak şekilde ve 300 ng DNA kullanılarak gerçekleştirildi. DNAsız kontrol olarak DNA yerine su kullanıldı. Çalışmada kullanılan primerler Döğen ve ark.⁽¹⁶⁾ tarafından tanımlandığı şekilde tasarlandı. PCR amplifikasyonu 94°C'de 5 dakika ilk denatürasyon işleminden sonra 94°C'de 1 dakika denatüras-

yon, 57°C'de 1 dakika bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzamadan oluşan 36 döngü ardından 72°C'de 10 dakika son uzama yapılarak yürütüldü. PCR ürünleri %1 agaroz içeren jel kullanılarak analiz edildi.

BULGULAR

İzolatların ITS bölgeleri PCR'da çoğaltılarak sekanslandı ve *C. parapsilosis* tür tanısı tüm izolatlar için doğrulandı. PCR sonucunda tüm izolatlarda yalnızca *MTLa1* ve *MTLa2* genlerine rastlandı, *MTLa1* veya *MTLa2* ürünü elde edilmedi. Tüm izolatların *MTLa* genotipine sahip olduğu belirlendi.

TARTIŞMA

Candida parapsilosis, filogenetik olarak, *C. albicans*'ı da içeren CTG grubunda (translasyonda CTG kodonunu lösün yerine serin olarak işleyen mikro-organizmalar) yer almaktadır⁽¹¹⁾. Bu gruptaki maya mantarları kaba bir sınıflandırma ile diploid ve haploid olarak iki gruba ayrılırlar. Haploid grupta, *Candida lusitanae* ve *Candida guilliermondii* gibi eşeyli üreme yapabilen türler bulunmaktadır. Diploid grupta ise *C. albicans* ve onunla yakın ilişkili *Candida dubliniensis* ve *C. tropicalis* ile *C. parapsilosis* türler kompleksi ve *Lodderomyces elongisporus* yer almaktadır⁽¹¹⁾. *C. albicans*, uzun yıllar boyunca yalnızca eşeysiz üreyebilen bir maya olarak kabul edilmiş; ancak, yakın zamanda paraseksüel olarak adlandırılan bir üreme döngüsünün de olduğu görülmüştür^(12,13). Diploid *C. dubliniensis* ve *C. tropicalis*'in eşeyli üremelerinin olduğuna dair bir bulguya ise şimdiye kadar rastlanmamıştır⁽¹⁵⁾. İlk çalışmalarda, *L. elongisporus*'un homotallik, yani kendi kendini döleyebilen, bir üreme şekline sahip olduğu ve askus ve askospor oluşturduğu tanımlanmış, ancak detaylı bilgi verilmemiştir⁽¹⁹⁾.

Candida parapsilosis 2005'ten önce moleküler analizlerde farklılık arz eden grup I, II, ve III olarak belirtilirken, daha sonra grup II *C. orthopsilosis*, grup III ise *C. metapsilosis* olarak adlandırılmıştır^(3,7,20). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, *C. parapsilosis*'in yalnızca *MTLa/MTLa* homozigot suşlarına rastlanmıştır^(11,15-17). Buna karşılık, *C. orthopsilosis*'in, *MTLa/MTLa* heterozigot, *MTLa/MTLa* ve *MTLa/MTLa* homozigot

yapılarında karışık bir popülasyona sahip olduğu belirlenmiştir⁽¹⁵⁾. Prysycz ve ark.'nın⁽²¹⁾ çalışmasında, 11 *C. metapsilosis* izolatının 10'unun *MTLa/MTLa* heterozigot bir yapıda bulunduğu, α idiomorfunun $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ ile *PAP α* , *PIK α* ve *OBP α* genlerini içerdiği, **a** idiomorfunun ise **a1** ve **a2** genleri ile $\alpha 2$ ve *OBP α* ile *PIK* geninin bir kısmı α , bir kısmı **a** olacak şekilde hibrit bir şeklini içerecek şekilde bir yapıya sahip olduğu görülmüştür.

Candida parapsilosis ile ilgili yapılan bir çalışmada, Portekiz kaynaklı 114 izolat ve çoğunluğu Macaristan kaynaklı 66 *C. parapsilosis* kökeni incelenmiş ve hepsi *MTLa/MTLa* olarak belirlenmiştir⁽¹⁵⁾. Porto Riko, ABD, Japonya, Belçika ve İngiltere'den sekiz *C. parapsilosis* izolatı içeren başka bir çalışmada da yine tüm izolatların *MTLa* genotipine sahip olduğu görülmüştür⁽¹⁷⁾. ABD, Yeni Zelanda, Norveç, Porto Riko, Şili, Zimbabve ve İtalya kaynaklı sekiz *C. parapsilosis* izolatı içeren başka bir çalışmada da yine yalnızca *MTLa* genotipine rastlanmıştır⁽¹⁶⁾. Benzer şekilde, bizim çalışmamızda da 167 Türkiye izolatı incelenmiş, ancak yalnızca *MTLa* genotipi belirlenmiştir. Bu durum, *C. parapsilosis*'in *MTLa* eşey tipinin zaman içerisinde yok olmuş olabileceğini veya çok seyrek olup rastlanmadığına işaret etmektedir. Yukarıda belirtildiği gibi, Avrupa dışında çalışılan izolatlar sınırlı sayıdadır. **Bu durum, diğer kıtalardan da yapılacak global örnekleme ile daha sağlıklı sonuçların elde edileceğini göstermiştir.**

