

Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Candida* Suşlarında Antifungal Duyarlılığın ve Bazı Virülans Faktörlerinin Araştırılması ve RAPD-PCR ile Genotiplendirilmesi

Investigation of Antifungal Susceptibilities and Some Virulence Factors of *Candida* Strains Isolated from Blood Cultures and Genotyping by RAPD-PCR

Berna GÜLTEKİN, Mete EYİGÖR, Yasin TIRYAKI, Sevin KIRDAR, Neriman AYDIN

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.
Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Aydın, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 13.12.2010 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 07.02.2011

ÖZET

Kandidemi yüksek mortalite ile seyreden ciddi bir klinik tablodur. Özellikle immünyetmezlikli olgularda sık görülen bu tabloda erken tanı ve uygun tedavi önem taşır. Bu retrospektif çalışmada, kan kültürlerinden izole edilmiş olan *Candida* suşlarının antifungal duyarlılık paternlerinin belirlenmesi; virülans faktörü olarak kabul edilen fosfolipaz, esteraz ve biyofilm oluşturma özelliklerinin araştırılması ve izolatlar arasındaki klonal ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, laboratuvarımızda Şubat 2005-Temmuz 2010 tarihleri arasında, sekizi yenidoğan, 38'i ise erişkin hastaların kan kültürlerinden izole edilen 46 *Candida* spp. suşu alınmıştır. Suşların 17'si *C.albicans*, 18'i *C.parapsilosis*, beşi *C.glabrata*, dördü *C.tropicalis*, biri *C.guilliermondii* ve biri *C.krusei* olarak tanımlanan izolatlardır. Antifungal duyarlılık testleri "Sensititre Yeast One (Trek Diagnostic Systems, ABD)" ticari kiti ile yapılmış; esteraz aktivitesi Tween-80'li besiyerinde, fosfolipaz aktivitesi yumurta sarılı agarda araştırılmış ve biyofilm oluşturma özelliğinin belirlenmesinde mikropak yöntemi kullanılmıştır. Suşların genotiplendirilmesi; OPE-03, OPE-18, AP50-1, Cnd-3 ve Cnd-4 primerleri kullanılarak "Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR)" yöntemiyle yapılmıştır. Çalışmamızda, tüm suşların amfoterisin B, vorikonazol, posakonazol ve kaspofungine duyarlı olduğu saptanmıştır. *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* suşları flukonazole duyarlı bulunurken, *C.krusei* suşu flukonazole doğal dirençli kabul edilmiştir. Beş *C.glabrata* izolatının üçünde itrakonazol direnci belirlenmiş, diğer tüm suşların itrakonazole duyarlı olduğu görülmüştür. *C.albicans* suşlarının tümünde fosfolipaz ve esteraz aktivitesi

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Berna Gültekin, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 506 437 6933, **E-posta (E-mail):** gultekinberna@hotmail.com

pozitif, biyofilm oluşumu negatif iken, tüm *C.parapsilosis* suşlarının fosfolipaz ve esteraz aktivitesi negatif, biyofilm oluşumu pozitif bulunmuştur. Fosfolipaz aktivitesine hiçbir albicans-dışı türde rastlanmamış; *C.tropicalis* suşlarının hepsinde esteraz pozitifliği saptanırken, üç *C.tropicalis*, bir *C.glabrata* ve bir *C.krusei* izolatının biyofilm oluşturma özelliğine sahip olduğu izlenmiştir. Genotiplendirme sonucunda; beş farklı primer ile *C.albicans* suşları 5-8 patern, *C.parapsilosis* suşları ise 2-3 patern oluşturmuş, *C.parapsilosis* izolatlarından 14'ü primerlerin hepsi ile aynı bulunarak tek bir paternde (patern A) toplanmıştır. Sonuç olarak çalışmamızda, kandan izole edilen *Candida* spp. izolatlarının test edilen antifungal ajanlara karşı duyarlılıklarının oldukça yüksek olduğu görülmüş; *C.albicans* suşlarında yüksek oranda fosfolipaz ve esteraz, *C.parapsilosis* suşlarında yüksek oranda biyofilm pozitifliği saptanmıştır. *C.parapsilosis* izolatları arasında bulunan baskın paternin ise ekzojen yayılımla ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Candida* türleri; kandidemi; antifungal duyarlılık; esteraz; fosfolipaz; biyofilm; genotiplendirme; RAPD-PCR.

ABSTRACT

Candidemia is a serious clinical picture with a rather high mortality. Early diagnosis and appropriate treatment is crucial in this picture especially in immunocompromised cases. The aims of this retrospective study were to investigate the antifungal susceptibility patterns and to detect the presence of phospholipase, esterase and biofilm production which are excepted as virulence factors of *Candida* spp. strains and to evaluate the clonal relationships between isolates. A total of 46 *Candida* spp. strains isolated from blood cultures of patients of whom eight were newborn and 38 were adults, between the period of February 2005 to July 2010, were included in the study. Of the isolates 17 were identified as *C.albicans*, 18 were *C.parapsilosis*, five were *C.glabrata*, four were *C.tropicalis*, one was *C.guilliermondii* and one was *C.krusei*. Antifungal susceptibility tests were performed by using "Sensititre Yeast One (Trek Diagnostic Systems, USA)" commercial kit. Esterase activity was detected in Tween-80 medium; phospholipase activity in yolk egg agar and biofilm formation was investigated by microplate assay. Strain genotyping was performed by RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction) by using OPE-03, OPE-18, AP50-1, Cnd-3 and Cnd-4 primers. All strains were found to be susceptible to amphotericin B, voriconazole, posaconazole, and caspofungin. *C.krusei* strain was defined as resistant (intrinsically) to fluconazole. All strains of *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, and *C.tropicalis* were found to be susceptible to fluconazole. Three of five *C.glabrata* strains were resistant to itraconazole, while the other strains were found to be susceptible. All of the *C.albicans* strains had phospholipase and esterase activity, however none were biofilm-producing isolates. In contrast all of the *C.parapsilosis* strains were negative for phospholipase and esterase activity, however all were positive for biofilm formation. Phospholipase activity has not been detected in non-albicans strains; esterase activity were found positive in all of the *C.tropicalis* strains, while biofilm formation was detected in three *C.tropicalis*, one *C.glabrata* and one *C.krusei* isolates. The results of genotyping demonstrated that *C.albicans* strains displayed 5-8 different patterns and *C.parapsilosis* strains 2-3 patterns with the use of five primers. Among *C.parapsilosis* strains, 14 were found identical (with the use of all the primers forming a single pattern (pattern A)). In conclusion, the *Candida* spp. isolated from blood samples were highly susceptible to the tested antifungals, and *C.albicans* strains had high phospholipase and esterase activity, while *C.parapsilosis* strains had high rate of positivity for biofilm formation. The predominant pattern amongst *C.parapsilosis* strains was thought to be related to exogenous dissemination.

