

Yoğun Bakım Ünitesinde Yatan Hastaların İdrarlarından İzole Edilen *Candida* Türlerinin Moleküler Epidemiyolojisi ve Antifungal Duyarlılıkları*

Molecular Epidemiology and Antifungal Susceptibility of *Candida* Species Isolated from Urine Samples of Patients in Intensive Care Unit

Şerife YÜKSEKKAYA, Duygu FINDIK, Uğur ARSLAN

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya.
Selçuk University Meram Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Konya, Turkey.

* Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü tarafından desteklenen (BAP Proje No: 07102020) proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 27.05.2010 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 23.09.2010

ÖZET

Bu çalışmada, yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların idrar kültürlerinden izole edilen *Candida* (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*) suşlarının moleküler epidemiyolojik analizinin yapılması ve amfoterisin B ve flukonazole karşı antifungal duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır. İzolatların tanımlanması germ tüp testi, mısır unlu agar besiyerindeki mikroskopik morfoloji (klamidospor, blastospor, artrospor, yalancı hif ve gerçek hif) ve karbonhidrat asimilasyon testleri (API ID 32C bioMérieux, Fransa) kullanılarak yapılmıştır. Suşların amfoterisin B ve flukonazole karşı antifungal duyarlılığı, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" kriterlerine göre mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. Suşlar arasındaki klonal ilişkiyi araştırmak için Cnd3 primeri kullanılarak RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) analizi uygulanmıştır. Amfoterisin B için 56 *Candida* suşunun mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibitör konsantrasyonu (MIK) aralıkları, MIK₅₀ ve MIK₉₀ değerleri sırasıyla, *C. albicans* için 0.125-1 µg/ml, 0.125 ve 0.5 µg/ml, *C. tropicalis*'te 0.125-1 µg/ml, 0.25 ve 1 µg/ml, *C. glabrata*'da 0.125-1 µg/ml, 0.25 ve 1 µg/ml olarak bulunmuştur. Flukonazol için MIK aralıkları, MIK₅₀ ve MIK₉₀ değerleri sırasıyla; *C. albicans*'ta 0.25-4 µg/ml, 0.25 ve 0.5 µg/ml, *C. tropicalis*'te 0.25-16 µg/ml, 0.5 ve 1 µg/ml, *C. glabrata*'da 0.5-64 µg/ml, 8 ve 16 µg/ml olarak saptanmıştır. İzolatların hiçbirisi amfoterisin B için yüksek (MIK > 1 µg/ml) MIK değerine sahip bulunmamıştır. Bir *C. glabrata* izolatu flukonazole dirençli (MIK ≥

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Duygu Fındık, Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Konya, Türkiye. Tel (Phone): +90 332 251 5000/40953-5047, E-posta (E-mail): duygu@yaho.com

64 µg/ml) iken bir *C.tropicalis* ve iki *C.glabrata* izolatu flukonazole doza bağımlı duyarlı (MIK: 16-32 µg/ml) bulunmuştur. RAPD analizi sonuçları *C.albicans* için iki klondan, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* için ise tek bir klondan ekzojen yayılım olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan alınan klinik örnekler ile çevresel örneklerin birlikte epidemiyolojik analizinin yapılarak ekzojen odağın tespit edilmesinin, hastane enfeksiyonlarını ve hastalarda morbidite ve mortalite oranlarını azaltması açısından önemli olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Candida* türleri; antifungal duyarlılık; RAPD; moleküler epidemiyoloji; idrar örneği.

ABSTRACT

The aims of this study were to analyse the amphotericin B and fluconazole susceptibility and molecular epidemiology of *Candida* strains (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata*) isolated from the urine samples of patients hospitalized in the intensive care unit. Identification of the isolates was done according to microscopic morphology (chlamydospor, blastospor, pseudohyphae and true hyphae) on cornmeal agar, germ tube formation and carbohydrate assimilation patterns (API ID 32C bioMérieux, France). Antifungal susceptibilities of the isolates were determined by in vitro broth microdilution method recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). To investigate the clonal relationship of the isolates, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was performed by using Cnd3 primer. Of the 56 *Candida* isolates minimum inhibitory concentration (MIC) ranges, MIC₅₀ and MIC₉₀ values for amphotericin B were 0.125-1 µg/ml, 0.125 and 0.5 µg/ml for *C.albicans*, 0.125-1 µg/ml, 0.25 and 1 µg/ml for *C.tropicalis* and 0.125-1 µg/ml, 0.25 and 1 µg/ml for *C.glabrata*, respectively. Fluconazole MIC ranges, MIC₅₀ and MIC₉₀ values were 0.25-4 µg/ml, 0.25 and 0.5 µg/ml for *C.albicans*, 0.25-16 µg/ml, 0.5 and 1 µg/ml for *C.tropicalis* and 0.5-64 µg/ml, 8 and 16 µg/ml for *C.glabrata*, respectively. For amphotericin B, none of the isolates had high MIC values (MIC > 1 µg/ml). While one of the *C.glabrata* isolates was resistant to fluconazole (MIC ≥ 64 µg/ml), one *C.tropicalis* and two *C.glabrata* isolates were dose-dependent susceptible (MIC: 16-32 µg/ml). The results of RAPD analysis indicated an exogenous spread from two clones for *C.albicans*, one clone for *C.glabrata* and one clone for *C.tropicalis*. This study underlines the importance of molecular epidemiological analysis of clinical samples together with hospital environmental samples in terms of *Candida* spp. to determine the exogenous origin for the related strains and to prevent nosocomial *Candida* infections.