Teşekkür

Sunulan çalışmaya ilişkin eşey tip gen bölgeleri Duke Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji ve Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Eşsiz katkı ve yardımlarından ötürü Prof. Dr. Joseph Heitman'a teşekkür ederiz.

Etik Kurul Onayı: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (06/02/2020-E.40067).

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Finans bilgisi bulunmamaktadır.

Ethics Committee Approval: Approval was obtained from Ege University Faculty of Medicine Medical Research Ethics Committee (06/02/2020-E.40067).

Conflict of Interest: The authors did not declare a conflict of interest related to this article.

Funding: There is no financial information.

KAYNAKLAR

1. Tabah A, Koulenti D, Laupland K, et al. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EURO-BACT International Cohort Study. *Intensive Care Med.* 2012;38(12):1930-45. <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2695-9>
2. Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, et al. *Candida parapsilosis*: from genes to the bedside. *Clin Microbiol Rev.* 2019;20;32(2):e00111-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00111-18>
3. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):606-25. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-08>
4. Döğen A, Sav H, Gonca S, et al. *Candida parapsilosis* in domestic laundry machines. *Med Mycol.* 2017;55(8):813-9. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx008>
5. Fell JW, Meyer SA. Systematics of yeast species in the *Candida parapsilosis* group. *Mycopathol Mycol Appl.* 1967;32(3):177-93. <https://doi.org/10.1007/BF02049795>
6. 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. <https://doi.org/10.3109/10408410903213393>
7. Tavanti A, Davidson AD, Gow NAR, Maiden MCJ, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):284-92. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.284-292.2005>
8. Wolfe KH, Butler G. Evolution of mating in the Saccharomycotina. *Annu Rev Microbiol.* 2017;71(1):197-214. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093403>
9. Bennett RJ, Turgeon BG. Fungal sex: The Ascomycota. *Microbiol Spectr.* 2016;4(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0005-2016>
10. Butler G. Fungal sex and pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Jan 1;23(1):140. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-09>
11. Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature.* 2009;459(7247):657-62. <https://doi.org/10.1038/nature08064>
12. Hull CM, Raisner RM, Johnson AD. Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science.* 2000;289(5477):307-10. <https://doi.org/10.1126/science.289.5477.307>
13. Magee BB, Magee PT. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of *MTLa* and *MTLα* strains. *Science.* 2000;289(5477):310-3. <https://doi.org/10.1126/science.289.5477.310>
14. Bennett RJ, Johnson AD. Completion of a parasexual cycle in *Candida albicans* by induced chromosome loss in tetraploid strains. *EMBO J.* 2003;22(10):2505-15. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg235>
15. Sai S, Holland LM, McGee CF, Lynch DB, Butler G. Evolution of mating within the *Candida parapsilosis* species group. *Eukaryot Cell.* 2011;10(4):578-87. <https://doi.org/10.1128/EC.00276-10>
16. Döğen A, Metin B, Ilkit M, de Hoog GS, Heitman J. *MTL* genotypes, phenotypic switching, and susceptibility profiles of *Candida parapsilosis* species group compared to *Lodderomyces elongisporus*. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182653>
17. Logue ME, Wong S, Wolfe KH, Butler G. A genome sequence survey shows that the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* has a defective *MTLa1* allele at its mating type locus. *Eukaryot Cell.* 2005;4(6):1009-17. <https://doi.org/10.1128/EC.4.6.1009-1017.2005>
18. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ. *Lodderomyces elongisporus* masquerading as *Candida parapsilosis* as a cause of bloodstream infections. *J Clin Microbiol.* 2008;46(1):374-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.01790-07>
19. van der Walt JP. *Lodderomyces*, a new genus of the Saccharomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek.* 1966;32(1):1-5. <https://doi.org/10.1007/BF02097439>
20. Cebeci Güler N, Tosun İ, Bayramoğlu G, Buruk K, Aydın F. Klinik örneklerden izole edilen *Candida parapsilosis* kompleks türlerinin (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. metapsilosis* ve *C. orthopsilosis*) genotipik olarak tanımlanması ve dağılımlarının belirlenmesi. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45(4):723-8.
21. Prysacz LP, Németh T, Saus E, et al. The genomic aftermath of hybridization in the opportunistic pathogen *Candida metapsilosis*. *PLoS Genet.* 2015;11(10):e1005626. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005626>