

***Candida albicans* suşlarının Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanımlanması**

Fahriye Küçükcaslan¹, Hasibe Cingilli Vural², Zeki Severoğlu^{1,3}, Kadırbay Çekirov³, Neşet Kaan Karahan¹

1 Marmara Üniversitesi, Eğitim Mh. Fahrettin Kerim Gökay Cd. Göztepe Yerleşkesi Kadıköy, İstanbul, Türkiye

2 Necmettin Erbakan Üniversitesi, Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi Yerleşkesi Meram, Konya, Türkiye
3 Kırgızistan Türkiye Manas Üniversitesi, Cengiz Aytmatov Kampüsü Cal, Bişkek 720038, Kırgızistan

Özet : İnvaziv mantar hastalıklarına sebep olan türlerin tanımlanmasında direkt mikroskopik inceleme ve kültüre alma metotları halen oldukça kullanışlı olmasına rağmen uygulamada zorluklar içerirler. Günümüzde, direkt mikroskopik inceleme ve kültüre alma metotlarının yerine mantar türlerinin tanımlanmasında kesin sonuçlar veren moleküler genetik metotlar kullanılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada bir mantar türü olan *Candida albicans* suşlarının genotiplerinin belirlenmesinde mikrobiyolojik ve moleküler genetik metotlar birlikte kullanılmıştır. Çalışmada, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde, 0 ile 78 yaş arasındaki yatan hastalardan 150 klinik örnek (kan, idrar, balgam ve diş, ağız içi ve vajinal mukozalar) alınmıştır. Kontrol türleri olarak *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258 ve *Candida parapsilosis* ATCC 22019 kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçları, ARG4 primerinin *Candida dubliniensis*'in tanımlanmasında önemli olduğu ispatlanmıştır. *Candida albicans*'ın virulens suşlarını tanımlamak için HIS1-2 primeri amplifikasyonlarda kullanılmıştır. *C. albicans* ATCC 90028 ve diğer *C. albicans* suşları arasında bir fark gözlenmemiştir. Sadece bir tane örneğin *C. dubliniensis* olma ihtimalinden dolayı $p < 0.05$ olarak gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Candida albicans* suşları, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, genotipleme, moleküler genetik.

Identification of *Candida albicans* strains using Molecular Methods

Abstract: Although having application difficulties, direct microscopic examination and culture methods are still useful in the identifications of species causing invasive fungal diseases. Nowadays, instead of direct microscopic examination and culture methods, the molecular genetic methods are being used for identifications of fungal species because of providing accurate results. Therefore, in this study, both microbiological and molecular methods were used together for the identifications of the genotypes of *Candida albicans* strains. 150 clinical samples (blood, urine, sputum, and vaginal, dental and oral mucosae) were obtained from inpatients aged between 0 and 78 years old in Bakırköy Dr. Sadi Konuk Education and Research Hospital. *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019 were used as control species. The results of the study showed that ARG4 primer was proven to be important for the identification of *Candida dubliniensis*. For identifications of virulent *C. albicans* strains, HIS1 primer was employed in the amplifications. Between the genotypes of *C. albicans* ATCC 90028 and other *C. albicans*

strains, no differences were observed. $P < 0.05$ was defined for only one sample because of the possibility of being *C. dubliniensis*.

Keywords: *Candida albicans* strains, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Education and Research Hospital, genotyping, molecular genetics.

GİRİŞ

Fungal enfeksiyonlar dünyada oldukça yaygın görülmektedir. Bulaşıcı özellikteki yüzeysel enfeksiyonlar, dermatofitler ve *Candida* türleri tarafından oluşturulmaktadır [1]. İnsanlarda bağışıklık sisteminin yani diğer bir deyiş ile savunma mekanizmasının iyi gelişmemesinin yanı sıra özellikle de lösemi, lenfoma gibi bazı hastalıklar bulunan yada transplantasyon geçirmiş hastalarda, mantar enfeksiyonlarının yüksek oranda morbidite ve mortaliteye yol açtıkları bilinmektedir [2, 3]. Bu hastalarda, gerek organizma gerekse hücrese seviyede immunitenin bozulması ve geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi sırasında gelişen kolonizasyon, fungal enfeksiyonlar için bilinen risk faktörleridir [4, 5, 6]. Ayrıca bu hastalarda gelişen fungal enfeksiyonlara karşı başarılı bir tedavinin önündeki en büyük engel, tanı konulmasındaki güçlütür. Kan kültürü ve seroloji gibi klasik tanı testleri, fungal enfeksiyonların erken tanısında yeterince duyarlı ve özgün değildir. Son yıllarda, fungal enfeksiyonların tanısına yönelik önemli ilerlemeler gerçekleşmiş ve bugüne kadar tanıda kullanılan kültüre alma, direk mikroskop incelemesi ve antijen tayini gibi mikrobiyolojik yöntemler yerine duyarlılık ve özgünlüğü yüksek polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) dayalı kısa sürede sonuç veren moleküler seviyedeki teknikler kullanıma girmiştir ve bu sayede idrar, vajinal akıntı, kan, kateter ucu sıvısı gibi lokal bölgelerden alınan örneklerde fungal enfeksiyonların teşhisi ve etkili antifungal ajanlarla fungal hastalıkların tedavilerinin yapılması mümkün hale gelmiştir. Kantitatif niteliği de olan bu yöntemlerle hem tanı konulması, hem de tedaviye yanıtın izlenmesi mümkündür. Bu moleküler tanı yöntemleri aynı zamanda *C. albicans*'ın patogenitesinin belirlenmesinde önemlidir [7].