Key words: *Candida* spp.; antifungal sensitivity; RAPD; molecular epidemiology; urine sample.

GİRİŞ

Candida türleri doğada yaygın olarak bulunan ve hem yüzeysel hem de derin enfeksiyonlara neden olabilen maya mantarlarıdır. Yüzeysel enfeksiyonlar çoğunlukla toplum kökenli iken, derin sistemik enfeksiyonlar nozokomiyal kaynaklıdır. Nozokomiyal mantar enfeksiyonları açısından en riskli grubu yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar oluşturmur^{1,2}.

İdrarda *Candida* varlığı (kandidüri), kontaminasyon, kolonizasyon veya enfeksiyonun bir belirtisi olabilir; ancak kolonizasyonu enfeksiyondan ayırt edebilecek güvenilir bir yöntem henüz yoktur. *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* gibi albicans dışı türler sıklıkla idrardan izole edilseler de *Candida albicans* hala en sık görülen türdür. İleri yaş, kadın cinsiyet, uzun süre hastanede yatış, diabetes mellitus, total parenteral beslenme, mekanik ventilasyon, antimikrobiyal ilaç kullanımı ve üriner kateter gibi risk faktörleri kandidüri ile yakından ilişkilidir. Akut ve kronik ciddi hastalığı olan, özellikle üriner sis-

temde tıkanıklık bulunan hastalarda kandidüri, sistemik kandidiyaz için risk oluşturabilir ve kandideminin önemli bir belirtici olabilir. Asemptomatik kandidürinin sıklıkla yaşlı debil hasta grubunda mortalite açısından bir risk göstergesi olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur³⁻⁵.

Yoğun bakım üniteleri gibi riskli hastaların yattığı birimlerde, endemik enfeksiyonların 1/3'ünden fazlası çapraz bulaşmayla meydana gelmektedir; kontrol önlemlerinin yeterliliği halinde bu oran daha da yükselir. Moleküler yöntemler, hastane enfeksiyonu etkenlerinin bulaş yollarını ortaya çıkarmak için, klonal ilişkinin varlığı ya da yokluğunu belirleyerek enfeksiyonların yayılımının takibine önemli katkı sağlar⁶.

Bu çalışmada Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım Ünitesinde yatan hastaların idrar kültürlerinden izole edilen *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.tropicalis* suşlarının moleküler epidemiyolojik analizinin yapılması ve amfoterisin B ve flukonazole karşı antifungal duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Yoğun Bakım Ünitesinde Temmuz 2006-Haziran 2008 tarihleri arasında yatan 46 hastanın idrar kültürlerinden izole edilen 56 *Candida* suşu alındı. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması, germ tüp testi, mısır unlu agar besiyerindeki mikroskopik morfoloji (klamidospor, blastospor, artrospor, yalancı hif ve gerçek hif) ve karbonhidrat asimilasyon testleri (API ID 32C, bioMérieux, Fransa) kullanılarak yapıldı. Suşlar moleküler tanımlama ve antifungal duyarlılık testi yapılincaya kadar %20 gliserollü beyin kalp infüzyon besiyerinde -20°C'de saklandı.

Çalışmaya alınan *Candida* kökenlerinin amfoterisin B ve flukonazole karşı antifungal duyarlılık testi, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" M27-A2 standartlarına uygun olarak mikrodilüsyon yöntemi ile araştırıldı⁷. MOPS ile tamponlanan RPMI 1640 (L-glutaminli, sodyum bikarbonatsız; Sigma-Aldrich, ABD) besiyeri kullanıldı. Amfoterisin B (MP Biomedicals, Fransa) ve flukonazol (Pfizer, ABD) toz halde ticari olarak elde edildi. Antifungal (final) test konsantrasyonları amfoterisin B için 0.0313-16 µg/ml, flukonazol için 0.125-64 µg/ml olacak şekilde seri dilüsyonları hazırlandı. Doksan altı kuyucuklu mikropiçin 1-10. kuyucuklarına dilüsyon sırasına uyularak 100'er µl dağıtıldı. Üzeri steril kapak ile kapatılarak kullanılıncaya kadar -70°C'de saklandı.

Antifungal duyarlılık testi için -20°C'de saklanan *Candida* suşlarının Sabouraud dekstroza agara (SDA) iki kez ardışık pasajı yapıldı. İnokulum, SDA'da 35°C'de üretilen 24 saatlik kolonilerden hazırlandı. İnokulum süspansiyonu başlangıçta 0.5 McFarland olacak şekilde ayarlandıktan sonra 50 µl süspansiyon 2450 µl RPMI 1640 ile 1/50 dilüe edildi. 1/50 inokulum dilüsyonundan 150 µl alınarak 2850 µl RPMI 1640 ile ikinci kez 1/20'lik bir dilüsyon daha yapıldı. Mikrodilüsyon plaklarının daha önce hazırlanan 100 µl ilaç dilüsyonu içeren kuyucuklarına 100 µl hazırlanan inokulum süspansiyonundan eklendi. Her plak için bir sterilit kontrolü (yalnız 200 µl besiyeri) ve bir üreme kontrolü (100 µl inokulum süspansiyonu ve 100 µl besiyeri) olmak üzere iki sı-

ra ilaçsız kontrol kuyucuğu kullanıldı. Mikrodilüsyon plakları 35°C'de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası gözle değerlendirilerek, her bir kuyucuktaki üreme, kontrol kuyucuğuyla karşılaştırıldı. Amfoterisin B için üremenin olmadığı en düşük antifungal konsantrasyonu, flukonazol için ise üremenin belirgin (yaklaşık %50) olarak azaldığı antifungal konsantrasyonu, minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri olarak kabul edildi. CLSI'nın M27 A2'de önerdiği gibi flukonazol için MİK değeri $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ ise duyarlı, 16-32 $\mu\text{g/ml}$ ise doza bağımlı duyarlı, $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ ise dirençli olarak bildirildi. Amfoterisin B'nin sınır değeri (breakpoint) belirlenmediği için MİK değerleri direnç durumu belirtilmeden rapor edildi. Kontrol suşu olarak *Candida parapsilosis* ATCC 22019 kullanıldı.

