

## **CANDIDA ALBICANS 25S İNTRON GENOTİPLERİ İLE ANTİFUNGAL DUYARLILIKLARI ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

### **EVALUATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN *CANDIDA ALBICANS* 25S INTRON GENOTYPES AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITIES**

**Neriman BALABAN<sup>1</sup>, Zeynep Ceren KARAHAN<sup>2</sup>, İpek MUMCUOĞLU<sup>1</sup>  
Altan ÇAYIRLI<sup>1</sup>, Semra KUŞTİMUR<sup>3</sup>**

**ÖZET:** Son yıllarda özellikle çeşitli nedenlerle bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların sayısındaki hızlı artış nedeniyle *Candida albicans*'ın neden olduğu enfeksiyonların sıklığında artış olmuştur. 25S intron genotiplendirmesi ile *C.albicans* suşları, aktarılabılır grup-1 intron varlığına göre, A, B ve C olmak üzere üç genotipe ayrılmaktadır. Genotip A izolatlarının artmış flusitozin direnci ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, klinik izolatlardan elde edilen *C.albicans* suşlarının 25S genotip dağılımlarının belirlenmesi ve genotipler ile antifungal duyarlılıkları arasında ilişki olup olmadığının araştırılmasıdır. Çalışmaya çeşitli klinik örneklerden izole edilen 70 adet *C.albicans* suşu alınmıştır. Suşların tanımlanması ve antifungal duyarlılık testleri sırasıyla API ID 32C ve ATB Fungus 2 (bioMerieux, Fransa) sistemleri kullanılarak yapılmıştır. Suşlardan DNA ekstraksiyonunu takiben genotipleme için literatürde belirtildiği şekilde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürününün büyüklüğüne göre genotipler belirlenmiştir. Genotipler ile antifungal duyarlılık paternleri arasındaki ilişkinin araştırılmasında Pearson Khi kare testi ve Fisher's Exact test kullanılmıştır. Değerlendirilen 70 suşun 35'i (%50) genotip A, dokuzu (%12.9) genotip B ve 26'sı (%37.1) genotip C olarak bulunmuştur. Nistatin, mikonazol ve ketokonazol duyarlılıklarının genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösterdiği tespit edilmiştir (p değerleri sırasıyla; 0.032, 0.035 ve 0.035). Bu farklardan genotip B suşları içerisinde orta derecede duyarlı (ve dirençli) izolat sayısının daha fazla olması sorumlu görülmektedir. Ancak, 25S intron varlığına göre antifungal duyarlılıklar değerlendirildiğinde, intron varlığı ile antifungal duyarlılıklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiş ve genotiplerle flusitozin, amfoterisin B ve ekonazol duyarlılıkları arasında anlamlı fark bulunmamıştır (p değerleri sırasıyla; 0.357, 0.602 ve 0.051). Sonuç olarak, *C.albicans* genotipleri ile direnç gelişme mekanizmaları arasındaki olası ilişkinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılabilmesi için daha geniş kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

*Anahtar sözcükler: Candida albicans, 25S intron genotiplemesi, antifungal duyarlılık.*

**ABSTRACT:** Due to the increase in the number of immunosuppressive patients, an increase in the frequency of *Candida albicans* infections is recorded during the recent years. *C.albicans* strains can be grouped into three genotypes (genotypes A, B and C)

<sup>1</sup> Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara.

