



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLMİŞ
***Meyerozyma guilliermondii* SUŞLARININ**
GENOTİPİK VE VİRÜLANS
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nejla CEBECİ GÜLER

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. İlknur TOSUN

TRABZON-2014

ONAY

Bu tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Faruk AYDIN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Nejla CEBECİ GÜLER'in hazırladığı “Kan Kültürlerinden İzole Edilmiş *Meyerozyma guilliermondii* Suşlarının Genotipik Ve Virülans Özelliklerinin Araştırılması” başlıklı tez Karadeniz Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. İlknur TOSUN

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İlknur TOSUN

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Prof. Dr. Asım ÖREM

Prof. Dr. Aynur EREN TOPKAYA

Prof. Dr. Faruk AYDIN

Tarih: .../.../2014

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../.... tarih ve ...sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

10/07/2014

Nejla CEBECİ GÜLER

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Prof. Dr. İlknur TOSUN'a, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Faruk AYDIN'a, anabilim dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ'a, Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA'ya, Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. C. Kurtuluş BURUK'a doktora öğrenimim ve tez çalışmam süresince sağladıkları tüm katkılar için teşekkür ederim.

DNA sekans çalışmalarım sırasında teknik imkanlarını ve tecrübelerini benimle paylaşan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ersan KALAY'a, öğretim görevlisi Bayram TORAMAN'a ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerine teşekkür ederim. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlilerine de desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hediye ettiği referans suşlarla ve tecrübeleri ile çalışmama katkı sağlayan Dr. Huu-Vang NGUYEN'e (Laboratoire de Microbiologie et Genetique Moleculaire, Thiverval-Grignon, Fransa) teşekkür ederim.

Anabilim dalımızda yüksek lisans, doktora ve uzmanlık öğrenimi gören arkadaşlarıma ve Hasta Hizmetleri Laboratuvarı çalışanlarına değerli paylaşımları için teşekkür ederim.

Sevgili eşime tükenmeyen anlayışı ve sabrı için, annem ve babama varlıkları için, kız kardeşlerime bana daima güç verdikleri için teşekkür ederim.

Nejla CEBECİ GÜLER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xv
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	6
4.1.1. Nomenklatür	6
4.1.2. Taksonomi ve Filogenetik	7
4.1.3. Fenotipik İdentifikasyon	12
4.1.3.1. Kültür ve Mikroskobi Özellikleri	12
4.1.3.2. Biyokimyasal Özellikler	13
4.1.4. Moleküler İdentifikasyon	15
4.1.4.1. Ribozomal RNA Geninin Sekanslanması	15
4.1.5. Moleküler Genotiplendirme	19
4.1.5.1. Pulse Field Jel Elektroforezi	19
4.1.6. Epidemiyoloji ve Klinik Önem	21
4.1.7. Antifungal Duyarlılık ve Tedavi	27
4.1.7.1. Azoller	27
4.1.7.2. Polyenler	28
4.1.7.3. Ekinokandinler	28
4.1.7.4. Flusitozin	29
4.1.8. Virülans ve Patojenite Özellikleri	29
4.1.8.1. Salgı Aspartik Proteaz Enziminin Genel Özellikleri	30
4.1.8.2. Salgı Aspartik Proteaz Enziminin Virülans ve Patojenite Özellikleri	31

4.1.9. Biyoteknolojik Uygulamalar	32
4.1.9.1. Riboflavin	32
4.1.9.2. Ksilitol	32
4.1.9.3. Endüstriyel Enzimler	32
4.1.9.4. Bitki Patojenlerinin Biyolojik Kontrolü	33
4.1.9.5. Biyoremediasyon	34
5. GEREÇ ve YÖNTEM	35
5.1. Gereç	35
5.1.1. Çalışma Grubu İzolatları	35
5.1.2. Araç ve Gereçler	39
5.1.3. Kimyasallar	40
5.1.4. Kitler	41
5.1.5. Solüsyonlar	41
5.1.5.1. Pulse Field Jel Elektroforezi Solüsyonları	41
5.1.5.2. Salgı Aspartik Proteaz Aktivitesi Solüsyonları	43
5.2. Yöntem	44
5.2.1. <i>Meyerozyma guilliermondii</i> İzolatlarının İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Saklanması	44
5.2.2. rDNA Tüm ITS Gen Bölgesinin Sekanslanması	44
5.2.3. rDNA Tüm IGS Gen Bölgesi PCR Ürünlerinin <i>AluI</i> Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi	47
5.2.4. Pulse Field Jel Elektroforezi Karyotipleme ve Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi Optimizasyonu	49
5.2.4.1. Maya Kültürü Hazırlanması	49
5.2.4.2. Low Melting Point Agaroz Hazırlanması	50
5.2.4.3. Litikaz Solüsyonu Hazırlanması	50
5.2.4.4. Maya Hücre Pelleti Hazırlanması	50
5.2.4.5. Plug Hazırlanması	51
5.2.4.6. EDTA-Tris- β -Merkaptoetanol Solüsyonu Hazırlanması	51
5.2.4.7. Proteinaz Solüsyonu Hazırlanması	51
5.2.4.8. Genomik DNA'nın Retriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilmesi	52
5.2.4.9. Megabaz Agaroz Jel Hazırlanması	53

5.2.4.10. Elektroforez	54
5.2.4.11. Boyama ve Görüntüleme	55
5.2.5. Antifungal (Flukonazol, Vorikonazol, İtrakonazol, Flusitozin) Duyarlılık Testleri	55
5.2.6. Ekstraselüler Salgı Aspartik Proteaz Aktivitesinin Semikantitatif Belirlenmesi	55
5.2.6.1. Albümin Agar Hazırlanması	55
5.2.6.2. Albümin Agar'a İnokülasyon, İnkübasyon, Boyama ve Değerlendirme	56
6. BULGULAR	57
6.1. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Maya Türleri	57
6.2. <i>Meyerozyma guilliermondii</i> İzolatlarına Ait Genel Bulgular	59
6.3. Biyokimyasal İdentifikasyon Sonuçları	64
6.4. rDNA ITS Gen Bölgesi DNA Sekansı Sonuçları	66
6.5. rDNA Tüm IGS Gen Bölgesi PCR Ürünlerinin <i>AluI</i> Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi	70
6.6. Pulse Field Jel Elektroforezi	71
6.6.1. Pulsed Field Jel Elektroforezi-Karyotipleme Sonuçları	71
6.6.2. Pulsed Field Jel Elektroforezi-Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi Sonuçları	75
6.7. Antifungal Duyarlılık Sonuçları	78
6.8. Salgı Aspartik Proteaz Aktivitesi Sonuçları	80
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	83
8. SONUÇLAR	110
9. KAYNAKLAR	113
10. ETİK KURUL ONAYI	139
11. ÖZGEÇMİŞ	140

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	<i>Candida</i> türlerinin genom özellikleri	12
Tablo 2.	<i>Candida guilliermondii</i> 'ye ait biyokimyasal reaksiyonlar ve çoğalma özellikleri	14
Tablo 3.	API 20C AUX V4.0 sisteminde <i>Candida guilliermondii</i> ve <i>Candida famata</i> türlerinin karbohidrat asimilasyonu yüzde pozitif reaksiyonunu gösteren identifikasyon tablosu	15
Tablo 4.	<i>Candida guilliermondii</i> ilişkili klinik sendromlar	25
Tablo 5.	<i>Candida guilliermondii</i> enfeksiyonlarının risk faktörleri ve eşlik eden tıbbi durumlar	26
Tablo 6.	<i>Candida guilliermondii</i> 'nin antifungal duyarlılık oranları	28
Tablo 7.	Çeşitli CTG klad türleri için klinik önem, biyoteknolojik uygulama, biyolojik kontrol potansiyeli, genom sekansı ve moleküler araç bilgileri	34
Tablo 8.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının izolasyon tarihi, örnek tipi ve servis bilgileri	35
Tablo 9.	Referans suşlar ve suş koleksiyonlarındaki kodları	39
Tablo 10.	rDNA tüm ITS gen bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan primerler	45
Tablo 11.	rDNA tüm ITS gen bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları	45
Tablo 12.	rDNA tüm ITS gen bölgesinin amplifikasyonu için termal döngü cihazının koşulları	45
Tablo 13.	DNA sekans reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları	46
Tablo 14.	DNA sekans reaksiyonu için termal döngü cihazının koşulları	46
Tablo 15.	rDNA tüm IGS gen bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan primerler	48

Tablo 16.	rDNA tüm IGS gen bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları	48
Tablo 17.	rDNA tüm IGS gen bölgesinin amplifikasyonu için termal döngü cihazının koşulları	48
Tablo 18.	rDNA tüm IGS gen bölgesi PCR ürünün <i>AluI</i> ile kesim reaksiyonu bileşenleri ve miktarları	49
Tablo 19.	Pulse field jel elektroforezi-genomik DNA'nın restriksiyon enzim kesimi için kullanılan bileşenler ve miktarları	52
Tablo 20.	Pulse field jel elektroforezi-genomik DNA'nın restriksiyon enzim kesimi için kullanılan enzimlere ait bilgiler	53
Tablo 21.	Kan kültürlerinden izole edilen <i>Meyerozyma guilliermondii</i> ve tüm maya izolatu sayılarının yıllara göre dağılımı	59
Tablo 22.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> klinik izolatlarının örnek tipine göre dağılımı	62
Tablo 23.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> izole edilen hastaların kliniklere göre dağılımı	63
Tablo 24.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> sürveyans izolatlarının örnek tipine göre dağılımı	63
Tablo 25.	TPN solüsyonu ve kan kültürlerinden <i>Meyerozyma guilliermondii</i> izole edilen hastaların kliniklere göre dağılımı	64
Tablo 26.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının tüm ITS DNA sekansı blast sonucu	69
Tablo 27.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının ITS1 DNA sekansı blast sonucu	69
Tablo 28.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının ITS2 DNA sekansı blast sonucu	69
Tablo 29.	PFGE-EK uygulanan <i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının izolasyon tarihi, örnek tipi ve servis bilgileri	73
Tablo 30.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının PFGE karyotipleri	74
Tablo 31.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının flukonazol, vorikonazol, itrakonazol ve flusitozin MİK değerleri	79