Key words: *Candida* spp.; candidemia; antifungal susceptibility; phospholipase; esterase; biofilm; genotyping; RAPD-PCR.

GİRİŞ

Kandidemi, özellikle immünyetmezliği olan olgularda görülen, yüksek mortalite ile seyreden ciddi bir klinik tablodur. Kandidemilerde en sık etken *Candida albicans* olmakla birlikte albicans-dışı türlerin görülme sıklığı da giderek artmaktadır. *Candida* türleri arasında antifungallere duyarlılık açısından farklar görülmektedir. Örneğin; *C.krusei* flukonazole doğal olarak dirençlidir; *C.glabrata* suşlarında flukonazole, *C.lusitaniae* suşlarında ise amfoterisin B'ye karşı duyarlılığın diğer türlere göre daha düşük olduğu belirtilmektedir¹. Son yıllarda ülkemizde de kullanılan ve duyarlılık oranlarının oldukça yüksek olduğu bildirilen kaspofungin, vorikonazol ve posakonazol gibi yeni antifungal ilaçlar, diğer antifungallere dirençli bulunan suşlarda tedavi seçeneklerini artırmaktadır^{2,3}.

Hastane kökenli enfeksiyon etkenlerinin arasında mantarların sıklığı giderek artmaktadır⁴. Enfeksiyonlardan izole edilen suşların genetik olarak ilişkili olup olmadıkları, moleküler yöntemlerle araştırılmakta, etkenin kaynağı (ekzojen veya endojen) ve bulaş yolları saptanabilmekte ve epidemiyolojik süreyans yapılabilmektedir⁵. Moleküler genotipleme yöntemleri içinde yer alan "random amplified polymorphic DNA (RAPD)-polymerase chain reaction (PCR)" ile *Candida* türlerinin hızlı ve kolay bir şekilde tiplendirilebileceği belirtilmektedir^{6,7}. Bu yöntemle yapılmış çalışmalarda birden fazla primerin kullanılması ve elde edilen sonuçların kombine edilmesiyle yöntemin ayırım gücünün artırıldığı ifade edilmektedir⁷⁻¹⁰.

Kandidoz gelişiminde, konağın savunma mekanizmalarındaki zayıflamanın yanı sıra etkene ait virülans faktörleri de önemli rol oynar. Bu konuda üzerinde en çok çalışılan tür *C.albicans* olup, fenotipik değişim, morfolojik dimorfizm, çeşitli adezyon molekülleri, hidrolitik enzimler (fosfolipaz, lipaz, aspartik proteinazlar vb.), katalaz, süperoksit dismutaz ve ısı-şok proteinleri gibi birçok virülans faktörü belirlenmiştir¹¹. *C.albicans* dışındaki türlerde virülans faktörleri ile ilgili çalışmaların sayısı da giderek artmaktadır^{6,12-14}.

Sunulan bu retrospektif çalışmada, kan kültürlerinden izole edilmiş olan *Candida* suşlarının çeşitli antifungal ajanlara karşı duyarlılığının belirlenmesi; fosfolipaz, esteraz ve biyofilm oluşturma özelliklerinin araştırılması ve izolatlar arasındaki klonal ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Candida Suşları

Çalışmaya, Şubat 2005-Temmuz 2010 tarihleri arasında laboratuvarımızda BACTEC 9120 sistemi (Becton-Dickinson, ABD) ile kan kültürlerinden izole edilmiş ve saklanmış olan *Candida* suşları alındı. Suşlar iki kez sabouraud dekstroz agar (SDA)'a pasajlanarak saflaştırıldı ve tanımlama testleri [germ tüp testi, mısır unu-Tween 80 agarda mikroskopik görünüm, CHROMagar *Candida* (Oxoid, İngiltere) besiyerinde koloni rengi] tekrarlandı. *C.albicans* olarak tanımlanan izolatlar arasında *C.dubliniensis* olup olmadığı PCR ile araştırıldı¹⁵. Kontrol suşları olarak *C.albicans* ATCC 90028, *C.tropicalis* ATCC 750, *C.krusei* ATCC 6258 ve *C.glabrata* ATCC 90030 kullanıldı.