<sup>2</sup> Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (ckarahan@medicine.ankara.edu.tr)

<sup>3</sup> Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

by 25S intron analysis according to the presence of a transposable group-1 intron. Genotype A isolates were found to be associated with increased resistance to flucytosine. The aim of this study was to determine the genotypic distribution of *C.albicans* isolates and investigate the relationship between the genotypes and antifungal susceptibility patterns. Seventy clinical *C.albicans* isolates were included in the study. The strains were identified by API ID 32C (bioMerieux, France), and antifungal susceptibilities were determined by ATB Fungus 2 (bioMerieux, France) system. Following DNA extraction from the isolates, polymerase chain reaction (PCR) was performed as indicated in the literature. The genotypes were determined according to the size of the amplified PCR product. For the statistical analysis of the relationship between the genotypes and antifungal susceptibility patterns, Pearson's khi square and Fisher's exact tests were performed. Among the 70 strains investigated, 35 (50%) were found as genotype A, nine (12.9%) were genotype B and 26 (37.1%) were genotype C. Nystatin, miconazole and ketoconazole susceptibilities were significantly different among the genotypes, genotype B being more resistant to these agents (p values were 0.032, 0.035 and 0.035, respectively). When the susceptibility of the strains were compared according to the presence of the transposable intron, no significant difference was observed. There was also no statistically significant difference between the genotype distribution of the isolates and flucytosine, amphotericin B and econazole susceptibilities (p values were 0.357, 0.602 and 0.051, respectively). As a result, in order to clarify the resistance mechanisms of different genotypes of *C.albicans* isolates, more sophisticated and large-scale studies should be performed.

*Key words: Candida albicans, 25S intron genotypes, antifungal susceptibility.*

## GİRİŞ

Son yıllarda, AIDS ve kanser gibi bağışıklık sistemini ileri derecede baskılayan hastalıkların ve organ nakli uygulamalarının artması ile bu hastalara uygulanan yoğun tedavi programlarının bağışıklığı baskılanmış hastaların sağ kalma sürelerini uzatması sonucunda, mantar enfeksiyonu geçiren hasta sayısında önemli ölçüde artış olmuştur. Değerlendirilen örneklerden izole edilen mantarların çeşitliliğinde belirgin bir artışa rağmen, *Candida albicans* hala en önde gelen enfeksiyon etkenidir<sup>1,2</sup>. *C.albicans*'ın neden olduğu enfeksiyonların spektrumu basit kozmetik problemlerden, hayatı tehdit eden ağır sistemik enfeksiyonlara kadara değişebilmektedir<sup>3</sup>.

Enfeksiyon etkeninin moleküler tiplendirilmesi (genotipleme) özellikle epidemiyolojik çalışmalar açısından önem taşımaktadır. Enfeksiyon dinamiklerini inceleme, korunma ve tedavi stratejilerini geliştirmede genotipleme önemlidir<sup>4-7</sup>. Yaygın olarak uygulanabilmesi için, genotiplerede kullanılacak yöntemin, kolay ve ucuz olması, temiz, tartışmasız, doğru, güvenilir ve tekrarlanabilir sonuç vermesi, duyarlılık ve ayırım gücünün yüksek olması, standardize edilebilmesi ve yapılan çalışmalarla geçerliliğinin ispatlanmış olması gereklidir<sup>6-8</sup>. Mantarların tiplendirilmesinde tüm bu özellikleri taşıyan ve altın standart olarak kabul edilebilecek bir yöntem bulunmamaktadır.

McCullough ve arkadaşlarının<sup>5</sup> geliştirdiği bir yöntem olan 25S intron genotiplendirmesi, belirtilen bu özelliklerin pek çoğunu taşıyan ve kullanımı giderek artan bir yöntemdir. Bu yöntem ile genotip ayrımı, 25S rRNA'yı

kodlayan DNA bölgesinde (rDNA) yer alan 379 baz çift (bç)'lik aktarılabılır bir grup-1 intronun varlığına dayanmaktadır<sup>9</sup>. Buna göre, genomunda bütün rDNA tekrarlarında bu intronu taşıyan *C.albicans* suşları genotip B, bazılarında taşıyıp bazılarında taşımayan suşlar genotip C ve genomunda bu intronu taşımayanlar genotip A olarak isimlendirilmişlerdir<sup>5</sup>. Aynı yöntemle tespit edilebilen genotip D ve E'nin ise *C.dublınıensis*'e ait genotipler olduğu anlaşılmıştır<sup>5,10</sup>. Yapılan çalışmalarda genotip A suşlarının artmış flusitozin ve bunun bir metaboliti olan 5-flourourasile karşı direnç ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur<sup>5,9,10</sup>.