Tablo 32.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının antifungal duyarlılık sonuçları, MİK aralıkları, MİK50 ve MİK90 değerleri	80
Tablo 33.	<i>Candida membranifaciens</i> izolatının flukonazol, vorikonazol, itrakonazol ve flusitozin MİK değerleri	80
Tablo 34.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının albümin agarda oluşturdıkları hidroliz zonlarının büyüklüğü	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	rRNA LSU D1/D2 ve SSU gen sekanslarının neighbour-joining analizi ile değerlendirilmesi sonucunda <i>Meyerozyma</i> cinsinin yakın ilişkili cinsler arasındaki filogenetik yerleşimi	9
Şekil 2.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> türünün rRNA LSU D1/D2 gen sekanslarının maksimum parsimony analizi ile yakın ilişkili taksonlar arasındaki filogenetik yerleşimi	10
Şekil 3.	<i>Candida</i> ve <i>Saccharomyces</i> klad filogenisi	11
Şekil 4.	Fungal ribozomal RNA genlerinin organizasyonu	16
Şekil 5.	<i>Candida guilliermondii</i> ribozomal RNA genlerinin organizasyonu	18
Şekil 6.	Kan kültürlerinden izole edilen maya türlerinin yıllara göre dağılımı	58
Şekil 7.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının üçer aylık dönemlere göre dağılımı	60
Şekil 8.	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının aylara göre dağılımı	61

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. <i>Candida guilliermondii</i> klinik izolatının pseudohifa görünümü	13
Resim 2. <i>Meyerozyma guilliermondii</i> klinik çalışma izolatının Api 20 C AUX identifikasyon sistemindeki karbohidrat asimilasyon profilinin görünümü ve sayısal değerlendirme çizelgesi	65
Resim 3. <i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının rDNA tüm ITS gen bölgesi PCR ürünlerinin agaroz jelde görünümü	66
Resim 4. <i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının rDNA tüm IGS gen bölgesi PCR ürünlerinin agaroz jelde görünümü	70
Resim 5. <i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının rDNA tüm IGS bölgesi PCR ürünlerinin <i>AluI</i> ile kesilmesiyle oluşan bant profillerinin agaroz jelde görünümü	71
Resim 6. <i>Pichia guilliermondii</i> CBS 2030 ve <i>Candida guilliermondii</i> CBS 566 suşlarının PFGE-EK bant profillerinin görünümü	72
Resim 7. <i>Meyerozyma guilliermondii</i> çalışma izolatlarının PFGE-EK bant profillerinin görünümü	74
Resim 8. <i>Candida guilliermondii</i> CBS 566 ve <i>Candida albicans</i> SC5314 referans suşlarının pulsed field jel elektroforezi-genomik DNA'nın <i>BssHII</i> enzimi ile restriksiyonu sonucu oluşan bant profilleri	76
Resim 9. <i>Candida guilliermondii</i> CBS 566 suşu genomik DNA'sının farklı restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan PFGE bant profillerinin görünümü	77
Resim 10. <i>Pichia guilliermondii</i> CBS 2030 suşu genomik DNA'sının farklı restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan PFGE bant profillerinin görünümü	77
Resim 11. <i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının albümin agar besiyerinde görünümleri	82

KISALTMALAR, SİMGELER VE FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ade	Adenin hemisülfat
AFLP	Amplifiye Fragment Uzunluk Polimorfizmi
AIDS	Bulaşıcı İmmün Yetmezlik Virüsü
Ark	Arkadaş
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
Blast	Basic local alignment search tool
bp	Baz çifti
BSA	Sığır Serum Albümini
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CHEF	Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
cm	Santimetre
CoQ-9	Koenzim Q-9
ddw	İki kere distile su
dk	Dakika
DSM	Alman Kültür Koleksiyonu
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EK	Elektroforetik karyotipleme-Elektroforetik karyotip
ETB	EDTA-Tris- β Merkaptotanol
EtBr	Etidyum Bromür
ETS	External Transcribed Spacer
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
Ig	İmmün globulin
IGS	Intergenic Spacer

ITS	Internal Transcribed Spacer
JCM	Japon Mikroorganizma Koleksiyonu
kb	Kilobaz
L	Litre
LMP	Low Melting Point
LSU	Büyük Alt Ünite
Mb	Megabaz
MIK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MLST	Multi Lokus Sekans Tipleme
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
nDNA	Nükleer DNA
NRRL	Tarımsal Araştırma Servisi Kültür Koleksiyonu
NTS	Non-Transcribed Spacer
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	Pulse Field Jel Elektroforezi
RAPD	Rastgele Amplifiye Polimorfik DNA
rDNA	Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
REAG	Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi
Rep-PCR	Tekrarlayan Sekans Temelli-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RF	Riboflavin
RFLP	Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
sa	Saat
Sap	Salgı aspartik proteaz
SCE	Sorbitol-Sodyum sitrat-EDTA
SDA	Sabouraud Dekstroz Agar
sn	Saniye
SSU	Küçük Alt Ünite

TBE	Trik-Borik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
TPN	Total Parenteral Beslenme
U	Ünite
V	Volt
YCB	Yeast Karbon Baz
YEPD	Yeast Ekstrat Pepton Dekstroz
µl	Mikrolitre

1. ÖZET

Kan Kültürlerinden İzole Edilmiş *Meyerozyma guilliermondii* Suşlarının Genotipik ve Virülans Özelliklerinin Araştırılması

Meyerozyma guilliermondii, insan deri ve mukozal yüzey mikroflorasının bir üyesidir. Bununla birlikte, fırsatçı patojen olarak ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu çalışmaya, 2006-2012 yılları arasında KTÜ Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen 119 hastanın örneklerinden izole edilmiş 136 izolat dahil edildi. Biyokimyasal yöntemlerle *M. guilliermondii* olarak tanımlanmış izolatlar genotipik yöntemlerle identifiye edilerek, antifungal duyarlılıkları ve salgı aspartik proteaz (Sap) aktiviteleri yönünden araştırıldı. Ayrıca, *M. guilliermondii* suşlarının moleküler epidemiyolojik analizlerinde pulse field jel elektroforezi karyotipleme (PFGE-EK) ve PFGE genomik DNA restriksiyon enzim analizi (REAG) yöntemlerinin uygun birer yöntem olarak kullanılabilirliği araştırıldı. *M. guilliermondii* izolatlarının moleküler identifikasyonları ribozomal ITS gen bölgelerinin DNA sekans analizleri ile ve ribozomal IGS gen bölgesinin PCR-RFLP bant paternleri karşılaştırılarak gerçekleştirildi. Antifungal duyarlılık testleri Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems, ABD) mikrodilüsyon kiti ile 46 suшта saptandı. İzolatların Sap aktivitesi albümin agar besiyerlerinde gösterildi. *M. guilliermondii* suşlarının karyotipleri total genomik DNA'nın ve 12 değişik restriksiyon enzimi ile kesilen genomik DNA'nın PFGE'nde yürütülmesi ile gerçekleştirildi. İzolatlardan 135'i ITS DNA sekans analizlerine göre *M. guilliermondii* ve bir izolat *Candida membranifaciens* olarak tanımlandı. *M. guilliermondii* izolatlarının tümünün identifikasyonları PCR-RFLP analizi ile doğrulandı. Pan-azol (flukonazol, vorikonazol, itrakonazol) dirençli bir izolat belirlendi. İzolatlarda Sap aktivitesi zayıf veya hiç saptanmadı. *M. guilliermondii*'nin identifikasyonunda biyokimyasal ve moleküler yöntemlerin uyumlu olduğu gösterildi. ITS1 bölgesinin bu türlerin tanımlanmasında daha spesifik olduğu saptandı. *M. guilliermondii* suşlarının PFGE-REAG analizinde *NotI*, *PacI* ve *SfiI* enzimlerinin uygun olduğu belirlendi. *M. guilliermondii* suşlarının epidemiyolojik analizlerinde PFGE-EK ve PFGE-REAG yöntemlerinin kullanılabilirliği gösterildi.

Anahtar Sözcükler: *Meyerozyma guilliermondii*, ribozomal ITS gen sekansı, PCR-RFLP, PFGE, antifungal duyarlılık, salgı aspartik proteaz

2. SUMMARY

Investigation of the Genotypic and Virulence Factors in Blood Culture Isolates of *Meyerozyma guilliermondii*

Meyerozyma guilliermondii is a member of human normal skin and mucosal surface microflora. However, it causes serious infections as an opportunistic pathogen. This study included 136 *M. guilliermondii* strains isolated from 119 patient samples sent to KTU, Faculty of Medicine, Medical Microbiology Laboratory between 2006-2012. The strains identified by using biochemical methods were identified by genetic methods, tested for their antifungal susceptibilities and secretory aspartic protease (Sap) activities. In addition, suitability of pulse field gel electrophoresis karyotyping (PFGE-EK) and PFGE genomic DNA restriction enzyme analysis (REAG) method use in the molecular epidemiological analysis of *M. guilliermondii* was investigated. The molecular identification of *M. guilliermondii* strains were carried out by DNA sequencing of the ITS gene regions and comparison of the PCR-RFLP band patterns of the ribosomal IGS regions. Antifungal susceptibility tests were performed for 46 strains using Sensititre YeastOne microdilution test kit (TREK Diagnostic Systems, USA). The Sap activities of isolates were tested on albumin agar medium. The karyotypes of *M. guilliermondii* strains were determined by PFGE using total genomic DNA and genomic DNA digested with 12 different restriction endonuclease enzymes. Based on ITS DNA sequence analysis, 135 strains were identified as *M. guilliermondii*, and one strain as *Candida membranifaciens*. Identification of all *M. guilliermondii* strains was confirmed by PCR-RFLP analysis. One strain was pan-azol (fluconazole, voriconazole, itraconazole) resistant. Sap activity was found to be absent or weak for all strains. It has been demonstrated that biochemical and molecular methods were in agreement for the identification of *M. guilliermondii*. ITS1 region was shown to be more specific in the identification of these yeast species. The restriction endonuclease enzymes *NotI*, *PacI* and *SfiI* were determined to be suitable in PFGE-REAG analysis of *M. guilliermondii* strains. It was demonstrated that PFGE-EK and PFGE-REAG methods could be used in epidemiological typing of *M. guilliermondii* strains.

