

İnvaziv ve İnvaziv Olmayan Örneklerden İzole Edilen *Candida albicans* Suşlarının Genotip Dağılımı

Genotype Distribution Of *Candida albicans* Strains Isolated From Invasive And Noninvasive Samples

Esra Koyuncu¹, İştar Dolapçı¹, Ceren Karahan¹, Alper Tekeli¹, Özay Arıkan Akan²

¹Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbn-i Sina Hastanesi Merkez Laboratuvarları

Amaç: Bu çalışmada, sepsisli hastaların kanından izole edilen invaziv *C. albicans* izolatları ile, sağlıklı ve Human-Immunodeficiency Virus (HIV) ile infekte kişilerin boğazlarından izole edilen invaziv olmayan *C. albicans* izolatlarının genotip dağılımlarının belirlenmesi ve aynı bölgeyi hedef alan iki ayrı primer çifti kullanılarak elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, kandan izole edilen 42 adet *C. albicans* suşu (invaziv izolatlar) ile HIV pozitif hastaların boğaz çalkantı sularından elde edilen 38, sağlıklı erişkinlerin boğaz çalkantı sularından izole edilen 30 adet *C. albicans* suşu (invaziv olmayan izolatlar) dahil edilmiştir. *C. albicans* identifikasyonu konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemlerle gerçekleştirilmiş ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile doğrulanmıştır. 25S intron genotiplendirmesi, CaLSU-F ve CaLSU-R ile CA-INT-L ve CA-INT-R primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Kandan izole edilen 42 adet *C. albicans* suşunun 12'si genotip A (%28.5), 17'si genotip B (%40.5) ve 13'ü genotip C (%31) olarak bulunurken, sağlıklı kontrollerden izole edilen 30 adet *C. albicans* suşunun 9'unun genotip A (% 30), 12'sinin genotip B (% 40) ve 9'unun genotip C (%30) dağılımında olduğu gösterilmiştir. HIV pozitif bireylerden elde edilen 38 adet *C. albicans* suşunun 15'i genotip A (%39.5), 7'si genotip B (%18.4) ve 16'sı genotip C (%42.1) olarak bulunmuştur. Her iki primer ile de elde edilen sonuçlar birbirleriyle uyumlu bulunmuştur.

Sonuç: İnvaziv ve non-İnvaziv örneklerin genotip dağılımları birbirleriyle karşılaştırdıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Anahtar Kelimeler: *Candida albicans*, genotiplendirme

Aim: The aim of this study was to genotype *C. albicans* strains isolated from blood cultures of sepsis patients (invasive isolates) and from oral rinse samples of healthy adults and HIV-positive patients (non-invasive isolates) by using two different primer sets targeting the same gene.

Materials and Methods: 42 *C. albicans* invasive isolates obtained from sepsis patients and 68 oral non-invasive isolates obtained from oral rinse samples of healthy adults (n=30) and HIV-positive patients (n=38) were included in this study. *C. albicans* identification was made by conventional microbiological tests and confirmed by polymerase chain reaction (PCR). 25S intron genotyping was performed by using CaLSU-F and CaLSU-R primers and by using CA-INT-L and CA-INT-R primers.

Results: Twelve of the 42 *C. albicans* isolates from blood samples were genotype A (28.5%), 17 were genotype B (40.5) and 13 were genotype C (31%). In the noninvasive group, genotype distribution of the HIV-positive patients and healthy controls were as follows: 15 (39.5%) of the 38 oral isolates obtained from HIV-positive patients were found as genotype A, 7 (18.4) genotype B, and 16 (42.1%) genotype C. Among the 30 oral isolates obtained from healthy adults, 9 (30%) were genotype A, 12 (40%) were genotype B, and 9 (30%) were genotype C. The results obtained by using both of the primers were in correlation with each other.

Conclusion: No statistical significant difference was observed between the genotype distributions of invasive and noninvasive isolates.

Key Words: *Candida albicans*, genotyping

Başvuru tarihi: 09.03.2007 • Kabul tarihi: 23.05.2007

İletişim

İştar Dolapçı
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Morfoloji binası 3. kat Sıhhiye 06100 Ankara
Tel : (312) 310 30 10/277
E-posta adresi: dolapci@medicine.ankara.edu.tr

Son yıllarda, yeni ve daha etkili tedavi protokollerinin geliştirilmesi sonucunda, özellikle altta yatan bağışıklık sistemini baskılayan hastalıkları olan hastalarda sağ kalım süresi uzamış, ancak bu hastalarda görülen mantar enfeksiyonlarının sıklığı ve çeşitliliğinde belirgin bir artış ortaya çıkmıştır (1,2).