Bu araştırmada, yapılacak olan mikrobiyolojik ve moleküler düzeydeki çalışma için her hasta bireyin farklı bölgelerinden alınan herbir örnekten izole edilecek *C. albicans* suşlarının tanısında kontrol türleri kullanılacaktır. Böylece, izole edilen *C. albicans* suşlarına ait genotipler orijinine (izole edildiği kaynağa) göre kontrol türleri ile karşılaştırılarak genotip düzeyinde farklılıkların olup olmadığı tespit edilecektir. Funguslar, bakteriler gibi zaman içerisinde çok hızlı şekilde antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirebildiğinden dolayı elde edilecek veriler her *C. albicans* suşunun antibiyotik direnç mekanizmasının aydınlatılmasında da kullanılabilir. Duyarlılık ve özgünlükleri yüksek olan PZR'a dayalı tanı testlerinin güvenilir biçimde yapılabilmesi içinde; günlük, kolay uygulanabilen, kısa sürede sonuç veren ve DNA'nın en saf şekilde izole edebilmesini sağlayan en uygun ekstraksiyon teknikleri kullanılmaktadır. Bu amaçla çalışmamızda, öncelikle *C.*

albicans suşlarına ait DNA'ların izole edilmesinde uygulanmakta olan 4 dört farklı DNA izolasyon yöntemi kullanılarak *C. albicans* suşlarından DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir [2]. Daha sonra genotip tayinleri için *C. albicans* genomuna spesifik primerler kullanılarak PZR amplifikasyonları sonucunda elde edilen bant profilleri, amplifikasyonlar sonucu elde edilen örneklerin %2'lik agaroz jelde yürütülmesi ile elde edilmiş ve bant profil analizleri gerçekleştirilerek PZR-RFLP temelli *C. albicans* suşları için genotipik tanımlama yapılarak genotip düzeyindeki farklılıklar ortaya çıkarılmıştır ve aynı zamanda mikrobiyolojik tanımlama ile elde edilen bilgilerle sonuçlar yorumlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

C. albicans suşları ve kontrol türleri

Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yatan hastalardan steril koşullarda alınan ve laboratuvara getirilen 150 klinik örnek, *C. albicans* yönünden değerlendirmiştir. Yapılan mikrobiyolojik identifikasyon deneyleri sonucunda *C. albicans* olarak belirlenen 51 adet suş çalışmada kullanılmıştır. Klinik örneklerin alındığı yatan hastaların yaş aralığı 0 ile 78 arasında olup, 18 erkek ve 33 bayandan oluşmuştur. Çalışmanın etik kurul izinleri onaylanmıştır. Alınan örnekler kan, idrar, balgam ve diş, ağız içi, vajinal ve kateter ucu sıvılarından oluşmaktadır. Araştırmada kullanılan kontrol türleri *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258 ve *C. parapsilosis* ATCC 22019 Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (The American Type Culture Collection)'ndan temin edilmiştir. Çalışmada, hem kontrol türleri hem de *C. albicans* suşları mikrobiyolojik hemde moleküler olarak tanımlanmıştır (Tablo 1 ve 2).

Tablo-1. Kontrol türleri listesi

<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019

Moleküler Çalışma

C. albicans İzolatlarından ve Kontrol Türlerinden Genomik DNA İzolasyonları

Mikrobiyolojik testlerle tanımlanmış olan her bir *C. albicans* izolatından ve kontrol türlerinden EZ1 DNA tissue kit ile BioRobot EZ1 workstation ve EZ1 DNA Bacteria Card kullanılarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

C. albicans İzolatlarından ve Kontrol Türlerinden İzole Edilen DNA Örneklerinin %2'lik Agaroz jelde Yürütülmesi

DNA izolasyon protokolünün uygulanması sonucunda *C. albicans* izolatlarından ve kontrol türlerinden izole edilen DNA örnekleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek DNA profilleri görüntülenmiştir (Şekil 1-3).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

C. albicans HIS1-5', *C. albicans* HIS1-3', *C. dubliniensis* ARG4-5', *C. dubliniensis* ARG4-3' primerleri kullanılarak PZR yöntemi ile izole edilen DNA örneklerinde amplifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyonlar sonucu elde edilen DNA örnekleri %2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra, jel UV illüminatör kullanılarak fotoğrafları bilgisayarlı görüntüleme sisteminden alınmıştır (Şekil 5-7 ve Şekil 9).

Restriksiyon Enzim Analizi (REA)

C. albicans ATCC 90028'e spesifik HIS1 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PZR amplifikasyonları sonucunda ortaya çıkan DNA fragmentlerinin herhangi bir mutasyon taşıyıp taşımadığı restriksiyon enzim analizi ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyonu gerçekleştirilmiş olan *C. albicans*'a ait DNA örneklerinden HIS1 primeri kullanılarak çoğaltılan DNA bölgelerine spesifik restriksiyon kesim noktaları için restriksiyon enzimleri seçilmiş ve bu enzimler kullanılarak herhangi bir mutasyonun yada mutasyonların varlığı test edilmiştir. Bu şekilde HIS1 primeri kullanılarak çoğaltılan DNA bölgesinin parmak izinde tanımlanması gerçekleştirilmiştir (Şekil 4).

Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmleri (PZR-RFLP)

İzolasyonu gerçekleştirilmiş olan *C. albicans* ait DNA örneklerinden HIS1 primeri kullanılarak çoğaltılan DNA bölgeleri EcoRI ve Hind III restriksiyon enzimleri ile kesilerek % 2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve oluşan DNA bant profillerinin karşılaştırılmalı analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 8 ve Şekil 10).

Tek Zincir Konformasyon Polimorfizm Analizi (Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) Analysis)

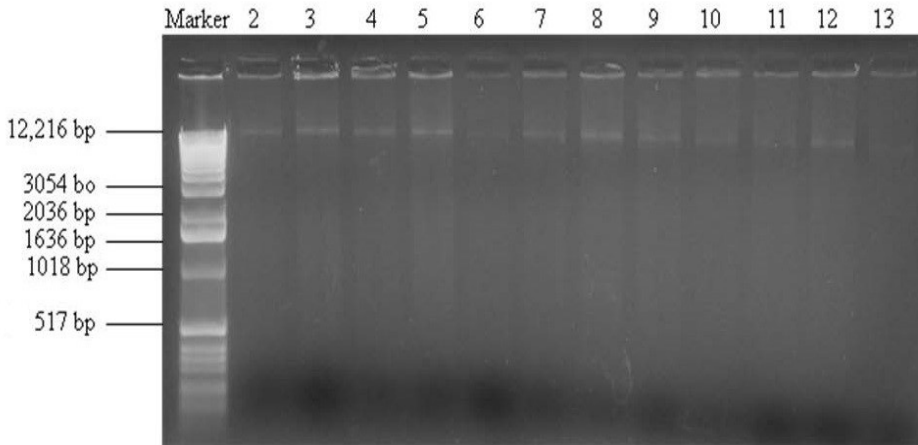
Yüksek çözünürlükteki poliakrilamid jelde denatüre edici olmayan şartlar altında izolasyonu gerçekleştirilmiş olan *C. albicans* ait DNA örneklerinden HIS1 primeri kullanılarak çoğaltılan DNA bölgeleri tek zincir DNA molekülleri haline getirilerek tek veya çoklu nükleotid değişiklikleri elektroforetik mobiliteleri değiştirme etkisinden dolayı *C. albicans* mutant suşları *C. albicans* ATCC 90028 (kontrol) ile karşılaştırılarak tespit edilmeye çalışılmıştır (Şekil 11).

