

Candida parapsilosis İzolatlarının Soğuk Saklama Koşullarına Dayanıklılığı: On Yıllık Stoklama Sonrası Canlandırma

Survival of Candida parapsilosis Isolates in Cold Storage Conditions: Recovery in Cultures After 10-Years of Storage

Tuğrul Hoşbul*[©], Ramazan Gümrall*[©], Bayhan Bektöre**[©], Kemal Tekin***[©], Fatih Şahiner*[©]

*Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

**Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Alanya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Alanya, Antalya, Türkiye

***Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Öz

Amaç: Mikrobiyoloji laboratuvarlarında yürütülen araştırmalara farklı özelliklere sahip çok sayıda türün ve izolatın dâhil edilmesi çalışma verilerini değerli kılan önemli göstergelerden biridir. Bu amaçla her laboratuvar özgün bir suş koleksiyonu oluşturur. Bunun sürdürülebilirliği için tercih edilen saklama yöntemi izolatların uzun süreli saklanmasına ve hücrelerin canlı ve stabil kalmasına uygun olmalıdır. Bu çalışmada, *Candida* türlerinin soğukta saklama koşullarına olan dayanıklılıklarının tür düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya 10 yıldan daha uzun bir süredir laboratuvarımızda saklanan (-20°C'de boncuklu saklama tüpleri içerisinde) ve bu süre zarfında üzerlerinde herhangi bir canlandırma işlemi veya farklı bir çalışma yapılmayan, klinik örneklerden elde edilmiş 94 stok *Candida* izolatı dâhil edilmiştir. Çalışma örneklerinden sıvı ve katı besiyerlerine pasajlar alınarak canlanan suşların güncel rutin tanı yöntemleriyle doğrulaması yapılmıştır.

Bulgular: Çalışma izolatlarında canlanma oranı *Candida parapsilosis* için %59.1 (13/22), *Candida glabrata* için %41.7 (5/12), *Candida tropicalis* için %25 (4/16) ve *Candida albicans* için %9.52 (4/42) olarak bulundu. *C. parapsilosis* izolatlarının canlı kalma oranı, *C. albicans* ve *C. tropicalis* izolatları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla $p<0.0001$ ve $p=0.037$).

Sonuç: Bu çalışmada sunulan veriler yüksek sıcaklıklarda canlılığını sürdürebilen, soğuk koşullara adapte olan ve hastane ortamlarında uzun süre canlılığını sürdürebilen bir tür olan *C. parapsilosis* izolatlarının soğuk saklama koşullarına *C. albicans* başta olmak üzere *C. tropicalis* ve *C. glabrata* türlerinden daha dayanıklı olduğunu desteklemektedir.

Anahtar kelimeler: *Candida*, maya, boncuklu saklama tüpü

ABSTRACT

Objective: Studies conducted in microbiology laboratories with the inclusion of huge amount and variety of species and isolates are important indicators that render them valuable. For this purpose, each laboratory creates its own unique strain collection. For the sustainability of this procedure, the preferred storage method should be suitable for long-term storage of the isolates that keep the cells alive and stable. In this study, it was aimed to investigate the viability of *Candida* species in cold storage conditions at species level.

Method: The study included 94 stocks of *Candida* isolates obtained from clinical samples that had been stored in our laboratory for more than 10 years (in Cryobank vials with beads at -20°C) and had not undergone any recultivation or other recovery procedures during this period. Samples were passaged into liquid and solid media and recovered strains were confirmed with current routine diagnostic methods.

Results: The recovery rate of the study isolates was found 59.1% (13/22) for *Candida parapsilosis*, 41.7% (5/12) for *Candida glabrata*, 25% (4/16) for *Candida tropicalis*, and 9.52% (4/42) for *Candida albicans*. The recovery rate of *C. parapsilosis* isolates was found to be significantly higher compared to *C. albicans* and *C. tropicalis* isolates ($p<0.0001$ and $p=0.037$, respectively).

Conclusion: The data presented in this study support that *C. parapsilosis* isolates, which can survive at high temperatures, adapt to cold conditions and survive in hospital environments. They are also more stable under cold storage conditions than *C. tropicalis*, *C. glabrata*, and especially *C. albicans* species.