Suşların klonal olarak ilişkili olup olmadığını saptamak için epidemiyolojik tiplendirme amacıyla RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) yöntemi uygulandı. Örneklerden DNA izolasyonu, Otlu ve Durmaz'ın⁸ tarif ettiği protokole göre yapıldı. RAPD-polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), yine Otlu ve Durmaz⁸ tarafından standardize edilmiş protokol ile Ergon ve arkadaşlarının⁹ önerdiği Cnd3 primeri kullanılarak uygulandı. Amplifikasyon, GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem; ABD) cihazı ile yapıldı. Amplifikasyon ürünleri Tris-borat-EDTA tamponu içinde %2'lik agaroz jelde elektroforez ile ayrıldı ve etidyum bromür ile boyanarak görüntüleme cihazında (Kodak Gel Logic 200 Imaging System) incelendi. Amplifikasyon sonucunda jel elektroforezinde gözlenen, her bir izolata ait bant profilleri birbirleriyle karşılaştırıldı. Aynı bant profili gösteren izolatlar epidemiyolojik olarak ilişkili kabul edildi.

Her antifungal için elde edilen MİK değerlerinde türler arasında fark olup olmadığını belirlemek için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Bu testin sonucunun anlamlı çıktığı durumlarda, aradaki farkın hangi türler arasında olduğunu belirlemek için ikincil test olarak Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi kullanıldı. Kruskal-Wallis testinde $p < 0.05$, Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testinde ise $p < 0.017$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 56 *Candida* suşunun 22'si *C.albicans*, 19'u *C.glabrata* ve 15'i *C.tropicalis* olarak tanımlanmıştır. *Candida* suşlarının amfoterisin B ve flukonazol için MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo I'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye

Tablo I. *Candida* Suşlarının MİK Aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ Değerleri ($\mu\text{g/ml}$)

Antifungal	Suşlar (sayı)	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀
Amfoterisin B	<i>C.albicans</i> (22)	0.125-1	0.125	0.5
	<i>C.glabrata</i> (19)	0.125-1	0.25	1
	<i>C.tropicalis</i> (15)	0.125-1	0.25	1
Flukonazol	<i>C.albicans</i> (22)	0.25-4	0.25	0.5
	<i>C.glabrata</i> (19)	0.5-64	8	16
	<i>C.tropicalis</i> (15)	0.25-16	0.5	1

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

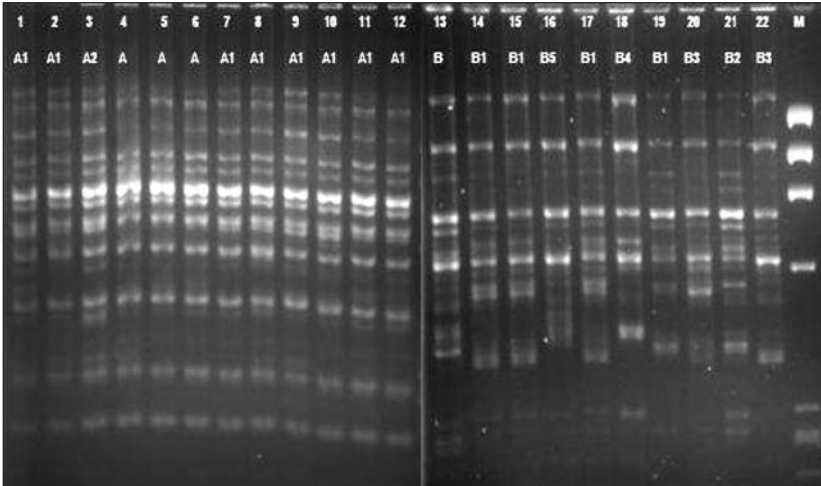
de, amfoterisin B'nin MİK değerlerinde, türler arasında önemli fark olduğu saptanmış ($p < 0.05$); bu farkın *C.glabrata* ile *C.albicans* arasındaki farktan kaynaklandığı tespit edilmiştir ($p < 0.017$). Benzer olarak flukonazol MİK değerlerinde de türler arasında önemli fark olduğu belirlenmiş ($p < 0.05$); bu farkın *C.glabrata* ile diğer türler arasındaki farktan kaynaklandığı saptanmıştır ($p < 0.017$).

Flukonazol için *C.albicans* suşlarının tümü (%100) duyarlı, *C.glabrata* suşlarının 16 (%84.2)'si duyarlı, 2 (%10.5)'si doza bağımlı duyarlı, 1 (%5.2)'i dirençli ve *C.tropicalis* suşlarının 14 (%93.3)'ü duyarlı, 1 (%6.7)'i doza bağımlı duyarlı olarak saptanmıştır.