Bu çalışmanın amacı, çeşitli klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *C.albicans* suşlarının 25S intron genotip dağılımlarının belirlenmesi ve genotiplerle antifungal duyarlılıkları arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

### GEREÇ ve YÖNTEM

***C.albicans* Suşları:** Çalışmaya Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin çeşitli kliniklerinde Temmuz 2004 - Haziran 2005 tarihleri arasında yatarak tedavi gören 38 kadın ve 32 erkek olmak üzere toplam 70 hastanın çeşitli enfeksiyon bölgelerinden izole edilen 70 *C.albicans* suşu dahil edildi. Suşların 31'i idrar, 13'ü kan, 10'u steril vücut sıvıları (beyin omurilik sıvısı, periton mayi, eklem mayi), 9'u yara, 5'i balgam ve ikisi biyopsi materyalinden izole edilmişti. Çalışmaya alınan suşların tanımlanması, çimlenme borusu testi ve API ID 32C (bioMerieux, Fransa) sistemi ile, antifungal duyarlılık testleri ATB Fungus 2 (bioMerieux, Fransa) sistemleri kullanılarak yapıldı.

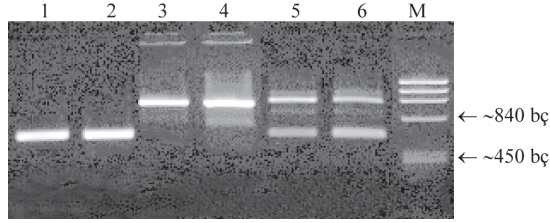
**25S İtron Genotiplendirmesi:** Suşlardan DNA izolasyonu için tek koloni pasajı yapıldı, pasajdan alınan bir öze dolusu *C.albicans* kolonisi, 200 µl steril distile su içerisinde süspansiyon edilerek üzerleri steril mineral yağ ile kapatıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) öncesinde koloni süspansiyonları 95°C'de 5 dakika tutularak hücre duvarları patlatıldı ve süspansiyonun 5 µl'si PCR'da şablon olarak kullanıldı. PCR; CA-INT L (5'ATA AGG GAA GTC GGC AAA ATA GAT CCG TAA 3') ve CA-INT R (5' CCT TGG CTG TGG TTT CGC TAG ATA GTA GAT 3') primerleri kullanılarak daha önce literatürde belirtildiği şekilde gerçekleştirildi<sup>5</sup>. Toplam hacim 100 µl olacak şekilde, PCR karışımı içerisine uygun tampon ile birlikte 1U Taq DNA polimeraz (Fermentas, Litvanya), her bir primerden 1 µM, 1.5 µM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP (Fermentas, Litvanya) eklendi. PCR amplifikasyonu, 94°C'de 3 dakika ilk denatürasyonu takiben 30 döngü olacak şekilde 95°C'de 1 dakika denatürasyon, 65°C'de 1 dakika primer bağlanması, 72°C'de 2.5 dakika uzama ve son olarak 72°C'de 5 dakika son uzama olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünleri %3'lük agaroz jel elektroforezine tabi tutulduktan sonra etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık altında görüntülendi. Elde edilen PCR ürününün büyüklüğüne göre, 450 bç'lik tek bant veren suşlar genotip A, 840 bç'lik tek bant veren suşlar genotip B, 450 ve 840 bç'lik iki bant veren suşlar ise genotip C olarak tanımlandı (Şekil 1).

**İstatistiksel Analiz:** Genotipler ile antifungal duyarlılık paternleri arasındaki ilişkinin araştırılmasında, Pearson Khi kare testi ve hücrelerdeki beklenen sayı beşin altında olduğunda Fisher's Exact Test kullanıldı. p değeri 0.05'den küçük bulunan analizler, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## BULGULAR

Değerlendirilen 70 *C.albicans* suşunun 35'i (%50) genotip A, 9'u (%12.9) genotip B ve 26'sı (%37.1) genotip C olarak bulunmuştur (Şekil 1). Suşların izole edildikleri bölgelere göre genotiplerin dağılımı Tablo I'de görülmektedir.