Keywords: *Candida*, yeast, cryobank vials with beads

Alındığı tarih / Received:

24.09.2019 / 24.September.2019

Kabul tarihi / Accepted:

11.12.2019 / 11.December.2019

Yayın tarihi / Publication date:

31.06.2020 / 31.June.2020

ORCID Kayıtları

T. Hoşbul 0000-0002-0150-4417

R. Gümrall 0000-0002-2303-8234

B. Bektöre 0000-0002-1225-7693

K. Tekin 0000-0002-6610-6540

F. Şahiner 0000-0002-3488-0339

✉ tugrulhosbul@gmail.com

Atf: Hoşbul T, Gümrall R, Bektöre B, Tekin K, Şahiner F. *Candida parapsilosis* izolatlarının soğuk saklama koşullarına dayanıklılığı: 10 yıllık stoklama sonrası canlandırma. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2020;50(2):70-7.

© Telif hakkı Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti'ne aittir. Logos Tıp Yayıncılık tarafından yayınlanmaktadır. Bu dergide yayınlanan bütün makaleler Creative Commons Atf-Gayri Ticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

© Copyright Turkish Society of Microbiology. This journal published by Logos Medical Publishing. Licensed by Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0)

GİRİŞ

İmmün yetmezlikli hastaların sayısındaki artış ile beraber sistemik fungal enfeksiyonların insidansı da artış eğilimindedir. *Candida* türleri günümüzde hastane enfeksiyonu etkenleri arasındaki sık karşılaşılan etkenler arasında yer almaktadır^(1,2). Mukozal yüzeylerden çok ciltte bulunabilen ekzojen bir patojen olan *Candida parapsilosis*, kateterlerde ve diğer implante cihazlarda (örneğin total parenteral nutrisyon setleri) biyofilm oluşturma yeteneği, el ile taşınarak nozokomiyal yayılma ve çevresel koşullara dayanıklılığı ile hastane ortamlarında persistans göstermesi ile öne çıkar⁽³⁾. Bu özellikleri ile kan dolaşımı ve mukozal enfeksiyonlarda sık karşılaşılan bir fırsatçı patojen olan *C. parapsilosis* özellikle yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde ortaya çıkan hastane enfeksiyonları ile ilişkilidir⁽⁴⁻⁶⁾.

Candida parapsilosis kompleksi, fizyolojik ve morfolojik olarak ayırt edilemeyen ancak genetik yönden farklılık gösteren üç ayrı türden oluşur; *C. parapsilosis sensu stricto* (en sık saptanan tür), *C. orthopsilosis* ve *C. metapsilosis*^(7,8). *C. parapsilosis* insanlar ve memelilerde mukoza, deri ve tırnaklardan izole edilebilmektedir ve evcil hayvanlar, böcekler, toprak ve deniz ekosistemi de dâhil olmak üzere doğada, bulaşık makineleri ve su dağıtım sistemleri gibi konutlardaki insan yapımı ortamlarda yaygın olarak bulunan bir türdür⁽⁹⁻¹¹⁾. *C. parapsilosis*'in termofilik ve halofilik özelliklere sahip olduğu ve zorlu koşullara tolerans gösterebildiği gösterilmiştir. Bir çalışmada, *C. parapsilosis* izolatlarının, 10°C ila 37°C arasında değişen sıcaklıklarda ve 4 ila 10 arasında değişen pH değerlerinde çoğalabildiği ve %5-10 NaCl'yi tolere ettiği bildirilmiştir⁽¹¹⁾. Başka bir çalışmada, *C. parapsilosis* izolatlarının 40°C'yi tolere edebildikleri ve bazı izolatların 45°C inkübasyon koşullarında canlı kalabildikleri gösterilmiştir⁽⁹⁾. Soğuk koşullarda aktif kalabilen *Candida* türleri bu özellikleri ile çeşitli tıbbi ve ekonomik sonuçlara neden olmaktadır. Transplante edilecek dokuların soğuk saklama koşullarında kontaminasyona yol açabilen *Candida* türlerinin kornea nakillerinde postkeratoplasti enfeksiyonlarından izole

edilen en yaygın mantar türleri olduğu bildirilmiştir^(12,13). Bu sorunu aşabilmek için yürütülen çalışmalarda, özellikle amfoterisin B ve ayrıca vorikonazolün transplante edilecek dokuların *Candida* türleri ile kontaminasyonuna karşı soğuk saklama koşullarında (+4 ve +8°C'lerde 24-72 saat) koruyucu etkinlik gösterdiği bildirilmiştir^(14,15). *C. parapsilosis*'in de dâhil olduğu bazı *Candida* türleri ve bir grup maya türü soğuğa adapte olmuş mayalar ("cold-adapted yeast") olarak tanımlanmakta ve soğuk saklama koşullarında süt ve süt ürünlerinde bozulmalara neden oldukları bildirilmektedir⁽¹⁶⁾. Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarları açısından bakıldığında *Candida* türlerinin soğuk koşullarda canlılıklarını devam ettirebilme özellikleri seçilen izolatların hangi koşullarda ne kadar süre ile saklanabileceğini bilmemiz açısından önemlidir.