Antifungal Duyarlılık Testi

İzolatların antifungal ilaçlara duyarlılığı "Sensititre Yeast One Test Panel Y06 (Trek Diagnostic Systems Inc., ABD)" kiti ile araştırıldı. Kolorimetrik mikrodilüsyon yöntemine dayanan bu testte, her kuyucukta belirli miktar antifungal bulunmaktadır. "Sensititre Yeast One" buyyonunda $1.5-8 \times 10^3$ hücre/ml içerecek şekilde hazırlanmış maya süspansiyonu çukurlara eklendi ve 35°C 'de 24 saat inkübe edildi. Değerlendirmede, pozitif üreme çukurundaki kırmızı rengin gözlenmediği ilk çukura ait değer, minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri olarak kabul edildi.

Antifungal duyarlılık testinde direnç sınır değeri olarak kabul edilen MİK değerleri; flukonazol için *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*'de $> 4 \mu\text{g/ml}$, *C.glabrata*'da $> 32 \mu\text{g/ml}$; kaspofungin için *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.krusei*'de $> 0.5 \mu\text{g/ml}$, *C.parapsilosis*'de $> 4 \mu\text{g/ml}$; itrakonazol için $> 0.5 \mu\text{g/ml}$; vorikonazol ve posakonazol için $> 2 \mu\text{g/ml}$ idi¹⁶⁻¹⁹. Amfoterisin B için, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" tarafından MİK değeri $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ olan suşlar duyarlı kabul edildi. Direncin saptanmasında CLSI tarafından belirlenen sınır değer bulunmasa da, bazı çalışmalarda MİK değeri $> 1 \mu\text{g/ml}$ saptanan suşların dirençli kabul edilmiş olması dikkate alındı².

Virülans Faktörlerinin Araştırılması

Esteraz aktivitesinin tespitinde; suşlar Tween 80 agara 10 mm çaplı daire şeklinde ekilerek 10 gün 30°C 'de inkübe edildi ve ekim bölgesinin etrafında ışığı geçiren hale oluşumunun saptanması pozitif olarak kabul edildi²⁰.

Fosfolipaz aktivitesinin tespitinde; yumurta sarılı agara 0.5 McFarland bulanıklığındaki maya süspansiyonundan 10 μl ekilmesinden ve 37°C 'de dört gün inkübasyondan sonra, koloni çapının presipitasyon çapına oranı (Presipitasyon zonu; Pz) hesaplandı. Fosfolipaz aktivitesi açısından; Pz değeri < 0.69 bulunan suşlar çok kuvvetli (++++), Pz= 0.70-0.79 olan suşlar kuvvetli (+++), Pz= 0.80-0.89 olan suşlar orta (++) ve Pz= 0.90-0.99 olan suşlar zayıf (+) pozitif olarak kabul edilirken; Pz ≥ 1 olan suşlar negatif olarak değerlendirildi^{21,22}.

İzolatların biyofilm oluşturma yetenekleri mikropalak yöntemiyle araştırıldı²³. Kısaca, %0.9 NaCl içinde 3 McFarland standardına ayarlanan maya süspansiyonu (20 μl) ile %8 glukoz içeren Sabouraud-dekstroz buyyon (BioMérieux, Fransa) (180 μl) düz tabanlı polistiren mikropalaklar (Greiner bio one, Almanya) içinde karıştırıldı. Kırk sekiz saat 30°C 'de inkübasyondan sonra çukurlar boşaltılarak üç kez distile su ile yıkandı ve havada kurutuldu. Kristal viyole (%1 dilüsyonda) ile 20 dakika boyama, yıkama ve kurutma işlemlerinden sonra çukurlara 200'er μl %96'lık etanol eklendi ve mikropalak okuyucuda (Bio Tek, EL x 800, USA) 630 nm'lik filtre ile okutularak optik dansite (OD) değerleri elde edildi. Eşik değer (negatif kontrollerin OD ortalaması + 3x standart sapma değeri) hesaplanarak OD değeri eşik değer üzerinde bulunan örneklerin biyofilm oluşum testi pozitif kabul edildi.

Esteraz, fosfolipaz ve biyofilm oluşumu testleri her suş için üçer kez tekrar edildi.

RAPD-PCR

Suşların genotiplendirmesi RAPD-PCR yöntemiyle yapıldı. Bu amaçla, Marol ve arkadaşlarının¹⁰ kullandığı OPE-03 (5'-CCAGATGCAC-3), OPE-18 (5'-GGACTGCAGA-3), AP50-1 (5'-GATTGAGACC-3') ve Gülay ve arkadaşlarının²⁴ kullandığı Cnd-3 (5'-CCA-GATGCAC-3'), Cnd-4 (5'-ACGGTACTACT-3') primerlerini içeren yöntemler, adı geçen çalışmalarda belirtildiği şekilde uygulandı. PCR karışımı 50 µl son hacimde, 200 µM dNTP'lerin her birinden (Invitrogen, ABD), 5 µl 10x PCR tamponu, 2.5 mM MgCl₂, 2.5 U Taq polimeraz (Invitrogen, ABD), primerler (Cnd-3 için 0.2 µM, Cnd-4 için 0.8 µM, OPE-03 ve OPE-18 için 0.6 µM, AP50-1 için 2 µM) ve 5 µl DNA olacak şekilde hazırlandı. Isı döngü cihazı (Eppendorf, ABD) programı; 94°C'de üç dakika ön denatürasyonun ardından 45 döngü olacak şekilde; 94°C'de bir dakika denatürasyon, 36°C'de bir dakika yapışma, 72°C'de iki dakika uzama ve 72°C'de yedi dakika son uzama şeklinde uygulandı. Amplifikasyon sonrasında ürünler %1.5 agar ve 1 µl/ml "cybersafe" (Invitrogen, ABD) içeren jelde 80V'da 1.5 saat yürütüldü. Oluşan bandlar jel görüntüleme cihazında (Vilber Lourmat, Fransa) görüntülenerek Bio1D yazılımı (Vilber Lourmat, Fransa) ile analiz edildi ve UPGMA yöntemiyle her bir primer için ayrı dendogram oluşturuldu. Suşlar arasındaki klonal ilişkinin yorumlanmasında Dice benzerlik katsayısı dikkate alındı ve < 0.90 olması halinde suşların farklı paternde olduğu kabul edildi¹⁰.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 46 *Candida* spp. suşunun sekizinin yenidoğan, 38'inin ise erişkin hastalardan (yaş aralığı: 0-80; yaş ortalaması: 61.71 ± 13.93 yıl) izole edilen suşlar olduğu belirlenmiştir. İzolatların 18 (%39)'i *C.parapsilosis*, 17 (%37)'si *C.albicans*, 5 (%11)'i *C.glabrata*, 4 (%9)'ü *C.tropicalis*, 1 (%2)'i olmak üzere *C.guilliermondii* ve 1 (%2)'i *C.krusei* olarak tanımlanmıştır.