Key Words: *Meyerozyma guilliermondii*, ribosomal ITS gene sequence, PCR-RFLP, PFGE, antifungal susceptibility, secretory aspartic protease

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Candida guilliermondii (*C. guilliermondii*), ilk defa 1912 yılında Castellani tarafından bronkomikoz hastalarından izole edilmiş maya benzeri bir mantar türüdür (1). Günümüze kadar çok sayıda sinonim ile adlandırılmıştır (2, 3). Sıklıkla *Candida guilliermondii* (telemorf *Pichia guilliermondii*) sinonimi kullanılmakla birlikte; 2010 yılında Kurtzman ve Suzuki tarafından *Meyerozyma* yeni cinsine dahil edilen bir tür olarak, günümüzde telemorf tür adı olan *M. guilliermondii* sinonimi ile adlandırılmaktadır (4).

Candida guilliermondii ve *Pichia guilliermondii* (*P.guilliermondii*) olarak sınıflandırılan suşlar, özellikle *Candida fermentatii* (telemorf *Pichia caribbica*) ve *Candida carpophila* sinonimlerinin dahil olduğu, fenotipik olarak ayrılamayan, genetik olarak heterojen bir kompleks olarak düşünülmüştür. Ayrıca bu tür, *Candida famata* (telemorf *Debaryomyces hansenii*) türü ile de mevcut fenotipik identifikasyon metodları ile tam olarak ayrılamamaktadır. Son yıllarda, internal transcribed spacer (ITS), D1/D2 ve intergenic spacer (IGS) ribozomal gen bölgelerinin DNA sekans çalışmaları, elektroforetik karyotipleme, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (PCR- RFLP) çalışmaları ile *P.guilliermondii* klad'daki taksonların ayırımına ve *P.guilliermondii*'nin *C. famata* (*D. hansenii*) türünden ayırımına katkı sağlanmıştır (5-18).

Meyerozyma guilliermondii (*M. guilliermondii*) doğal ortamlardan sıklıkla izole edilmesinin yanında insan deri ve mukozal yüzey mikroflorasında da bulunmaktadır. Üstelik insan fırsatçı patojeni olarak fungemi gibi ciddi enfeksiyonların etkeni olarak bildirilmiştir (1).

Candida guilliermondii'nin klinik maya izolatları arasındaki izolasyon sıklığı yaklaşık %2 olarak bildirilmiştir. Son yirmi yılda, bu patojenin etken olduğu fungemiler ise artan insidans ile bütün kandidemilerin %1-11.7'sinden sorumludur. Bu sonuçlarla *C.guilliermondii*, tüm kandidemilerin yalnızca küçük bir yüzdesinden sorumlu, yeni ortaya çıkan, nadir patojen olarak tanımlanmıştır. *C. guilliermondii*, invaziv fungal enfeksiyonların nedeni olarak nadiren görülmektedir (19-31). Ancak fungemiler yüksek mortaliteye sahip enfeksiyonlardır (20, 21, 32-34).

Candida guilliermondii enfeksiyonlarının çoğu kanser hastalarında görülen fungemiler şeklindedir (20, 22, 28, 34-38). Üstelik yetişkin popülasyonda *C. guilliermondii*'nin neden olduğu hastane kaynaklı salgınlar bildirilmiştir (39, 40). Aynı şekilde pediatrik popülasyonda da fungemi ve fungemi yalancı salgınları bildirilmiştir (30, 41, 42). Çoğunlukla patojen farz edilen bu maya türü birçok çalışmada kan kültüründen izole edilmekle birlikte diğer steril vücut sıvılarından, deri ve yumuşak doku örneklerinden, idrardan, genital ve solunum yolu örneklerinden ve tırnaktan da izole edilmiştir (26, 38, 43).

Candida guilliermondii izolatları çoğunlukla flukonazol duyarlı olmakla birlikte flukonazol dirençli izolatlar rapor edilmiştir. Vorikonazolün *C. guilliermondii*'ye karşı flukonazolden daha etkili olduğu, azoller arasındaki en etkili molekülün vorikonazol olabileceği belirtilmektedir. Azollere çapraz direnç rapor edilmiştir. *C. guilliermondii* izolatları polyen direnci gösterebilir; direnç tesbit edilmemişse bile in vivo olarak polyen toleran olabilir. Ekinokandinlere intrensik olarak zayıf duyarlılık sergiler, en az ekinokandin duyarlı maya türlerinden biridir. Ancak ekinokandin direnci bu türde yalnızca sporadik olarak gözlenmiştir. Flusitozin direnci de rapor edilmiştir (1).

Mantarlar konak dokularında invazyona yardımcı olan enzimler oluşturmaktadırlar. Salgı aspartik proteaz (Sap) enzimi en iyi tanımlanmış ve en fazla çalışılmış virülans enzimi konumundadır. Bu enzim genellikle *C.albicans* suşlarında çalışılmış ve en patojen *Candida* türleri (*C. albicans*, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis*) tarafından salgılandığı bildirilmiştir (44, 45). *C. guilliermondii* izolatlarının SAP gen ailesine sahip olduğu bilinmesine rağmen (46) türe ait Sap aktivitesi çalışmaları az sayıda izolat ile yapılmış birkaç çalışmadan ibarettir. Bu çalışmalar ile *C. guilliermondii* suşlarında enzim aktivitesi saptanamamış ya da düşük düzeyde saptanmıştır (47-49).

Bu mantar türü literatür genelinde sıklıkla *C. guilliermondii* (telemorf *P. guilliermondii*) olarak adlandırılmaktadır. Ancak 2010 yılında Kurtzman ve Suzuki tarafından yapılan çalışma ile *Meyerozyma* yeni cinsine dahil edilmiş ve telemorf tür adı *M. guilliermondii* olarak değiştirilmiştir. Bu nedenle günümüzde sıklıkla *M. guilliermondii* sinonimi ile adlandırılmaktadır (4).

Çalışmamızda, biyokimyasal yöntemlerle *M. guilliermondii* olarak tanımlanmış 136 klinik izolatın identifikasyonunun moleküler yöntemlerle doğrulanması, *M.*

guilliermondii suşlarının moleküler epidemiyolojik analizlerinde pulse field jel elektroforezi karyotipleme (PFGE-EK) ve PFGE genomik DNA restriksiyon enzim analizi (REAG) yöntemlerinin uygun birer yöntem olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlandı. Ayrıca bu çalışma ile *M. guilliermondii* suşlarının flukonazol, vorikonazol, itrakonazol ve 5-flusitozin antifungal duyarlılıklarının ve salgı aspartik proteaz aktivitesinin belirlenmesi amaçlandı.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. *Meyerozyma guilliermondii*

4.1.1. Nomenklatür

İlk tanımlandığı günden günümüze kadar kullanılan *Meyerozyma guilliermondii* sinonimleri aşağıdaki metinde belirtilmiştir.

Endomyces guilliermondii Castellani (1912), *Monilia guilliermondii* (Castellani) Castellani&Chalmers (1913), *Myceloblastanon guilliermondii* (Castellani) Ota (1927), *Mycotorula guilliermondii* (Castellani) Langeron&Guerra (1935), *Blastodendron guilliermondii* (Castellani) Guerra (1935), *Castellania guilliermondii* (Castellani) C.W. Dodge (1935), *Monilia guilliermondii* (Castellani) Castellani&Chalmers var. *pseudoguilliermondii* (Castellani&Chalmers) Castellani (1937), *Candida guilliermondii* (Castellani) Langeron&Guerra (1938)¹, *Mycotorula guilliermondii* (Castellani) Langeron&Guerra var. *muhira* (Matlett) Redaelli&Ciferri (1943), *Candida guilliermondii* (Castellani) Langeron&Guerra var. *soya* Onishi&T.Suzuki (1969), *Candida guilliermondii* (Castellani) Langeron&Guerra var. *japonica* Sugiyama&S.Goto (1969)², *Endomycopsis guilliermondii* Wickerham&Burton (1954), *Pichia guilliermondii* Wickerham (1966), *Yamadazyma guilliermondii* (Wickerham) Billon-Grand (1989), *Meyerozyma guilliermondii* (Wickerham) Kurtzman&M. Suzuki (2010).

Endomyces negrii Castellani (1912), *Monilia negrii* (Castellani) Castellani&Chalmers (1913), *Castellania negrii* (Castellani) C.W.Dodge (1935).

Monilia pseudoguilliermondii Castellani&Chalmers (1919), *Myceloblastanon pseudoguilliermondii* (Castellani&Chalmers) Ota (1927), *Castellania pseudoguilliermondii* (Castellani&Chalmers) C.W.Dodge (1935).

Monilia muhira Matlett (1926), *Castellania muhira* (Matlett) C.W.Dodge (1935).

Blastodendron arzti Ota (1924)^{2,3}, *Monilia arzti* (Ota) Nannizzi (1934), *Myceloblastanon arzti* (Ota) Rippon (1988).

Myceloblastanon krausi Ota (1924), *Cryptococcus krausi* Ota (1924), *Blastodendron krausi* (Ota) Redaelli&Ciferri (1929)², *Monilia krausi* (Ota) Nannizzi

(1934), *Parendomyces krausi* (Ota) C.W.Dodge (1935), *Mycotorula krausi* (Ota) Ciferri&Redaelli (1943).

Candida parapsilosis (Ashford) Langeron&Talice var. *tokyoensis* T.Suzuki, Sumino, Akiyama&Fukada (1973)², *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron&Talice var. *tuxtlensis* Herrera, Ulloa&Fuentes (1973)³.

