ResearchGate

See discussions, stats, and author profiles for this publication at:
https://www.researchgate.net/publication/235420975

[Genotyping of Vaginal Candida glabrata Isolates Using Microsatellite Marker Analysis and DNA Sequencing to Identify...

Article *in* Mikrobiyoloji bülteni · February 2013

Source: PubMed

CITATIONS
0

READS
31

12 authors, including:



Mehmet sami Serin
Mersin University
173 PUBLICATIONS **7,023** CITATIONS
SEE PROFILE



Macit Ilkit
Cukurova University
99 PUBLICATIONS **700** CITATIONS
SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Virulence markers of opportunistic black yeasts in Exophiala View project



I am working on Aspergillus and aspergillosis View project

All content following this page was uploaded by Macit Ilkit on 16 February 2015.

The user has requested enhancement of the downloaded file.

Özgün Çalışma/Original Article *Mikrobiyol Bul 2013; 47(1): 109-121*

Vajinal *Candida glabrata* İzolatlarının Mikrosatellit Gösterge Analizi ile Genotiplendirilmesi ve DNA Dizi Analizi ile Antifungal Direnç ile İlişkili Mutasyonların Belirlenmesi*

Genotyping of Vaginal *Candida glabrata* Isolates Using Microsatellite Marker Analysis and DNA Sequencing to Identify Mutations Associated with Antifungal Resistance

Aylin DÖĞEN[1], Hüseyin DURUKAN[2], Ahmet Barış GÜZEL[3], Zehra ÖKSÜZ[1], Engin KAPLAN[4], Mehmet Sami SERİN[1], Ayşe SERİN[5], Gürol EMEKDAŞ[6], Gönül ASLAN[6], Seda TEZCAN[6], Ayşe KALKANCI[7], Macit İLKİT[8]

[1] Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.
[1] *Mersin University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Mersin, Turkey.*

[2] Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Mersin.
[2] *Mersin University Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Mersin, Turkey.*

[3] Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Adana.
[3] *Cukurova University Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Adana, Turkey.*

[4] Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim Araştırma ve Uygulama Merkezi, Mersin.
[4] *Mersin University, Advanced Technology Research and Practice Center, Mersin, Turkey.*

[5] Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı, Adana.
[5] *Cukurova University Faculty of Medicine, Department of Forensic Medicine, Adana, Turkey.*

[6] Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.
[6] *Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.*

[7] Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
[7] *Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.*

[8] Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana.
[8] *Cukurova University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Adana, Turkey.*

** Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından [BAP ECZ F TEB (AD) 2010-5A] desteklenmiştir.*

Geliş Tarihi (Received): 07.08.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 29.09.2012

İletişim (Correspondence): *Yrd. Doç. Dr. Aylin Döğen, Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 33169 Yenişehir, Mersin, Türkiye.* ***Tel (Phone):*** *90 324 3412815,*
E-posta (E-mail): *aylinats@hotmail.com*

ÖZET

Vulvovajinal kandidoz, vajinitlerin en sık ikinci sebebi olup (%17-39), hemen daima ilk sırada yer alan (%22-50) bakteri vajinitini izlemektedir. Tanı genellikle klinik olarak, mikolojik doğrulama testleri yapılmaksızın konulduğundan ve ampirik tedavi uygulandığından vulvovajinal kandidozun gerçek insidansı bilinmemektedir. Vulvovajinal kandidozda olguların %70-90'ında etken *Candida albicans*'dır, ancak son yıllarda albicans dışı *Candida* türlerinde, özellikle de *C.glabrata* enfeksiyonlarında artış dikkati çekmektedir. Azol ilaç tedavisine azalmış duyarlılığı nedeniyle *C.glabrata* enfeksiyonlarının klinik önemi artmış olup epidemiyoloji ve popülasyonuna ilişkin bilgiler sınırlıdır. Bu çalışmada, Çukurova Bölgesinde vajinal örneklerden izole edilen *C.glabrata* izolatlarının mikrosatellit göstergeler ile genotiplendirilmesi, antifungal duyarlılık profilinin araştırılması ve fenotipik azol direncine neden olabilen moleküler mekanizmaların belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, akut (n= 11) ve rekürren (n= 14) vulvovajinal kandidoz tanılı olgular ile vajinit bulgusu olmayan kontrol grubundan (n= 9) izole edilen 34 vajinal *C.glabrata* suşu ve referans *C.glabrata* CBS 138 (ATCC 2001) suşu olmak üzere birbirleriyle ilişkisiz toplam 35 *C.glabrata* suşu dahil edilmiştir. Bu izolatlar, üç mikrosatellit göstergenin (*RPM2*, *MTI* ve *Cg6*), değişken sayıdaki uç tekrarlarındaki farklılıklarına dayalı, çoklu lokus gösterge analizi (Multiple-locus variable number tandem repeat analysis) ile genotiplendirilmiştir. Mikrosatellit gösterge analizi, *RPM2*, *MTI* ve *Cg6* mikrosatellitlerinin PCR amplifikasyonu ve elde edilen ürünlerin kapiller elektroforezi ile yapılan fragment uzunluk analizi ile gerçekleştirilmiştir. Her bir suş için, bir gen (*CgERG11*) ve dört lokus (*CgPDR1*, *NTM1*, *TRP1* ve *URA3*)'un DNA dizi analizleri yapılmış ve antifungal direnç ile ilişkili olabilecek mutasyonlar araştırılmıştır. CLSI M27-A3 belgesine göre 13 antifungal ilaç ve borik asidin in vitro duyarlılık profili belirlenmiş ve fenotipik ilaç direnci ile genotip ve belirlenen mutasyonlar arasındaki olası ilişki sorgulanmıştır. Çalışmamızda, *C.glabrata* CBS 138 suşu tüm antifungal ilaçlara duyarlı bulunmuş; 34 vajinal *C.glabrata* izolatından 1 (%2.9)'i flukonazol, 13 (%38.2)'ü itrakonazol ve 3 (%8.8)'ü vorikonazole doza bağlı duyarlı olarak saptanmış; bu antifungallere karşı dirençli izolata rastlanmamıştır. Klotrimazol direnci ise yalnızca 3 (%8.8) suşta izlenmiş; ancak genotip ve fenotipik direnç arasında ilişki olmadığı belirlenmiştir (p> 0.05). Mikrosatellit gösterge analizine göre 13 farklı genotip saptanmış ve yöntemin ayırt etme gücü yüksek (DP= 0.877) bulunmuştur. Sonuç olarak, *C.glabrata* izolatlarının genotiplendirmesinde mikrosatellit gösterge analizinin hızlı ve uygulanabilir bir yöntem olduğu, ancak ayırt etme gücünün yüksek olmakla birlikte ideal olmadığı belirlenmiştir. Fenotipik direnç testi ile mutasyon arasındaki ilişkinin doğrulanması için daha geniş örnek hacmine sahip, ileri çalışmaların yapılması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Candida glabrata; genotiplendirme; antifungal test; flukonazol; klotrimazol; mikrosatellit gösterge; vajinit; kandidoz.*