Antifungal duyarlılık testi sonuçlarına göre, izolatların tümü amfoterisin B, vorikonazol, posakonazol ve kaspofungine duyarlı bulunmuş; beş *C.glabrata* suşundan üçünün itrakonazole dirençli olduğu görülmüştür (Tablo I). Çalışmadaki tek *C.krusei* suşunun ise, flukonazole doğal dirençli olduğu için MİK değeri dikkate alınmamıştır.

Çalışmamızda *C.albicans* suşlarının tümünde fosfolipaz ve esteraz aktivitesi saptanırken, hiçbir *C.albicans* suşunun biyofilm oluşturmadığı izlenmiştir. Buna karşın *C.parapsilosis* suşlarının fosfolipaz ve esteraz aktivitesi göstermediği, ancak tümünün biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir. Tüm izolatların esteraz, fosfolipaz ve biyofilm oluşturma özellikleri Tablo II'de gösterilmiştir.

RAPD-PCR ile yapılan tiplendirmede, beş farklı primere göre değişmek üzere *C.albicans* suşlarının 5-8, *C.parapsilosis* suşlarının ise 2-3 patern oluşturduğu görülmüştür (Tablo III) (Resim 1,2). *C.parapsilosis* suşlarının 14 (CP 1-14)'ü beş primerle de benzer bulunarak A paternini ve diğer 3 (CP 16-18)'ü beş primerle de benzer bulunarak B paternini oluşturmuş; bir (CP 15) suş ise primerlerin üçü ile A paternindeki suşlarla benzer bulunurken, iki (OPE-18, Cnd-4) primerle farklı patern (Patern C) oluşturmuştur. *C.parapsilosis* dışındaki türlerde primerlere göre patern sayılarında ve paternlerin içerdiği suşlarda (aynı bulunan suşlar dahil) farklar olduğu belirlenmiştir.

Tablo 1. *Candida spp.* İzolatlarının Antifungal Duyarlılık Testi Sonuçları

<i>Candida</i> türü (sayı)	Amfoterisin B			Flukonazol			İtrakonazol			Vorikonazol			Posakonazol			Kaspofungin		
	MIK 50	MIK 90	MIK aralığı	MIK 50	MIK 90	MIK aralığı	MIK 50	MIK 90	MIK aralığı	MIK 50	MIK 90	MIK aralığı	MIK 50	MIK 90	MIK aralığı	MIK 50	MIK 90	MIK aralığı
<i>C.albicans</i> (17)	0.25	0.5	0.12- 0.5	0.5	1	<0.12- 1	0.06	0.12	0.03- 0.12	0.015	0.03	<0.008- 0.06	0.03	0.06	0.008- 0.12	0.12	0.5	0.06- 0.5
<i>C.parapsifosis</i> (18)	0.25	0.5	0.03- 0.5	2	2	0.5-4	0.12	0.25	0.03- 0.25	0.03	0.06	<0.008- 0.5	0.06	0.12	0.03- 0.25	1	1	0.5-2
<i>C.tropicalis</i> (4)			0.12- 0.5			1-4		0.25- 0.5	0.06- 0.25			0.06- 0.25		0.06-1				0.06- 0.25
<i>C.glabrata</i> (5)			0.06-1			8-32		0.5-1	0.12- 0.5			0.12- 0.5		1-2				0.12- 0.25
<i>C.guilliermondii</i> (1)			0.25			8		0.5	0.06			0.25		0.5				1
<i>C.krusei</i> (1)			0.25	B	B	B	B	0.5	1			0.5		0.5				0.5

MIK: Minimal inhibitör konsantrasyon (µg/ml); B: *C.krusei* flukonazole doğal dirençli olduğundan MIK değeri belirtilmemiştir.

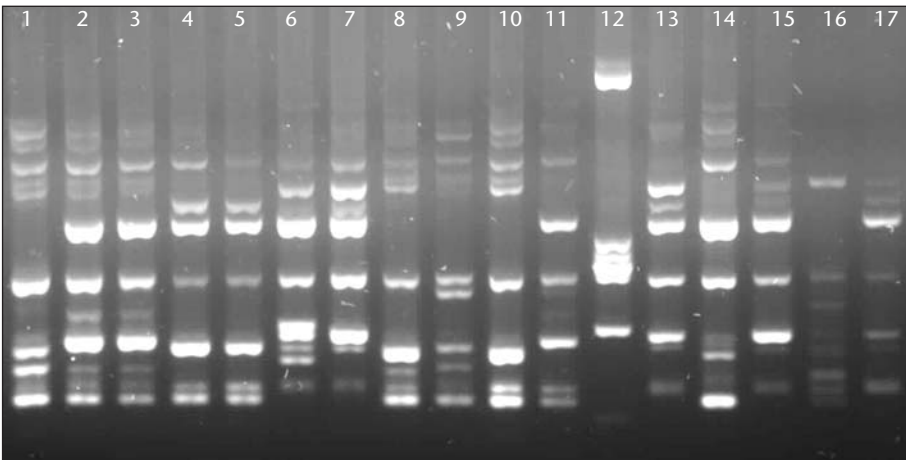
Tablo II. *Candida* spp. İzolatlarının Esteraz, Fosfolipaz ve Biyofilm Oluşturma Özellikleri

