

CANDIDA KRUSEI KLİNİK İZOLATLARININ GENOMİK DNA RESTRİKSİYON ENZİM ANALİZİ VE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE TİPLENDİRİLMESİ*

MOLECULAR TYPING OF CLINICAL CANDIDA KRUSEI ISOLATES BY USING RESTRICTION ENDONUCLEASE ANALYSIS OF GENOMIC DNA AND POLYMERASE CHAIN REACTION

Banu SANCAK¹, Dilek MENEMENLİOĞLU¹, Nazlı GÜRKAN AYDIN¹, Sibel ERGÜVEN¹,
Sevtap ARIKAN¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
(banusancak@yahoo.com)

ÖZET

Candida krusei, flukonazole doğal dirençli bir mayadır ve özellikle hematolojik malignansili hastalarda önemli bir hastane kaynaklı kandidoz etkenidir. *C.krusei* enfeksiyonlarının giderek artan önemine karşın bu mikroorganizmanın genetik farklılıkları ve moleküler epidemiyolojisi ile ilgili bilinenler sınırlıdır. Dolayısıyla, *C.krusei* izolatlarının birbirinden ayrımı, bu mikroorganizmanın epidemiyolojisinin, bulaş yollarının ve patogenezinin aydınlatılması için büyük önem taşımaktadır. Bu çalışma, klinik örneklerden izole edilen 56 *C.krusei* izolatının, Arno1 ve Arno2 primerlerinin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve *HinfI* enziminin kullanıldığı genomik DNA restriksiyon enzim analizi (restriction endonuclease analysis of genomic DNA; REAG) yöntemleriyle moleküler düzeyde tiplendirilmesi ve *C.krusei* enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisinin aydınlatılması amacıyla planlanmıştır. REAG yöntemiyle 10 farklı genotip (A-J) saptanmıştır. Elde edilen bant sayısı 12 ile 15 arasında değişirken, bant büyüklükleri 2 ile 6.2 kb arasında ölçülmüştür. Hastaların %71.4'ü üç ana patern (D, F, H) altında toplanmıştır. PCR analizi sonucunda büyüklükleri yaklaşık 1-2 kb olan farklı PCR ürünleri elde edilmiş ve 13 farklı DNA paterni (a-m) saptanmıştır. Hastaların %58.9'u dört ana patern (d, f, h, k) altında toplanmıştır. Elli altı izolatın 43'ünde hem REAG hem de PCR ile elde edilen genotipler aynı bulunmuştur. İzole edilen suşların çoğunun bant paternlerinin benzer çıkması ve belli başlı paternler altında toplanmış olması, çalışma kapsamındaki *C.krusei* izolatlarının etken olduğu enfeksiyonların ekzojen kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür. Tiplendirmede kullanılan her iki yöntem de *C.krusei* izolatlarının genotiplendirilmesinde başarılı bulunmakla birlikte PCR yöntemi, uygulanmasının basit olması ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle tercih edilebilir. Sonuç olarak, yöntemlerin güvenilirliğinin ve ayırım gücünün aydınlatılabilmesi için farklı moleküler yöntemlerle karşılaştırmalı ve kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar sözcükler: *Candida krusei*, genotiplendirme, restriksiyon enzim analizi, polimeraz zincir reaksiyonu.

* Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (Proje no: 02.02.101.037) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Candida krusei is inherently resistant to fluconazole and is an important pathogen responsible for nosocomial candidiasis especially in patients with hematological malignancy. Despite the growing clinical importance of *C. krusei* infections, little is known of its genetic diversity and molecular epidemiology. Therefore, differentiating between *C. krusei* isolates is of importance for a better understanding of the epidemiology, mode of transmission and pathogenesis of the organism. We investigated the use of two different methods (restriction endonuclease analysis of genomic DNA (REAG) with *HinfI* and polymerase chain reaction by using Arno1 and Arno2 primers) for molecular typing of 56 *C. krusei* isolates from 56 patients. Ten different types (A-J) were determined by REAG. Depending on the patterns of isolates, the number of the bands varied from 12 to 15 and the size of the fragments varied from 2.0 kb to 6.2 kb. Of the isolates 71.4% were gathered under three major patterns (D, F, H). In the second method, PCR amplified different sizes of fragments varied approximately from 1 kb to 2 kb, which yielded 13 types (a-m) from 56 patients. Four major patterns (d, f, h, k) were observed for 58.9% of the isolates. The genotypes detected by REAG and PCR methods were found to be same in 43 isolates out of 56. As the banding patterns of the isolates were found to be similar in this study, it was thought that an exogenous origin could be the source of infections caused by *C. krusei* isolates. Both REA of genomic DNA and PCR analysis seem to be useful for the typing of *C. krusei*, however PCR assay can be preferred as it is a simple and rapid method. As a result, further studies are required for the validation of reproducibility and discriminatory power of these methods.