İstatistik

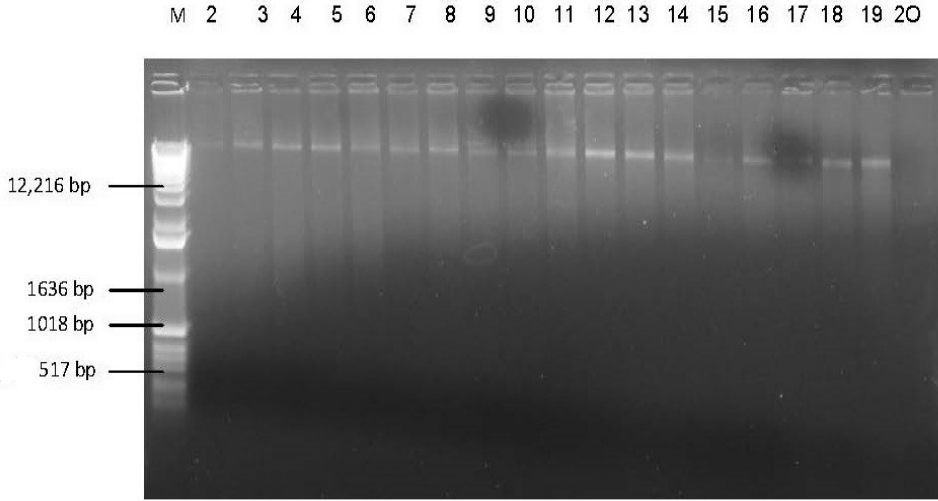
İzolasyonu gerçekleştirilen *C. albicans* suşlarına ait genotipler ile *C. albicans* ATCC 90028 arasında fark gözlenmemesine rağmen elde edilen suşların birinin *C. dubliniensis* olma ihtimalinde dolayı $p < 0.05$ olarak tanımlanmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

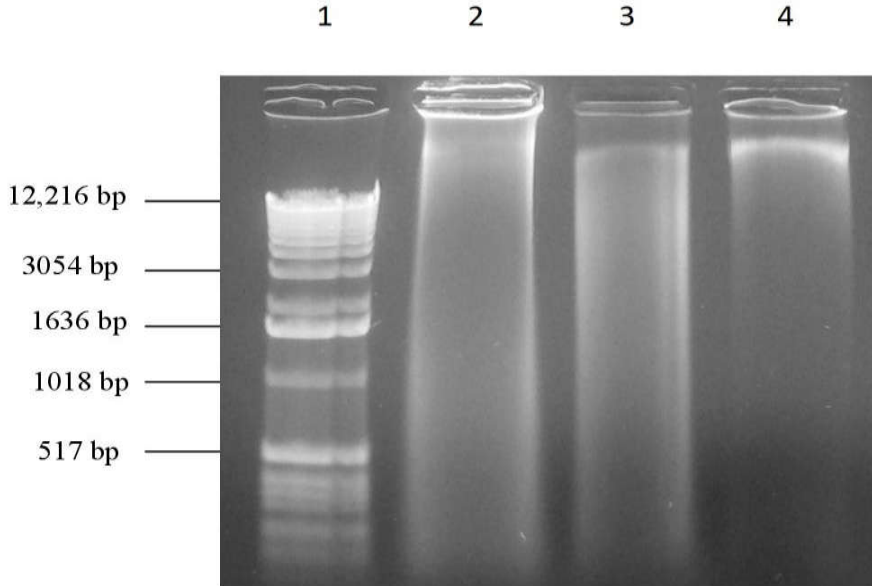
Özellikle *C. albicans*'ın patojenitesinin anlaşılabilmesi için moleküler düzeyde güçlü genetik yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda *Candida* türleri arasında *C. albicans*'ın en sık izole edilen tür olduğu bilinmektedir [8, 9, 10]. Bu çalışmada, moleküler genetik teknikleri ve protokolleri uygulanarak optimizasyon sağlandıktan sonra *Candida* genomuna özgü primerler kullanılarak PZR amplifikasyon sonuçlarına göre oluşan polimorfik bant profillerine bakılarak her bir izolatin filogenetik olarak incelenmesi *Candida* kontrol türleri ile birlikte değerlendirilerek cins ve tür bazında izole edildiği orijine bağlı olarak farklılıklar tespit edilmiştir. PZR amplifikasyonlarında özgün bölgelerin özgün primerlerle çoğaltılması sırasında PZR koşulları, PZR reaksiyon karışımı ve PZR cihazı çalışmalara göre optimize edilmiştir. Mikrobiyolojik olarak tanımlanan tür ve suşların moleküler genetik yöntemlerle yapılan tanımlarla tutarlılıklarının karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, kontrol *Candida* türleri ve çeşitli *C. albicans* suşlarının mikrobiyolojik tanımlanması yapıldıktan sonra DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Her bir *Candida* türü ve *C. albicans* suşu için izole edilen DNA'nın spesifik primerler kullanılarak çoğaltılan spesifik bölgelerinin çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesilmesi *Candida* genomunun tanımlanması için önemlidir.