<i>Candida</i> türü	Pozitif sayı/Toplam sayı		
	Esteraz	Fosfolipaz	Biyofilm
<i>C.albicans</i>	17/17	17/17*	0/17
<i>C.parapsilosis</i>	0/18	0/18	18/18
<i>C.tropicalis</i>	4/4	0/4	3/4
<i>C.glabrata</i>	0/5	0/5	1/5
<i>C.guilliermondii</i>	0/1	0/1	0/1
<i>C.krusei</i>	0/1	0/1	1/1
Toplam	21/46 (%46)	17/46 (%37)	23/46 (%50)

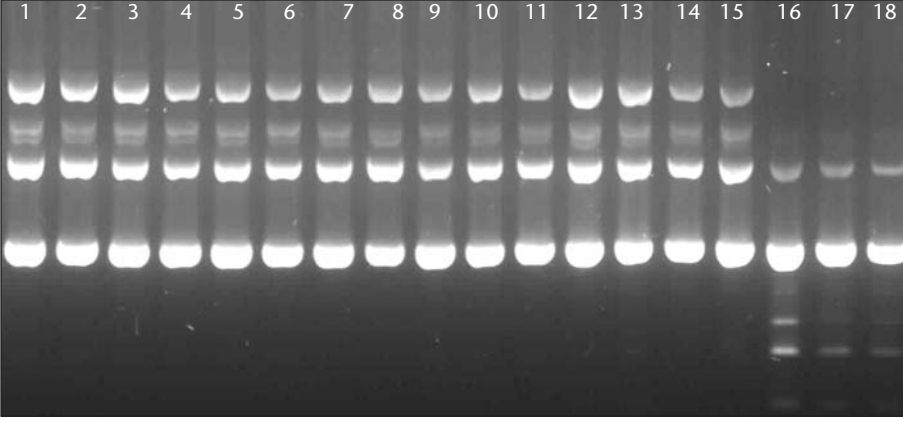
* Suşların 6'sı çok kuvvetli, 8'i kuvvetli, 3'ü orta/zayıf düzeyde fosfolipaz aktivitesi göstermiştir (ortalama Pz: 0.690 ± 0.840).

Tablo III. RAPD-PCR ile Yapılan Genotiplendirmede Farklı Primerlerle Elde Edilen Patern Sayıları

<i>Candida</i> türü (n)	Primer				
	OPE-03	OPE-18	APS0-1	Cnd-3	Cnd-4
<i>C.albicans</i> (17)	6	8	8	8	5
<i>C.parapsilosis</i> (18)	2	3	2	2	3
<i>C.glabrata</i> (5)	3	3	2	3	4
<i>C.tropicalis</i> (4)	3	2	2	4	2



Resim 1. *C.albicans* suşlarının Cnd-3 primeri ile RAPD-PCR görüntüsü.



Resim 2. *C.parapsilosis* suşlarının *Cnd-3* primeri ile RAPD-PCR görüntüsü.

TARTIŞMA

Bu retrospektif çalışmada, *Candida* spp. kan kültürü izolatlarının antifungal ilaçlara karşı duyarlılığı ve virülans faktörü olarak kabul edilen bazı özellikleri araştırılmış ve izolatlar arasındaki klonal ilişki RAPD-PCR ile genotiplendirilerek değerlendirilmiştir. Çalışmamızda antifungal duyarlılık testleri "Sensititre Yeast One (SYO) Test Panel" ticari kiti ile uygulanmıştır. Yapılan bir çalışmada, ekinokandinlere duyarlılık testinde SYO kiti ve CLSI'nın referans yöntemiyle alınan sonuçlar karşılaştırılmış ve iki yöntem arasındaki uyum %100 olarak saptanmıştır²⁵. Bertout ve arkadaşları²⁶ ise, SYO kiti ile CLSI'nın mikrodilüsyon yöntemi arasındaki uyum oranlarını flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, posakonazol, amfoterisin B ve kaspofungin için sırasıyla; %70.6, %83.3, %80.4, %87.3, %92.2 ve %88.2 olarak bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar, çok büyük hata oranını %0.9 (amfoterisin B, kaspofungin) ile %7.8 (vorikonazol) arasında, büyük hata oranını ise %2.9 (vorikonazol) ile %26.5 (amfoterisin B) arasında tespit etmiş; en düşük kategorik uyumun (%72.6) amfoterisin B için saptandığını belirtmişlerdir²⁶. Ticari olarak kolay sağlanabilmesi, aynı anda çok sayıda antifungal ilacın test edilebilmesi ve uygulama kolaylığı gibi avantajları nedeniyle, çalışmamızda tercih edilen bu yöntem ile alınan sonuçlar değerlendirilirken, referans yöntem ile arasında uyumsuz sonuçlar olabileceği göz önünde tutulmalıdır. Çalışmamızda, antifungal duyarlılık testinin değerlendirilmesinde, yeni güncellenen, flukonazol ve kaspofungin için *Candida* türüne göre farklılık gösteren direnç sınırları değerleri kullanılmıştır^{16,17}. Buna göre suşların tümü vorikonazol, posakonazol, amfoterisin B ve kaspofungine duyarlı bulunmuş; üç *C.glabrata* izolatı dışında itrakonazole dirençli suş saptanmamıştır (Tablo I). *C.krusei* suşları ise flukonazole doğal dirençlidir.