ABSTRACT

Vulvovaginal candidosis is the second most common cause of vaginitis (17-39%) after bacterial vaginosis (22-50%). Since the diagnosis of vulvovaginal candidosis mainly depends on clinical findings without mycologic confirmatory tests and treated empirically, the actual incidence rate of vulvovaginal candidosis is unknown. Approximately 70-90% of vulvovaginal candidosis cases are caused by *Candida albicans*, however the increasing incidence of *C.glabrata* infections and its reduced susceptibility to azole drug therapy have generated increasing attention. The epidemiology and population structure of vulvovaginal candidosis due to *C.glabrata* are poorly characterized. This study was aimed to genotype the *C.glabrata* strains isolated from vaginal samples in Cukurova region, Turkey by microsatellite markers, to investigate the antifungal susceptibility profiles of the strains and to determine the molecular mechanisms leading to phenotypical azole resistance. A total of 34 unrelated vaginal *C.glabrata* strains isolated from patients with acute (n= 11) and recurrent (n= 14) vulvovaginal candidosis, control group (n= 9) without vaginitis symptoms, and a reference strain of *C.glabrata* CBS 138 (ATCC 2001) were included in the study. These isolates were genotyped using multiple-locus variable number tandem repeat analysis of three microsatellite markers (*RPM2*, *MTI*, and *Cg6*). Analysis of microsatellite markers was performed by fragment size determination of *RPM2*, *MTI*, and *Cg6* PCR products through capillary electrophoresis. For each of the evaluated strains, DNA sequence analysis was performed for one gene (*CgERG11*)

and four loci (*CgPDR1*, *NTM1*, *TRP1*, and *URA3*) to detect mutations possibly associated with antifungal resistance in each strain. In vitro susceptibility profiles of the strains to 13 antifungals and boric acid were determined according to CLSI document M27-A3 to investigate possible relationships between detected mutations and phenotypic resistance. *C.glabrata* CBS 138 strain was found to be susceptible to all the antifungals tested, while one of (%2.9) 34 vaginal *C.glabrata* isolates was found to be dose-dependent susceptible to fluconazole, 13 (38.2%) to itraconazole and 3 (8.8%) to voriconazole. No resistant strain were detected in the study population. Only three isolates were found to be resistant to clotrimazole (8.8%), however no relationship was identified between the genotypes and phenotypic resistance ($p > 0.05$). Thirteen genotypes were detected by microsatellite marker analysis, with high discrimination power (DP= 0.877). As a result, microsatellite marker analysis was validated as a rapid, reliable method for genotyping *C.glabrata* strains with good, but not optimal discriminatory power. Further studies examining larger numbers of isolates are needed to verify possible relationships between mutations and phenotypic resistance.

Key words: *Candida glabrata; genotyping; antifungal testing; fluconazole; clotrimazole; microsatellite marker; vaginitis; candidosis.*

GİRİŞ

Kadınların yaklaşık %75'i yaşamları boyunca en az bir kez, bunların da %40-50'si ikinci kez vulvovajinal kandidoz (VVK) atağı geçirmektedir. Olguların %5'inde ise rekürren VVK olarak tanımlanan ve son 12 ay içerisinde mikolojik yöntemlerle kanıtlanmış en az dört VVK atağı bildirilmektedir[1,2]. VVK etkenleri arasında en sık (%70-90) saptanan tür *Candida albicans*'dır; ancak son 20 yılda diğer *Candida* türlerinde ve özellikle *C.glabrata* enfeksiyonlarında artış dikkati çekmektedir[2,3]. *C.albicans*'ın etken olduğu VVK'da klinik ve mikolojik yanıt genellikle çok iyi iken, başta *C.glabrata* olmak üzere albicans dışı kandida türleri ile oluşan rekürren VVK olgularında antifungal ilaç direnci önemli bir sorundur[4,5]. Azol grubu antifungallere karşı duyarlılığın azalması, *C.glabrata* enfeksiyonlarının tedavisinin geç ve güç olmasına neden olur[6,7]. Bu çalışmada, Çukurova bölgesinde vajinal örneklerden izole edilen *C.glabrata* izolatlarının mikrosatellit göstergeler (*RPM2*, *MTI* ve *Cg6*) ile genotiplendirilmesi, antifungal duyarlılık profilinin araştırılması ve fenotipik azol direncine neden olabilen moleküler mekanizmaların belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Candida glabrata İzolatları

Çalışmaya, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikoloji Bilim Dalından sağlanan 34 vajinal *C.glabrata* izolatı dahil edildi. Suşların 11'i akut VVK, 14'ü rekürren VVK ve 9'u vajinit bulgusu ve rekürren VVK öyküsü olmayan olgulardan elde edilmişti. Kontrol olarak *C.glabrata* ATCC 2001 (CBS 138) referans suşu (Mantar Biyoçeşitlilik Merkezi, Utrecht, Hollanda) kullanıldı.