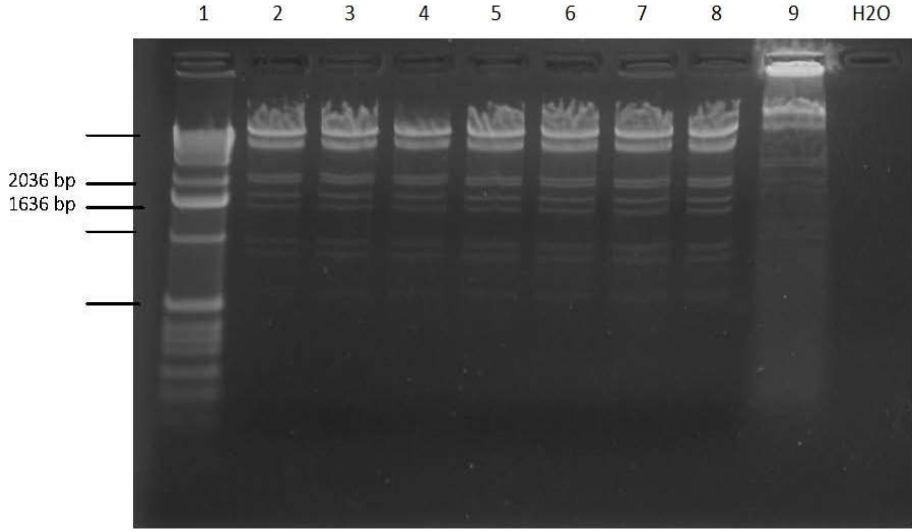
Şekil-1. İzole edilen DNA örneklerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri. 1) 1 kb DNA ladder (marker), 2-6) idrardan elde edilen izolatlar ait DNA örnekleri, 7) dış plağın elde edilen izolata ait DNA örneği ve 8-13) idrardan elde edilen izolatlar ait DNA örnekleri.



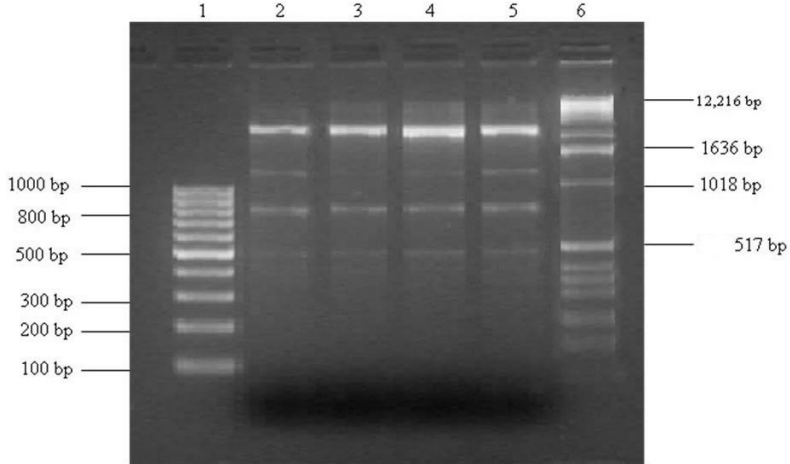
Şekil-2. İzole edilen DNA örneklerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri. 1) 1 kb DNA ladder (marker), 2-3) balgamdan elde edilen izolatlara ait DNA örnekleri, 4-8) vajinal sürüntüden elde edilen izolatlara ait DNA örnekleri, 9) ağız içinden elde edilen izolata ait DNA örneği, 10) dış plağından elde edilen izolata ait DNA örneği, 11) kateter ucu sıvıdan elde edilen izolata ait DNA örneği, 12) asit sıvısından elde edilen izolata ait DNA örneği, 13) kateter ucu sıvıdan elde edilen izolata ait DNA örneği, 14) idrardan elde edilen izolata ait DNA örneği, 15-17) kandan elde edilen izolatlara ait DNA örnekleri ve 18-19) idrardan elde edilen izolatlara ait DNA örnekleri.



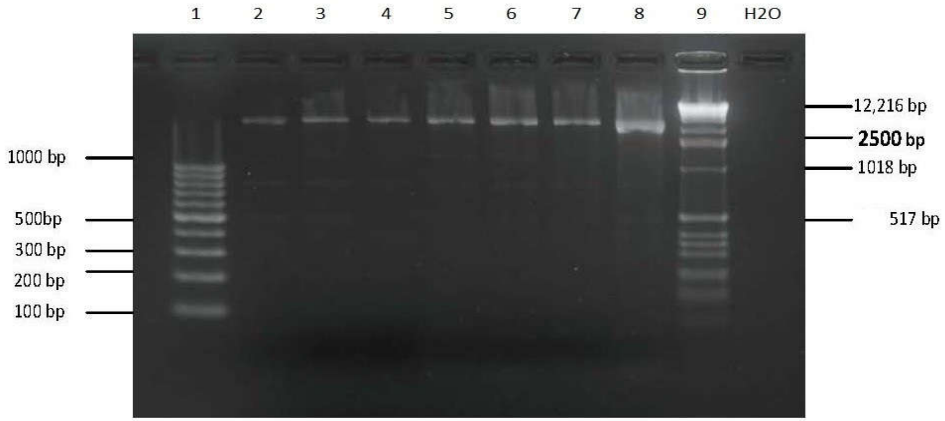
Şekil-3. Kontrol türlerinin %2'lik agaroz jeldeki DNA görüntüleri. 1) 1 kb DNA ladder (marker), 2) *C. albicans* ATCC 90028'den elde edilen DNA örneği, 3) *C. krusei* ATCC 6258'den elde edilen DNA örneği ve 4) *C. parapsilosis* ATCC 22019'den elde edilen DNA örneği.