Key words: *Candida krusei*, genotyping, restriction enzyme analysis, polymerase chain reaction.

GİRİŞ

Son yıllarda *Candida krusei*'ye bağlı meydana gelen enfeksiyonlar, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar başta olmak üzere, hastanede yatan hastalarda giderek artan sıklıkta görülmeye başlamıştır¹⁻⁴. Bu mikroorganizma, özellikle nötropenik hastalarda yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden enfeksiyonlara yol açmaktadır. *C. krusei*'nin flukonazole doğal dirençli bir tür olması ve *C. krusei* enfeksiyonlarında amfoterisin B'nin de bazı olgularda yetersiz kalabilmesi gibi nedenlerden dolayı, bu enfeksiyonların tedavisi ile ilgili önemli sorunlar ortaya çıkmaktadır⁵⁻¹⁰. *C. krusei* ile oluşan kolonizasyon ve enfeksiyon insidansındaki bu artış, nötropenik hastalara uygulanan uzun süreli flukonazol profilaksisi ya da tedavisi ile yakından ilişkilidir. İnsidandaki bu artışa rağmen, *C. krusei* enfeksiyonlarının patogenezi, epidemiyolojisi ve hastadan hastaya geçiş yolları hakkında bilinenler oldukça sınırlıdır¹¹⁻¹⁴. Bu konuların aydınlatılmasında *C. krusei* izolatlarının moleküler düzeyde ayırt edilmesi ve aralarındaki epidemiyolojik ilişkinin gösterilmesi oldukça önemlidir. Günümüzde, genotip tanımlamasına dayalı birçok yöntem kullanılmakla birlikte¹⁵⁻¹⁹, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve genomik DNA'nın *HinfI* enzimi ile yapılan restriksiyon enzim analizi (restriction endonuclease analysis of genomic DNA; REAG) yöntemlerinin oldukça başarılı olduğu bildirilmiştir^{11-13,15}.

Bu çalışma, klinik örneklerden izole edilen *C. krusei* suşlarının genotiplendirilmesi ve bu suşlarla gelişen enfeksiyonların kaynağı (endojen ya da ekzojen) hakkında bilgi verebilecek moleküler epidemiyolojik verilerin elde edilmesi amacıyla planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar

Çalışmaya, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesinde Ocak 1998-Ocak 2006 tarihleri arasında yatarak tedavi görmüş 56 hastadan izole edilmiş 56 *C.krusei* izolatı dahil edildi. Suşların tür düzeyinde tanımlanması; koloni morfolojileri, germinasyon tüpü oluşturma özellikleri, mısır unlu-Tween 80 besiyerindeki morfolojik görünümüleri ve ID32C kiti (BioMerieux, Fransa) kullanılarak saptanan asimilasyon reaksiyonları sonuçları değerlendirilerek gerçekleştirildi²⁰.

Genomik DNA'nın Elde Edilmesi

DNA ekstraksiyonu için küçük bazı değişiklikler dışında Scherer ve arkadaşlarının²¹ uyguladığı yöntem kullanıldı. Bu amaçla, *C.krusei* suşları, Sabouraud dekstroz agarda 18-24 saat süreyle 37°C'de inkübe edildi. Üreyen maya kolonilerinden 2-3 adet alınarak 5 ml maya ekstraktı-pepton-dekstroz sıvı besiyeri içine eklendi ve bir gece 37°C'de inkübe edildi. Süre sonunda besiyerinden 1.5 ml alınarak steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Daha sonra mikrosantrifüj tüpleri, 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atılarak elde edilen çökelti 1 ml 1 M sorbitol ile yıkandı. 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj sonrasında elde edilen çökelti, litikaz ve β-merkaptetoetanol içeren sorbitol-potasyum fosfat (KH₂PO₄) tamponu (pH: 7.5) içinde 30°C'de 1 saat inkübe edildi. Elde edilen sferoplastlar santrifüj edildikten sonra 0.5 ml lizis tamponu [50 mM EDTA (pH: 8.5), 2 mg/ml SDS] içinde 65°C'de 30 dakika inkübe edildi. Proteinlerin çöktürülmesi için 50'şer µl 5 M potasyum asetat eklenerek 1 saat buz üstünde bekletildi. Santrifüj sonrası alınan üst sıvı, RNaz ile 37°C'de 30 dakika muamele edildi. Elde edilen DNA, 7.5 M amonyum asetat ve %100 etanol ile çöktürüldü. %70 etanol ile yıkanan örnekler, 50 µl TE [10 mM Tris-Cl tamponu (pH: 7.5)-1 mM EDTA] solüsyonu içinde 4°C'de kullanılmaya dek saklandı.