İzolatların tür düzeyinde tanımlanması ve doğrulanması; (i) insan serumunda 37°C'de 24 saat içinde çimlenme borusu oluşturmama, (ii) mısırunu-Tween 80 agarda eşeysiz sporların varlığı ancak gerçek hiflerin yokluğu ve (iii) API 20C AUX ticari kiti (bioMérieux, Fransa) ile yapıldı.

Antifungal Duyarlılık Testi

Antifungal testler, RPMI 1640 besiyeri kullanılarak mikrodilüsyon yöntemiyle CLSI önerilerine göre gerçekleştirildi[8]. Kısaca, her ilaç için minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) tanımlandı ve izolatların duyarlılık profillerinin sınıflandırılmasında kullanıldı. Buna göre; (1) Flukonazol (FLU), MİK: 8 µg/ml duyarlı (S), MİK 16-32 µg/ml doza bağlı duyarlı (S-DD), MİK 64 µg/ml dirençli (R); (2) İtrakonazol (ITR), MİK 0.125 µg/ml S, MİK 0.25-0.5 µg/ml S-DD, MİK 1 µg/ml R; (3) Amfoterisin B (AMB), MİK 1 µg/ml S; (4) 5-Flusitozin (5-FU), MİK 4 (µg/ml) S, MİK 8-16 µg/ml intermediate (I), MİK 32 µg/ml R olarak değerlendirildi. Ancak diğer antifungal ilaçlar için önerilen direnç sınır değerine rastlanmadı[9]. Antifungal duyarlılık test sonuçları MİK dağılımlarına göre rapor edildi ve her ilaç için $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ değerleri verildi. CLSI önerileri doğrultusunda, *C.krusei* ATCC 6258 ve *C.parapsilosis* ATCC 22019, kontrol izolatı olarak kullanıldı[8,10].

Antifungal ilaç konsantrasyonları deney öncesinde belirlenen aralıklarda incelendi: AMB (0.03-1 µg/ml); FLU (0.03-16 µg/ml); ITR (0.06-0.5 µg/ml); vorikonazol (VOR, 0.125-2 µg/ml); ketokonazol (KET, 0.25-8 µg/ml); mikonazol (MICO, 0.007-0.5 µg/ml); ekonazol (ECO, 0.06-1 µg/ml); tiyokonazol (TIO, 1-8 µg/ml); klotrimazol (CLO, 0.03-0.25 µg/ml); sulkonazol (SUL, 0.125-2 µg/ml); nistatin (NYS, 2-16 µg/ml); 5-FU (0.125-2 µg/ml); terbinafin (TER, 0.5-4 µg/ml) ve borik asit (BA, 3.28-419.84 µg/ml).

DNA Ekstraksiyonu, PCR ve Dizi Analizi

Vajinal *C.glabrata* izolatları ile referans suşun genomik DNA ekstraksiyonu Turin ve arkadaşları[11] tarafından önerilen yönteme göre yapıldı ve daha sonra *CgERG11*, *CgPDR1*, *RPM2*, *MTI*, *Cg6*, *NMT1*, *TRP1* ve *URA3* gen ve fragmentleri amplifiye edildi.

Mikrosatellit PCR Amplifikasyonu

RPM2, *MTI* ve *Cg6* mikrosatellit primerleri kullanılarak mikrosatellit uzunluk polimorfizmleri belirlendi[12]. PCR reaksiyonu; 1x PCR buffer (20 mM Tris HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 0.2 mM her bir dNTP (Fermentas, Almanya), 0.25 mM her bir ileri (FAM ile işaretli) ve geri primeri (Tablo I), 5 µl genomik DNA ve 1.25 U Taq DNA polimeraz (New England Biolabs, Almanya) 50 µl'lik reaksiyon karışımı içerisinde yapıldı. PCR amplifikasyonu başlangıç denatürasyonu 95°C'te 5 dakika, 40 siklus 95°C'te 30 saniye, 54°C'te 30 sani-

Tablo I. *Mikrosatellit PCR Primerleri*

Gen/lokus	Gen Erişim no	Primer adı	Dizi (5'-3')	Floresans ile işaretli
RPM2	AF338039	RPM2-For	ATCTCCCAACTTCTCGTAGCC	5' Fam[a]
		RPM2-Rev	ACTTGAACGACTTGAACGCC	-
MTI	J05133	MTI-For	CAGCAATAATAGCTTCTGACTATGAC	5' Fam[a]
		MTI-Rev	GACAGGAGCAACCGTTAGGA	-
Cg6	BZ298679	Cg6-For	AGCAAGAGGGAGGAGGAAACT	5' Fam[a]
		Cg6-Rev	AAATCCGGGGATAGATGAGG	-

[a] FAM: 6-carboxyfluorescein; For: Forward; Rev: Reverse.

ye, 54°C, 55°C ve 56°C'de (*RPM2*, *Cg6* ve *MT1* için sırasıyla) 45 saniye ve son uzama için 72°C'de 5 dakika olmak üzere ısı döngü cihazında (TC-Pro, Almanya) yapıldı.