Çalışmamızın sonuçları, klinik *Candida* izolatlarında antifungal duyarlılığın araştırıldığı diğer çalışmalarla, kullanılan direnç sınır değerleri farklı olmasına rağmen, benzerlik göstermektedir^{3,27-29}. Aydın ve arkadaşları²⁷, *C.glabrata* suşları dışında flukonazol direnci saptamamışlar, Gürcüoğlu ve arkadaşları²⁸ ile Saraçlı ve arkadaşları³⁰ flukonazole dirençli *C.parapsilosis*; Tan ve arkadaşları³ ile Spiliopoulou ve arkadaşları²⁹ ise flukonazole di-

rençli *C.tropicalis* suşlarını rapor etmişlerdir. Çalışmamıza dahil edilen *Candida* suşları içinde en yüksek direnç (3/46; %6.5) itrakonazol için saptanmıştır. Benzer şekilde, test edilen antifungaller içinde en düşük duyarlılık oranının itrakonazol için saptandığı çalışmalar bulunmaktadır^{3,31}. Vorikonazol duyarlılığı ile ilgili olarak, direncin hiç saptanmadığı çalışmalar olduğu gibi, düşük MİK değerlerinin bildirildiği ya da dirençli *C.tropicalis* suşlarının rapor edildiği araştırmalar da mevcuttur^{3,27,30,32}. Posakonazol duyarlılığı için yapılan çalışmalarda, Diekema³² suşların tümünü duyarlı bulmuş, Spiliopoulou ve arkadaşları²⁹ ise dirençli *C.glabrata* suşları saptamışlardır. Amfoterisin B için de, bazı araştırmacılar^{4,29,32} tüm suşların duyarlı olduğunu bildirirken, bazıları²⁷ > 1 µg/ml MİK değeri saptadıkları *C.kefyr* ve *C.lusitaniae* suşları olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer olarak, çalışılan suşlarda kaspofungin duyarlılığını %98-100 olarak bildiren yayınların yanı sıra, kaspofungin MİK değerlerinin *C.parapsilosis* suşları dışında düşük bulunduğunu ifade eden yayınlar da bulunmaktadır^{29,30}. Bizim çalışmamızda kullandığımız direnç sınır değerlerini kullanan Pfaller ve arkadaşlarının³¹ çalışmasında, farklı ülkelerdeki merkezlerde kandan izole edilen toplam 934 *Candida* suşunda en yüksek direnç oranlarının saptandığı türler; flukonazol için *C.parapsilosis* (%6.8), itrakonazol için *C.krusei* (%43.8), vorikonazol için *C.glabrata* (%2.5), posakonazol için *C.glabrata* (%3.8) ve kaspofungin için *C.krusei* (%12.5) olmuştur.

Hastane enfeksiyonları ve salgınlarında suşlar arasındaki ilişkinin saptanması, bulaş kaynağı açısından önem taşımakta ve bu amaçla moleküler genotiplendirme yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır^{24,33,34}. Çalışmamızda, uygulama kolaylığı ve daha az zaman alması nedeniyle birçok araştırmacı tarafından tercih edilen RAPD-PCR yöntemi kullanılmıştır⁶⁻⁹. Bu yöntemin en önemli dezavantajı, elde edilen DNA paternlerinin, MgCl₂ konsantrasyonu, DNA ekstraksiyonu, amplifikasyon parametreleri ve ısı döngü cihazı tipine bağlı olarak değişiklik gösterebilmesidir⁵. Araştırmacılar, RAPD-PCR yönteminin standartize edilmesi durumunda tekrarlanabilirliğinin artacağını ve kullanılan primerlere bağlı olarak ayırım gücünün yükseleceğini bildirmekte; az sayıda suşun değerlendirildiği küçük ölçekli epidemiyolojik araştırmalarda kullanılabileceğini vurgulamaktadırlar^{7-10,24,34}. Çalışmamızda, *C.parapsilosis* suşlarında, kullanılan beş primerle benzer sonuçlar alınmış ve primerlere göre iki ya da üç farklı patern elde edilerek sırasıyla 15 ya da 14 suş içeren baskın bir patern (patern A) saptanmıştır. Primerler arasında farklılık gösteren tek suş (CP-15), OPE-03, AP50-1 ve Cnd-3 ile A paternine dahil edilmiş; OPE-18 ve Cnd-4 primerleri kullanıldığında ise ayrı bir patern oluşturduğu görülmüştür. *C.albicans*, *C.glabrata* ve *C.tropicalis* türlerinde ise kullanılan primere göre farklı sonuçlar elde edilmiş, baskın bir patern ile karşılaşılmağı. Bu sonuç, *C.albicans*'ın daha ziyade endojen kaynaklı enfeksiyonlar oluşturma özelliği ile uyumludur^{10,35}. Bizim çalışmamızda olduğu gibi *C.parapsilosis* suşları arasında baskın paternler saptanan ve bu durumun ekzojen kaynaklı enfeksiyonlarla açıklandığı çalışmalar bulunmaktadır^{6,35}. *C.parapsilosis* dışındaki türlerde suşların seçilen primere göre farklı paternlerde yer alması, bir primer ile benzer bant paternine sahip olan suşların bir başka primerle farklı bant paterni göstermesi nedeniyle değerlendirilmede zorlukla karşılaşmıştır. Bu sorun, suşların genotiplendirmesinde 10 farklı primer kullanan Saran ve arkadaşları⁷ tarafından da vurgulanmaktadır. Dolayısıyla