Mikoloji laboratuvarlarında çeşitli mantarlar kökenleri sistematik araştırmalar ve eğitim amacıyla steril distile suda, toprak veya kumda, madeni yağla kaplanmış yatık agar besiyerlerinde, -20°C ve -70°C derin dondurucularda, silika jelde, sıvı nitrojende veya liyofilize edilerek saklanabilmekte veya kısa süreli saklama durumlarında canlılığı devam ettirebilmek için ardışık pasajlar tercih edilebilmektedir⁽¹⁷⁻²⁰⁾. Geçmişte yapılan çeşitli çalışmalarda saklanan izolatların dayanıklılıklarının ve canlı kalma sürelerinin tercih edilen saklama yöntemine, saklama süresi ve koşullarına, mantarların cins ve türlerine göre belirgin derecede değiştiği gösterilmiştir⁽²¹⁻²⁴⁾. Bu çalışmada, 10 yıldan daha uzun bir süredir boncuklu saklama tüpü içerisinde -20°C'de dondurularak sakladığımız ve bu süre zarfında herhangi bir çalışma veya araştırma için kullanılmamış olan *Candida* izolatlarımızın canlı kalma oranları araştırılmış ve bu izolatların dayanıklılığını belirlemede etkili olabilecek faktörler tartışılmıştır.

GEREK ve YÖNTEM

Bu çalışmaya, 01.05.2007 tarihinden 31.12.2007 tarihine kadar geçen 8 aylık süre içerisinde GATA Haydarpaşa Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde çeşitli kliniklerde yatarak tedavi gören hastalardan izole edilen hastane enfeksiyonu etkeni 94 stok *Candida*

izolatı dahil edilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen suşlar daha önceki bir çalışma sırasında hem geleneksel [germ tüp testi, klamidospore oluşturma, API ID 32C (BioMérieux, Fransa), CHROMagar *Candida* (BBL, Fransa) gibi], hem de moleküler yöntemlerle (PCR-RFLP) tiplendirilmiştir⁽¹⁾. Bu izolatlar üzerinde 10 yılı aşkın bir süre zarfında herhangi canlandırma veya farklı bir çalışma yapılmamıştır. Diğer yöntemlerle tam olarak tanımlanamayan *Candida haemulonii* izolatının tanımlanması MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) yöntemi ile canlandırma sonrası yapılmıştır.

Besiyerleri: Sabouraud Dekstroz Agar (SDA, %4 glukozlu, Merck); Besiyeri içeriği; D(+)-glukoz 40 g/L (g/litre), pepton 10 g/L, agar-agar 15 g/L. Toz hâlindeki besiyeri karışımının 65 g'ı 1.000 ml distile su içerisinde eritildi ve otoklavda 121°C 15 dakika sterilize edilip, steril cam petri plaklarına 4-6 mm (milimetre) kalınlığında döküldü.

Sabouraud Dekstroz Broth (SDB, Merck); Besiyeri içeriği; D(+)-glukoz 20 gr/L, pepton (meat) 5 g/L, pepton (kazein) 5 g/L. Toz halindeki besiyeri karışımının 30 g'ı 1.000 mL distile su içerisinde eritildi ve cam tüplere beşer mL dağıtıldı. Cam tüpler içindeki besiyerleri otoklavda 121°C'de 15 dakika tutularak sterilize edildi.

Boncuklu Saklama Tüpü: Ticari olarak kullandığımız sistem (Mast Cryobank, İngiltere), 25 adet gözenekli renkli boncuk ve bir kriyo-prezervatif sıvı içeren steril tüplerden oluşmaktadır. Boncuklu saklama tüpleri kullanım öncesi oda ısısında saklanmaktadır. Boncukların gözenekli yapıları hücrelerin boncuk yüzeyine yapışmasını sağlar ve boncuklar depolanan hücreler için taşıyıcı görevi görürler. Bir izolat bu şekilde saklandığında 25 veya daha fazla pasaj yapma olanağı sağlanmış olur.