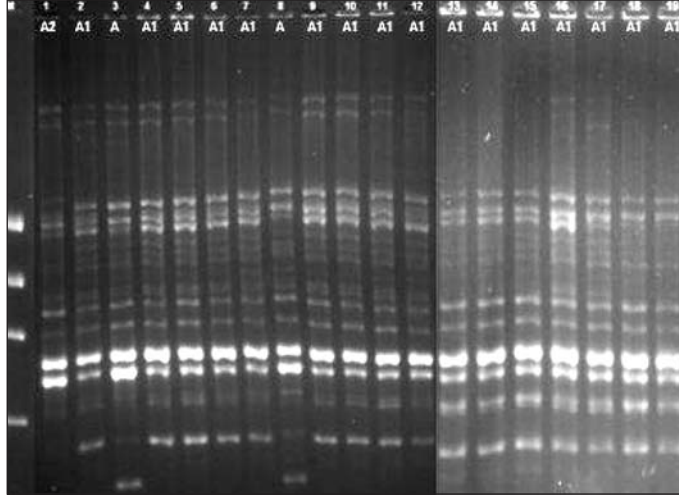
RAPD analizi sonucunda her bir suş için elde edilen bantlar, diğer izolatlarla ait bantlar ile karşılaştırılarak paternleri belirlenmiştir. Farklı paternler farklı harflerle gösterilmiş; alt grup paternler ise paterne ait harfin numaralandırılması şeklinde ifade edilmiştir. Buna göre *C.albicans* izolatlarında A ve B olmak üzere iki adet ana patern belirlenmiştir. A paterni A (n= 3), A1 (n= 8) ve A2 (n= 1) olarak toplam 12 suşta tespit edilmiştir. B paterninde ise B (n= 1), B1 (n= 4), B2 (n= 1), B3 (n= 2), B4 (n= 1) ve B5 (n= 1) olmak üzere altı varyant saptanmıştır. *C.albicans* suşları arasında iki yaygın klon ve varyantları belirlenmiştir. Diğer moleküler tiplendirme yöntemleri ile doğrulanması gerekmektedir birlikte RAPD sonucuna göre iki klonun egemen olduğu gözlenmiştir (Resim 1).

C.glabrata ve *C.tropicalis* türlerinde de yaygın bir klonun varyantlarının bulunduğu gösterilmiştir. *C.glabrata* suşlarında A (n= 2), A1 (n= 16), A2 (n= 1) olmak üzere üç varyanta sahip tek bir paternin bulunduğu görülmüştür. Bunlar arasında en yaygın olan A1 profili olarak saptanmıştır. *C.tropicalis* suşları için de A (n= 1), A1 (n= 12), A2 (n= 2) olmak üzere üç alt grup paterni belirlenmiştir (Resim 2,3).

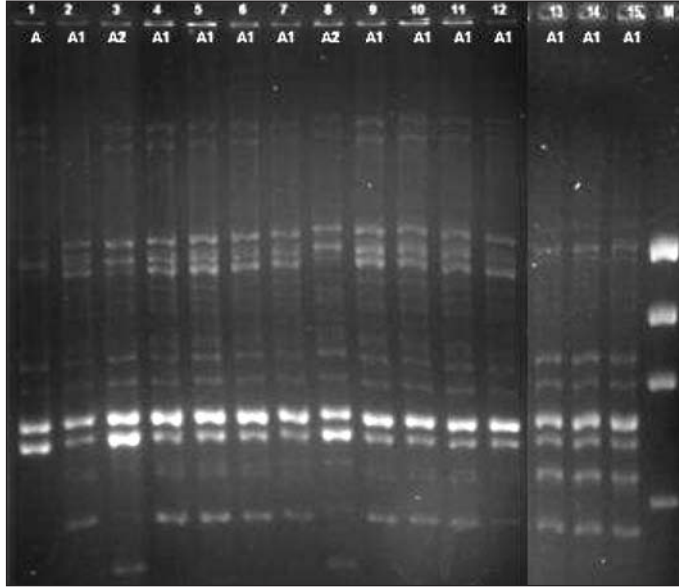
C.albicans, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* suşlarının izolasyon tarihi, RAPD paternleri ve MİK değerleri Tablo II, III ve IV'te verilmiştir.



Resim 1. *C.albicans* suşlarının *Cnd3* primeri ile elde edilen RAPD paternleri.



Resim 2. *C. glabrata* suşlarının *Cnd3* primeri ile elde edilen RAPD paternleri.



Resim 3. *C. tropicalis* suşlarının *Cnd3* primeri ile elde edilen RAPD paternleri.

TARTIŞMA

İdrardan *Candida* türlerinin izole edilmesi, tedavi gerektirmeyen basit bir kolonizasyon olabileceği gibi, tedavi gerektiren alt üriner sistem enfeksiyonu, piyelonefrit ve renal kandidiyaz gibi üst üriner sistem enfeksiyonunu da gösterebileceği için klinik olarak önemlidir¹⁰. Morera ve arkadaşları¹¹ ile Alvarez-Lernma ve arkadaşlarının¹² çalışmalarında, yo-

Tablo II. *C.albicans* Suşlarının İzolasyon Tarihi, RAPD Paternleri ve MİK Değerleri (µg/ml)