İzlenen mantar enfeksiyonları arasında etken olarak, daha önceleri özel bir öneme sahip bulunmayan virülansı az mantar türlerinin sayısında artış izlenmekle birlikte, *Candida albicans* hala en sık izole edilen etkindir (3,4).

C. albicans, tüm *Candida* enfeksiyonlarının yaklaşık %60-75'inden, tüm sepsislerin %10'undan sorumludur. *C. albicans* sepsisi gelişen hastalarda, hastanede yatış süresi belirgin olarak uzamakta ve mortalite %60'lara kadar çıkabilmektedir. Bu nedenlerle, etkenin moleküler yöntemlerle tanımlanması; kısa sürede güvenilir sonuçların alınmasını sağlayarak, hastanın tanısının neredeyse örneğin alındığı gün içerisinde konulmasına imkan vermektedir. Moleküler tiplendirme yani genotiplendirme ise, etkenin epidemiolojisinin belirlenmesi ile uygun tedavi ve korunma protokollerinin geliştirilmesini sağlamaktadır (5,6,7).

Bu çalışmada, sepsisli hastaların kanından izole edilen invaziv ve sağlıklı ve Human-Immunodeficiency Virus (HIV) ile enfekte olan kişilerin boğazlarından izole edilen invaziv olmayan *C. albicans* izolatlarının genotip dağılımlarının belirlenmesi ve aynı bölgeyi hedef alan iki ayrı primer çifti kullanılarak elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Hastanesi Merkez Bakterioloji Laboratuvarı'na 2001-2004 yılları arasında çeşitli kliniklerden gönderilen kan örneklerinden Bactec 9120 sistemi ile izole edilen 42 adet *C. albicans* suşu "invaziv izolat" olarak çalışmaya alınmıştır.

İnvaziv olmayan izolat olarak toplam 68 adet oral *C. albicans* suşu kullanılmıştır. Bu 68 suşun 38'i Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi'nde 2002-2004 yılları arasında takip edilmekte olan HIV ile enfekte ancak aktif hastalık belirtileri bulunmayan bireylerin boğaz çalkantı sularından izole edilmiştir. Geri kalan 30 izolat, sigara kullanmayan, yakın dönemde antibiyotik tedavisi almamış ve herhangi bir oral lezyonu bulunmayan sağlıklı erişkinlerin boğaz çalkantı sularından elde edilmiştir.

Suşların identifikasyonu, jerm tüp testi, mısır unu tween 80 agarda klamidospore oluşumu, Staib agar besiyerindeki koloni morfolojileri, Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)'da 45°C'de üreme özellikleri, CHROMagar *Candida* besiyerindeki (Mast Diagnostics, İngiltere) görünüşleri incelenerek konvansiyonel yöntemler ve API 20 C AUX (BioMerieux, Fransa)

identifikasyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Tanı ayrıca, *C. albicans* için spesifik olan NL4 (5' AAG ATC ATT ATG CCA ACA TCC TAG GTA AA 3') ve CAL5 (5' TGT TGC TCT CTC GGG GGC GGC CG 3') primerleri kullanılarak, literatürde belirtildiği şekilde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile doğrulanmıştır (8). Tüm çalışmalarda *C. albicans* NIH A ve NIH B suşları, kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

Genotip dağılımının saptanmasında 25S rDNA'daki grup I intron bölgesini hedefleyen, iki farklı primer çifti kullanılmıştır. Bunlardan CaLSU-F (5' GTT AAT CCA TTC ATG CGC GTC AC 3') ve CaLSU-R (5' GAT TTC TGC CCA GTG CTC TG 3') primerleri ile genotip A 133 bç, genotip B 512 bç ve genotip C 133 ve 512 bç'lik ürün vermektedir (9). CA-INT-L (5'ATA AGG GAA GTC GGC AAA ATA GAT CCG TAA 3') ve CA-INT-R (5' CCT TGG CTG TGG TTT CGC TAG ATA GTA GAT 3') primerleri ise genotip A izolatlarında 450 bç, genotip B izolatlarında 840 bç ve genotip C izolatlarında 450 ve 840bç'lik ürünler oluşturmaktadır (6).