Monilia lustigi Castellani&Chalmers (1913), *Castellania lustigi* (Castellani&Chalmers) C.W.Dodge (1935).

Torula fermentati Saito (1922), *Microanthomyces alpinus* Grüss (1926, 1927), *Candida paranensis* Negroni&Fischer (1941), *Torulopsis xylinus* Tatsumi&Katagiri (1950), *Candida melibiosi* Lodder&Kreger-van Rij (1952)³, *Trichosporon appendiculare* Batista (1959), *Candida mamillae* S.Goto (1979)², *Candida amidovorans* Balloni, Florenzano, Mazza&Polsinelli (1987)^{2,3} (2, 3).

¹ Nükleer DNA (nDNA) yeniden birleşme (nuclear DNA reassociation) deneyleri, ² Elektrokaryotip (EK) benzerliği, ³ ribozomal DNA (rDNA) büyük alt ünite (LSU) D1/D2 gen sekansları. Belirtilen diğer sinonimler farklı fenotipik yöntemlerle tanımlanmıştır.

Kaynak gösterilerek aktarılan bilgilerde kaynaktaki nomenklature bağlı kalınmakla birlikte, tez metni içinde *M. guilliermondii* sinonimi kullanılmıştır.

4.1.2. Taksonomi ve Filogenetik

Meyerozyma guilliermondii, ilk defa 1912 yılında Castellani tarafından Sri Lanka'da bronkomikoz hastalarından izole edilmiş ve *Endomyces guilliermondii* olarak tanımlanmıştır (1).

Wickerham ve Burton 1954'de, *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii* olarak tanımlanan suşlarda askosporulasyonu keşfetmiş ve askosporik (seksüel) şeklini *Endomycopsis guilliermondii* olarak adlandırmıştır (50). Wickerham 1966 yılında türün seksüel şeklini *P. guilliermondii* olarak doğrulamıştır (51). *P. guilliermondii* günümüzde, önceden asporogenous tür *Candida guilliermondii* (Castellani) Langeron and Guerra'ya ait sporogenous suşların bir koleksiyonunu temsil etmektedir. Bu eşleşebilen her *C. guilliermondii* suşunun *P. guilliermondii* türüne taşınması gerektiği

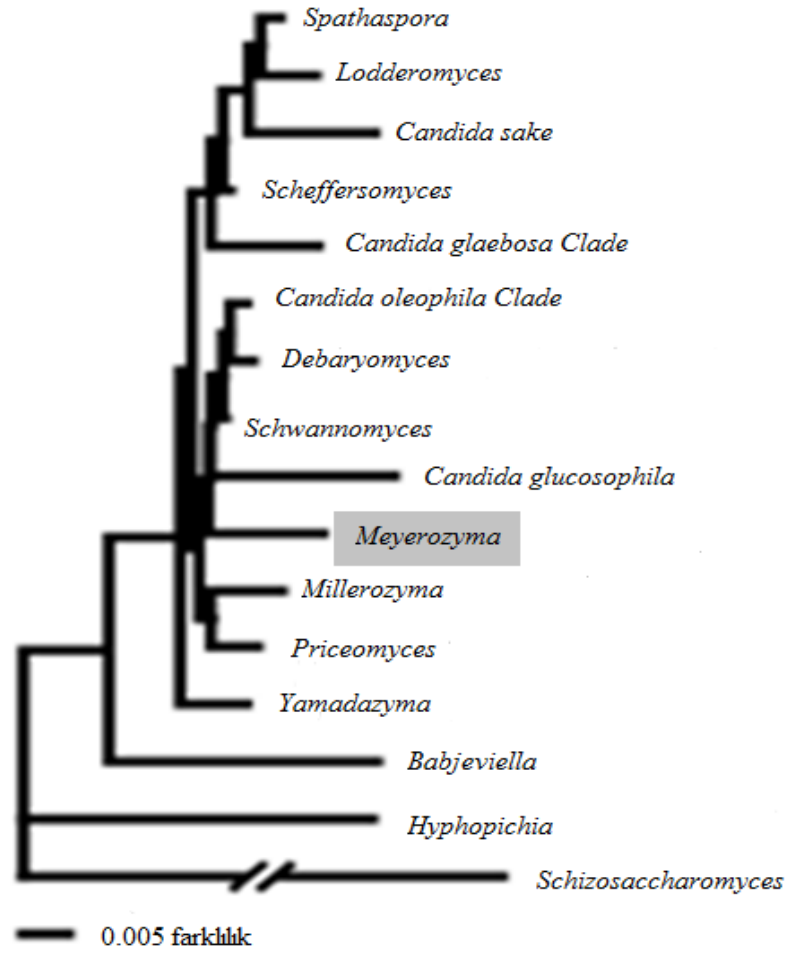
anlamına gelmektedir (50, 51). Kurtzman 1992’de, nDNA yeniden birleşme deneyleri ile *P. guilliermondii* ve anamorfu kabul edilen *C. guilliermondii*’nin aynı türe ait (conspecific) olduğunu bulmuştur (52).

Kurtzman ve Suzuki 2010 yılındaki çalışmalarında, koenzim (Co) Q-9 üreten *Pichia* türleri arasındaki ilişkiyi, ribozomal RNA (rRNA)’nın büyük alt ünite (LSU) D1/D2 ve küçük alt ünite (SSU) bölgelerini sekanslayarak analiz etmiştir. Bu analiz CoQ-9 türlerinin çeşitli yeni cinslerde yerleşimi ile sonuçlanmıştır. Bu çalışma ile *P. guilliermondii* ve *Pichia caribbica* türleri, yeni *Meyerozyma* cinsine dahil edilmiştir (Şekil 1). *Candida carpophila* ve *Candida*’nın bazı diğer türleri *Meyerozyma* klad (clade)’ının üyeleridir (Şekil 2) (4).

Meyerozyma guilliermondii’nin güncel sistematik yerleşimi şu şekildedir:

Alem : Fungi
Şube : Ascomycota
Alt şube : Saccharomycotina
Sınıf : Saccharomycetes
Takım : Saccharomycetales
Aile : Debaryomycetaceae
Cins : *Meyerozyma*

Meyerozyma cinsi *Debaryomyces*, *Millerozyma*, *Priceomyces* ve *Schwanniomyces* cinsleri ile filogenetik olarak yakın ilişkilidir. *Meyerozyma* cinsinin yakın ilişkili cinsler arasındaki filogenetik yerleşimi Şekil 1’de görülmektedir (3, 4).

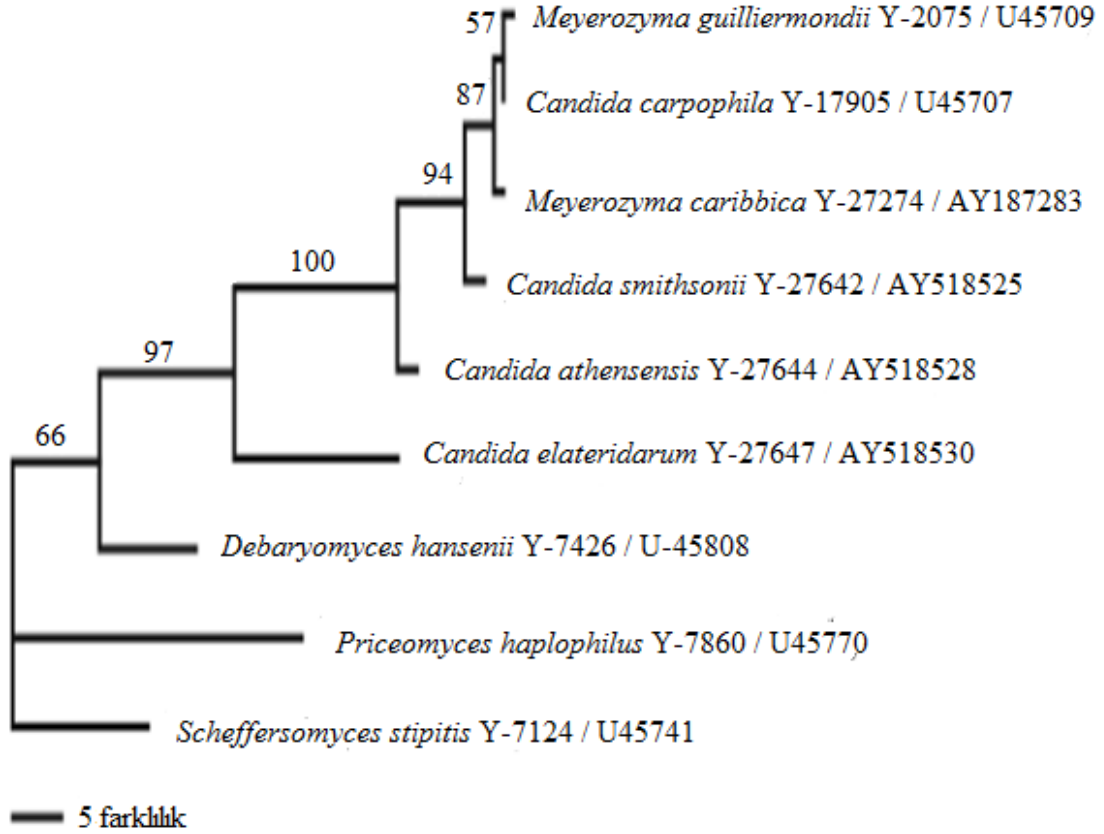


Şekil 1. rRNA LSU D1/D2 ve SSU gen sekanslarının neighbour-joining analizi ile değerlendirilmesi sonucunda *Meyerozyma* cinsinin yakın ilişkili cinsler arasındaki filogenetik yerleşimi (3, 4)

Meyerozyma cinsinin kabul gören türleri *Meyerozyma guilliermondii* (Wickerham) Kurtzman&M.Suzuki (2010) ve *Meyerozyma caribbica* (Vaughan-Martini, Kurtzman, S.A.Meyer&O'Neill) Kurtzman&M.Suzuki (2010) türleridir. *Meyerozyma* cinsinin tip türü *Meyerozyma guilliermondii* (Wickerham) Kurtzman&M.Suzuki (2010) kabul edilmektedir. Kurtzman ve Suzuki (2010)'nin çalışmalarına göre *C. guilliermondii*'nin yeni atanmış telemorf tür adı *Meyerozyma guilliermondii*'dir (4).