İzolasyon tarihi	Hasta no	Cinsiyet	Patern	Amfoterisin B MİK	Flukonazol MİK
17.07.2006	5	E	A1	0.125	0.25
31.07.2006	7	K	A1	0.25	0.5
28.08.2006	10	E	A2	1	1
13.11.2006	13	K	A	0.25	0.25
27.11.2006	14	E	A	0.125	0.25
27.11.2006	15	K	A	0.125	0.25
26.02.2007	17	K	A1	0.125	0.25
28.03.2007	18	E	A1	0.125	0.25
13.04.2007	19	E	A1	0.125	0.25
25.04.2007	20	E	A1	0.25	4
29.05.2007	23	E	A1	0.25	0.5
17.06.2007	25	K	A1	0.125	0.25
20.08.2007	27-a	K	B	0.25	0.5
15.10.2007	30-a	E	B1	0.5	0.5
05.11.2007	30-b	E	B1	0.25	0.5
26.11.2007	32	E	B5	1	0.25
07.01.2008	36-a	E	B1	0.125	0.25
21.01.2008	37	E	B4	0.125	0.25
04.02.2008	26-c	K	B1	0.25	0.5
28.04.2008	39-b	K	B3	0.125	0.25
02.06.2008	44	E	B2	0.125	0.25
02.06.2008	45	K	B3	0.25	0.5

ğün bakım ünitesinde yatan hastaların idrarlarından en sık *C.albicans* izole edilmiş, bunu sırasıyla *C.glabrata* ve *C.tropicalis* izlemiştir. Bizim çalışmamızda da *C.albicans* en sık, *C.glabrata* ikinci sıklıkta, *C.tropicalis* ise üçüncü sıklıkta saptanmıştır.

Son yıllarda mantar hastalıklarının sıklığının giderek artması ve ampirik antifungal kullanımının yaygınlaşması, dirençli mantar suşlarının ortaya çıkmasına ve direnç oranlarının artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle uygun ve etkin antifungal tedavinin seçiminde in vitro antifungal duyarlılık testlerine gereksinim artmaktadır. Sistemik kandidiyaz, aspergilloz, mukormikoz, kriptokokoz, koksidiomikoz ve diseminere histoplazmoz tedavisinde en sık tercih edilen ilaç olan amfoterisin B'nin 40 yıldan uzun süredir kullanılıyor olmasına rağmen, sekonder direnç gelişiminin sorun olması, ilacın fungustik aktivitesine bağlıdır. *Candida*'lar membran ergosterol içeriğini

Tablo III. *C.glabrata* Suşlarının İzolasyon Tarihi, RAPD Paternleri ve MİK Değerleri (µg/ml)

İzolasyon tarihi	Hasta no	Cinsiyet	Patern	Amfoterisin B MİK	Flukonazol MİK
03.07.2006	2	E	A2	0.25	2
17.07.2006	4	K	A1	0.5	4
31.07.2006	6	K	A	0.5	8
07.08.2006	8	K	A1	0.25	4
09.10.2006	11	E	A1	0.25	8
09.10.2006	12	E	A1	0.25	8
03.05.2007	21	E	A1	0.25	4
27.06.2007	24-a	E	A	0.25	8
20.08.2007	26-a	K	A1	0.5	8
20.08.2007	28-a	K	A1	0.5	2
03.09.2007	28-b	K	A1	0.5	2
22.10.2007	27-b	K	A1	0.125	0.5
03.12.2007	26-b	K	A1	0.25	8
03.12.2007	33	E	A1	0.25	8
31.12.2007	35	K	A1	0.5	4
11.02.2008	36-b	E	A1	0.25	64
25.02.2008	39-a	K	A1	0.25	16
31.03.2008	40	K	A1	1	4
14.04.2008	42	K	A1	1	8

azaltarak ya da ergosterol bağlanma noktasını değiştirerek amfoterisin B'ye karşı direnç geliştirebilirler¹³. Amfoterisin B için *Candida* türlerinin hepsinde elde edilen MİK değerleri benzer ve MİK aralığı dar olduğu için in vitro referans duyarlılık testleri ile suşların direncinin belirlenmesi zordur¹⁴. Çeşitli çalışmalarda idrardan izole edilen *C.albicans*, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* suşlarında saptanan amfoterisin B MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo V'te görülmektedir^{9,15-17}. Çalışmamızda *C.albicans* suşlarında dar bir MİK aralığı (0.125-1 µg/ml) saptanırken MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 0.125 ve 0.5 µg/ml olarak saptanmıştır. *C.tropicalis* suşlarında *C.albicans* ile aynı MİK aralığı (0.125-1 µg/ml) bulunurken MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 0.25 ve 1 µg/ml olarak saptanmıştır. İzolatlarımızın %34'ünü oluşturan *C.glabrata* suşlarında amfoterisin B için MİK aralığı 0.125-1 µg/ml, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 0.25 ve 1 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Tablo I). Çalışmamızda *C.tropicalis* ve *C.glabrata* için *C.albicans*'a göre daha yüksek MİK değerleri saptanmış ve *C.glabrata* ile *C.albicans* arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir.

Tablo IV. *C.tropicalis* Suşlarının İzolasyon Tarihi RAPD Paternleri ve MİK Değerleri (µg/ml)

İzolasyon tarihi	Hasta no	Cinsiyet	Patern	Amfoterisin B MİK	Flukonazol MİK
03.07.2006	1	K	A	0.25	0.5
17.07.2006	3-a	E	A1	0.25	0.5
14.08.2006	3-b	E	A2	0.25	0.5
28.08.2006	9	E	A1	0.25	0.5
26.02.2007	16	E	A1	0.125	0.25
08.05.2007	22	E	A1	0.25	0.25
03.09.2007	29	E	A1	0.25	0.5
17.09.2007	24-b	E	A2	1	1
22.10.2007	31	K	A1	1	1
10.12.2007	34	K	A1	0.25	0.5
25.02.2008	38	E	A1	0.25	0.5
07.04.2008	26-d	K	A1	0.25	0.5
14.04.2008	41-a	K	A1	0.25	16
12.05.2008	43	K	A1	0.25	0.5
12.05.2008	41-b	K	A1	0.25	0.5