Suşların Stoklanması: Uygun koşullarda alınıp mikrobiyoloji laboratuvarına transportu sağlanan klinik örneklerde üreyen ve yukarıda belirtilen yöntemlerle

tanımlanan izolatların SDA ve "CHROMagar *Candida*" (CAC) besiyerlerine tek koloni pasajları yapılarak izolatların tümü saflaştırıldı ve boncuklu saklama tüplerinde -20°C'de laboratuvar tipi derin dondurucuda saklandı. Her bir izolat için, saklama tüplerinin kriyojenik sıvısı yaklaşık olarak 3 veya 4 McFarland standardına eşdeğer bir yoğunluğa sahip olacak şekilde inoküle edildi. İnokülasyon sıvısı, süspansiyonu emülsiyon hâline getirmek ve hücrelerin boncuklara tutunmasını sağlamak için dört veya beş kez çalkalandı ve karıştırıldı. Daha sonra kriyojenik sıvının fazla olan kısmı uzaklaştırıldı ve boncukların donma sırasında birbirine yapışmasını engellemek ve süspansiyon tabakasının şişenin dibinde kalmasına izin vermek için az bir miktar sıvı bırakıldı. Şişeler daha sonra -20°C'de tutuldu. İlk stoklama sonrası canlılık kontrolü için stoklama işleminden 1-2 hafta sonra her bir kültürden birer boncuk alınarak canlılık ve morfolojik özellikleri kontrol edildi ve tüm stok kültürlerinin uzun süreli saklanmaya uygun olduğu gözlemlendi. İzolatların bulunduğu boncuklu saklama tüpleri 2008 yılında İstanbul'dan Ankara'ya soğuk transport şartlarına uyulmaksızın taşındı. Daha sonraki süreçte Ankara'da laboratuvar koşullarında -20°C'de korundu. Laboratuvarımızda derin dondurucunun çalışması kalite kontrol uygulamaları kapsamında düzenli olarak takip edilmektedir. Laboratuvarımız hastane güç kaynağına bağlı olduğundan, sonraki saklama sürecinde kültürlerin canlılığını önemli ölçüde azaltan yineleyen donma ve çözülme olayı (uzun süreli elektrik kesintileri gibi) meydana gelmemiştir.

Stok Suşların Canlandırılması: Çalışmaya dâhil edilen 94 izolatın stoklandığı boncuklu saklama tüplerinden ilk olarak, cam tüpler içerisinde hazırlanan steril SDB besiyerlerine ekimler yapıldı. İzolatların ani ısı değişimlerinden etkilenmemesi için boncuklar oda sıcaklığında bekletilen sıvı besiyerlerine inoküle edildi ve bu besiyerleri birkaç saat içerisinde etüve alındı. En az iki günlük inkübasyonu (37°C'lik etüvde; 48-72 saat) takiben üreme gözlenen kültür tüplerinden katı besiyerlerinde pasajları yapıldı. Üreme olmayan boncuklu saklama tüplerinden ikinci pasaj-

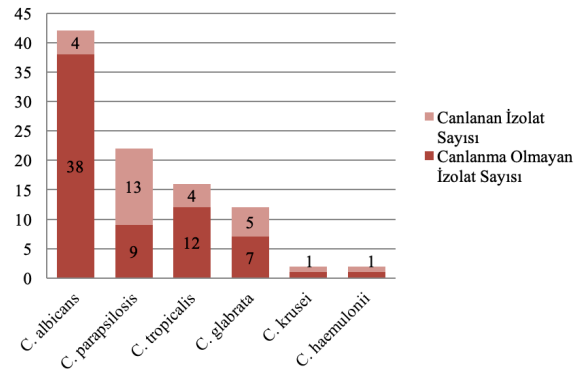
lar alındı ve aynı işlemler tekrarlandı. Son olarak ikinci pasajlarında da üreme olmayan saklama tüpleri içerisine sıvı besiyeri eklenip 37°C'lik etüvde 48-72 saat inkübe edildi ve katı besiyerlerine pasajları alındı. Canlandırılan izolatların tanımlamaları laboratuvarımızda kullanılan rutin tanı yöntemleri ile doğrulandı.

Veri Analizi ve Karşılaştırmalar: Aynı ortamda ve eşit koşullarda saklanan izolatların canlı kalma oranları için tür ve izole edildikleri klinik örnekler için karşılaştırmalar ve temel istatistiksel hesaplamalar yapıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında, anlamlılık ise $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen izolatlardan [*Candida albicans* 42 izolat, *C. parapsilosis* 22 izolat, *Candida tropicalis* 16 izolat, *Candida glabrata* 12 izolat, *Candida krusei* bir izolat ve *C. haemulonii* bir izolat] %29.8'i (28/94) stoklandıkları dönemden on yıldan daha uzun bir süre sonra pasajlandıkları kültürlerde üredi. Her bir türün canlanma oranları Şekil 1'de gösterilmektedir.