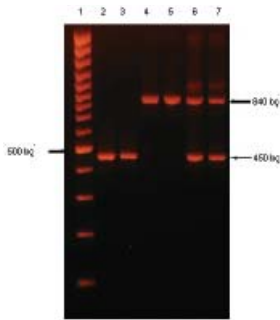
Grupların karşılaştırılmasında Pearson'un khi kare testi kullanılmıştır. p<0.05 bulunan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 1. Genotip dağılımları açısından çalışma gruplarının karşılaştırılmaları

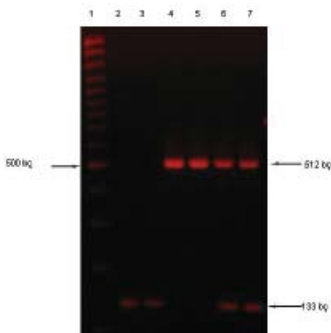
İzolatlar	Genotip A	Genotip B	Genotip C	TOPLAM
Kan (invaziv örnekler)	12 (%28.5)	17 (%40.5)	13 (%31)	42
Oral (sağlıklı kontrol)	9 (%30)	12 (%40)	9 (%30)	30
Oral (HIV pozitif bireyler)	15 (%39.5)	7 (%18.4)	16 (%42.1)	38
Oral (invaziv olmayan örnekler)	24 (%35.3)	19 (%27.9)	25 (%36.8)	68

Bulgular

Her iki primerle uygulanan PZR ile alınan sonuçlarda beklenen uyum görülmüştür (Şekil 1, 2). Çalışılan izolatların genotip dağılımları tablo-1'de verilmiştir. İnvaziv örneklerle invaziv olmayan örnekler karşılaştırıldığında; kan izolatları arasında genotip B ve C'nin, oral izolatlar arasında ise genotip A ve C'nin daha sık olduğu izlenmiştir. Ancak grupların genotip dağılımları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Oral izolatlar, HIV ile enfekte bireyler ve sağlıklı bireyler olarak ayrıldığında; gerek birbirleri ile gerekse ayrı ayrı kan izolatları ile karşılaştırıldıklarında genotip dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği ortaya konulmuştur.



Şekil 1. CA-INT primerleri ile yapılan genotiplendirim; 1. molekül, 2 ve 3. genotip A, 4 ve 5 genotip B, 6 ve 7



Şekil 2. CaLSU primerleri ile yapılan genotiplendirim; 1. molekül, 2 ve 3. genotip A, 4 ve 5 genotip B, 6 ve 7 genotip C'ye ait örnekler

Tartışma

C. albicans genotiplendirmesi amacıyla ilk olarak 1987 yılında Scherer ve ark. (10), restriction length fragment polymorphism (RFLP) yöntemini kullanarak, *EcoRI* enzimi ile *C. albicans* genomunu kesmişlerdir. Bu çalışmada 100'ün üzerinde bant elde edilmekle beraber, bütün suşlarda ortak olarak bulunan dimorfik bandın büyüklüğüne göre izolatlar iki büyük gruba ayrılmış ve 3.7 kb bant taşıyanlar, genotip A; 4.2 kb bant taşıyanlar, genotip B olarak sınıflandırılmıştır. Daha sonra yapılan hibridizasyon çalışmaları, bu bantların rDNA bölgeleri olduğunu ortaya çıkartmıştır. Genotip B'deki 4.2 kb'lik banttan, bu izolatların 25S rDNA geninde taşıdıkları 379 bp büyüklüğündeki aktarılabılır grup-1 intron bölgesinin sorumlu olduğu saptanmıştır. Genotip A'da yer alan izolatların bu insersiyon bölgesini taşımadıkları ve artmış flusitozin direncine sahip oldukları ortaya konulmuştur (6, 11, 12).

Aynı yöntemle yapılan sonraki çalışmalarda, her iki bandı da taşıyan genotip C izolatları ve bu bantları bulundurmeyen genotip D ve E izolatları tespit edilmiştir (13, 14). Ancak daha sonra yapılan araştırmalar, genotip D ve E izolatlarının aslında *C. dubliniensis*'e ait olduklarını ortaya koymuştur (3, 6).