Fragment Uzunluklarının Belirlenmesi

PCR ürünleri, GeneScan-500 (ROX) büyüklük standardı kullanılarak ABI 3100 genetik analiz sistemi (Applied Biosystems, Fransa) ile incelendi. Fragment uzunlukları "GeneScan 3.7 analysis software" programı ile belirlendi[12].

Mikrosatellit Gösterge Analizi

Her bir mikrosatellit gösterge için belirlenen fragment büyüklükleri "Arlequin 3.52" programı ile analiz edilerek izolatların mikrosatellit varyasyonlarına göre genotipleri belirlendi ve ayırt etme değeri (Discriminatory Power; DP= 0.8770 ± 0.0384) Arlequin 3.5 programı ile hesaplandı[13].

DNA Dizi Analizi

CgERG11 gen ve *CgPDR1*, *NTM1*, *TRP1* ve *URA3* lokus primerleri kullanılarak her bölge için PCR amplifikasyonu yapıldı[12]. Her bir hedef bölge için PCR reaksiyonu; 1x PCR buffer (20 mM Tris HCl, pH 8.4 ve 50 mM KCl), 0.2 mM her bir dNTP (Fermentas, Almanya), 0.25 mM her bir ileri (FAM ile işaretli) ve geri primeri (Tablo II), 5 µl genomik DNA ve 1.25 U Taq DNA polimeraz (New England Biolabs, Almanya) 50 µl'lik reaksiyon karışımı içerisinde yapıldı. PCR amplifikasyonu; başlangıç denatürasyonu 95°C'de 5 dakika, 40 siklus 95°C'de 30 saniye, 55°C (*NMT1*, *URA3* ve *TRP1* için), 56°C'de (*PDR1* için) ve 60°C (*ERG11* için) 30 saniye, 72°C 45 saniye ve son uzama için 72°C'de 5 dakika olmak üzere uygulandı. PCR ürünleri saflaştırıldıktan sonra, her bir primer çiftinin ileri primerleri kullanılarak RefGen Biyoteknoloji ve Araştırma merkezi ODTÜ, Ankara'da sekans reaksiyonları yapıldı.

Tablo II. *PCR ve Dizi Analizinde Kullanılan ERG11, PDR1, NMT1, TRP1 ve URA3 Primerleri*

Gen/lokus	Gen Erişim no	Primer adı	Dizi (5'-3')
ERG11	L40389	ERG11-For*	GCGATCCCTTCATGTCCATTGTC
		ERG11-Rev	GGCTAATGAATCAGCGTATATCCCG
PDR1	AY700584.1	PDR1-F2	GTGACTCGGAAGAAAGGGAC
		PDR1-Rev	CCGATAAGGGAGATGCAGTT
		PDR1-F5*	CAGAGACATCATATGAGGCAATCAG
		PDR1-STOP	GATATATGAATTCTCATTCAGAATCGAAGGG
NMT1	AF073886	NMT1-For*	GCCGGTGTGGTGTTGCCTGCTC
		NMT1-Rev	CGTTACTGCGGTGCTCGGTGTCG
TRP1	U31471	TRP1-For*	AATTGTTCCAGCGTTTTTGT
		TRP1-Rev	GACCAGTCCAGCTCTTTCAC
URA3	L13661	URA3-For*	AGCGAATTGTTGAAGTTGGTTGA
		URA3-Rev	AATTCGGTTGTAAGATGATGTTGC

* Sekans primerleri; For: Forward; Rev: Reverse.

Dizi Analiz Sonuçlarının Yorumlanması

ClustalX (ver. 1.83) programında her iki zincir karşı karşıya getirildi ve hizalandı. Sonra, GENDOC (ver. 2.6.002) DNA dizi analizi programında, uç kısımlardaki fazla hizalanmamış diziler kırpıldıktan sonra, son konsensus dizi şeklinde kaydedildi. Her bir izolata ait dizisi çıkarılmış olan bu gen bölgeleri, Gen-Bankası veri tabanında yayınlanmış referans dizi verileri ile karşılaştırıldı ve gen bölgesindeki özgül nükleotid değişiklikleri ve olası diğer polimorfik bölgeler belirlendi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS paket programı ver. 17.0 (SPSS Inc. USA) kullanıldı. Nonparametrik Kruskal-Wallis testi uygulandı ve $p< 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, 34 klinik *C.glabrata* izolatından 1 (%2.9)'i FLU, 13 (%38.2)'ü ITR ve 3 (%8.8)'ü VOR'e doza bağlı duyarlı (S-DD) olarak saptanmış; yalnızca 3 (%8.8) izolat CLO'e dirençli bulunmuştur (Tablo III). Referans *C.glabrata* CBS 138 suşunun tüm antifungal ilaçlara duyarlı olduğu belirlenmiştir. Mikrosatellit primerler kullanılarak yapılan fragment uzunluğuna göre 13 farklı genotip saptanmış (Tablo IV) ve dizi analiz sonucuna göre fenotipik antifungal direnç ve dizi analizi arasında baz ve aminoasit düzeyinde değişkenlik belirlenmiştir (Tablo V, VI). CLO'e dirençli üç izolatın farklı genotiplerde (genotip 2, 5 ve 13) yer aldığı; FLU S-DD bir izolatın genotip 6; VOR S-DD 3 izolatın genotip 2 (n= 2) ve 5 (n=1); ITR S-DD 13 izolatın genotip 2 (n= 3), 3 (n= 1), 5 (n= 2), 6 (n= 3), 7 (n= 1), 10 (n= 2) ve 12 (n= 1) içinde bulunduğu izlenmiştir. Yalnızca iki izolat (no. 5 ve 10) hem ITR hem de VOR'e S-DD bulunmuştur. CLO'e dirençli üç izolat akut VVK, rekürren VVK ve kontrol olmak üzere üç ayrı olguda görülmüştür. FLU S-DD bir izolatın akut VVK; VOR S-DD üç izolatın akut VVK (n= 1) ve rekürren VVK (n= 2); ITR S-DD 13 izolatın akut VVK (n= 5), rekürren VVK (n= 5) ve kontrol (n= 3) olgulardan izole edildiği belirlenmiştir. Genotip ile direnç veya S-DD arasındaki ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p> 0.05$).