İzolatların canlanma oranlarının ayrıntılı karşılaştırılması Tablo 1'de yer almaktadır. Canlanma oranı *C. parapsilosis* suşlarında %59.1 (13/22) iken, *C. albicans* suşlarında %9.52 (4/42) olarak bulundu (χ^2 testi, $p < 0.0001$). *C. glabrata* ve *C. tropicalis* suşla-



Şekil 1. *Candida* türlerinin canlanma oranları.

rında canlanma oranları sırasıyla %41.7 (5/12) ve %25 (4/16) olarak bulundu. Canlanma oranı ikinci en yüksek tür olan *C. glabrata* suşları diğer türler ile karşılaştırıldığında yalnızca *C. albicans* ile canlanma oranları arasında anlamlı bir fark bulundu. *C. krusei* ve *C. haemulonii* için tek izolat olmaları nedeniyle istatistiksel karşılaştırmalar yapılmadı. *C. parapsilosis* ile diğer türlerin canlanma oranlarının karşılaştırmaları Tablo 1'dedir.

Saklanan izolatlar için saklama süresi, saklama ortamı (boncuklu saklama tüpleri), saklama sıcaklığı (-20°C), saklamada kullanılan elektrikli cihaz gibi karşılaştırmalı sonuçları doğrudan etkileyebilecek parametreler tüm izolatlar için aynı şekildeydi.

İzolasyon bölgelerine göre karşılaştırmalar yapıldığında "kan, kateter ve yara" izolatlarında canlanma oranı %42 (21/50) iken, "idrar ve genital bölge"

Tablo 1. *Candida* türlerinde canlanma oranları ve oranların türler arasında karşılaştırılması.

Tür adı	İzolat sayısı	Canlanan izolat		Canlanma oranlarının karşılaştırılması	
		n	%	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. albicans</i>	42	4	9.52	$p < 0.0001^*$	$p = 0.0188^{**}$
<i>C. parapsilosis</i>	22	13	59.1	-	$p = 0.329^*$
<i>C. tropicalis</i>	16	4	25	$p = 0.037^*$	$p = 0.431^{**}$
<i>C. glabrata</i>	12	5	41.7	$p = 0.329^*$	-
<i>C. krusei</i>	1	1	100	-	-
<i>C. haemulonii</i>	1	1	100	-	-
Toplam	94	28	29.8	-	-
Non-parapsilosis	72	15	20.8	$p = 0.000595^*$	-
Non-glabrata	82	23	28	-	$p = 0.499^{**}$

* χ^2 , **Fisher'in kesin χ^2 testi.

Tablo 2. *Candida* türlerinin izole edilme bölgelerine göre canlanan izolat sayıları.

Tür adı	Kan, kateter, yara		Ağız, solunum yolu		İdrar, genital örnekler	
	Canlanan	Kayıp	Canlanan	Kayıp	Canlanan	Kayıp
<i>C. albicans</i>	3	13	0	8	1	17
<i>C. parapsilosis</i>	13	8	0	0	0	1
<i>C. tropicalis</i>	3	7	0	1	1	4
<i>C. glabrata</i>	1	1	0	1	4	5
<i>C. krusei</i>	0	0	1	0	0	0
<i>C. haemulonii</i>	1	0	0	0	0	0
Toplam (%)	21 (42)	29 (58)	1 (9.1)	10 (90.9)	6 (81.8)	27 (18.2)

örneklerinden izole edilen suşlarda canlanma oranı %18.2 (6/33) idi ve iki oran arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 2, $p=0.023381$).