Meyerozyma caribbica (Vaughan-Martini, Kurtzman, S.A.Meyer&O'Neill) Kurtzman&M.Suzuki (2010) türünün anamorfu *Candida fermentatii* (Saito) Bai (1996)'dir. 2010 yılı öncesinde, telemorf tür adı olarak *Pichia caribbica* Vaughan-Martini, Kurtzman, S.A.Meyer&O'Neill (2005) sinonimi kullanılmıştır (4).

Meyerozyma guilliermondii türünün yakın ilişkili türler arasında filogenetik yerleşimi Şekil 2’de görülmektedir (3, 4).



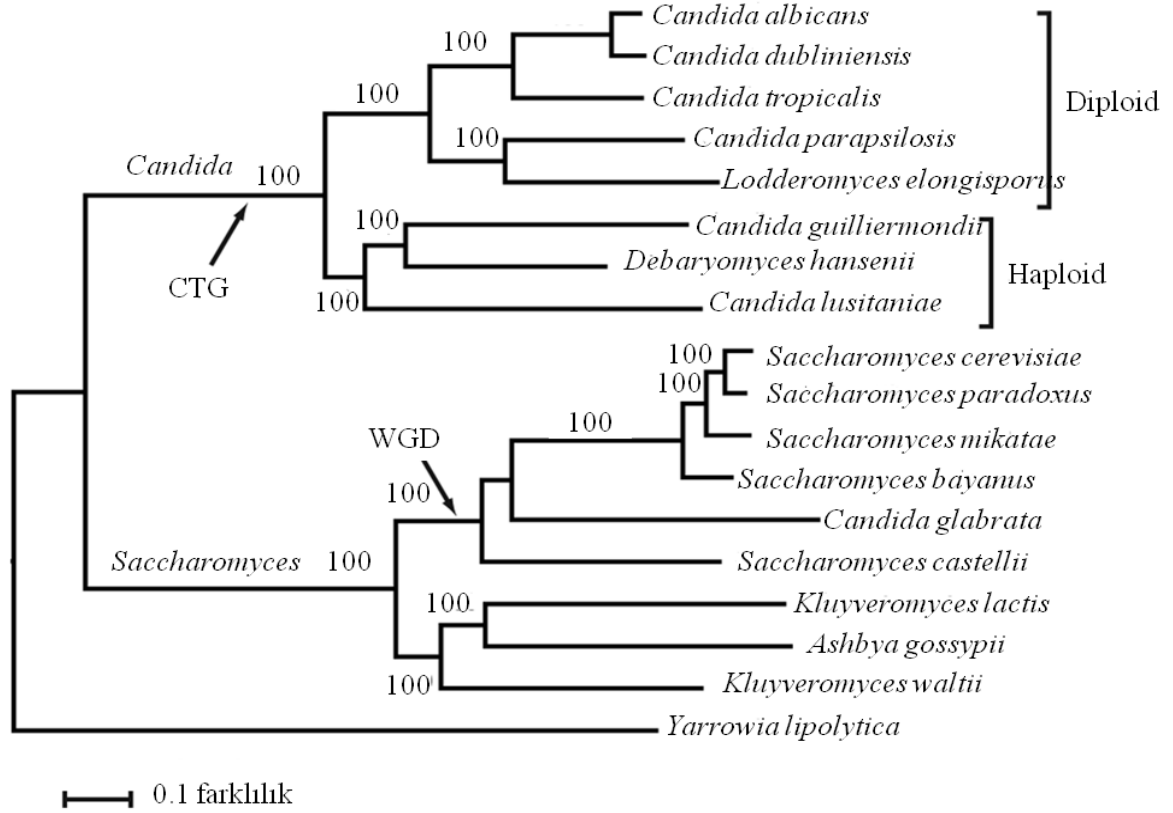
Şekil 2. *Meyerozyma guilliermondii* türünün rRNA LSU D1/D2 gen sekanslarının maksimum parsimony analizi ile yakın ilişkili taksonlar arasındaki filogenetik yerleşimi (3, 4)

Tüm genom analizine dayanan en son filogenetik çalışmalara göre *Saccharomycotina* iki ana gruba ayrılabilir. Bunlar:

- *Candida glabrata* ve *Saccharomyces* cinsinden mayaları içeren *Saccharomycetaceae* klad
- *C.albicans*, *C.dubliniensis*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.maltosa*, *C.famata*, *C.lusitaniae*, *C.oleophila*, *C.rugosa*, *Lodderomyces elongisporus*, *Scheffersomyces stipitis* ve *C.guilliermondii*’yi içeren CTG klad (CTG kodonunu lösin yerine serin olarak translate eden) türleri (53-55).

Candida ve *Saccharomyces* klad filogenisi için Şekil 3’e bakınız (54). 1990 yılından bu yana kabul gören bu özel kodon kullanımı *C. guilliermondii*’de

Saccharomyces-bakteriyel marker'ların ve raportör genlerin genetik araç olarak kullanımını engellemektedir (56).



Şekil 3. *Candida* ve *Saccharomyces* klad filogenisi (54)

Candida guilliermondii ATCC 6260 referans suşunun tüm genomu 2009 yılında sekanslanmıştır. *C. guilliermondii* kısmen küçük bir genoma (10.6 Mb, 8 kromozom) sahiptir. Şimdiye kadar belirlenen gen sayısı (5,920) diğer CTG klad türlerine benzerdir. Bu *C. guilliermondii* genomundaki kısa intergenik boşluklardan (ortalama 426 bp) kaynaklanmaktadır (mevcut CTG klad genomlarında ortalama 794 bp). Tablo 1’de *C. guilliermondii* ATCC 6260 ile birlikte sekiz farklı maya türünün genom özellikleri belirtilmiştir. *C. albicans* SC5314 suşunun genom bilgileri "*Candida* Genom Database", *D. hansenii*’nin genom bilgileri "GenBank", diğer türlerin genom bilgileri ise Genbank ve "Broad Institute *Candida* Database" web sitelerinde mevcuttur (54).

Tablo 1. *Candida* türlerinin genom özellikleri

Tür	Genom büyüklüğü (Mb)	%GC	Gen sayısı	Ortalama gen büyüklüğü (bp)	Ortalama intergenik boşluk (bp)	Plöidi	Patojen ^t
<i>Candida albicans</i> WO-1	14.4	33.5	6,159	1,444	921	Diploid	++
<i>Candida albicans</i> SC5314	14.3	33.5	6,107	1,468	858	Diploid	++
<i>Candida tropicalis</i>	14.5	33.1	6,258	1,454	902	Diploid	++
<i>Candida parapsilosis</i>	13.1	38.7	5,733	1,533	752	Diploid	++
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	15.4	37.0	5,802	1,530	1,174	Diploid	-
<i>Candida guilliermondii</i>	10.6	43.8	5,920	1,402	426	Haploid	+
<i>Candida lusitanae</i>	12.1	44.5	5,941	1,382	770	Haploid	+
<i>Debaryomyces hansenii</i>	12.2	36.3	6,318	1,382	550	Haploid	-

*bp: baz çifti, ^t: Göreceli patojenite düzeyi (54)

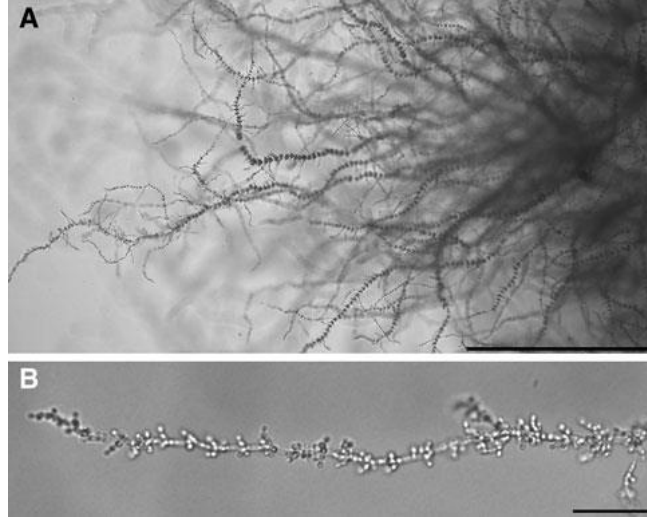
4.1.3. Fenotipik İdentifikasyon

4.1.3.1. Kültür ve Mikroskopi Özellikleri

Candida guilliermondii tipik olarak aerobik mayaları temsil eder ve tam anaerobik koşullarda çoğalamaz. *C. guilliermondii* için standart çoğalma sıcaklığı 30 °C ve üst sınır 42 °C'dir (57). *C. guilliermondii*, maya kültürü amacı ile yaygın şekilde kullanılan Sabouraud dekstrozu agar (SDA)'da kolayca çoğalan maya benzeri bir organizmadır fakat sabouraud broth yüzeyinde çoğalmaz. Koloniler krem veya sarı pigmentli, tipik olarak düz yüzeyli, düzgün kenarlı ve ıslak görünümlüdür (1).

Mısır unu-tween 80 agar'da 25 °C'de 72 saatlik inkübasyondan sonra küçük blastosporlardan yığınlar oluşturmaktadır. Tomurcuklanan hücre yığınının merkezinden dışarıya doğru uzayan çoğunlukla az sayıda, kısa pseudohifa gözlenmektedir. *C. guilliermondii*'nin bu morfogenetik geçiş (pseudohifa oluşturma) yeteneği bir kural değildir. Pseudohifa oluşturma durumunun izolat koleksiyonları arasında oldukça değişken olduğu görülmüştür. 33 *P. guilliermondii* izolatının 27'sinin, 18 *P. caribbica* izolatının 17'sinin pseudohifa oluşturduğu; 3 *D. hansenii* izolatının ise pseudohifa oluşturmadığı tesbit edilmiştir (14). McManners ve Samaranayake (1990), *C. guilliermondii* izole ettikleri bir dento-alveolar absenin gram boyama preparatında hifa

bildirmişlerdir. Fakat örnek identifikasyonu yanlış olmadıkça bu görüntünün pseudohifa olduğu düşünülmektedir. Çünkü bu türde gerçek hifa görülmemektedir (11, 14, 40, 58).