TARTIŞMA

Klinik örneklerden izole edilen *C.glabrata* izolatlarının tiplendirilmesinde elektroforetik karyotiplendirme, "multilocus sequence typing (MLST)", probla "southern-blot" ve "randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)" yöntemleri kullanılmıştır[14-18]. Günümüzde ise tiplendirme için daha çok 2-6 nükleotidin "short tandem repeat"i olarak tanımlanan ve yüksek polimorfizm gösteren mikrosatellit gösterge (MG)'ler önerilmektedir[19]. Ayrıca, MG'lerin MLST'den daha iyi ayırım gücü sağladığı bildirilmiştir[19]. MG ile tiplendirme; güvenilir, ayırt edici ve uygulaması kolay bir yöntem olarak tarif edilmiş; ancak güvenilirliğin kontrolü için test sırasında referans bir suşun kullanılması önerilmiştir[20].

Berila ve Subik[12] 38 vajinal *C.glabrata* izolatının genetik çeşitliliği ile ilaç direnci arasındaki ilişkiyi araştırmış; 3 mikrosatellit, 4 lokus ve 1 gen primerleri kullanmış ve 14 genotip belirlemişlerdir. Yazarlar, H576Y aminoasit grubu içinde tanımlanan azol direncinden sorumlu *PDR1p* bölgesini göstermişlerdir. Yine Berila ve arkadaşları[21], çeşitli klinik

Tablo III. *Vajinal C.glabrata İzolatlarının İn Vitro Antifungal Duyarlılık Profili*

Antifungal ilaçlar (µg/ml)	***Candida glabrata* (n= 34)**
Amfoterisin B	
MİK Aralığı	0.03-1
$MİK_{50}$; $MİK_{90}$	0.5; 1
R (≥ 2 µg/ml), n (%)	-
Vorikonazol	
MİK Aralığı	0.125-2
$MİK_{50}$; $MİK_{90}$	0.5; 2
R (≥ 4 µg/ml), n (%)	-
S-DD (2 µg/ml), n (%)	3 (8.8)
Flukonazol	
MİK Aralığı	0.03-16
$MİK_{50}$; $MİK_{90}$	0.5; 8
R (≥ 64 µg/ml), n (%)	-
S-DD (16-32 µg/ml), n (%)	1 (2.9)
İtrakonazol	
MİK Aralığı	0.06-0.5
$MİK_{50}$; $MİK_{90}$	0.125; 0.5
R (≥ 1 µg/ml), n (%)	-
S-DD (0.25-0.5 µg/ml), n (%)	13 (38.2)
Ketokonazol	
MİK Aralığı	0.25-8
$MİK_{50}$; $MİK_{90}$	4; 8
R (≥ 16 µg/ml), n (%)	-
Nistatin	
MİK Aralığı	2-16
$MİK_{50}$; $MİK_{90}$	4; 8
R (ND), n (%)	-
5-Flusitozin	
MİK Aralığı	0.125-2
$MİK_{50}$; $MİK_{90}$	0.25; 1
R (≥ 32 µg/ml), n (%)	-
Borik asit	
MİK Aralığı	3.28-419.84
$MİK_{50}$; $MİK_{90}$	52.48; 209.92
R (ND), n (%)	-
Mikonazol	
MİK Aralığı	0.007-0.5
$MİK_{50}$; $MİK_{90}$	0.25; 0.5
R (≥ 4 µg/ml), n (%)	-
Ekonazol	
MİK Aralığı	0.06-1
$MİK_{50}$; $MİK_{90}$	0.5; 1
R (ND), n (%)	-

Tablo III. *Vajinal C.glabrata İzolatlarının İn Vitro Antifungal Duyarlılık Profili (Devamı)*

Antifungal ilaçlar (µg/ml)	***Candida glabrata* (n= 34)**
Tiyokonazol	
MİK Aralığı	1-8
$MİK_{50}$; $MİK_{90}$	4; 8
R (ND), n (%)	-
Klotrimazol	
MİK Aralığı	0.03-0.25
$MİK_{50}$; $MİK_{90}$	0.06; 0.25
R (≥ 0.5 µg/ml), n (%)	3 (8.8)
Sulkonazol	
MİK Aralığı	0.125-2
$MİK_{50}$; $MİK_{90}$	0.5; 2
R (ND), n (%)	-
Terbinafin	
MİK Aralığı	0.5-4
$MİK_{50}$; $MİK_{90}$	2; 4
R (≥ 16 µg/ml), n (%)	-

ND: Direnç sınır değeri belirli değil.