TARTIŞMA

Mantarlar farklı özelliklere sahip çok sayıda türden oluşan bir grup olduğundan, zaman içinde kültürlerin canlılığını ve morfolojik, fizyolojik ve genetik bütünlüğünü devam ettirebilmek için çeşitli kültürasyon ve saklama yöntemleri geliştirilmiştir⁽¹⁷⁾. Bununla birlikte, yöntem seçiminde her bir yöntemin maliyeti ve emek-zaman gereksinimi de dikkate alınır. Mantarlar kolay ve ekonomik bir prosedür ile steril distile su içerisinde oda sıcaklığında saklanabilmekte, ne var ki bu yaklaşım fungal hücrelerin canlılığını ve stabilitesini uzun süre sürdürebilmesi için yetersiz kalmaktadır⁽²⁰⁾. Mantarların 10 yıl gibi uzun süreli saklanması gereken durumlarda kurutma (drying) veya dondurma (freezing) yöntemleri tercih edilir. Kurutma yöntemleri teknik olarak basittir ve ayrıca pahalı ekipman gerektirmez⁽¹⁷⁾. Silika jel, cam boncuklar ve toprak, kurutmada yaygın olarak kullanılan substratlardır. Mantar sporlarının silis jeli üzerinde 11 yıla kadar başarıyla saklandığı bildirilmiştir⁽¹⁹⁾. Bununla beraber, distile su içinde saklama ve silika jel yöntemleri gibi bazı düşük maliyetli koruma yöntemleri kullanışlı yöntemler olmalarına rağmen, maksimum saklama süreleri, her bir yönteme ve türlerin korunmasına göre değişmekle beraber, genel olarak 10 yıl veya daha azdır⁽¹⁷⁾. Olabiliyorsa, mantar suşlarının daha uzun süre koruma sağlayan yöntemlerden (liyofilizasyon, kriyoprezervasyon) biriyle saklanması önerilir. Kriyoprezervasyon dâhil olmak üzere don-

durma yöntemleri çok yönlüdür ve yaygın olarak uygulanan etkinliği bilinen yöntemlerdir. Çoğu mantar, kriyoprotektanlarla veya onlar olmaksızın, sıvı azotta veya standart laboratuvar dondurucularında saklanabilir. Dondurarak kurutma (liyofilizasyon) yönteminde mantar kültürleri dondurulur ve daha sonra vakum altında kurutulur, bazı mantar türleri için 30 yıla kadar koruma sağlayabilir. Yöntem mitospor üreten kültürlerde oldukça başarılıdır. Liyofilizasyon ve -135°C 'nin altındaki dondurucular kalıcı koruma için kusursuz yöntemlerdir ve uygun saklama koşulları için özellikle önerilmektedirler, bununla birlikte her iki yöntem de özel ve pahalı ekipmanlar gerektirir ve birçok mantar türü liyofilizasyon için uygun değildir^(17,18). Türkiye'de yapılan bir çalışmada, stok mantar kültürlerinin -20°C 'de dondurulmuş olarak saklanması, kökenlerin fenotip ve eşey özelliklerini kaybetmeden uzun süreli olarak (3 yıla kadar) canlılıklarını sürdürmelerini sağladığı gösterilmiştir⁽¹⁸⁾. Günümüzde bakterilerin ve maya mantarlarının, özellikle *Candida* izolatlarının standart elektrikli soğutucularda -20°C 'de dondurularak saklanması için tasarlanmış boncuklu saklama tüpleri ticari olarak bulunmakta ve ekonomik olması, kullanım kolaylığı ve uzun süreli saklama için uygun özellikleri sağlamaları nedeni ile çoğu laboratuvarında tercih edilmektedir⁽²⁰⁾. İzolatların canlandırılması gereken durumlarda boncuklu saklama tüplerinden hızlı bir biçimde bir-birkaç boncuk alınıp besiyerlerine pasaj yapılabilmekte ve böylece kültürlerin canlılığını önemli ölçüde azaltan tekrarlayan donma ve çözülme olaylarının önüne geçilmektedir. Bu çalışmada yaygın bir şekilde kullanılan bu yaklaşımın *Candida* türlerinin saklanmasıdaki etkinliği ele alınmıştır.

Laboratuvar tipi derin dondurucularda -20° ila -80°C'de dondurulan mantar kültürlerinin çoğu uzun süre canlılığını ve stabilitesini koruyabilmektedir⁽¹⁷⁾. Bir çalışmada, mitosporik ascomycetes, zygomycetes ve mayalar için -20°C'de 5 yıl saklandıktan sonra genel başarısızlık oranı %5.1 olarak bulunmuştur⁽²⁵⁾. Çalışmamızda, -20°C'de 5 yıl saklanan *Candida* izolatlarında genel başarısızlık oranı %70.2 (66/94) oranında bulunurken, türlere göre baktığımızda başarısızlık oranı *C. albicans* için %90.5 (38/42) ve *C. parapsilosis* için %40.9 (9/22) olarak bulundu. *C. parapsilosis* türlerinin canlı kalma oranı, *C. albicans* ve *C. tropicalis* izolatları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla $p < 0.0001$ ve $p = 0.037$). Tüm izolatlar *C. parapsilosis* ve *parapsilosis*-dışı türler olarak ikiye ayrıldığında *C. parapsilosis* izolatlarının canlı kalma oranı yine anlamlı derecede yüksek bulundu ($p = 0.000595$). "Kan, kateter ve yara" izolatlarındaki canlanma oranı (%42; 21/50), "idrar ve genital bölge" izolatları (%18.2; 6/33) ile kıyaslandığında iki oran arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 0.023381$), bununla beraber, bu farklılık örneklerdeki tür dağılımı ile ilişkili olabilir. Şöyle ki, canlanma oranı en yüksek olan tür olan *C. parapsilosis* izolatlarının tamamına yakını "kan, kateter ve yara" izolatları iken, *C. albicans* izolatları "idrar ve genital bölge" örneklerinde canlanma oranının düşük olmasında başlıca nedeni olarak gözükmektedir (Tablo 2).