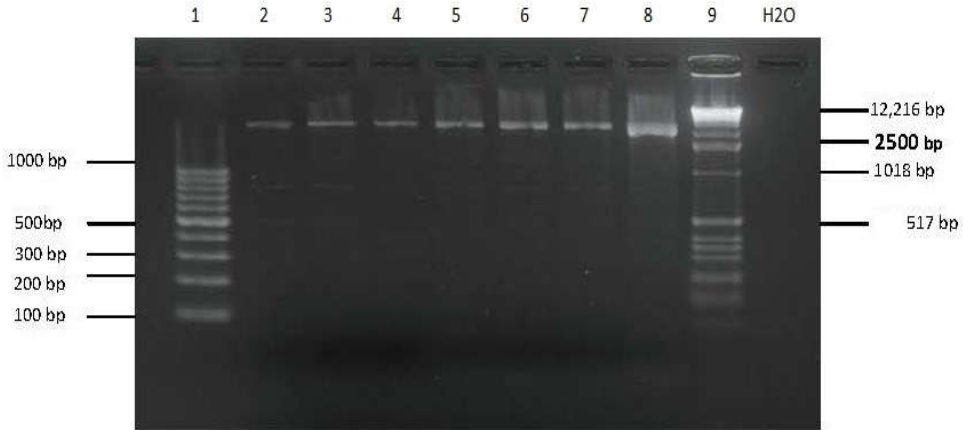
Şekil-4. HIS1 primerlerinin REA kesim görüntüleri. 1) 1 kb DNA ladder (marker), 2) vajinal sürüntüden elde edilen izolata ait DNA örneği, 3-4) idrardan elde edilen izolatlara ait DNA örnekleri, 5) kateter ucu sıvısından elde edilen izolata ait DNA örneği, 6) kandan elde edilen izolata ait DNA örneği, 7) ağız içinden elde edilen izolata ait DNA örneği, 8) dış kirinden elde edilen izolata ait DNA örneği ve 9) *C. albicans* ATCC 90028'dan elde edilen DNA örneği.



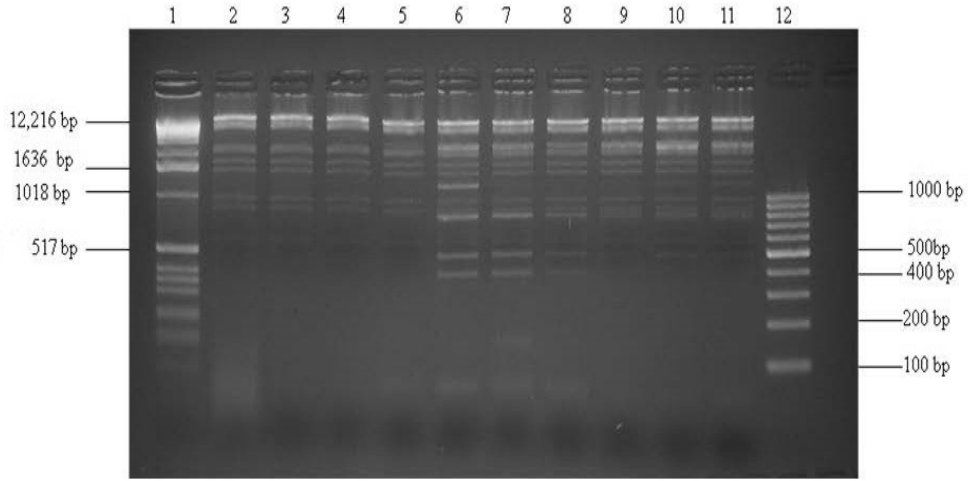
Şekil-5. HIS1 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen *C. albicans* suşlarına ait PZR amplifikasyonları. 1) 100 bp DNA ladder (marker), 2-5) vajinal sürüntüden elde edilen izolatlara ait DNA örnekleri ve 6) 1 kb DNA ladder (marker).



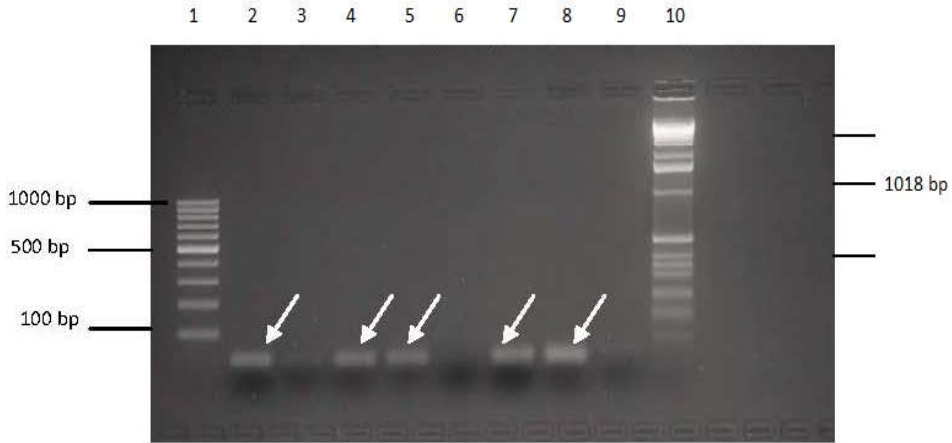
Şekil-6. HIS1 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen *C. albicans* suşlarına ait PZR amplifikasyonları. 1) 100 bp DNA ladder (marker), 2-3) idrardan elde edilen izolatlara ait DNA örnekleri, 4-5) balgamdan elde edilen izolatlara ait DNA örnekleri, 6) vajinal sürüntüden elde edilen izolata ait DNA örneği, 7) ağız içinden elde edilen izolata ait DNA örneği, 8) dış kirinden elde edilen izolata ait DNA örneği ve 9) 1 kb DNA ladder (marker).