RAPD-PCR ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesine yönelik, farklı yöntemlerle karşılaştırılmalı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızın verileri, tüm *C.albicans* suşlarında fosfolipaz aktivitesinin olduğunu, albicans-dışı türlerde ise bu aktivitenin bulunmadığını göstermiştir. Fosfolipaz aktivitesi, kandan izole edilen *C.albicans* suşlarında %68-79, kan dışı örneklerden izole edilen suşlarda ise %61-100 oranları arasında bildirilmektedir^{13,36-40}. Sonuçlarımıza benzer olarak, albicans-dışı suşlarda fosfolipazın saptanmadığı çalışmalar da mevcuttur^{6,13}. Esteraz aktivitesi değerlendirildiğinde; tüm *C.albicans* suşlarımızın ve albicans-dışı türlerden tüm *C.tropicalis* izolatlarımızın bu aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda *C.albicans* suşlarında %84-100 ve *C.tropicalis* suşlarında %93-100 oranlarında esteraz aktivitesi rapor edilmektedir^{14,20,41}. Buna karşın bazı araştırmacılar, diğer *Candida* türlerinde esteraz aktivitesi saptamazken, türlere göre değişmekle birlikte bu oranları bazıları düşük (%2-10) bazıları ise yüksek (%57-100) olarak bildirmektedirler^{6,14,20,41}. *Candida* suşları biyofilm oluşturma özellikleri yönünden incelendiğinde; hiçbir *C.albicans* izolatının biyofilm oluşturmada izlenmiş, ancak albicans-dışı izolatların %79 (23/29)'unda biyofilm oluşumu saptanmıştır (Tablo II). En yüksek biyofilm pozitiflik oranının *C.parapsilosis* suşlarına ait olduğu (18/18) gözlenmiştir. Bu konudaki veriler, sonuçlarımıza benzer olarak, klinik örneklerden izole edilen albicans-dışı türlerin *C.albicans* suşlarına göre daha yüksek oranda biyofilm oluşturduğunu göstermektedir^{6,42-44}. Çalışmalar arasında, *Candida* suşlarının fosfolipaz ve esteraz aktivitesi ile biyofilm oluşturma özellikleri konusunda alınan bu farklı sonuçların, çalışılan suş sayısına, olguların özelliklerine, bölgesel farklılıklara ve yöntem farklılıklarına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, kan kültürlerinden izole edilen *C.albicans*, *C.parapsilosis* ve *C.tropicalis* suşlarının test edilen tüm antifungal ajanlara duyarlı olduğu bulunmuş, itrakonazole dirençli suşların *C.glabrata* izolatları olduğu izlenmiş, *C.albicans* izolatlarında yüksek oranda fosfolipaz ve esteraz, *C.parapsilosis* suşlarında ise biyofilm pozitifliği saptanmış ve *C.parapsilosis* suşları arasında bulunan baskın paternin ekzojen yayılımla ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microbiol Rev 2007; 20(1): 133-63.
2. Diekema DJ, Messer SA, Boyken LB, et al. In vitro activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. J Clin Microbiol 2009; 47(10): 3170-7.
3. Tan TY, Tan AL, Tee NW, Ng LS. A retrospective analysis of antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates from Singapore hospitals. Ann Acad Med Singapore 2008; 37(10): 835-40.
4. Altuncu E, Bilgen H, Cerikçioğlu N ve ark. Neonatal *Candida* enfeksiyonları ve etkenlerinin antifungal duyarlılıkları. Mikrobiyol Bul 2010; 44(4): 593-603.
5. Gil-Lamaignere C, Roilides E, Hacker J, Muller FM. Molecular typing for fungi-a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. Clin Microbiol Infect 2003; 9(3): 172-85.
6. Akyol V, Çerikçioğlu N. *Candida parapsilosis* klinik izolatlarının morfoliplendirilmesi, genotiplendirilmesi ve farklı morfoliplerde bazı virülans faktörlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2010; 44(4): 605-17.