Resim 1. *Candida guilliermondii* klinik izolatının pseudohifa görünümü. Ölçek çubuğu A: 0.5 cm, B: 25 μ m

Meyerozyma guilliermondii ve *M. caribbica* farklı şekillere sahip askosporlar oluşturmaktadırlar fakat iki tür de az sporlandığı için bu kriterle tür ayrımı kesin değildir (3).

Biyogüvenlik düzeyi 1 (BSL-1) organizmadır.

4.1.3.2. Biyokimyasal Özellikler

Meyerozyma cinsine ait türler şekerleri fermente ederler. Birçok yaygın heksoz, disakkarit, poliol ve organik asidi asimile ederler fakat tek nitrojen kaynağı olarak nitratı kullanmazlar. *M. guilliermondii* ve *M. caribbica* türleri arasında standart fermentasyon ve çoğalma testlerinde farklılık görülmemiştir (3). *Candida guilliermondii*'ye ait biyokimyasal reaksiyonlar ve çoğalma özellikleri Tablo 2'de görülmektedir (2, 3).

Tablo 2. *Candida guilliermondii*'ye ait biyokimyasal reaksiyonlar ve çoğalma özellikleri

Fermantasyon					
Glukoz	+	Sükroz	+	Trehaloz	+
Galaktoz	d	Maltoz	-	Rafinoz	+
Laktoz	-				
Çoğalma (sıvı besiyerde)					
Glukoz	+	N-Asetil-D-glukozamin	+	D-Mannitol	+
Galaktoz	+	D-Glukozamin	+	D-Glusitol	+
Laktoz	-	D-Glukonat	d	Galaktitol	d
Sükroz	+	D-Glucarat	-	Ribitol	+
Maltoz	+	D-Riboz	+	Eritritol	-
Sellebiyoz	+	D-Ksiloz	+	myo-Inositol	-
Trehaloz	+	D-Arabinoz	+	Etanol	+
Rafinoz	+	L-Arabinoz	+	Metanol	-
Melezitoz	+	L-Ramnoz	d	Gliserol	+
Melibiyoz	+	L-Sorboz	d	Salisin	+
Çözünür nişasta	-	DL-Laktat	d	Süksinat	+
Hekzadekan	+	Metil- α -D-glukozit	+	Sitrat	d
Serbest vitamin	d	Nitrat	-		
İlave çoğalma testleri ve diğer özellikler					
2-Keto-D-Glukonat	+	Nişasta sentezi	-	37 °C'de çoğalma	+
5-Keto-D-Glukonat	-	%10 NaCl / %5 glukoz	+	42 °C'de çoğalma	b
Sakarat	-	Jelatin hidrolizi	-	44 °C'de çoğalma	b

d: değişken, b: bilinmiyor (2, 3)

Biyokimyasal reaksiyonları temel alan ticari olarak mevcut identifikasyon sistemleri bulunmaktadır. Bunlar Vitek (BioMerieux Vitek, France), API ID 32C ve API 20C AUX sistemleri (BioMerieux, France), API *Candida* (BioMerieux, France), Yeast Star (CLARC Laboratories, Netherlands), Auxacolor (Sanofi Diagnostics Pasteur, France), RapID Yeast Plus Systems (Thermo Scientific, Remel, ABD) sistemleridir (59).

Tablo 3. API 20C AUX V4.0 sisteminde *Candida guilliermondii* ve *Candida famata* türlerinin karbohidrat asimilasyonu yüzde (%) pozitif reaksiyonunu gösteren identifikasyon tablosu

Tür/Karbohidrat	0	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF
<i>C. famata</i>	0	100	96	98	60	60	98	75	99	0	100	99	99	89	70	100	100	96	78	75
<i>C. guilliermondii</i>	0	100	99	97	79	85	97	92	99	0	97	88	99	95	0	94	100	99	90	95

GLU: D-glukoz, GLY: gliserol, 2KG: kalsiyum 2-keto-glukonat, ARA: L-arabinoz, XYL: D-ksiloz, ADO: adonitol, XLT: ksilitol, GAL: D-galaktoz, INO: inositol SOR: D-sorbitol, MDG: metil- α D-glukopiranosid, NAG: N-asetil-glukozamin, CEL: D-sellobiyoz, LAC: D-laktoz (sığır menşeyli), MAL: D-maltoz, SAC: D-sakkaroz (sukroz), TRE: D-trehaloz, MLZ: D-melezitoz, RAF: D-rafinoz

Debaryomyces hansenii izolatları %0.01 sikloheksimid'e duyarlı görülürken, *P. guilliermondii* ve *P. caribbica* izolatlarının >%90'ı dirençlidir (6, 7, 11, 12, 14, 40).

4.1.4. Moleküler İdentifikasyon

Fungal organizmaların taksonomik ve epidemiyolojik çalışmaları için nükleik asitleri tesbit eden moleküler tekniklerden artan şekilde faydalanılmaktadır. Moleküler identifikasyon tipik olmayan morfolojik karakter gösteren, yavaş çoğaldığı için uzun inkübasyona ihtiyaç duyan, spor üretmek için özelleşmiş besiyere gereksinim duyan funguslar için ve fenotipik identifikasyon sonuçlarının spesifik olmadığı yada kafa karıştırıcı olduğu durumlarda faydalıdır (61). Üstelik fungal organizmaların morfolojik ve biyokimyasal özellikler kullanılarak fenotipik identifikasyonu çalışan hatalarından etkilenmektedir, zaman alıcıdır ve değişken sonuçlar verebilmektedir. Günümüzde birçok laboratuvar fungal identifikasyon amacı ile rutin protollerinin bir parçası olarak DNA sekanslama çalışmaktadır. Sekans temelli identifikasyon araştırma laboratuvarlarından, DNA izolasyonu-saflaştırma kitleri ve temel biyoteknolojik olanaklar ile desteklenen üçüncü basamak tıp merkezlerinin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarına taşınmaktadır.

4.1.4.1. Ribosomal RNA Geninin Sekanslanması

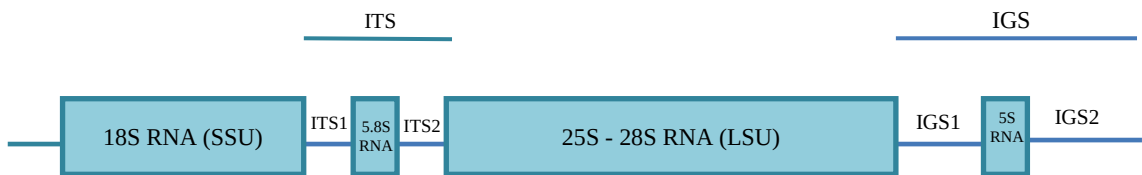
Ribozom yaşayan tüm organizmalarda protein sentezini gerçekleştiren zorunlu hücresel bir organeldir. Ribosomal RNA genleri oldukça iyi korunduklarından özellikle filogenilerin yorumlanması açısından önemlidirler. İki organizma arasındaki rRNA sekanslarındaki benzerliğin derecesi onların göreceli evrimsel akrabalıklarını güvenilir şekilde belirlemektedir. Korunmuş ribozomal DNA (rDNA) bölgeleri, yakın ilişkili

gruplar arasındaki akrabalığı belirlemek için yararlı olan hızlı evrimleşen bölgeler içermektedir. Bu ilişki, yakın ilişkili cinsler ve yakın ilişkili türlerin kendi aralarındaki veya fungusun tek türünün izolatları arasındaki ilişkidir (62).

Fungal organizmaların kesin identifikasyonu için bir dizi gen bölgesinin değerli olduğu kanıtlanmıştır. Bu amaçla en sık rDNA gen kompleksi kullanılmaktadır (63, 64). rDNA gen bölgelerinin sekanslanması ile yeterli ayrımın sağlanamadığı durumlarda RNA polimeraz II alt ünite 1, RNA polimeraz II alt ünite 2, translasyon elongasyon faktör 1a, ATP sentaz alt ünite 6, β -tubulin sentaz, aktin sentaz, kitin sentaz, asetil koenzim A sentaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, izoepoksidan dehidrogenaz (isoeoxydon dehydrogenase), lignin peroksidaz ve orotidin 5'-monofosfat dekarboksilaz genlerini içeren tek kopya hedefler bu amaçla kullanılmaktadır (61, 65).

Ribozomun anahtar bileşeni olarak rRNA molekülleri, kompleks şekilde katlanmış farklı büyüklükte (küçük ve büyük) iki alt ünite içermektedir. Fungusların da dahil olduğu ökaryotlarda iki rRNA alt ünitesi 40S ve 60S sedimentasyon katsayısı değerlerine sahiptir. Ökaryotlarda küçük rRNA alt ünitesi (40S) tek RNA tipi içermektedir (18S rRNA); büyük alt ünite (60S) ise üç RNA tipinden (5S, 5.8S, 25-28S rRNA) oluşmaktadır. Buna karşılık prokaryotlarda iki rRNA alt ünitesi sırasıyla 30S ve 50S ölçülmektedir (65).

Fungal rRNA'ya karşılık gelen DNA, ard arda sıralanmış bir dizi genden oluşmaktadır. Bu ribozomal genler her hücrede 50-500 kopya halinde bulunur ve bu nedenle tek kopya bir genden daha duyarlı olarak tesbit edilmektedirler. 8-12 kb büyüklüğündeki her kopya, 18S RNA (küçük alt ünite: SSU), ITS1 (internal transcribed spacer 1), 5.8S RNA, ITS2, 25-28S RNA (büyük alt ünite: LSU), IGS1 (intergenic spacer), 5S RNA ve IGS2'den oluşmaktadır. Şekil 4 fungal rRNA genlerinin organizasyonunu göstermektedir (65).