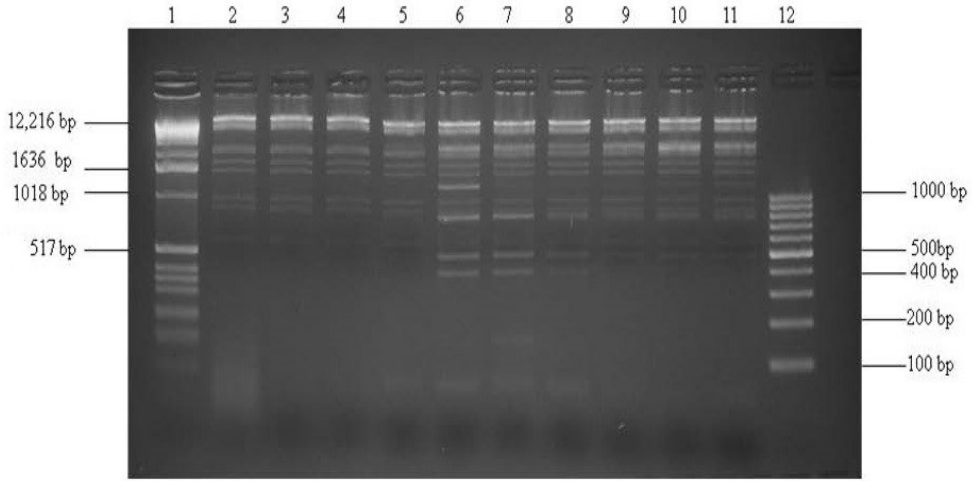
Şekil-7. ARG4 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR amplifikasyonları. 1) 100 bp DNA ladder (marker), 10) 1 kb DNA ladder (marker). Diğer kuyucuklarda ışına veren bant benzeri görüntüler PZR reaksiyonları içinde kullanılan primerlerin rastgele olarak eşleşmeleri ve PZR miksları içinde kullanılan diğer bileşenlerdir.



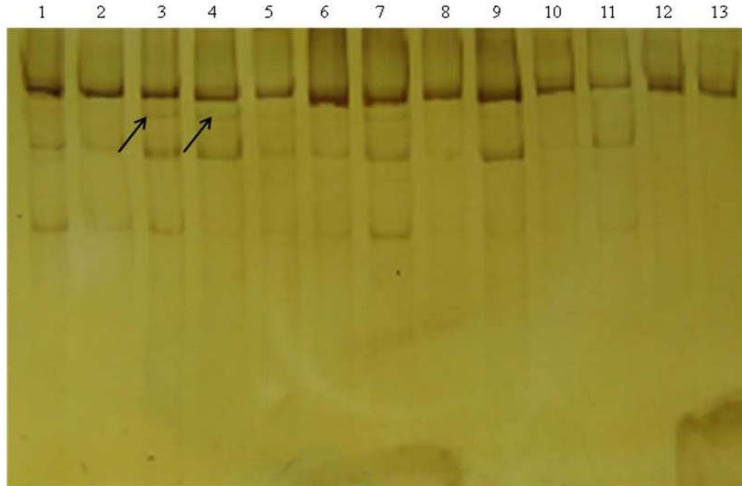
Şekil-8. HIS1 primerleri kullanılarak elde edilen PZR amplifikasyon ürünlerinin EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile muamelesi sonucunda oluşan *C. albicans* suşları ve kontrol türlerine ait DNA örneklerinin %2'lik agaroz jeldeki PZR-RFLP görüntüleri. 1) 1 kb DNA ladder (marker), 2) *C. albicans* ATCC 90028'dan elde edilen DNA örneği, 3) *C. krusei* ATCC 6258'dan elde edilen DNA örneği, 4) *C. parapsilosis* ATCC 22019'dan elde edilen DNA örneği, 5) kandan elde edilen izolata ait DNA örneği, 6-7) idrardan elde edilen izolatlara ait DNA örnekleri, 8) kateter ucu sıvısından elde edilen izolata ait DNA örneği, 9-11) vajinal sürüntüden elde edilen izolatlara ait DNA örnekleri ve 12) 100 bp DNA ladder (marker).



Şekil-9. ARG4 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR amplifikasyonları. 1) 100 bp DNA ladder (marker), 10) 1 kb DNA ladder (marker). Diğer kuyucuklarda ışına veren bant benzeri görüntüler PZR reaksiyonları içinde kullanılan primerlerin rastgele olarak eşleşmeleri ve PZR miksleri içinde kullanılan diğer bileşenlerdir.



Şekil-10. HIS1 primerleri kullanılarak elde edilen PZR amplifikasyon ürünlerinin EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile muamelesi sonucunda oluşan *C. albicans* suşları ve kontrol türlerine ait DNA örneklerinin %2'lik agaroz jeldeki PZR-RFLP görüntüleri. 1) 1 kb DNA ladder (marker), 2) *C. albicans* ATCC 90028'dan elde edilen DNA örneği, 3) *C. krusei* ATCC 6258'dan elde edilen DNA örneği, 4) *C. parapsilosis* ATCC 22019'dan elde edilen DNA örneği, 5) kandan elde edilen izolata ait DNA örneği, 6-7) idrardan elde edilen izolatlara ait DNA örnekleri, 8) kateter ucu sıvısından elde edilen izolata ait DNA örneği, 9-11) vajinal sürüntüden elde edilen izolatlara ait DNA örnekleri ve 12) 100 bp DNA ladder (marker).



Şekil-11. HIS1 primerleri kullanılarak elde edilen PZR amplifikasyon ürünlerinin SSCP sonuçları. 1-13) *C. albicans* suşlarına ait DNA örneklerinin SSCP analizi. (→) heterodupleks bandı göstermektedir.