Tablo IV. *Mikrosatellit Gösterge Analiz Sonuçları*

		Mikrosatellit marker allel uzunluğu (bç) DP= 0.8770 ± 0.0384		
Genotip no.	**Izolat sayısı (Frekans %)**	***RPM2***	***MTI***	***Cg6***
1	2 (5.88)	128	228	326
2	10 (29.4)	128	244	322
3	1 (2.94)	122	253	341
4	1 (2.94)	122	253	343
5	3 (8.82)	134	246	316
6	6 (17.6)	128	243	322
7	1 (2.94)	128	244	318
8	1 (2.94)	140	245	313
9	2 (5.88)	134	243	320
10	3 (8.82)	127	243	322
11	1 (2.94)	128	244	320
12	1 (2.94)	122	252	342
13	2 (5.88)	122	252	341

DP: Ayırt etme gücü; bç: baz çifti.

örneklerden izole edilen 38 *C.glabrata* suşundan FLU'e dirençli altı *C.glabrata* izolatında *CgPDR1* ve *CgERG11* genlerindeki mutasyonları araştırmış; her bir izolatta *CgPDR1p*'de L347F ve H576Y mutasyonlarını *CgPDR1* gen fragmentini kullanılarak PCR ile tanımlamışlardır. Bu durum, *C.glabrata PDR1* mutant suşlarının FLU direncinden so-

Tablo V. *Klotrimazol, Vorikonazol ve Flukonazole Karşı Dirençli ve Doza Bağlı Duyarlı Olduğu Belirlenen İzolatlarda DNA Dizi Analizi ile Belirlenen Mutasyon ve Polimorfizmlerin Dağılımı*

	ERG11 **(nt. 509-1343)**		***PDR1*** **(nt. 2213-2929)**		***NMT1*** **(nt. 673-1314)**		***TRP1*** **(nt. 71-568)**		***URA3*** **(nt. 248-844)**	
	BD	**AAD**	**BD**	**AAD**	**BD**	**AAD**	**BD**	**AAD**	**BD**	**AAD**
CLO-R izolatlar										
7	C1238T	-			A826G	-	A179G	-	G297A	-
					G917A	R306K	A285G	-	G304A	V102I
	-						C381A	-	A322T	M108L
19	G1324A	E442K	G2905C	G969R	T930G	-	G87C	-	T833G	-
	G1326A	E442K	A2912G	-			A94G	-	C842G	-
			A2914G	-			T224G	F75C	A843C	-
							C381A	-		
							A548T	H183L		
35	A1123C	T375P			G707A	R236Q	A230G	-		
VOR-SDD izolatlar										
5	A593G	N198S	-	-	A826G	-			G304A	V102I
	G606T	-			G917A	R306K			A322T	M108L
	G1109A	R370K							G844C	-
	A1123C	T375P								
	A1312C	T438P								
	A1317C	-								
	G1326A	-								
	T1328A	E443N								
	T1331G	M444R								
	C1333G	P445A								
6	T517A	F173I	-	-	G824A	G275D	G168A	M56I	T833G	V278R
	A558G	I186M			A826G	-				
	T662A	-								
	A1312C	T438P								
10	A1312C	T438P	T2825G	I942S	A826G	-	A179G	-	G297A	-
	A1317C	-					A285G	-	G304A	V102I
							C381A	-	A322T	M108L
FLU-SDD izolat										
22	G1324A	E422K	-	-	T930G	-	T224G	F75C	-	-
							C381A	-		
							A548T	H183L		

CLO: Klotrimazol; VOR: Vorikonazol; FLU: Flukonazol; BD: Baz değişikliği; AAD: Aminoasit değişikliği; nt: Nükleotid; R: Dirençli; SDD: Doza bağlı duyarlı.

rumlu olduğunu göstermiştir. Araştırıcılar, beş izolatta ise *CgERG11p* 14C-lanosterol-dimetilazda E502V mutasyon bölgesini de içeren H576Y bölgesini tanımlamışlar; ayrıca, ITR'a dirençli, FLU'e duyarlı dört izolatta *CgCDR2* bölgesinde ekspresyonun arttığını belirlemişlerdir[21]. Grenouillet ve arkadaşları[22], 127 *C.glabrata* izolatını MLVA (Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis) ile araştırmışlar; altı MG kullanarak 37 farklı genotip saptamışlar ve yalnızca dört gösterge kullanarak en yüksek ayırt etme gücüne (DP= 0.902) ulaşmışlardır. Abbes ve arkadaşları[19], birbirleriyle ilişkili 85 ve ilişkisiz 118 olmak üzere toplam 203 *C.glabrata* izolatını eski (*RPM2*, *MTI* ve *ERG3*) ve yeni (*GLM4*, *GLM5* ve *GLM6*) altı MG ile tanımlamışlar; yeni göstergelerin çok seçici olduğunu ve gerek her iki grupta yer alan izolatların ayırt edilmesinde, gerekse mikrovaryasyonların saptanmasında çok yararlı bir tiplendirme sistemi olduğunu kaydetmişlerdir. Foulet ve arkadaşları[20] birbirleriyle ilişkisiz 138 *C.glabrata* suşunu üç adet MG (*RPM2*, *MTI* ve *ERG3*) ile 23 genotipe ayırmış ve ayırt etme gücünü 0.84 olarak bildirmişlerdir. Shen ve arkadaşları[23] da, RT-PCR ile FLU'e dirençli dokuz, FLU S-DD dokuz ve FLU'e duyarlı 10 olmak üzere toplam 28 *C.glabrata* izolatında *ERG11*, *CDR1* ve *CDR2* gen ekspresyonu değişikliklerini araştırmışlar; FLU'e dirençli suşlarda *ERG11* ve *CDR1*'in duyarlı olanlara göre daha fazla eksprese edildiğini, *CDR2* regülasyonunda ise artış olduğunu bildirmişlerdir.