Şekil 4. Fungal ribozomal RNA genlerinin organizasyonu (65)

Bu kompleksin 18S ve 5.8S bölgeleri ITS1 bölgesi ile, 5.8S ve 25S-28S bölgeleri ITS2 bölgesi ile ayrılmaktadır. ITS bölgeleri işlevsel olmayan sekanslar olduklarından ters seleksiyon baskısı olmaksızın mutasyon ile değişikliğe tamamen açık bölgelerdir. Bu nedenle ITS bölgelerinin nükleotid sekansları oldukça değişkendir. Bu polimorfizm, hızlı ve yeterli oranda değişen bu bölgeleri göreceli yakın akrabalık çalışması için ideal bir marker molekül yapmaktadır. ITS1 ve ITS2 bölgeleri fungal türleşme (fungal speciation) ve identifikasyon için oldukça değerli hedeflerdir (66-69).

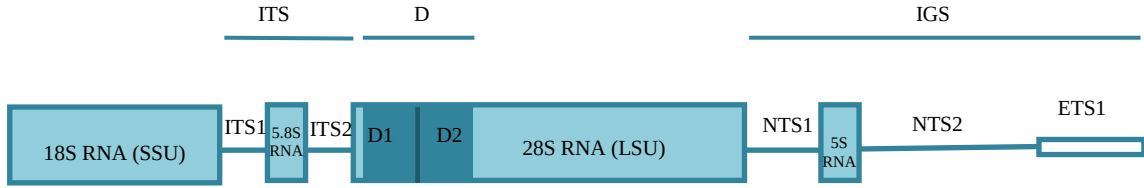
Ribozomal RNA'nın 25S-28S geni çoğunlukla oldukça farklı taksonlar boyunca korunmaktadır. Yalnızca ilk 600-900 bazlık kısım fungal organizmaların filogenetik çalışmaları için faydalı olan D1, D2 ve D3 olarak adlandırılan üç farklı bölge içermektedir. Mayalarda 25S rRNA geninin D1 ve D2 değişken bölgeleri sıklıkla hedef olarak kullanılmaktadır (70).

18S rRNA geni hem korunmuş ve hem de değişken sekans bölgeleri içermektedir. Değişken sekanslı bölgeler cins veya tür düzeyinde karakterizasyon için değerli iken (18S rRNA geninde >%97 sekans benzerliği gösteren izolatların aynı tür olduğu düşünülüyor); korunmuş bölgeler sıklıkla daha yüksek taksonomik sınıfların (cins, aile ve şube gibi) filogenetik analizi için kullanılmaktadır (71).

IGS bölgesi (transkript edilmeyen boşlukları kodlayan DNA) 18S, 5.8S, 25S-28S rRNA tekrarlarının kopyaları arasında bulunmaktadır. Bir 5S RNA geni IGS bölgesi içinde yer almaktadır. IGS bölgesinin uzunluğu iç tekrar sekanslarının sayısındaki varyasyondan dolayı değişmektedir; bundan dolayı bu bölgeler marker moleküller olarak iyi adaylardır. IGS bölgesi (fungal taksona bağlı olarak 2-5 kb uzunluğunda), ITS1 ve ITS2 bölgelerine benzemekle birlikte daha fazla genetik değişkenlik içermektedir. Bu durum IGS bölgesini fungal identifikasyon için diğer bir potansiyel hedef yapmaktadır (72).

Fungus çalışmalarında rDNA'nın kullanılması amacıyla rDNA'nın farklı bölgeleri için universal PCR primerleri keşfedilmiştir. Universal primerler rDNA'daki korunmuş sekansları hedef almaktadır. Fungal organizmaların rRNA gen bölgelerinin PCR amplifikasyonu ve sekanslanması için yaygın kullanılan çok sayıda rRNA, ITS ve IGS primeri bulunmaktadır (65).

Candida guilliermondii CBS 2030 (accession no: AM992960) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) ve *Pichia guilliermondii* ATCC 6260 (accession no: AY939792) suşlarının GenBank DNA sekans verileri (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) ve fungal organizmaların rRNA genlerinin organizasyonu (65) temel alınarak; *Candida (Pichia) guilliermondii* rRNA genlerinin fiziksel organizasyonu çizilerek Şekil 5’de gösterildi.



Şekil 5. *Candida guilliermondii* ribozomal RNA genlerinin organizasyonu (65)

Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CSLI), klinik laboratuvar uygulamalarında sekans analizini irdellemek için; DNA sekanslama kullanılarak identifiye edilen funguslar için yorumlama kriterlerini belirleyen "Hedef DNA sekanslama ile bakteri ve fungusların identifikasyonu (Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing)" başlıklı bir kılavuzu 2008 yılında yayınlamıştır. Bu kılavuz en yaygın DNA hedefininin (ITS bölgesi) sekanslanması yolu ile fungusların identifikasyonuna standardize bir yaklaşım sağlamaktadır. Kılavuzda primer dizaynı, amplifikasyon-sekanslamanın kalite kontrolü ve referans sekans veri tabanlarını kapsayan konular ele alınmaktadır (61).

Bilinmeyen fungal izolatların identifikasyonu, ABD’de "National Library of Medicine" tarafından yönetilen "GenBank" veya Hollanda’da "Centraalbureau voor Schimmelcultures" tarafından yönetilen "CBS" veritabanı gibi merkezi bir veritabanındaki sekanslar ile bu organizmanın kısmi DNA sekansı karşılaştırılarak yapılabilmektedir. GenBank saprofitik olanların yanında tıbbi önemi olan mantarlara ait binlerce DNA sekansı içermektedir. Daha kısıtlı CBS veritabanı ise fenotipik ve taksonomik olarak iyi valide edilmiş identifikasyona sahip izolatların sekanslarını içermektedir. MicroSeq D2 LSU fungal sekanslama sistemi (Applied Biosystems, Warrington, İngiltere) ticari olarak mevcut bir fungal identifikasyon sistemidir. Bu fungal sekanslama sistemi ribozomal büyük alt ünitenin D2 bölgesinin sekanslanması

için solüsyonlar, identifikasyon-analiz yazılımı ve fungal sekanslar için bir kütüphane sağlamaktadır. Moleküler identifikasyondaki gelişmeler ile sıklıkla izole edilen türlerin bazılarının grup veya tür kompleksi olduğu ve birçok gizli tür (cryptic species) varlığı açık hale gelmiştir (61).

4.1.5. Moleküler Genotiplendirme

Moleküler tiplendirme yöntemleri suş ilişkisinin analizinde (73), profilaksiye karar vermede (74) ve mikrobiyal populasyondaki genetik çeşitliliğı belirlemede gittikçe artarak kullanılmıştır (75). Bu amaçlar için farklı prensiplere dayalı moleküler tiplendirme yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler, tüm genomun RFLP'si (76), RFLP'ini takiben prob hibridizasyonu (77), PFGE-EK ve tüm genomun *Sfi*I (78), *Sma*I, *Not*I ve *Bss*HIII gibi nadir kesen restriksiyon endonükleazlar tarafından kesilmesi ile oluşan DNA fragmentlerinin pulse field jel elektroforezi (79), rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (RAPD) ile tüm genomun PCR parmak izi analizi (80) veya amplifiye fragment uzunluk polimorfizmi (AFLP) analizi (81), tekrarlayan sekans temelli PCR (rep-PCR) ile tekrarlayan sekansların parmak izi analizi (82) ve multi lokus sekans tipleme (MLST) ile house-keeping genlerin sekanslanmasını içermektedir (83). Moleküler tiplendirme yöntemleri tekrarlanabilir, ayırıcı, yüksek verimli, uygulaması kolay, dijital olarak taşınabilir ve standardizasyona ve kütüphane oluşturmaya uygun olmalıdır (84).

4.1.5.1. Pulse Field Jel Elektroforezi

Schwartz ve ark.'ları 1982'de 50 kb'dan daha büyük DNA moleküllerinin iki alternatif elektrik alanı kullanarak agaroz jel içerisinde ayrılabilceğı fikrini ortaya atmıştır. Bu prensibe dayalı cihazlar geliştirilmiş ve birkaç kilobaz (kb)'dan 10 megabaz (Mb)'a kadar DNA parçalarının ayrılabilceğı gösterilmiştir. Farklı PFGE tipleri vardır. Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields (CHEF), günümüzde bu amaçla en yaygın kullanılan ticari cihaz sistemidir. Pulsed field jel elektroforezi, bakteri ve funguslardan memeli hücrelerine kadar birçok organizma grubunda farklı amaçlarla kullanılmaktadır. (85).

Pulse field jel elektroforezi, direk olarak genom DNA'sının elektroforetik ayrılmasına veya restriksiyon endonükleazlarla genomun kesilmesi ile elde edilen

restriksiyon bant paternlerinin karşılaştırılması esasına dayanır. Restriksiyon enzimi kullanılmaksızın kromozomların elektroforetik ayrılması, kromozomal uzunluk polimorfizmi ya da EK olarak bilinmektedir. Çok iyi saflaştırılmış genomik DNA örneğinin ilgili türün genomunda nadir bulunan restriksiyon bölgelerini tanıyan restriksiyon endonükleazlarla kesilmesi ise PFGE-REAG olarak bilinmektedir. Kesim sonucu oluşan DNA parçaları agaroz jelde büyüklüğe bağlı olarak 'pulsed-field' elektroforezi ile ayrılır. Bu elektroforezde jel boyunca elektrik alanının yönü periyodik olarak değiştirilir. Ayrılmış DNA fragmentleri band olarak jelde gözlenir ve belli bir paterni şekillendirir (86).