Çalışma grubu, yaş aralığı 0 ile 78 yaş arasında değişen 18 erkek ve 33 bayandan oluşmaktadır (Tablo 2). Herbir hasta grubu için yaş dağılımı açısından anlamlı bir fark yoktur ($p>0.05$). Kan, idrar, kateter ucu sıvı, balgam, ağız içi, diş plağı, vajinal akıntı gibi ortamlardan alınan *C. albicans* koleksiyonuna ait herbir suştan genomik DNA izolasyonu en uygun koşullarda gerçekleştirilmiştir (Tablo 3). İzolasyon için optimize edilen herbir protokol ile DNA izolasyonları manuel ile yapılanlarda %90, EZ1 izolasyon cihazı yardımı ile yapılanlarda %100'e yakın oranda sağlanmıştır. İzolasyon sonrası moleküler tanımlama için *C. albicans* suşları, kontrol türleri olan *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019 ve *C. krusei* ATCC 6258 ile birlikte gerçekleştirilerek PZR sonuçları elde edilmiştir (Şekil 5 ve 6). İzole edilen *C. albicans* suşlarına ve kontrol türlerine ait genomik DNA örnekleri *Candida* genomuna spesifik primerler kullanılarak çoğaltılan DNA bölgelerinde bulunan olası mutasyonları tanımlamak için spesifik restriksiyon enzimleri ile kesilerek örneklerin DNA profilleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir (Şekil 4 ve 8). Yapılan çalışmada mikrobiyolojik olarak petri kabında ekim yapıldıktan sonra oluşan koloni sayısındaki artış, PZR yöntemiyle gerçekleştirilen tanımlamaları istatistiksel olarak anlamlı gerçekleşmesini sağlamıştır ($p<0.05$). 4 kan örneğinden 3'ünde, 2 idrar ve 1 vajinal akıntı örneklerinden hepsinde petri kutularına ekim yapıldıktan sonra üreme gözlenmiş ve aynı zamanda PZR yöntemi ile yapılan tanımlamalardan pozitif sonuç alınmıştır. HIS1 primerleri kullanılarak PZR'de polimorfik bantlar elde edilmiştir (Şekil 5-6). İzolasyonu gerçekleştirilmiş olan *C. albicans* suşları ve kontrol türlerine ait DNA örneklerinden HIS1 primeri kullanılarak çoğaltılan DNA bölgeleri EcoRI ve Hind III restriksiyon enzimleri ile kesilerek % 2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve oluşan DNA bant profillerinin karşılaştırmalı analizi gerçekleştirilerek genomik farklılıklar tespit edilmiştir. Aynı türün farklı orijin kaynaklı izolatlarının bile restriksiyon enzimleri ile kesildiğinde farklı uzunlukta DNA bant profilleri oluşturduğu gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda, restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı DNA bant profillerinin çıkarılmasını sağlayan ve karşılaştırmalı analize olanak veren tanımlama sıklıkla kullanılmıştır ve moleküler tanımlamanın en etkili yöntemlerden biri olduğu böylece gösterilmiştir.

Yaptığımız çalışmada, izolasyonu gerçekleştirilmiş olan *C. albicans* suşlarına ait DNA örneklerinden ARG4 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR amplifikasyonlarında PZR bant profillerinin elde edilememesi *C. dubliniensis* türünün izolatların içinde olmadığını göstermektedir. *C. albicans* suşlarına ait genotiplerin tanımlanmasında mikrobiyolojik yöntemlerin yanı sıra moleküler genetik yöntemlerinde kullanılması sonucu herbir örnek için suş ve tür temelinde DNA izolasyonu, PZR amplifikasyonu, PZR-RFLP, Restriksiyon enzim ve SSCP analizleri gerçekleştirilmiştir.

Fahriye KÜÇÜKASLAN, Hasibe Cıngıllı VURAL, Zeki SEVEROĞLU, Kadirbay ÇEKİROV, Neşet Kaan KARAHAHAN

Tablo-2. Hastalardan çalışmak için alınan örneklerin özellikleri. K: kadın ve E: erkek.

Hasta Sayısı	Yaş/Cinsiyet	İzolasyon Kaynağı	İzolasyon Mikroskopik Olarak Tanımlanması
1	7/K	İdrar	<i>C.albicans</i>
2	76/K	İdrar	<i>C.albicans</i>
3	71/K	İdrar	<i>C.albicans</i>
4	72/E	İdrar	<i>C.albicans</i>
5	30/E	İdrar	<i>C.albicans</i>
6	45/E	İdrar	<i>C.albicans</i>
7	45/E	Diş	<i>C.albicans</i>
8	23/K	Diş	<i>C.albicans</i>
9	25/E	Diş	<i>C.albicans</i>
10	37/K	Diş	<i>C.albicans</i>
11	3/E	İdrar	<i>C.albicans</i>
12	45/E	İdrar	<i>C.albicans</i>
13	14/K	İdrar	<i>C.albicans</i>
14	78/K	İdrar	<i>C.albicans</i>
15	40/E	İdrar	<i>C.albicans</i>
16	2/K	İdrar	<i>C.albicans</i>
17	26/K	İdrar	<i>C.albicans</i>
18	57/E	Balgam	<i>C.albicans</i>
19	23/K	Balgam	<i>C.albicans</i>
20	47/K	Vajinal	<i>C.albicans</i>
21	30/K	Vajinal	<i>C.albicans</i>
22	26/K	Vajinal	<i>C.albicans</i>
23	34/K	Vajinal	<i>C.albicans</i>
24	31/K	Vajinal	<i>C.albicans</i>
25	35/K	Vajinal	<i>C.albicans</i>
26	22 günlük/E	Ağız içi	<i>C.albicans</i>
27	2 aylık/E	Ağız içi	<i>C.albicans</i>
28	20 günlük/E	Ağız içi	<i>C.albicans</i>
29	27/K	Diş	<i>C.albicans</i>
30	6/E	Kateter ucu	<i>C.albicans</i>
31	59/K	Asit sıvısı	<i>C.albicans</i>
32	2/K	Kateter ucu	<i>C.albicans</i>
33	2/K	İdrar	<i>C.albicans</i>
34	60/E	Kan	<i>C.albicans</i>
35	34/E	Kan	<i>C.albicans</i>
36	50/K	Kan	<i>C.albicans</i>
37	78/K	İdrar	<i>C.albicans</i>
38	40/K	İdrar	<i>C.albicans</i>
39	28/K	Vajinal	<i>C.albicans</i>
40	2/K	Kan	<i>C.albicans</i>
41	35/E	İdrar	<i>C.albicans</i>
42	25/E	Kan	<i>C.albicans</i>
43	48/K	İdrar	<i>C.albicans</i>
44	33/K	İdrar	<i>C.albicans</i>
45	45/K	Vajinal	<i>C.albicans</i>
46	18 günlük/K	Ağız İçi	<i>C.albicans</i>
47	31/K	Vajinal	<i>C.albicans</i>
48	43/K	Vajinal	<i>C.albicans</i>
49	35/K	Vajinal	<i>C.albicans</i>
50	32/K	Vajinal	<i>C.albicans</i>
51	29/K	İdrar	<i>C.albicans</i>

Tablo-3. Hastalardan çalışmak için alınan örneklerin sayısı ve kaynağı

İdrar	20
Vajinal kültür	12
Diş	5
Kan	5
Ağız içi	4
Balgam	2
Kateter ucu	2
Asit sıvısı	1