REAG

DNA örnekleri *Hinfl* enzimi ile 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Elde edilen kesim ürünleri %0.8'lik olarak hazırlanmış agaroz jel kullanılarak 30 V'da 18 saat yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak UV altında değerlendirildi.

PCR

PCR için *C. krusei*'ye özgül primer çifti Arno1 (GGC CAA CAC ATA CAT ACC TT) ve Arno2 (GGT AGG ATA CTA ACC ACA GC) kullanıldı¹⁶. DNA amplifikasyonu için hazırlanan 50 µl'lik karışımın içine, 2 µl kalıp DNA, 1.25 U Taq polimeraz, 200 µM dNTP, 10 mM Tris, 50 mM KCl, 50 pmol primer ve 1.5 mM MgCl₂ eklendi. Tüpler "thermal cycler" cihazında, 92°C'de 30 saniye, 55°C'de 30 saniye ve 72°C'de 2 dakika tutularak 32 döngü gerçekleştirildi. Elde edilen amplifikasyon ürünleri, %1'lik agaroz jel kullanılarak 100 V'da 2 saat yürütüldü ve etidyum bromür ile boyandıktan sonra UV altında değerlendirildi.

Her iki yöntemle de elde edilen bantlar iki farklı araştırmacı tarafından görsel olarak değerlendirildi. Yerleşimlerine göre bantlara farklı numara verilerek, bandın varlığı "1",

yokluğu ise "0" olarak skorlandı. "Gruplar Arası Bağlantı Yöntemi" ve "Dice Benzerlik katsayısı" kullanılarak SPSS 10.0 B programı yardımıyla her iki yöntem için birer dendrogram elde edildi.