McCullough ve ark (6), sadece grup 1 intron bölgesini çevreleyen primerler (CA-INT-L ve CA-INT-R primerleri) kullanarak, RFLP yöntemi ile tespit edilen *C. albicans* genotiplerini belirlemeyi başarmışlardır. Buna göre, aktarılabılır grup-1 intron taşımayan genotip A izolatları 450 bp'lik ürün; bu intronu taşıyan genotip B izolatları 840 bp'lik ürün ve genomunda bazı rDNA kopyalarında bu intronu taşıyıp, bazılarında taşımayan genotip C izolatları ise 450 ve 840 bp büyüklüğünde ürünler vermiştir.

Sugita ve ark. (9) 2002 yılında aynı bölgeye yönelik farklı bir primer çifti tasarlamışlar ve bu primerleri kullanarak gerçekleştirdikleri PZR sonucunda genotip A izolatlarını 133 bp, genotip B izolatlarını 512 bp ve genotip C izolatlarını da 133 ve 512 bp'lik ürün veren izolatlar olarak tanımlamışlardır.

Çalışmamızda, suşların genotiplendirmesi, patojenik mantarlar içerisinde sadece *C. albicans* ve *C. dubliniensis*'de bulunan "25 S rDNA içindeki aktarılabılır grup I intron bölgesine" spesifik bu iki farklı primer çifti kullanılarak PZR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu genotipleme yönteminde sıklıkla kullanılan primer çifti, McCullough ve arkadaşlarının (6) belirlediği CA-INT-L ve CA-INT-R primerleridir. Bununla birlikte, 17 bp daha kısa olan CaLSU-F ve CaLSU-R primerleri ile aynı doğrulukta sonuçların alınması nedeniyle, primer temininde dışarıya bağımlı olan ülkemiz laboratuvarlarında bu yöntemle genotipleme yapılmasında CaLSU primerlerinin kullanılması, maliyeti az da olsa düşüreceğinden tercih edilebilir.

Bir moleküler tiplendirme yönteminin rutin laboratuvar çalışmalarına uygulanabilmesi için; kolay, güvenilir, ucuz ve ayırım gücünün yüksek olması gerekir. Bu çalışmada kullanılan 25 S intron analizi, bu özellikleri karşılayan ve kullanımını gittikçe yaygınlaşan bir yöntemdir. 25 S intron genotiplerinin antifungal ajanlara duyarlılık veya invazivlik ile ilişkisi üzerine de araştırmalar devam etmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalar birbiri ile çelişkili sonuçlar vermektedir (3, 6, 15, 16). Çalışmamızda elde edilen bulgular daha önce yapılan benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında; gerek ülkemiz gerek yurt dışında yapılan farklı çalışmalarda farklı sonuçlar alındığı gözlenmiştir. Millar ve ark. (15) 25 S intron

genotipleri ile invazivlik arasındaki ilişki bulamamışlar ve bu lokusun invazivliği belirlemede uygun olmadığı sonucuna varmışlardır. Karahan ve ark. (16) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, invaziv izolatlar arasında genotip A anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da gruplarımız arasında genotip dağılımları açısından istatistiksel olarak bir fark bulunamamış olması, genotiplerin invazivlik ile ilişkili olmadığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, Karahan ve ark. (16) nın çalışmasında kullanılan noninvaziv örneklerin sadece oral izolatlar olmayıp, idrar, yara, vajen izolatlarını da içermesi nedeniyle farklı anatomik lokalizasyonlardan izole edilen suşların genotip dağılımlarının bu farkı anlamlı hale getirmiş olması muhtemeldir. Farklı bölgelerden veya yıllar içerisinde aynı bölgeden elde edilen suşların genotip dağılımlarında farklılık olabileceği bildirilmiştir (3, 6, 15, 16). Bu nedenle, çalışmamızda

kullanılan suşlar, Karahan ve ark. larının (16) çalışmasından daha sonra izole edildiklerinden, genotip dağılım şekli de değişiklik gösterebilir. Yine farklı hastanelerden izole edilen suşların klonal kökenlerinin farklı olması böyle bir fark doğurmuş olabilir. Bu çalışmada genotip A izolatlarında anlamlı bir azalma, genotip B izolatlarında ise artış olduğu dikkati çekmektedir. Genotipik dönüşüm, antifungal kullanım politikaları ile ilgili olabileceği gibi, yıllar içerisinde bu intronun kazanılmasındaki artışa da bağlı olabilir.