Orijine bağlı olarak *C. albicans* suşlarının genotiplerinde ortaya çıkan olası mutasyonların tespit edilmesi için bu çalışmada türe özgü spesifik primerlerin (ARG4-5' ve ARG4-3', H1S1-5' ve H1S1-3') kullanılmasıyla hem tür ve suş bazında hem de filogenetik açısından her bir örneğe ait genomun tanımlanması sağlanmıştır. Ayrıca mikrobiyolojik çalışmaların tür ve suşların identifikasyonunda yanıltıcı sonuçlar verebileceği ve bu yüzden çalışmaların moleküler genetik düzeyde genomik bazda yapılması gerekliliği gözlenmiştir. Yaptığımız moleküler genetik düzeydeki çalışmalar klinik tanının teyit edilmesinde önemli rol oynamıştır. PZR-RFLP rutin çalışmalarda kullanılabilir nitelikte ve güvenilirlikte bir tekniktir. Fakat bu teknik genomda meydana gelen bir ya da iki nükleotitik mutasyonların belirlenmesinde kullanılamamasından dolayı bu tip mutasyonların tespit edilmesi PZR-SSCP tekniği ile gerçekleştirilmektedir. Çalışmamızda yer alan 4 şüpheli izolatin genomunda mutasyon taşıyıp taşımadığı bu yukarıda bahsedilen teknikle gerçekleştirilerek mutasyonların varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada yukarıda bahsedildiği üzere öncelikli olarak çalışmada kullanılacak olan yöntemlerin optimizasyonu sağlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları içerisinde SSCP tekniğinin optimizasyonu RFLP tekniğine göre oldukça zor olmuştur. Laboratuvarda standart olarak kullanılacak bir yöntem için çalışma hassasiyeti, kolaylığı ve maliyeti göz önüne alınarak hangi yöntemin kullanılacağına karar verilmiştir. SSCP tekniği, RFLP tekniğine göre, manipülasyon zorluğu, çalışma süresinin daha uzun olması, tekrarlanabilirliğinin az olması ve çalışma koşullarının her zaman sabit tutulmaması gibi dezavantajlarından dolayı RFLP tekniğine göre daha tercih edilebilir olmasına neden olmuş ve böylece daha hızlı ve güvenilir sonuçlar alınması sağlanmıştır. Yüksek çözünürlükteki poliakrilamid jelde denatüre edici olmayan şartlar altında spesifik tür veya suşlara ait DNA örnekleri için spesifik primerler kullanılarak PZR yoluyla çoğaltılan DNA bölgeleri tek zincir DNA molekülleri haline getirilerek tek veya çoklu nükleotid değişiklikleri elektroforetik mobiliteyi değiştirme etkisinden dolayı mutant suşlar kontrol ile karşılaştırılarak (normalden farklı bant(lar)ın ortaya çıkması sayesinde) tespit edilebilmektedir. Mutasyonun kesin tanısı konmasa bile bu yöntem ile bileşik heterozigot *Candida* türleri saptanabilmektedir. Çalışmamızda, kontrol türleri ve mutasyon taşıyan *C. albicans*

suşlarına ait genotipler arasındaki bant profil farklılığına bakarak izolatların tanımlanması kolaylıkla yapılabilmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada sonuç olarak ARG4 primerinin *C. dubliniensis*'in tanımlanmasında önemli olduğu ispatlanmıştır. *C. albicans*'ın virulens suşlarını tanımlamak için HIS1-2 primeri amplifikasyonlarda kullanılmıştır. *C. albicans* ATCC 90028 ve diğer *C. albicans* suşları arasında bir fark gözlenmemiştir. Sadece bir tane örneğin *C. dubliniensis* olma ihtimalinden dolayı $p < 0.05$ olarak gösterilmiştir. Yapılan çalışma mikrobiyolojik ve moleküler disiplinlerin kullanılması sayesinde belirli bir gen havuzuna sahip tür genomlarının tanımlanması, direnç kimliğinin tanımlanması, gen tedavisi için etkili ilaç tasarımı ve bunların uygulanması açısından düşünüldüğünde, farmakogenomik ve biyoinformatik alanlarında araştırmacılara, kısa sürede kesin sonuç vermesinden dolayı özellikle de yatan hastaların yaşam kalitesinin yükseltilmesi bakımından yeni bir vizyon sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Richardson M, Elewski B.** Superficial Fungal Infections. *Medicine* 2000; 33: 89 – 90.
2. **Işık N.** Mantarlara Ait DNA Eldesinde İki Farklı Ekstraksiyon Yönteminin Karşılaştırılması ve Sekans Analizlerinin Değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2003; 33: 66-70.
3. **Storma L, Lauscha K, Arendrup M, Mortensen K, Petersen E.** Vertebral infection with *Candida albicans* failing caspofungin and fluconazole combination therapy but successfully treated with high dose liposomal amphotericin B and flucytosine. *Med Mycol Case Rep.* 2014; 6: 6–9.
4. **Buke Ç.** Yoğun Bakım Birimlerinde Mantar İnfeksiyonları Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri. *Klinik Derg* 2007; 29-30.
5. **Gloria Molero G, Diez-Orejas R, Navarro-García F, Monteoliva L, Pla J, Gil C et al.** *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. *International Microbiol.* 1998; 1: 95–106.
6. **Mayer F, Wilson D, Hube B.** *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013; 119-128.
7. **Eldesouky İ, Mohammed N, Khalaf D, Salama A, ElSifty A, Ombarak R et al.** *Candida* Mastitis in Dairy Cattle with Molecular Detection of *Candida albicans*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2016; 22 (3): 461-464.

8. **Atalay MA, Koç AN, Sav H, Demir G.** Yatan hastaların idrar kültürlerinden izole edilen *Candida* türleri ve antifungal duyarlılıkları. Turk Hij Den Biyol Derg 2013; 70(4): 185-90.
9. **Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, Gallis HA, McKinsey DS, Karchmer AW et. al.** Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients, The National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. Clin Infect Dis 2000; 30(1): 14-8.
10. **Güler S, Ural O, Fındık D, Aslan U.** Risk factors for nosocomial *candiduria*. Saudi Med J 2006; 27(11): 1706-10.