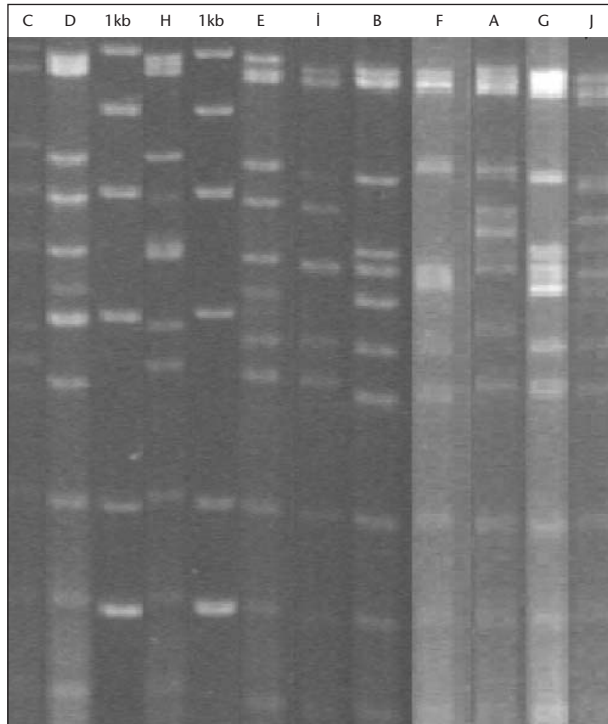
BULGULAR

REAG Analizi

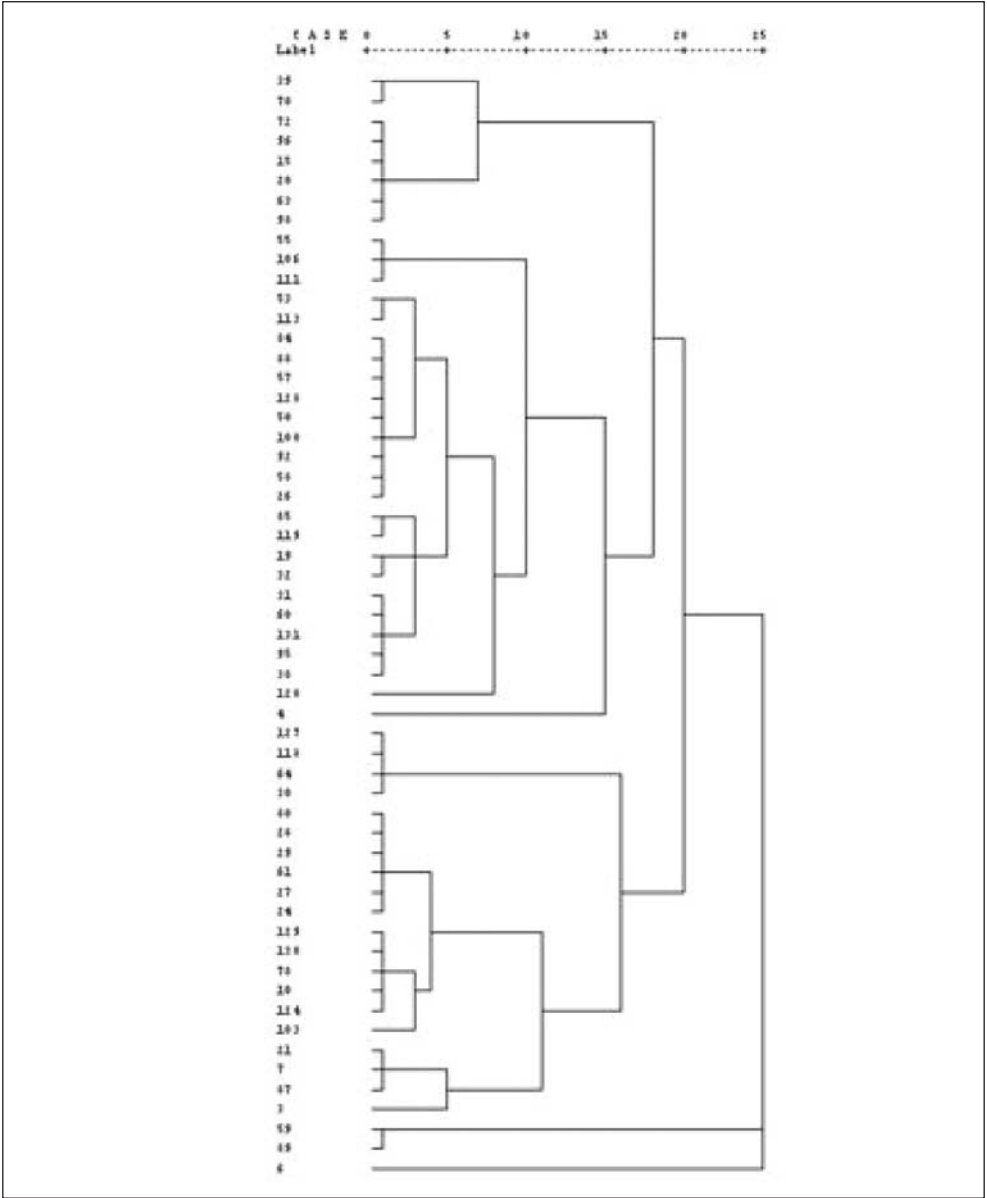
REAG ile 10 farklı DNA paterni (A-J) saptanmıştır. Elde edilen bant sayısı 12 ile 15 arasında değişirken, bant büyüklükleri 2 ile 6.2 kb arasında yer almıştır. Yirmi hastada H, 12 hastada D, 8 hastada F, 4'er hastada C ve E, 3 hastada G, 2 hastada B ve birer hastada A, İ ve J paternleri saptanmıştır (Resim 1). Hastaların %71.4'ü (40/56) 3 ana patern (D, F, H) altında toplanmıştır. Şekil 1'de REAG analizi sonucunda 56 *C.krusei* izolatı için elde edilen dendrogram görülmektedir.

PCR Analizi

PCR analizi sonucunda 13 farklı DNA paterni (a-m) elde edilmiştir. Elde edilen bant büyüklükleri 1-2 kb arasında değişkenlik göstermektedir. On dört hastada h, 8 hastada f, 6 hastada k, 5 hastada d, 4'er hastada c, e ve m, 3'er hastada g ve l, 2 hastada b ve birer hastada a, i ve j paternleri saptanmıştır (Resim 2). Hastaların %58.9'u (33/56) 4 ana

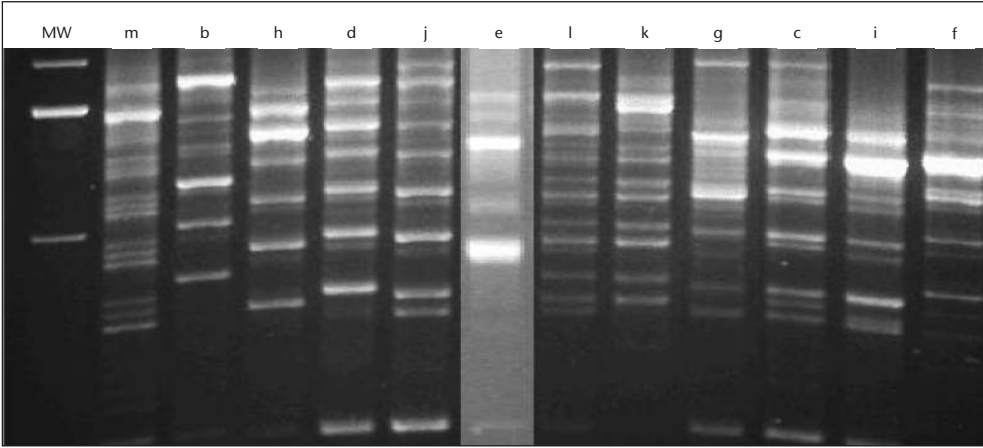


Resim 1. *C.krusei* izolatlarının *Hinf*I enzimi kullanılarak yapılan REAG yöntemiyle elde edilmiş farklı bant paternleri.