7. Saran B, Karahan ZC, Agirbasli H, Tekeli A, Aksoy AM. *Candida albicans* klinik izolatlarnın “randomly amplified polymorphic DNA” yöntemiyle genotiplendirilmesinde kullanılan farklı primerlerin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2008; 42(4): 645-54.
8. Chen KW, Lo HJ, Lin YH, Li SY. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. J Med Microbiol 2005; 54(Pt 3): 249-58.
9. Costa-de-Oliveira S, Sousa I, Correia A, et al. Genetic relatedness and antifungal susceptibility profile of *Candida albicans* isolates from fungaemia patients. Med Mycol 2011; 49(3): 248-52.
10. Marol S, Yucesoy M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. Mycoses 2008; 51(1): 40-9.
11. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Acta Biochim Pol 2009; 56(2): 211-24.
12. Dağdeviren M, Çerikçioğlu N, Karavuş M. Hastanede yatan fungemili hastalardan izole edilen *Candida parapsilosis* kökenlerinin virülans faktörleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2003; 33(4): 315-22.
13. Birinci A, Cihan CC, Bilgin K, Acuner C, Durupınar B. Değişik klinik örneklerden izole edilen *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2005; 39(2): 205-9.
14. Yücesoy M, Marol S. *Candida* türlerinin esteraz aktivitesinin belirlenmesi. Mikrobiyol Bul 2003; 37(1): 59-63.
15. Donnelly SM, Sullivan DJ, Shanley DB, Coleman DC. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. Microbiology 1999; 145(Pt 8): 1871-82.
16. Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility 386 Testing (EUCAST) and Etest methods with the CLSI broth microdilution method for 387 echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. J Clin Microbiol 2010; 48(5): 1592-9.
17. Pfaller MA, Diekema DJ, Andes D, et al; the CLSI Subcommittee for Antifungal Testing. Clinical breakpoints for the echinocandins and *Candida* revisited: integration of molecular, clinical, and microbiological data to arrive at species-specific interpretive criteria. Drug Resist Updat 2011. doi:10.1016/j.drug.2011.01.004.
18. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and antifungal resistance in community onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(2): 561-6.
19. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. J Clin Microbiol 2006; 44(3): 819-26.
20. Slikkin M. Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. J Clin Microbiol 2000; 38(12): 4626-8.
21. Samaranyake LP, Raeside JM, MacFarlane TW. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. Sabouraudia 1984; 22(3): 201-7.
22. Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. Sabouraudia 1982; 20(1): 7-14.
23. Ruzicka F, Hola V, Votava M, Tejkalova R. Importance of biofilm in *Candida parapsilosis* and evaluation of its susceptibility to antifungal agents by colorimetric method. Folia Microbiol (Praha) 2007; 52(3): 209-14.
24. Gülay Z, Ergon C, Ozkütük A, Yücesoy M, Biçmen M. Anestezi yoğun bakım ünitesi hastalarından izole edilen *Candida albicans* suşlarının antifungal ajanlara duyarlılığı ve moleküler epidemiyolojik izlemi. Mikrobiyol Bul 2002; 36(3-4): 309-16.
25. Pfaller MA, Chaturvedi V, Diekema DJ, et al. Clinical evaluation of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel for antifungal susceptibility testing of the echinocandins anidulafungin, caspofungin, and micafungin. J Clin Microbiol 2008; 46(7): 2155-9.
26. Bertout S, Dunyach C, Drakulovski P, Reynes J, Mallié M. Comparison of the Sensititre YeastOne dilution method with the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 microbroth dilution reference method for determining MIC of eight antifungal agents on 102 yeast strains. Pathol Biol (Paris) 2011; 59(1): 48-51.

27. Aydın F, Bayramoğlu G, Güler NC, Kaklıkkaya N, Tosun I. Bloodstream yeast infections in a university hospital in Northeast Turkey: a 4-year survey. *Med Mycol* 2011; 49(3): 316-9.
28. Gurcuoğlu E, Ener B, Akalin H, et al. Epidemiology of nosocomial candidaemia in a university hospital: a 12-year study. *Epidemiol Infect* 2010; 138(9): 1328-35.
29. Spiliopoulou A, Vamvakopoulou S, Bartzavali C, Dimitracopoulos G, Anastassiou ED, Christofidou M. Eleven-year retrospective survey of candidemia in a University Hospital in Southwestern Greece. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1378-81.
30. Saracli MA, Gumral R, Gul HC, Gonlum A, Yildiran ST. Species distribution and in vitro susceptibility of *Candida* bloodstream isolates to six new and current antifungal agents in a Turkish tertiary care military hospital, recovered through 2001 and 2006. *Mil Med* 2009; 174(8): 860-5.
31. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Moet GJ, Jones RN. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiologic cutoff values to characterize resistance in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2009). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69(1): 45-50.
32. Diekema DJ. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J Clin Microbiol* 2002; 40(4): 1298-302.
33. Cerikcioglu N, Ilki A, Bilgen H, et al. The relationships between candidemia and candidal colonization and virulence factors of the colonizing strains in preterm infants. *Turk J Pediatr* 2004; 46(3): 245-50.
34. Sancak B, Menemenlioğlu D, Aydın NG, Ergüven S, Arkan S. *Candida krusei* klinik izolatlarının genomik DNA restriksiyon enzim analizi ve polimeraz zincir reaksiyonu ile tiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(4): 635-44.
35. Kuzucu C, Durmaz R, Otlu B, et al. Species distribution, antifungal susceptibility and clonal relatedness of *Candida* isolates from patients in neonatal and pediatric intensive care units at a medical center in Turkey. *New Microbiol* 2008; 31(3): 401-8.
36. Arslan U, Fındık D. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* türü maya mantarlarında virulans faktörlerinin (proteinaz, slime ve fosfolipaz) in-vitro araştırılması. *Infeks Derg* 2003; 17(4): 471-81.
37. Arkan S, Sancak B, Haşçelik G, Günalp A. *Candida albicans* izolatlarında fosfolipaz aktivitesinin saptanması. *Flora* 1998; 3(4): 240-3.
38. Yücesoy M, Yuluğ N. *Candida* türlerinde fosfolipaz aktivitesinin araştırılması. *Infeks Derg* 1999; 13(4): 569-74.
39. Fotedar R, Al-Hedaithy SS. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C.dubliniensis*. *Mycoses* 2005; 48(1): 62-7.
40. Yenişehirli G, Bulut Y, Tunçoğlu E. Klinik örneklerden izole edilen *Candida albicans* suşlarının fosfolipaz, proteinaz ve hemoliz aktiviteleri. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(1): 71-7.
41. Dolapçı İ, Tekeli A. Çeşitli *Candida* türlerinde slime faktörü yapısının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2002; 36(3-4): 323-8.
42. Vinitha M, Ballal M. Activity of proteinase, phospholipase and biofilm as virulence markers in *Candida species* isolated from haematogenous samples. *J Hosp Infect* 2009; 73(1): 94-5.
43. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 2002; 40(4): 1244-8.
44. Demirbilek M, Timurkaynak F, Can F, Azap O, Arslan H. Hastane kaynaklı *Candida* türlerinde biyofilm oluşumu ve antifungal duyarlılık paternleri. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41(2): 261-9.