Boncuklu saklama tüplerinin etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada, 6.198 maya (25 ayrı tür) ve 391 küf izolatı (37 ayrı tür) -70°C dondurucuda ve ayrıca sıvı nitrojende (-130°C) sekiz yıl gibi uzun bir süre saklanmış ve bu süre sonunda izolatlar yeniden canlandırılmıştır⁽²⁰⁾. Saklama süresi çalışmamıza yakın, ancak soğuk saklama koşulları bizim çalışmamıza kıyasla daha düşük sıcaklık derecelerinde (-20°C'ye karşın -70°C ve -130°C) olan bu çalışma verilerine göre suş kayıp oranı *C. albicans* için %0.11 (5/4453), *C. parapsilosis* için %0.85 (3/352), *C. glabrata* için %0 (0/359), *C. tropicalis* için %0.5 (2/401), *C. krusei* için %1.79 (5/279) ve *C. lusitanae* için %0 (0/43) olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada, *Candida* türleri

arasında en yüksek suş kayıp oranı %66.7 (28/42) ile *C. dubliniensis* için bulunurken, kayıp oranı %24.6 (15/61) olan dermatofitler dışındaki küf türlerinin (moniliyosöz ve dematiyosiyöz küfler ve dimorfik mantarlar) boncuklu saklama tüpleri ile çok iyi korunduğu (330 izolat için kayıp oranı %0) bildirilmiştir⁽²⁰⁾. Eski bir çalışmada, tür isimleri belirtilmeksizin mayalar ve maya benzeri fungal izolatlar için -20°C saklama koşullarında canlılık kaybı oranları 2 yıllık stok izolatlarda %2.14 (3/140) ve 5 yıllık izolatlarda %5.19 (4/77) olarak bildirilmiştir⁽²⁵⁾. Çalışmamızda, tüm izolatlar için canlılık oranının düşük olmasının önemli bir nedeni şehirler arası nakil sırasında boncuklu saklama tüplerinin çözülmeye maruz kalması olabilir.

Literatür taramalarında çalışmamız ile benzer koşulları taşıyan ve doğrudan karşılaştırma yapabileceğimiz araştırma sayısı sınırlı olsa da, *C. parapsilosis*'in saklama koşullarına ve çevresel şartlara karşı dayanıklılığını gösteren çok sayıda araştırma bulunmaktadır^(9,11,16). Bazı maya türlerinin distile suda uzun dönem saklandığı bir çalışmada *C. parapsilosis* türlerinin tamamının (%100;51/51) bir yıldan 10 yıla kadarki dönemde canlılığını koruduğu, aynı dönemlerde *C. albicans* için bu oranın %99-94.5 aralığında olduğu bildirilmiştir⁽²⁴⁾.

Sonuç olarak, çalışmamızda sunulan veriler, 45°C gibi yüksek sıcaklıklarda canlılığını sürdürebilen, soğuk koşullara adapte *Candida* türleri arasında yer alan (*C. albicans* bu grupta yer almamaktadır) ve hastane ortamlarında uzun süre canlılığını sürdürebilen bir tür olan *C. parapsilosis* izolatlarının soğuk saklama koşullarına *C. albicans* başta olmak üzere *C. tropicalis* ve *C. glabrata* türlerinden daha dayanıklı olduğunu desteklemektedir.

KAYNAKLAR

1. Şahiner F, Ergünay K, Özyurt M, Ardic N, Hoşbul T, Haznedaroğlu T. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen *Candida* suşlarının genotipik ve fenotipik olarak tanımlanması. Mikrobiyol Bul. 2011;45(3):478-88.