Şekil 1. REAG analizi sonucunda 56 *C.krusei* izolatu için elde edilen dendrogram.

patern (d, f, h, k) altında toplanmıştır. Şekil 2’de Arno1 ve Arno2 primerleri kullanılarak uygulanan PCR analizi sonucunda 56 *C.krusei* izolatu için elde edilen dendrogram görülmektedir.



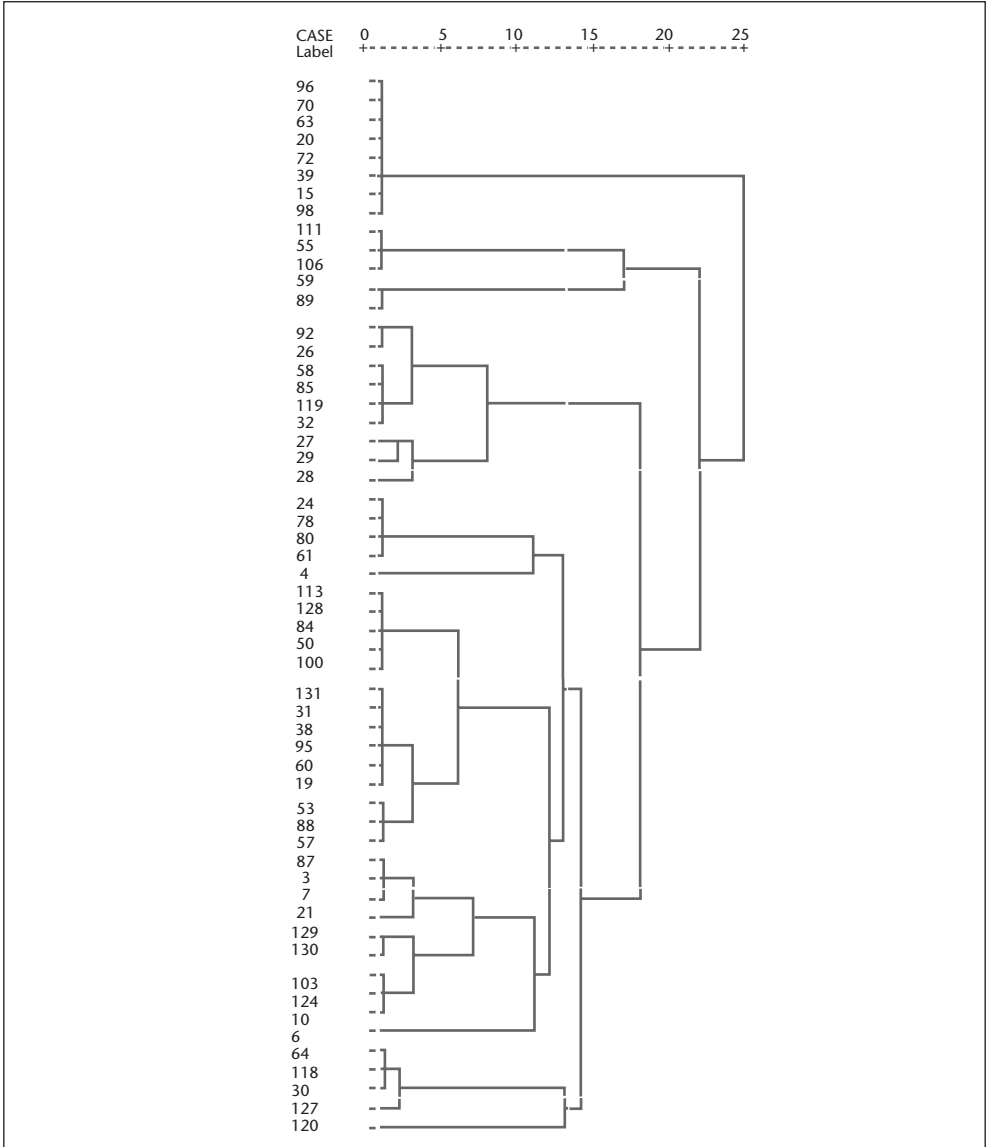
Resim 2. *C.krusei* izolatlarının Arno1 ve Arno2 primerleri kullanılarak uygulanan PCR ile elde edilmiş farklı genotipik paternleri.

REAG ve PCR ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, REAG ile H paterni olarak sınıflandırılan izolatların PCR ile h ve k olmak üzere 2 farklı grup altında; D paterni altında toplanan suşların ise PCR ile d, l ve m olmak üzere 3 farklı grup altında toplandıkları gözlenmiştir. REAG ile A, B, C, E, F, G, I ve J paternleri altında toplanan suşların ise sırasıyla a, b, c, e, f, g, i ve j olmak üzere PCR ile de aynı genotip altında toplandıkları görülmüştür.