Çalışılan suşların antifungal ajanlara duyarlılıkları ve genotip dağılımları Tablo II'de, intron varlığına göre antifungal duyarlılıkların değerlendirmesi ise Tablo III'de verilmiştir.



**Şekil 1.** Etidyum bromür ile boyanarak UV altında görüntülenmiş PCR ürünleri. Moleküler büyüklük belirteci [ $\phi$ X174 HaeIII kesim (Fermentas, Litvanya)] M ile gösterilmiş ve bantların karşılık geldiği molekül büyüklükleri sağda verilmiştir. 1. ve 2. sıralar genotip A (~450 bç), 3. ve 4. sıralar genotip B (~840 bç), 5 ve 6. sıralar genotip C (~450 bç ve ~840 bç) izolatları göstermektedir.

**Tablo I.** İzole Edildikleri Yerlere Göre Suşların Genotip Dağılımı

Örnek (Sayı)	Genotip		
	A	B	C
İdrar (31)	12	6	13
Kan (13)	6	1	6
Steril vücut sıvıları (10)	9	0	1
Yara (9)	5	1	3
Balgam (5)	3	0	2
Biyopsi (2)	0	1	1
Toplam (70)	35 (%50)	9 (%13)	26 (%37)

**Tablo II.** Antifungal Ajanlara Duyarlılık İle Genotip Dağılımının Karşılaştırılması

Antifungal	Duyarlılık*	Genotip A	Genotip B	Genotip C	p
5-Flusitozin	<0.25	33	9	26	0.357
	>128	1	0	0	
Amfoterisin B	<1	34	9	26	0.602
	4	1	0	0	
Nistatin	S	35	8	26	0.032
	I	0	1	0	
Mikonazol	S	27	3	19	0.035
	I+R	8+0	6+0	6+1	
Ekonazol	S	26	3	19	0.051
	I+R	9+0	6+0	6+1	
Ketokonazol	S	27	3	19	0.035
	I+R	8+0	6+0	6+1	

\* Rakamlar MİK ( $\mu$ g/ml) değerlerini göstermektedir. S: Duyarlı, I: Intermediate, R: Dirençli.

**Tablo III.** İntron Varlığına Göre Antifungal Duyarlılıkların Karşılaştırılması

Antifungal	Duyarlılık*	İntron yok (Genotip A)	İntron var (Genotip B ve C)	p
5-Flusitozin	<0.25	33	35	0.493
	4	1	0	
	>128	1	0	
Amfoterisin B	<1	34	35	1.000
	4	1	0	
Nistatin	S	35	34	1.000
	I	0	1	
Mikonazol	S	27	22	0.192
	I+R	8+0	12+1	
Ekonazol	S	26	22	0.303
	I+R	9	12+1	
Ketokonazol	S	27	22	0.192
	I+R	8	12+1	

\* Rakamlar MİK ( $\mu\text{g/ml}$ ) değerlerini göstermektedir. S: Duyarlı, I: Intermediate, R: Dirençli.