Lanosterolün ergosterole dönüşümünden sorumlu olan 14- α -demetilazı inhibe ederek etki eden azollerin en önemli sorunu, direnç gelişimidir. Direnç mekanizmaları eflüks pompası ile ilacın dışa atılması yanında, 14- α -demetilazın değişimi ya da yapımında artış meydana gelmesidir¹³. *Candida* türlerinin flukonazole in vitro duyarlılık profili belirli bir dağılım gösterir. Dolayısıyla tür tanımlaması yapıldığı zaman, flukonazole duyarlı olup olmadığı tahmin edilebilir. Ancak hemen her tür içerisinde bu kuralın dışında kalan suşlar da bulunabilir. *Candida krusei* suşlarında flukonazole intrinsek direnç olduğu saptanmıştır. *C.glabrata* da genellikle yüksek MİK değerlerine sahiptir¹⁸. Bu ilaca kazanılmış direnç ise başta *C.albicans* olmak üzere *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *Candida kefyr* gibi çeşitli *Candida* türlerinde gözlenmiştir^{14,18}. *Candida* suşları için saptanan flukonazol MİK değerleri, amfoterisin B'nin aksine geniş bir aralıkta dağılım göstermekte ve dirençli-duyarlı suşların birbirinden ayırma olanak sağlamaktadır¹⁴. Çeşitli çalışmalarda idrardan izole edilen *C.albicans*, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* suşlarında saptanan flukonazol MİK aralıkları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo VI'da verilmiştir^{9,15-17,19}. Bizim çalışmamızda *C.albicans* suşlarının flukonazol MİK aralığı 0.25-4 µg/ml, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 0.25 ve 0.5 µg/ml olarak bulunmuştur. Albicans dışı *Candida*'lar intrinsek olarak flukonazole daha dirençlidirler. İdrardan üçüncü sıkkıta izole ettiğimiz *C.tropicalis* suşlarında MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0.25-16 µg/ml, 0.5 ve 1 µg/ml olarak bulunmuştur. *C.glabrata* suşları ise flukonazol için genellikle yüksek MİK değerlerine sa-

Tablo V. Çeşitli Çalışmalarda Amfoterisin B İçin Saptanan Mik Değerleri (µg/ml)

Yıl	Araştırmacı	Yer	<i>C. albicans</i>			<i>C. tropicalis</i>			<i>C. glabrata</i>		
			Mik aralığı	Mik ₅₀	Mik ₉₀	Mik aralığı	Mik ₅₀	Mik ₉₀	Mik aralığı	Mik ₅₀	Mik ₉₀
1999	Febre ve ark. ¹⁵	Brezilya		0.25	1		1	1		0.25	0.5
2000	Baran ve ark. ¹⁶	ABD	0.5-1	0.5		1	1		1	1	
		ABD	0.5-1	1		1-2	1		1	1	
2002	Gülşay ve ark. ¹⁷	İzmir	0.25-1	0.5	1	-	-	-	-	-	-
2006	Ergon ve ark. ⁹	İzmir	0.25-1	0.5	1	0.125-0.5	0.5	0.5	0.125-0.25	0.125	0.25
2008	Bu çalışma	Konya	0.125-1	0.125	0.5	0.125-1	0.25	1	0.125-1	0.25	1

Tablo VI. Çeşitli Çalışmalarda Flukonazol İçin Saptanan Mik Değerleri (µg/ml)

Yıl	Araştırmacı	Yer	<i>C. albicans</i>			<i>C. tropicalis</i>			<i>C. glabrata</i>		
			Mik aralığı	Mik ₅₀	Mik ₉₀	Mik aralığı	Mik ₅₀	Mik ₉₀	Mik aralığı	Mik ₅₀	Mik ₉₀
1997	Schwab ve ark. ¹⁹	ABD							1-> 64		
1999	Febre ve ark. ¹⁵	Brezilya		0.5	1		1	1		1	1
2000	Baran ve ark. ¹⁶	ABD	0.125-> 64	0.25		0.5-4	1		4-> 64	16	
		ABD	0.25-> 64	0.5		1-> 64	2		4-32	16	
2002	Gülşay ve ark. ¹⁷	İzmir	0.25-16	1	8						
2006	Ergon ve ark. ⁹	İzmir	0.25-16	1	8	1-8	2	4	2-64	16	64
2008	Bu çalışma	Konya	0.25-4	0.25	0.5	0.25-16	0.5	1	0.5-64	8	16

hiptir ve bizim çalışmamızda da MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri 0.5-64 µg/ml, 8 ve 16 µg/ml olarak saptanmıştır. Çalışmamızda, flukonazol için bir *C.tropicalis* ve iki *C.glabrata* suşu doza bağımlı duyarlı (MİK: 16-32 µg/ml), bir *C.glabrata* suşu ise dirençli (MİK ≥ 64 µg/ml) olarak bulunmuştur.