TARTIŞMA

Candida enfeksiyonları, hem florada yer alan türlerle yani endojen yolla, hem de entübasyon ya da damar içi kateter uygulaması gibi invazif işlemler sonucunda ekzojen yolla meydana gelebilir²²⁻²⁴. *Candida* enfeksiyonlarını önlemek ve hastalar arasındaki yayılımını kontrol altına alabilmek için bu enfeksiyonların endojen ya da ekzojen kaynaklı olup olmadığının anlaşılması, yüksek riskli hastaların bu enfeksiyonlara karşı korunmasında gerekli önlemlerin alınabilmesi için önemli ipuçları sağlayacaktır.

C.krusei, flukonazole karşı doğal dirençli olması ve bağışıklık sistemi baskılanmış olgularda lokal ve sistemik enfeksiyonlara yol açması nedeniyle önemli bir hastane kaynaklı kandidoz etkenidir. *C.krusei* enfeksiyonlarında amfoterisin B tedavisinin de başarısız kalabildiği bilinmekte ve bu nedenlere bağlı olarak bağışıklık sistemi baskılanmış olgularda *C.krusei* enfeksiyonları morbidite ve mortalite yönünden önemini korumaktadır^{1,2,4,9,10,25}. Flukonazole doğal dirençli olması nedeniyle *C.krusei*, flukonazol profilaksisi veya uzun süreli flukonazol tedavisi sonucunda, ilacin seçici baskısına bağlı olarak kolonizasyon ya da enfeksiyon etkeni olarak ortaya çıkabilmektedir^{2,4}. Bu mikroorganizmanın epidemiyolojisinin, geçiş yollarının ve enfeksiyonun patogenezinin aydınlatılması hastane enfeksiyonları açısından önem taşımaktadır.



Şekil 2. Arno1 ve Arno2 primerleri kullanılarak uygulanan PCR analizi sonucunda 56 *C. krusei* izolatu için elde edilen dendrogram.

Günümüzde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, farklı *Candida* türleri için, bir tür içinde bulunan izolatların birbiriyle olan klonal ilişkilerinin araştırılmasında değişik genotipik yöntemler kullanılmaktadır. İyi bir moleküler yöntem, birbiriyle ilişkili klonları tanımlarken, ilişkisiz olan izolatları da birbirinden ayırt edebilmelidir. Ancak, her bir genotipik yöntemin kendine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar-

da *C.krusei* izolatlarının genotiplendirilmesinde de farklı yöntemler kullanılmıştır. Bunlar arasında *Hinfl* enziminin uygulandığı REAG yöntemi, Arno1 ve Arno2 primerlerinin kullanıldığı PCR yöntemi, PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) ve MLST (Multilocus Sequence Typing) yöntemleri yer almaktadır^{13,15-19}. Bunlardan PFGE ve MLST, yüksek duyarlılık ve tekrarlanabilirliğe sahip olmalarına karşın, her laboratuvarında uygulanmaları mümkün olmayan, pahalı ve zaman alıcı yöntemlerdir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, *C.krusei* izolatlarının genotiplendirilmesinde, gerek *Hinfl* enziminin kullanıldığı REAG yöntemi, gerekse Arno1 ve Arno2 primerlerinin kullanıldığı PCR yöntemi oldukça başarılı bulunmuştur^{11-13,15,16,26}. İlk kez Carlotti ve arkadaşları¹⁵ 58 *C.krusei* izolatını genotiplendirmek amacıyla *Hinfl* enzimini kullanarak REAG yöntemini uygulamışlar, benzerlik sınır değerini (cutoff similarity value) %55-60 olarak kabul ettiklerinde 12 farklı genotip elde etmişlerdir. Bunu takiben Berrouane ve arkadaşları¹¹, 67 klinik izolatı aynı yöntemi kullanarak genotiplendirmiş, üç ya da daha fazla bant farkı gösteren suşları farklı genotip olarak kabul etmişlerdir. Bu kritere göre 28 farklı REAG profili elde etmişlerdir. Daha sonra Carlotti ve arkadaşları¹⁶ *C.krusei* izolatlarını tiplendirmek amacıyla Arno1 ve Arno2 primerlerini kullanarak, CKRS-1 (*C.krusei* repeated sequence 1) olarak adlandırılan değişken gen bölgesinin amplifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yüz otuz bir *C.krusei* izolatının dahil edildiği çalışmada 95 farklı DNA paterni elde edilmiştir¹⁶. Vos ve arkadaşları²⁶, aynı primerleri kullanarak 39 hastadan izole ettikleri 135 *C.krusei* suşunu PCR yöntemiyle genotiplendirmiş, bunun sonucunda dokuz farklı genotip elde etmişlerdir. Sancak ve arkadaşları¹³ ise 17 hastadan elde edilen 90 klinik izolatı hem *Hinfl* enziminin kullanıldığı REAG yöntemi, hem de Arno1 ve Arno2 primerlerinin kullanıldığı PCR yöntemiyle genotiplendirmiş ve buna göre *C.krusei* izolatları REAG yöntemiyle yedi, PCR yöntemiyle altı farklı genotip altında toplanmıştır. Bizim çalışmamızda da, *C.krusei* izolatlarının genotiplendirilmesinde *Hinfl* enziminin uygulandığı REAG yöntemi ve Arno1 ve Arno2 primerlerinin kullanıldığı PCR yöntemleri kullanılmış, 56 *C.krusei* suşunda REAG ile 10 farklı DNA paterni (A-J), PCR analizi sonucunda ise 13 farklı DNA paterni (a-m) elde edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen izolatların, REAG analiziyle %71.4'ü (40/56) üç ana patern (D, F, H) altında toplanırken, PCR analizi sonucunda %58.9'u (33/56) dört ana patern (d, f, h, k) altında toplanmıştır. Hastalardan izole edilen *C.krusei* suşlarının önemli bir bölümünün her iki yöntemle de belli başlı paternler altında toplanmış olması, bu çalışma kapsamındaki *C.krusei* izolatlarının etken olduğu enfeksiyonların bir kısmının ekzojen kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür. Öte yandan, yine her iki yöntemle de, her biri az sayıda suş içeren paternlerin mevcut oluşu, en azından bu paternler altında toplanan suşlara bağlı gelişen enfeksiyonların endojen kaynaklı olabileceğini akla getirmiştir.