## TARTIŞMA

Daha önce yapılan çalışmalarda, 25S intron analizi ile belirlenen genotip A suşlarının flusitozin ve bunun metaboliti olan 5-florourasile daha dirençli olduğu gösterilmiştir<sup>5</sup>. Flusitozin, sentetik florlanmış bir pirimidin olup duyarlı mantar hücrelerinin içerisine sitozin permeaz enzimi ile alınır ve sitozin deaminaz enzimi ile aktif metaboliti olan 5-florourasile (5-FU) dönüştürülür. 5-FU, RNA'da urasilin yerini alarak protein sentezini bozar. Flusitozinin bir diğer etki mekanizması, timidilat sentetaz enzimini bloke etmesi sonucu DNA sentezinin inhibisyonudur<sup>11</sup>. Genotip A *C.albicans* suşlarında görülen bu dirençten, genotip A'ların grup-1 intron taşımamalarının sorumlu olduğu ileri sürülmüş ve baz analoglarının, bu intronun arasına girip sekonder yapısını bozarak intronun kendi kendini ayırma mekanizmasını önlediği sonucuna varılmıştır<sup>9</sup>. Bu intronun varlığı, *C.albicans*'ta flusitozin duyarlılığına katkıda bulunan bir faktör olarak belirtilmiştir. İntronu taşımayan genotip A suşları, ilacın kromozomal DNA, ribozomal RNA ve mRNA içerisine girerek oluşturduğu etkilerin sonucu olarak değişen düzeylerde duyarlılık göstermektedir<sup>9</sup>. Ancak, genotip A içerisinde duyarlı suşların, genotip B ve genotip C içerisinde ise dirençli suşların bulunması nedeniyle, bu mekanizmanın flusitozin direncini belirlemede çok fazla önemli olmayabileceği, henüz tanımlanmamış başka mekanizmaların daha önemli olabileceği üzerinde durulmaktadır<sup>10</sup>.

Bu çalışmada değerlendirilen 70 suşun 35'i (%50) genotip A, dokuzu (%13) genotip B ve 26'sı (%37) genotip C olarak bulunmuştur. *C.albicans* suşlarının genotip dağılımları ülkeler arasında, hatta aynı ülke içerisinde yıldan yıla farklılık gösterebilmektedir<sup>10,12-14</sup>. Elde edilen sıklıklar, genotip C sıklığında hafif bir artış ve B sıklığında azalma haricinde daha önce yayınlanan Türkiye sonuçları ile benzerdir<sup>14</sup>. Genotip C'nin genotip A'dan B'ye veya B'den A'ya geçiş esnasında

ortaya çıkan bir ara form olabileceği gibi, genotip A ile B arasındaki eşeyli üremenin bir sonucu olarak da ortaya çıkabileceği ileri sürülmektedir<sup>5</sup>. Genotip C sıklığının yeni izolatlarda artıyor olması, genotip B'den A'ya geçiş veya direnç gelişimi esnasında genotip C'nin ortaya çıkıyor olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızda değerlendirilen suşlar içerisinde, istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da, genotip B'lerde flusitozine dirençli suş bulunmaması, genotip A'lar içerisinde ise direnç tespit edilmesi, bu savı desteklemektedir.

Çalışmamızda, suşların antifungal duyarlılıklarının değerlendirilmesinde ATB Fungus 2 kiti kullanılmıştır. Bu yöntem, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) tarafından mantar izolatlarında antifungal duyarlılıkların belirlenmesi için önerilen standart yöntem olmamakla birlikte, yapılan çalışmalar ATB Fungus 2 testinin, referans yöntem olan sıvı dilüsyon duyarlılık testleri ile %90 üzerinde uyumlu sonuç verdiğini göstermektedir<sup>15,16</sup>. Çalışmada değerlendirilen suşların nistatin, mikonazol ve ketokonazol duyarlılıklarının genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı kabul edilebilecek bir fark gösterdiği tespit edilmiştir (p değerleri sırasıyla; 0.032, 0.035 ve 0.035). Bu farklardan genotip B suşları içerisinde orta derecede duyarlı (ve dirençli) izolat sayısının daha fazla olması sorumlu görülmektedir. Ancak, 25S intron varlığına göre antifungal duyarlılıklar değerlendirildiğinde, intron varlığı ile antifungal duyarlılıklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. Bu nedenle, nistatin, mikonazol ve ketokonazol direnci ile genotipler arasında tespit edilen ilişki, intron varlığına bağlanmamıştır. Bu ilişkiden başka mekanizmaların sorumlu olma ihtimali daha yüksek görünmektedir. Nistatine dirençli tek izolat olması nedeniyle kesin bir yorum yapmak mümkün değildir. Nistatine dirençli bu tek örnek aynı zamanda mikonazol, ekonazol ve ketokonazole de dirençli bulunmuştur. Mikonazol ve ketokonazol direnci tespit edilen örnekler aynı zamanda ekonazole de dirençli bulunmuştur. Genotip B suşlarının %66.7'sinin üç imidazol türevi antifungale de dirençli olduğu görülmektedir. İmidazol türevi antifungaller, duyarlı olan mantarlarda, ergosterol sentezini inhibe ederek membran fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır. *C.albicans* genotip B'de daha yüksek bulunan, ancak intron varlığı ile açıklanamayan bu direncin altında yatan mekanizmanın araştırılması gerekmektedir.