Dodgson ve arkadaşları[16] farklı coğrafi bölgelerden sağlanan 107 klinik *C.glabrata* izolatını MLST ile incelemiş ve beş majör "clade" saptamışlardır. Lin ve arkadaşları[17] ise, 80 suşu MLST ve PFGE ile incelemiş, 15 sekans tipi ve 54 genotip tanımlamıştır. Marol ve Yücesoy[18], yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalara ait klinik örneklerden izole edilen 70 *Candida* suşunun 42'sini *C.albicans*, 16'sını *C.glabrata* ve 12'sini *C.tropicalis* olarak tanımlamışlar; tüm izolatların AMB'ye duyarlı, 42 *C.albicans*'ın FLU'e duyarlı, beş *C.glabrata* ve dört *C.tropicalis* suşunun FLU S-DD, beş *C.glabrata* suşunun ise dirençli olduğunu kaydetmişlerdir. Ayrıca, bu suşların OPE-3, OPE-18, RP4-2 ve AP50-1 primerlerini kullanarak RAPD-PCR ile farklı RAPD paternlerini gösterdiğini ve enfeksiyon etkeni *Candida* suşlarının endojen kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir. Ferrari ve arkadaşları[24], fare modelinde yaptıkları çalışmada *CgPDR1* hiperaktif allellerinin varlığının FLU ile tedavinin başarısızlığında rol oynadığını bildirmişlerdir. Vandeputte ve arkadaşları[25], *C.glabrata*'nın mitokondrial DNA'sında kısmen veya tamamen görülen mutasyonlarında mikroorganizmanın azol direnci ile solunum yetersizliği arasında ilişki olduğunu, solunum kapasitesinin azaldıkça azollere karşı aşırı duyarlılığın PDR gen düzenleyici mekanizmasının anlaşılmasını zorlaştırdığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, mikrosatellit göstergeler ile 34 vajinal *C.glabrata* suşunun 13 genotipe ayrıldığı (Tablo IV) ve anılan yöntemin DP gücünün yüksek (0.87) olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, 14 antifungal ilaçtan yalnızca CLO'e (%8.6) direnç görülmüştür. FLU, ITR ve VOR için S-DD oranları sırasıyla, %2.8, %38.2 ve %8.8 olarak saptanmıştır (Tablo III). Çalışmamızda, fenotipik antifungal direnç ve dizi analizi sonuçları karşılaştırıldığında baz ve aminoasit düzeyinde değişkenlik görülmüştür (Tablo V, VI). Ancak, genotip ile hasta grupları veya direnç ya da S-DD arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p > 0.05$). Bu bulguların antifungal tedaviye direnç gösterebilen *C.glabrata* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin aydınlatılmasına katkı sağlayacağı ve antifungal ilaca klinik ya-

Tablo VI. *İtrakonazole Doza Bağlı Duyarlı Olduğu Belirlenen İzolatlarda DNA Dizi Analizi ile Belirlenen Mutasyon ve Polimorfizmlerin Dağılımı*

ITR-SDD izolatlar	*ERG11* (nt. 509-1343)		*PDR1* (nt. 2213-2929)		*NMT1* (nt. 673-1314)		*TRP1* (nt. 71-568)		*URA3* (nt. 248-844)	
	BD	**AAD**	**BD**	**AAD**	**BD**	**AAD**	**BD**	**AAD**	**BD**	**AAD**
2	A593G	N198S					T224G	F75C	C329A	A110D
	C752T	S251F					C381A	-	C714T	-
3	A1312C	-	G2879A	-	G707A	-	A230G	-	-	-
	A1317C	-								
5	A593G	N198S			A826G	-			G304A	V102I
	G606T	-			G917A	R306K			A322T	M108L
	G1109A	R370K							G844C	-
	A1123C	T375P								
	A1312C	T438P								
	A1317C	-								
	G1326A	-								
	T1328A	E443N								
	T1331G	M444R								
	C1333G	P445A								
10	A1312C	T438P	T2825G	I942S	A826G	-	A179G	-	G297A	-
	A1317C	-					A285G	-	G304A	V102I
							C381A	-	A322T	M108L
11	A558G	I186M			G824A	G275D	A74C	Y25S	T833G	V278R
	A561T	-			A826G	-	G87C	-		
	A576T	-					A94G	-		
	C594G	N198K					T224G	F75C		
	G652T	-					C381A	-		
	T662A	-					A548T	H183L		
	T860C	L287S								
12	A593G	N198S	-	-	A826G	-	C381A	-	-	-
	G606T	-			C1202T	-	G551A	-		
	G1109A	R370K								
	A1312C	T438P								
16	T860C	L287S	-	-	G824A	G275D	G168A	M56I	T833G	V278R
	A1312C	T438P			A826G	-				
	A1317C	-								
	G1324A	E442K								
17	T860C	L287S	-	-	G824A	G275D	G168A	M56I	T833G	V278R
	A1312C	T438P			A826G	-	G327A	-		
	A1317C	-								

Tablo VI. *İtrakonazole Doza Bağlı Duyarlı Olduğu Belirlenen İzolatlarda DNA Dizi Analizi ile Belirlenen Mutasyon ve Polimorfizmlerin Dağılımı (Devamı)*

ITR-SDD izolatlar	*ERG11* (nt. 509-1343)		*PDR1* (nt. 2213-2929)		*NMT1* (nt. 673-1314)		*TRP1* (nt. 71-568)		*URA3* (nt. 248-844)	
	BD	**AAD**	**BD**	**AAD**	**BD**	**AAD**	**BD**	**AAD**	**BD**	**AAD**
23	T514A	Y172N	-	-	G824A	G275D	G168A	M56I	T833G	V278R
	A558G	I186M			A826G	-	G327A	-		
	T662A	-								
	T860C	L287S								
27	A593G	N198S	T2807A	V936D	A826G	-	G87C	-	-	-
					T930G	-	A94G	-		
							T224G	F75C		
							C381A	-		
							A548T	H183L		
29	T860C	L287S	A2275C	R759P	T930G	-	G87C	-	-	
			G2276C	R759P			A94G	-		
							T224G	F75C		
							C381A	-		
							A548T	H183L		
30	A528G	-	-	-	G707A	-	A230G	-	-	
	A561T	-								
	G606T	-								
	G1324A	E442K								
31	T662A	-	-	-	A826G	-	-	-	T833G	V278R
	T860C	L287S								
	G1326A	-								