C.krusei suşlarının genotiplendirilmesi için, araştırmacılar tarafından bugüne kadar uygulanmış olan yöntemler genel olarak aynı olmakla birlikte, elde edilen sonuçların birbirlerinden çok farklı oldukları görülmektedir. Örneğin; PCR yönteminin uygulandığı bir çalışmada¹⁶ 131 suş 95 farklı genotip oluştururken, bir başka çalışmada²⁶ yine aynı primerler kullanılmış, 135 suş bu kez sadece dokuz farklı genotip oluşturmuştur. Bizim çalışmamızda ise 56 suş 13 genotip altında toplanmıştır. Sonuçlar arasındaki bu farklılıklar, enfeksiyonların geliştiği epidemiyolojik zeminin farklılığından, farklılık kriteri olarak uygula-

nan eşik değerlerinin standart olmamasından ve/veya gelişen enfeksiyonların bir kısmının endojen, bir kısmının ise ekzojen kaynaklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Bu konuda kesin yargılara varabilmek için, standart örnek seçiminin ve standart çalışma kriterlerinin uygulandığı, PCR ve REAG dışında kalan genotiplendirme yöntemlerinin de değerlendirildiği çok merkezli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda, REAG ve PCR ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, REAG ile H paterni olarak sınıflandırılan izolatlar PCR ile h ve k olmak üzere iki farklı grup altında, D paterni altında toplanan suşlar ise PCR ile d, l ve m olmak üzere üç farklı grup altında toplanmıştır. PCR ile REAG sonuçları kıyaslandığında, PCR ile daha fazla genotip elde edildiği görülmektedir. Çalışmamızda kullanılan primer dizileri ve restriksiyon enzimi dahilinde, bu farklılık, PCR yönteminin ayırım gücünün REAG yöntemine göre daha iyi olduğu şeklinde yorumlanabilir. Ancak bu farklılığın sadece iki REAG paterninde ve sınırlı sayıda izolatta ortaya çıkmış olması nedeniyle kesin yorumlar oluşturmak mümkün olmamaktadır. Böyle bir durumda, bu farklılığın, PFGE ve MLST gibi diğer yöntemlerle de ortaya konması alternatif bir çözüm olabilir. Bu nedenlerden dolayı, *C.krusei* izolatlarının genotiplendirilmesi ile ilgili elde ettiğimiz verilerin daha ayrıntılı yorumlanabilmesi için, hem daha fazla klinik örneğin dahil edildiği kıyaslamalı çalışmalara, hem de ayrıntılı klinik ve epidemiyolojik verilere ihtiyaç vardır. Sonuç olarak, *C.krusei*'ye bağlı gelişen enfeksiyonları önlemek ve hastalar arasında yayılımını kontrol altına alabilmek için, izole edilen suşlar arasında klonal ilişkinin gösterilmesi önem taşımaktadır. Çalışmamızda gerek REAG gerekse PCR yöntemi ile *C.krusei* izolatlarının tamamı genotiplendirilebilmiş ve bu yöntemler başarılı bulunmuştur. Ancak PCR yöntemi, kolay uygulanabilir olması, REAG'ın ayırt edemediği bazı genotipik paternleri saptaması ve kısa sürede sonuç vermesi gibi özellikleri nedeniyle daha avantajlı görünmektedir. Her iki yöntemin de güvenilirliğinin ve ayırım gücünün aydınlatılabilmesi için diğer yöntemlerle karşılaştırılmaları gereklidir. Bunun da ötesinde, suşların kaynağı ile ilgili yorum yapılmasına yardımcı olabilecek, klinik ve epidemiyolojik verilerle de desteklenmiş kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