Gerek amfoterisin B gerekse flukonazol için MİK aralığı, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri için çalışmalar arasındaki farkın; ülkeler ve hastaneler arasında antifungal kullanımında ve enfeksiyon kontrol stratejilerindeki farklılıklardan ve çalışmalardaki farklı örnek sayılarından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Hastane enfeksiyonlarında, enfeksiyonu önlemek ve kontrol stratejileri geliştirmek için izolatların ve kaynağının epidemiyolojik olarak tanımlanması önemlidir. Genotipik düzeyde tiplendirme yapan yöntemler, *Candida* gibi fenotipik yöntemlerle epidemiyolojik olarak değerlendirmesi zor olan mikroorganizmalar için önemli avantajlar sağlar. Fenotipik bir yöntem olan antifungallere karşı duyarlılık paternlerinin karşılaştırılması, nozokomiyal *Candida* enfeksiyonlarının değerlendirilmesinde sınırlı bir fonksiyona sahiptir. Etkili bir moleküler yöntem, aynı suşu bağımsız izolatlar içerisinde tanıyabilmeli, ilişkili izolatları kümeleştirmeli ve tamamen ilişkisiz izolatları ayırt edebilmelidir. Bütün bu kriterleri sağlayan günümüzde mevcut bir yöntem yoktur. Fungal enfeksiyonların moleküler epidemiyolojik analizi için RFGE (Rotating-Field Gel Electrophoresis), RAPD, MLST (Multilocus sequence typing) ve mikrosatellit analizi gibi yöntemler kullanılabilir²⁰. Bu yöntemlerden RAPD analizi, kolay uygulanabilir olması ve kısa sürede sonuç vermesi gibi özellikleri nedeniyle diğer yöntemlere göre daha avantajlıdır. Ancak bu yöntemin, sadece laboratuvarlar arası değil, aynı laboratuvar içinde dahi tekrarlanabilirliğinin düşük olması bir dezavantajdır^{17,20}. Standardizasyonu sağlamak için, aynı termal döngü cihazında, standart bir amplifikasyon protokolüyle uygulanmalı, tüm izolatlar birlikte çalışmalıdır²¹. Bu dezavantajına rağmen, RAPD analizinin *Candida* izolatlarında ayırım gücü ve tiplendirme etkinliği yüksektir^{9,17,20}.

Endojen *Candida* enfeksiyonları, hastanın gastrointestinal sistem, vajen ve deri gibi floralı bölgelerinde fizyolojik koşullarının farklılaşması ve mantarların kolonize olması ile gelişir^{20,22}. Son zamanlarda genotipik yöntemlerin kullanımının artmasıyla, endojen enfeksiyonlardan daha az yaygın olmasına rağmen, ekzojen enfeksiyonlar da dikkat çekmeye başlamıştır²⁰. Yapılan çalışmalarda, yoğun bakım hastalarında, mikozların sadece endojen kaynaklı olmadığı, hastadan hastaya veya sağlık personelinin hastaya geçebildiği epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir². Ergon ve arkadaşları⁹, *C.albicans* ile meydana gelen enfeksiyonların sıklıkla endojen kaynaklı olduğunu saptamışlar, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* izolatlarında ise yetersiz bant elde ettikleri için suşların yayılımı konusunda yorum yapamamışlardır. Bir başka çalışmada, bir yıllık sürede idrardan izole edilen *C.glabrata* suşları genetik olarak farklı bulunmuş ve sonuç olarak endojen kazanımın çapraz enfeksiyondan daha yaygın olduğu belirtilmiştir¹⁹. İzmir’de yapılan bir araştırmada, *C.albicans* suşlarının RAPD analizinde izolatların çoğunlukla endojen kaynaklı olduğu düşünülmüş; ancak klonal ilişkili bazı suşların farklı hastalardan ve yakın tarihlerde izole edilmesi nedeniyle ekzojen yayılım olasılığının da göz ardı edilmemesi gerektiği vurgulanmıştır²⁰.

C.tropicalis'in etken olduğu idrar yolu enfeksiyonu salgınının moleküler epidemiyolojisi, Han ve arkadaşları²³ tarafından RAPD analizi kullanılarak araştırılmış; yoğun bakım ünitesindeki hastalardan izole edilen *C.tropicalis* suşlarının tümünde aynı bant paternleri tespit edilmiş ve bütün suşların aynı klondan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda hastanemiz reanimasyon yoğun bakım ünitesinde yatan 46 hastanın idrar kültürlerinden izole edilen *C.albicans*, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* suşlarının, RAPD analizi ile moleküler epidemiyolojik incelemesi yapılmıştır. *C.albicans* izolatlarında A ve B olmak üzere iki adet ana patern belirlenmiş; toplam 12 suшта A, A1 ve A2 paterni bulunmuş, B paterninde ise B, B1-5 olmak üzere altı varyant saptanmıştır (Tablo II). *C.albicans* suşları arasında iki yaygın klon ve varyantları belirlenmiştir. Diğer moleküler tiplendirme yöntemleri ile doğrulanması gerekmele birlikte RAPD sonucuna göre iki klonun egemen olduğu gözlenmiştir. Bir RAPD tipinin farklı varyantlarının bulunması ise, klonların uzun süredir var olduğunu ve zaman içinde farklılaştığını gösteren bir bulgu olarak kabul edilebilir. *C.glabrata* suşlarında üç varyanta sahip tek bir RAPD tipi belirlenmiş olup, bu patern, A, A1 ve A2 olmak üzere üç varyanta sahiptir (Tablo III). *C.tropicalis* suşları için de yine yaygın bir RAPD tipinin ve varyantlarının (A, A1, A2) bulunduğu gösterilmiştir (Tablo IV).