2. Turner SA, Butler G. The *Candida* pathogenic species complex. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014;4(9):a019778.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019778>
3. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev. 2007;20(1):133-63.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>
4. Neji S, Hadrich I, Trabelsi H, et al. 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.
<https://doi.org/10.1186/s12929-017-0376-2>
5. Qi L, Fan W, Xia X, et al. Nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis* sensu stricto fungaemia in a neonatal intensive care unit in China. J Hosp Infect. 2018;100(4):e246-52.
<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.06.009>
6. Ting JY, Roberts A, Synnes A, et al. Invasive fungal infections in neonates in Canada: Epidemiology and outcomes. Pediatr Infect Dis J. 2018;37(11):1154-9.
<https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001968>
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. J Clin Microbiol. 43(1):284-92.
<https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.284-292.2005>
8. Borghi E, Sciota R, Iatta R, Biassoni C, Montagna MT, Morace G. Characterization of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from invasive fungal infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011;30(11):1437-41.
<https://doi.org/10.1007/s10096-011-1242-x>
9. Kaplan E, İlkit M, de Hoog GS. *Candida parapsilosis*'in ekstrem koşullara toleransında tuz ve sıcaklık stres direncinin etkisi. Turk Mikrobiyoloji Cemiy Derg 2019;49(1):24-9.
<https://doi.org/10.5222/TMCD.2019.024>
10. Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(2):288-305.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x>
11. Dögen 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>
12. Aldave AJ, DeMatteo J, Glasser DB, et al. Report of the Eye Bank Association of America Medical Advisory Board Subcommittee on fungal infection after corneal transplantation. Cornea. 2013;32(2):149-54.
<https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31825e83bf>
13. Edelstein SL, DeMatteo J, Stoeger CG, et al. Report of the Eye Bank Association of America Medical Review Subcommittee on adverse reactions reported from 2007 to 2014. Cornea. 2016;35:917-26.
<https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000869>
14. Tran KD, Aldrich BT, D'Amato Tóthová J, et al. Efficacy and safety of various amphotericin B concentrations on *Candida albicans* in cold storage conditions. Cornea. 2020;39(1):110-7.
<https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002019>
15. Ritterband DC, Shah MK, Meskin SW, et al. Efficacy and safety of voriconazole as an additive in Optisol GS: a preservation medium for corneal donor tissue. Cornea. 2007;26(3):343-7.
<https://doi.org/10.1097/ICO.0b013e31802d82e8>
16. Maráz A, Kovács M. Food spoilage by cold-adapted yeast. In: Cold-adapted Yeasts. Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance. Buzzini, Pietro, Margesin, Rosa (Eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2014:497-532.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-45759-7_23
17. Nakasone KK, Peterson SW, Jong SC. Preservation and distribution of fungal cultures. In: Mueller G, Foster M, Bills G (eds). Biodiversity of fungi. 1st Ed. Inventory and monitoring methods. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004:37-47.
<https://doi.org/10.1016/B978-012509551-8/50006-4>
18. Yücel A, Kantarcıoğlu AS. Mantar stok kültürlerinin üç farklı yöntemle karşılaştırılması. Cerrahpaşa J Med. 2000;31(1):7-15.
19. Agnes DS, Onions HS. A comparison of some preservation techniques for fungi. Trans Brit Mycol Soc. 1983;81(3):535-40.
[https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(83\)80122-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(83)80122-3)
20. Espinel-Ingroff A, Montero D, Martin-Mazuelos E. Long-term preservation of fungal isolates in commercially prepared cryogenic microbank vials. J Clin Microbiol. 2004;42(3):1257-9.
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1257-1259.200>
21. McGinnis MR, Padhye AA, Ajello L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts and some aerobic *Actinomyces* in sterile distilled water. Appl Microbiol. 1974;28(2):218-22.
<https://doi.org/10.1128/AEM.28.2.218-222.1974>
22. Pasarell L, McGinnis MR. Viability of fungal cultures

- maintained at -70 degrees C. J Clin Microbiol. 1992;30(4):1000-4.
<https://doi.org/10.1128/JCM.30.4.1000-1004.1992>
23. Kramer CL, Mix AJ. Deep freeze storage of fungus cultures. Trans Kans Acad Sci. 1957;60:54-64.
<https://doi.org/10.2307/3627003>
24. Odds FC. Long-term preservation of pathogenic yeasts in water. J Med Vet Mycol. 1991;29(6):413-5.
<https://doi.org/10.1080/02681219180000651>
25. Carmichael JW. Viability of mold cultures stored at -20°C. Mycologia. 1962;54(4):432-6.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1962.12025019>