Sonuç olarak subtiplerle anatomik lokalizasyon veya invazivlik arasında ilişki varlığını belirlemek ve bu yöntemin epidemiyolojik çalışmalar açısından anlamını ortaya koymak için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Suş sayısı ve çeşitliliği artırılarak, antifungal duyarlılık ile genotipler arası ilişkilerin belirlenmesi,

genotipler ile virülans faktörleri (özellikle iki büyük virülans faktörü olan ekstraselüler proteinaz ve fosfolipazlar) arasında bağlantı olup olmadığının araştırılması yeni hedeflerimiz arasında yer almaktadır. Böylece etkenin epidemiyolojisinin belirlenmesi ile uygun tedavi ve korunma protokollerinin geliştirilmesine katkı sağlanabilecektir.

Teşekkür: 2003-08-09-150 no'lu Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Destekleme Fonu'nca desteklenen proje sırasında sağlanan HIV (+) hastaların oral izolatları için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Enfeksiyon Hastalıkları Ünitesi Öğretim Üyelerinden Sayın Prof. Dr. Serhat Ünal, Sayın Prof. Dr. Ömrüm Uzun ve Sayın Uzm. Dr. Gülay Sain Güven'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Jabra-Rizk MA, Falkler WA, Merz WG, et al. Retrospective identification and characterization of *Candida dubliniensis* isolates among *Candida albicans* clinical laboratory isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-infected and Non-HIV-infected individuals. J Clin Microbiol 2000; 38: 2423-2426.
- Swerdluff JN, Filler SG, Edwards JE Jr. Severe *Candidal* infections in neutropenic patients. Clin Infect Dis 1993; 17(suppl 2):457-467.
- Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, et al. Molecular characterization of new clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in Japan: analysis reveals a new genotype of *C. albicans* with group I intron. J Clin Microbiol 2001; 39: 4309-4315.
- Vrioni G, Bernard M. Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. J Infect 2001; 42: 50-56.
- Dalle F, Franco N, Lopez J et al. Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and non-bloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. J Clin Microbiol 2000; 38: 4554-4559.
- McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. J Clin Microbiol 1999; 37: 417-421.
- Pfaller MA. Epidemiology of fungal infections: the promise of molecular typing. Clin Infect Dis 1995; 20: 1535-1580.
- Mannarelli BM, Kurtzman CP. Rapid identification of *Candida albicans* and other human pathogenic yeasts by using short oligonucleotides in a PCR. J Clin Microbiol, 1998; 6:1634-1641.
- Sugita T, Kurosaka S, Yajitate M, et al. Extracellular proteinase and phospholipase activity of three genotypic strains of a human pathogenic yeast, *Candida albicans*. Microbiology and Immunology, 2002; 46:881-883.
- Scherer S, Stevens DA. Application of DNA typing methods to epidemiology and taxonomy of *Candida* species. J Clin Microbiol 1987; 25:675-679.
- Mercure S, Montplaisir S, Lemay G. Correlation between the presence of a self-splicing intron in the 25S rDNA of *Candida albicans* and strain susceptibility to 5' fluorocytosine. Nucleic Acids Res. 1993; 21: 6020-6027.
- Stevens DA, Odds FC, Scherer S. Application of DNA typing methods to *C. albicans* epidemiology and correlation with phenotype. Rev Infect Dis 1990; 12: 258-266.
- Clemons KV, Feroze F, Holmberg K, et al. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. J Clin Microbiol 1997; 35: 1332-1336.
- McCullough MJ, Clemons KV, Del Palacio A, et al. Epidemiology of *Candida albicans* isolates from heroin addicts analyzed by DNA typing. Med. Mycol. 1998; 36: 213-217.
- Millar BC, Moore JE, Xu J, et al. Genotypic subgrouping of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by 25S intron analysis. Lett Appl Microbiol 2002; 35: 102-106.
- Karahan ZC, Güriz H, Ağırbaşı H, et al. Genotype distribution of *Candida albicans* isolates by 25S intron analysis with regard to invasiveness. Mycoses 2004; 47:465-469.