Paternlerin incelemesi sonucunda *C.albicans* için iki klondan, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* için ise tek bir klondan ekzojen yayılım olduğu düşünülmüştür. Ekzojen kaynak olarak; sağlık personelinin eli, kontamine tıbbi araç-gereçler ve kirli çevresel yüzeydeki mikroorganizmalar sayılabilir. Hastane enfeksiyonları için çok yüksek riskli yerler olarak tanımlanan yoğun bakım ünitelerinde, istenen temizlik standartları kritik önem taşımaktadır. Bu alanlarda sık ve etkin temizlik yapılmalıdır. Hastalara zorunlu olmadıkça aletli girişimler (sonda, kateter vb.) uygulanmamalı, eğer uygulanacaksa steril şartlarda ve deneyimli kişiler tarafından yapılmalı, kullanım süreleri olabildiğince kısa tutulmalıdır. Hastalardan alınan çeşitli klinik örneklerle, çevresel örneklerin birlikte epidemiyolojik analizinin yapılarak ekzojen odağın tespit edildiği daha ileri çalışmalar planlanmalıdır. Hastane enfeksiyonlarını azaltmak için, ekzojen kaynağın tespiti ve alınan önlemlerle enfeksiyon zinciri kırılarak önemli bir adım atılmış olacaktır.

TEŞEKKÜR

RAPD paternlerinin değerlendirilmesinde emeği geçen Adnan Menderes Üniversitesi, BİLTEM Epidemiyoloji Birimi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Bülent Bozdoğan'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Tümbay E. *Candida* türleri, s: 1081-6. Ustaçelebi Ş (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1999. Güneş Kitabevi, Ankara.
2. Ener S, Ener B, Akalın H. Uzun süren operasyonlardan sonra yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda gelişen invaziv kandida enfeksiyonları. Ege Tıp Derg 2001; 40(3): 185-9.
3. Passos XS, Sales WS, Maciel PJ, et al. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005; 100(8): 925-8.
4. Köksal İ. Nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisi. Klimik Dergisi 2000; 13(Özel Sayı 1): 21-2.

- 5 Akalın H. Kandidemilerde risk faktörleri ve risk değerlendirmesi. ANKEM 2008; 22(Ek 2): 270-4.
6. Öztürk R. Hastane enfeksiyonları kontrolünde moleküler mikrobiyoloji metotlarının önemi. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 3-7 Eylül 2007, Malatya. Kurs Kitabı, s: 64-75.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard. Document M27-A2. 2002, 2nd ed. NCCLS/CLSI, Wayne, Pennsylvania.
8. Otlu B, Durmaz R. Farklı bakteri ve mantar türlerinin alt tiplendirmesi için ortak bir "Arbitrarily Primed" polimeraz zincirleme reaksiyonu protokolü. IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu, 3-7 Eylül 2007, Malatya. Kurs Kitabı, s: 208-13.
9. Ergon MC, Gülay Z. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from urine at an intensive care unit. Mycoses 2005; 48(2): 126-31.
10. Lundstrom T, Sobel J. Nosocomial candiduria: a review. Clin Infect Dis 2001; 32(11):1602-7.
11. Morera Y, Torres-Rodriguez JM, Catalan I, et al; Grup de Recerca en Micologia Experimental i Clínica (GRE-MEC). Candiduria in patients with urethral catheter admitted in intensive care unit. Etiology and in vitro susceptibility to fluconazole. Med Clin (Barc) 2002; 118(15): 580-2.
12. Alvarez-Lernma F, Nolla-Salas J, Leon C, et al; EPCAN Study Group. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. Intensive Care Med 2003; 29(7): 1069-76.
13. Usluer G. Antifungal İlaçlar, s: 147-57. Ulusoy S (ed), Önemli ve Sorunlu Fungal Enfeksiyonlar. 2006. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
14. Ankan S. *Candida* enfeksiyonlarının tedavisinde duyarlılık testlerinin önemi. *Candida* Mikrobiyolojisi ve Enfeksiyonları Sempozyumu, 21-22 Haziran 2002, Eskişehir. Sempozyum Kitabı, s: 161-7.
15. Febre N, Silva V, Medeiros EA, Wey SB, Colombo AL, Fischman O. Microbiological characteristics of yeasts isolated from urinary tracts of intensive care unit patients undergoing urinary catheterization. J Clin Microbiol 1999; 37(5): 1584-6.
16. Baran J Jr, Klauber E, Barczak J, Riederer K, Khatib R. Trends in antifungal susceptibility among *Candida* sp. urinary isolates from 1994 and 1998. J Clin Microbiol 2000; 38(2): 870-1.
17. Gulay Z, Ergon C, Ozkutuk A, Yucesoy M, Bicmen M. Molecular epidemiologic surveillance and antifungal agent sensitivity of *Candida albicans* isolated from anesthesia intensive care units. Mikrobiyol Bul 2002; 36(3-4): 309-16.
18. İnci R. Antifungal ilaçlar, s: 1155-8. Ustaçelebi Ş (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1999. Güneş Kitabevi, Ankara.
19. Schwab U, Chernomas F, Larcom L, Weems J. Molecular typing and fluconazole susceptibility of urinary *Candida glabrata* isolates from hospitalized patients. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 29(1): 11-7.
20. Marol S, Yucesoy M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit. Mycoses 2008; 51(1): 40-9.
21. Yagci A. Restriction fragment length polymorfizm ve polimeraz zincir reaksiyon bazlı tiplendirme yöntemleri, s:149-60. Durmaz R (ed), Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. 2001. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara.
22. Saniç A. Mantarlar: Genel mikrobiyolojik özellikler ve sınıflandırma, s: 9-20. Ulusoy S (ed), Önemli ve Sorunlu Fungal Enfeksiyonlar. 2006. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
23. Han SH, Huh HJ, Lee MA, Chung WS. Molecular epidemiologic study using randomly amplified polymorphic DNA and risk factor analysis for an outbreak of *Candida tropicalis* urinary tract infection. Korean J Clin Pathol 2002; 22(1): 15-20.