ITR: İtrakonazol; BD: Baz değişikliği; AAD: Aminoasit değişikliği; nt: Nükleotid; SDD: Doza bağlı duyarlı.

nıtın derecesi ile doğrulanabileceği düşünülmüştür. *C.glabrata*'nın gen polimorfizmleri ile antifungal direnç mekanizmalarını araştırmaya yönelik daha çok izolat ile yapılacak çalışmalar konuya ilişkin bilgilerimizin derinleşmesine yardımcı olacaktır. *Candida* vajinitinin tedavisinde önemli adımlardan birisinin de klinisyen ile mikrobiyolog arasındaki işbirliği olduğu unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

1. Sobel JD. Vulvovaginitis in healthy women. Compr Ther 1999; 25(6-7): 335-46.
2. Ilkit M, Guzel AB. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: a mycological perspective. Crit Rev Microbiol 2011; 37(3): 250-61.
3. Geiger AM, Foxman B, Sobel JD. Chronic vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and no *Candida*. Genitourin Med 1995; 71(5): 304-7.

4. Mårdh PA, Rodrigues AG, Genc M, Novikova N, Martinezde-Oliveira J, Guaschino S. Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis- a review on epidemiology, clinical manifestation, diagnosis, pathogenesis and therapy. Int J STD AIDS 2002; 13(8): 522-39.
5. Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Micheli M, Bille J. Multiple resistance mechanisms to azole antifungals in yeast clinical isolates. Drug Resist Updat 1998; 1(4): 255-65.
6. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. Lancet 2002; 359(9312): 1135-44.
7. Nyirjesy P. Chronic vulvovaginal candidiasis. Am Fam Phys 2001; 63(4): 697-703.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A3, 2008. CLSI, Wayne, PA.
9. Kalkanci A, Güzel AB, Khalil II, Aydin M, Ilkit M, Kuştimur S. Yeast vaginitis during pregnancy: susceptibility testing of 13 antifungal drugs and boric acid and the detection of four virulence factors. Med Mycol 2012; 50(6): 585-93.
10. Pfaller MA, Andes D, Diekema DJ, Espinel-Ingroff A, Sheehan D; CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing. Wildtype MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. Drug Resist Updat 2010; 13(6): 180-95.
11. Turin L, Riva F, Galbiati G, Cainelli T. Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. Eur J Clin Invest 2000; 30(6): 511-8.
12. Berila N, Subik J. Molecular analysis of *Candida glabrata* clinical isolates. Mycopathologia 2010; 170(2): 99-105.
13. Arlequin ver 3.5. Available at: http://www.cmpg.iee.unibe.ch/content/softwares__services/ computer_programs/arlequin/index_eng.html
14. Lockhart SR, Joly S, Pujol C, Sobel JD, Pfaller MA, Soll DR. Development and verification of fingerprinting probes for *Candida glabrata*. Microbiology 1997; 143(12): 3733-46.
15. Redding SW, Kirkpatrick WR, Saville S, et al. Multiple patterns of resistance to fluconazole in *Candida glabrata* isolates from a patient with oropharyngeal candidiasis receiving head and neck radiation. J Clin Microbiol 2003; 41(2): 619-22.
16. Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, Soll DR, Fox AJ. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. J Clin Microbiol 2003; 41(12): 5709-17.
17. Lin CY, Chen YC, Lo HJ, Chen KW, Li SY. Assessment of *Candida glabrata* strains relatedness by pulsed field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. J Clin Microbiol 2007; 45(8): 2452-9.
18. Marol S, Yücesoy M. Molecular epidemiology of *Candida* species isolated from clinical specimens of intensive care unit patients. Mycoses 2008; 51(1): 40-9.
19. Abbes S, Sellami H, Sellami A, et al. *Candida glabrata* strains relatedness by new microsatellite markers. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012; 31(1): 83-91.
20. Foulet F, Nicolas N, Eloy O, et al. Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. J Clin Microbiol 2005; 43(9): 4574-9.
21. Berila N, Borecka S, Dzugasova V, Bojnansky J, Subik J. Mutations in the *CgPDR1* and *CgERG11* genes in azole-resistant *Candida glabrata* clinical isolates from Slovakia. Int J Antimicrob Agents 2009; 33(6): 574-8.
22. Grenouillet F, Millon L, Bart JM, et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for rapid typing of *Candida glabrata*. J Clin Microbiol 2007; 45(11): 3781-4.
23. Shen YZ, Lu HZ, Zhang YX. Molecular mechanisms of fluconazole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata*. Zhonhua Nei Ke Za Zhi 2010; 49(3): 245-9.
24. Ferrari S, Ischer F, Calabrese D, et al. Gain of function mutations in *CgPDR1* of *Candida glabrata* not only mediate antifungal resistance but also enhance virulence. PLoS Pathog 2009; 5(1): 1-17.
25. Vandeputte P, Tronchin G, Rocher F, et al. Hypersusceptibility to azole antifungals in a clinical isolates of *Candida glabrata* with reduced aerobic growth. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(7): 3034-41.

View publication stats