Mevcut sonuçlarımız ve daha önce yapılan araştırmalar, *C.albicans* 25S intron genotipleri ile antifungal duyarlılık arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir. 25S intron varlığı direnç gelişiminden tek başına sorumlu olmasa da, *C.albicans* genotipleri ile direnç gelişme mekanizmaları arasında bir ilişki olması ihtimali yüksektir. Bu ilişki(ler)in daha kesin bir şekilde ortaya konması ve altta yatan mekanizma(lar)ın açıklığa kavuşturulabilmesi için daha fazla sayıda suşun değerlendirildiği geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## TEŞEKKÜR

İstatistiksel değerlendirmelere yaptığı yardımlardan ötürü Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Atilla Elhan'a teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Verduyn Lunel FM, Meis JF, Voss A. Nosocomial fungal infections: candidemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34: 213-20.
2. Dalle F, Franco N, Lopez J, et al. Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4554-9.
3. Monod M, Borg von Zepelin M. Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*, pp: 114-28. In: Breitenbach M, Cramer R, Lehrer SB (eds), *Fungal Allergy and Pathogenicity*. 2002, Karger, Basel.
4. Pfaller MA. Epidemiology of fungal infections: the promise of molecular typing. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1535-9.
5. McCullough JM, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 417-21.
6. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 332-70.
7. Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 675-9.
8. Pujol C, Joly S, Lockhart SR, Noel S, Tibayrenc M, Soll DR. Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2348-58.
9. Mercure S, Montplaisir S, Lemay G. Correlation between the presence of a self-splicing intron in the 25S rDNA of *C.albicans* and strains susceptibility to 5-fluorocytosine. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 6020-7.
10. Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, Yazawa K, Nishimura K. Molecular characterization of new clinical isolates of *Candida albicans* and *C.dubliniensis* in Japan: Analysis reveals a new genotype of *C.albicans* with group I intron. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4309-15.
11. Richardson MD, Warnock DW (eds). Antifungal drugs, pp: 35-38. In: *Fungal Infection. Diagnosis and Management*. 2002, 2<sup>nd</sup> ed. Blackwell Science, UK.
12. McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular epidemiology of the global and temporal diversity of *Candida albicans*. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1220-5.
13. Millar BC, Moore JE, Xu J, Walker MJ, Hedderwick S, McMullan R. Genotypic subgrouping of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by 25S intron analysis. *Lett Appl Microbiol* 2002; 35: 102-6.
14. Karahan ZC, Güriz H, Ağırbaşı H, et al. Genotype distribution of *Candida albicans* isolates by 25S intron analysis with regard to invasiveness. *Mycoses* 2004; 47: 465-9.
15. Durussel C, Parreno D, Nougier L, Monnin V, Zambardi G. Comparative study of various methods, NCCLS M27-A2, EUCAST and ATB Fungus 2 (bioMérieux) for the in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida* sp. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 (Suppl 3): 459-60.
16. Quindos G, Salesa R, Carrillo-Munoz AJ, et al. Multicenter evaluation of ATB fungus: a standardized micromethod for yeast susceptibility testing. *Chemotherapy* 1994; 40: 245-51.