KAYNAKLAR

1. Abbas J, Bodey GP, Hanna HA, et al. *Candida krusei* fungemia. An escalating serious infection in immunocompromised patients. Arch Intern Med 2000; 160: 2659-64.
2. Akova M, Akalin HE, Uzun O, Gür D. Emergence of *Candida krusei* infections after therapy of oropharyngeal candidiasis with fluconazole. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1991; 10: 598-9.
3. Merz WG, Karp JE, Schron D, Saral R. Increased incidence of fungemia caused by *Candida krusei*. J Clin Microbiol 1986; 24: 581-4.
4. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. N Engl J Med 1991; 325: 1274-7.
5. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al; Global Antifungal Surveillance Group. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. J Clin Microbiol 2008; 46: 515-21.
6. Quindós G, Sánchez-Vargas LO, Villar-Vidal M, Eraso E, Hernández-Almaraz JL. Activities of fluconazole and voriconazole against bloodstream isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*: a 14-year study in a Spanish tertiary medical centre. Int J Antimicrob Agents 2008; 31: 266-71.

7. Kahn JN, Garcia-Effron G, Hsu MJ, Park S, Marr KA, Perlin DS. Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 1876-8.
8. Fleck R, Dietz A, Hof H. In vitro susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 767-71.
9. Ghannoum MA, Okogbule-Wonodi I, Bhat N, Sanati H. Antifungal activity of voriconazole (UK-109,496), fluconazole and amphotericin B against hematogenous *Candida krusei* infection in neutropenic guinea pig model. *J Chemother* 1999; 11: 34-9.
10. Pemán J, Jarque I, Bosch M, et al. Spondylodiscitis caused by *Candida krusei*: case report and susceptibility patterns. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1912-4.
11. Berrouane YF, Hollis RJ, Pfaller MA. Strain variation among and antifungal susceptibilities of isolates of *Candida krusei*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1856-8.
12. Noskin GA, Lee J, Hacek DM, et al. Molecular typing for investigating an outbreak of *Candida krusei*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 26: 117-23.
13. Sancak B, Rex JH, Chen E, Marr K. Comparison of PCR- and HinfI restriction endonuclease-based methods for typing of *Candida krusei* isolates. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5889-91.
14. Samaranayake Y, Samaranayake LP. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *J Med Microbiol* 1994; 41: 295-310.
15. Carlotti A, Grillot R, Couble A, Villard J. Typing of *Candida krusei* clinical isolates by restriction endonuclease analysis and hybridization with CkF1,2 DNA probe. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1691-9.
16. Carlotti A, Chaib F, Couble A, Bourgeois N, Blanchard V, Villard J. Rapid identification and fingerprinting of *Candida krusei* by PCR-based amplification of the species-specific repetitive polymorphic sequence CKRS-1. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1337-43.
17. Dassanayake RS, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Genomic diversity of oral *Candida krusei* isolates as revealed by DNA fingerprinting and electrophoretic karyotyping. *APMIS* 2000; 108: 697-704.
18. Jacobsen MD, Gow NA, Maiden MC, Shaw DJ, Odds FC. Strain typing and determination of population structure of *Candida krusei* by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 317-23.
19. Agirbasli H, Otlu B, Bilgen H, Durmaz R, Gedikoglu G. Epidemiological characteristics of fatal *Candida krusei* fungemia in immunocompromised febrile neutropenic children. *Infection* 2008; 36: 88-91.
20. Larone DH. Medically Important Fungi. A Guide to Identification. 1995, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.
21. Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 675-9.
22. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20: 485-506.
23. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 133-63.
24. van Asbeck EC, Huang YC, Markham AN, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis* fungemia in neonates: genotyping results suggest healthcare workers hands as source, and review of published studies. *Mycopathologia* 2007; 164: 287-93.
25. Hautala T, Ikäheimo I, Husu H, et al. A cluster of *Candida krusei* infections in a haematological unit. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 97.
26. Vos MC, Endtz HP, Horst-Kreft D, et al. *Candida krusei* transmission among hematology patients resolved by adapted antifungal prophylaxis and infection control measures. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1111-4.