Pulse field jel elektroforezi, klinik olarak önemli çeşitli bakteriler için moleküler tiplendirme yöntemleri arasında "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Günümüzde hala en sıklıkla salgınlarda bakteri izolatlarını karakterize etme yaklaşımı olarak kullanılmaktadır. PFGE'nin başarısı mükemmel ayırım gücü ve yüksek epidemiyolojik uyumunun sonucudur. Üstelik laboratuvar içi tekrarlanabilirlik ve mükemmel tiplendirme yeteneği ile kısmen pahalı olmayan bir yaklaşımdır. Son on yılda PFGE protokolleri standardize edilmiştir. Üstelik laboratuvarlar arası karşılaştırma PulseNet veya Harmony gibi çeşitli girişimler tarafından üstlenilmiştir (86).

Pulse field jel elektroforezi yönteminin belirgin bir avantajı araştırılan genomun büyük kısmına (>%90) hitap etmesidir. Dolayısıyla genomik DNA içindeki büyük rekombinasyon olaylarının yanı sıra hareketli genetik elementler de PFGE paterninde değişiklikliğe yol açar. Genellikle plazmit DNA'sı, tüm genomun restriksiyonu ile oluşan PFGE paternini etkilemez. Çünkü plazmit DNA'sının restriksiyonu ile oluşan fragmentler kesim profilini etkilemek için çok küçüktür. Büyük plazmitler (>50 kb) söz konusu olduğunda PFGE paternleri arasında tek bant farklılıkları gözlenir (86).

Pulse field jel elektroforezi yaygın şekilde kullanılmasına rağmen çeşitli kısıtlamalar içermektedir. Bu yöntem teknik olarak iddialı, emek yoğun ve zaman alıcıdır. Üstelik yaklaşık aynı büyüklükteki bantları (büyüklükleri %5'den daha az farklı olan DNA parçaları) ayırmak için yeterli ayırma gücüne sahip olmayabilir. PFGE sonuçlarının analizi subjektif olma eğilimindedir ve verilerin taşınabilirliği sekans temelli yöntemlerle karşılaştırıldığında sınırlıdır (86).

Multi lokus sekans tiplendirme gibi sekans temelli tiplendirme yöntemleri global fikir birliği ve popülerite kazanmasına rağmen yüksek ayırım gücü ile PFGE-REAG yaklaşımı salgın araştırmalarında hala yararlı ve maliyet etkin görünür. MLST gibi sekans temelli yöntemler güçlü bir karakterizasyon sistemi olduğundan ve merkezi bir veri tabanında verilerin depolanma olanağından dolayı tavsiye edilir. Bu büyük oranda standardizasyonu ve global epidemiyoloji için moleküler tiplendirme verilerinin uluslararası paylaşımını kolaylaştırır (87). Bu protokollerin uygulanması tür veya suş spesifik profillerin elde edilmesine izin vermektedir (87-89).

4.1.6 Epidemiyoloji ve Klinik Önem

Candida guilliermondii doğada geniş şekilde dağılmaktadır. Toprak, bitkilerden, böceklerden, deniz suyundan ve işlenmiş yiyeceklerden sıklıkla izole edilmesinin yanında insan deri ve mukozal yüzey mikroflorasının bir üyesidir. Bunların yanında fırsatçı insan patojeni olarak, kan dolaşımı enfeksiyonu gibi ciddi enfeksiyonların etkeni olarak da bildirilmiştir (1). *M. guilliermondii*, fenotipik identifikasyon ile filogenetik olarak yakın ilişkili olduğu türlerden tam olarak ayıramadığından ekolojisi de bazı belirsizliklerle sonuçlanmaktadır. Bu nedenle suşların moleküler yöntemlerle tanımlandığı bir çalışmada, *M. guilliermondii* suşları literatürle uyumlu habitatlardan izole edilmiştir (3).

Hastanede yatan hastalarda hastane kaynaklı enfeksiyon nedeni olarak fungal organizmaların rolü oldukça artmıştır. Ulusal Hastane Kaynaklı Enfeksiyon Sürveyansı (NNIS) verilerinde, *Candida* türleri hastane kaynaklı fungal enfeksiyonların %78.3'ünün, *Torulopsis* türleri %7.3'ünün ve *Aspergillus* türleri %1.3'ünün sebebi olarak bildirilmiştir. *C.albicans* izole edilen fungal patojenlerin yaklaşık %60'ını, diğer *Candida* türleri %19'unu ve diğer funguslar %21'ini oluşturmuştur. Hastane kaynaklı fungal enfeksiyonlar en sıklıkla üriner yol enfeksiyonları, cerrahi yara enfeksiyonları, pnömoni ve kan dolaşımı enfeksiyonu şeklindedir. *Candida* türleri hastane kaynaklı fungemilerin en sık nedenidir (32, 90). Başka bir çalışmada tüm hastane kaynaklı kandidal enfeksiyonların %58'ini kan dolaşımı enfeksiyonu, %17'sini steril vücut sıvıları enfeksiyonu ve %16'sını yara enfeksiyonları oluşturmuştur (91). Hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarının %5-9'undan *Candida* türlerinin sorumlu olduğu belirtilmiştir (92-94). *Candida* türleri 1990'larda hastane kaynaklı kan dolaşımı

enfeksiyonlarının 4. en sık nedeni iken günümüzde 3. en sık nedeni olarak bildirilmektedir (95).

Kandidemiye neden olan *Candida* türleri arasında non-*albicans Candida* türlerinin oranı artış göstermektedir. Non-*albicans Candida* türleri tüm kandidemilerin %10-65'ine neden olmaktadır. En yaygın non-*albicans Candida* türleri *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* ve *C. glabrata* türleridir. Ancak *C. lusitaniae* ve *C. guilliermondii* yeni ortaya çıkan iki tür olarak karşımıza çıkmaktadır (22).

ARTEMIS DISK Antifungal Sürveyans Programı kapsamında 2001-2003 yılları arasında 127 tıp merkezinden toplanan 75,761 *Candida* izolatının 1029'unun (%1.4) *C. guilliermondii* olduğu bildirilmiştir (26). Klinik maya izolatları arasında *C. guilliermondii*'nin izolasyon sıklığının yaklaşık %2 olduğu görülmektedir. *C. guilliermondii* bütün kandidemilerin de yaklaşık %2'sinden sorumludur (19-27, 29-31) ancak İtalya, Brezilya ve Hindistan gibi belli coğrafik alanlarda bu oran sırasıyla %11.7, %43 ve %85.4 olarak bildirilmiştir (28, 40, 42). Ülkemizden bildirilen bir çalışmada 2009 yılında kan kültürlerinden izole edilen 19 *Candida* izolatı arasında 3 *C. guilliermondii* izolatı tesbit edilmiş ve *C. guilliermondii*'nin kandidemi izolatlarının %16'sını oluşturduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada 2010, 2011 ve 2012 yıllarında kan kültürlerinden bu türün izolasyonu gerçekleşmemiştir (96). Bu sonuçlarla *C. guilliermondii*, tüm kandidemilerin yalnızca küçük bir yüzdesinden sorumlu, yeni ortaya çıkan, nadir patojen olarak tanımlanmıştır. Sonuç olarak, *C. guilliermondii* invaziv fungal enfeksiyonların nedeni olarak nadiren görülmektedir (19-31).

Candida guilliermondii enfeksiyonlarının çoğu kanser hastalarında görülen fungemilerdir (20, 22, 28, 34-38) Pediatrik popülasyonda da fungemiler ve fungemi yalancı salgınları bildirilmiştir (41, 30, 42). Çoğunlukla patojen farz edilen bu maya türü birçok çalışmada kan kültüründen izole edilmekle birlikte diğer steril vücut sıvılarından, deri ve yumuşak doku örneklerinden, idrardan, genital ve solunum yolu örneklerinden ve tırnaktan da izole edilmiştir (26, 38). Ayrıca karın içi asit sıvısından ve özofajiyal biyopsiden izole edilmiştir (33).

Literatür genelinde, *C. guilliermondii*'nin hastane kaynaklı salgınlara neden olduğu rapor edilmiştir. *C. guilliermondii*'nin neden olduğu hastane kaynaklı ilk salgın İsrail'den, pediatrik popülasyonda bildirilmiştir. Üç haftalık süreçte neonatal yoğun

bakım birimi infantlarının (n:14) ve yenidoğan birimi bebeklerinin (n:3) kanlarından *C. guilliermondii* izole edilmiştir. Birçok infant pozitif kan kültürü tespiti nedeni ile ciddi perinatal koşullarda günlerce veya haftalarca hastanede yatırılmıştır. Durumu kritik iki infant antifungal tedavi almıştır. Üstelik infantların bazılarının (n:7) kan örneklerinin alındığı gün doğduğu tesbit edilmiştir. Bu durum yalancı salgın şüphesi doğurmuş ve yapılan sürveyans kültürleri sonucunda kan alma işlemi sırasında kullanılan heparinin sulandırıldığı viallerden *C. guilliermondii* izole edilmiştir. Sonuçta bu durum, infantlarda yalancı enfeksiyonun belirlenebilmesinin güçlüğü, salgın şüpheli durumlarda yapılacak araştırma ve müdahalelerin önemini, mayanın deri florasında saprofit olarak bulunduğunu ve patojen olmadığı düşünülerek bu türe karşı koruyucu önlemlerin alınmamasının doğurduğu sonuçlara dikkat çekmiştir (41).

Brezilya'daki bir üniversite hastanesinde *C. guilliermondii*'nin çevresel yayılımına dikkat çeken bir fungemi "yalancı salgını" tanımlanmıştır. Bu maya türü sistemik enfeksiyon bulguları olmaksızın, çoğunlukla pediatri hastaları olmak üzere hastanenin farklı bölümlerindeki hastaların kan örneklerinde tespit edilmiş; aynı maya türü hemşirelerin deri ve tırnaklarının yanı sıra çevresel yüzeylerden de izole edilmiştir. İzole edilen tüm suşlar moleküler epidemiyolojik açıdan incelendiğinde hasta izolatu olmayan izolatların bazıları, hastalardan birinin izolatu ile genotipik olarak yakın ilişkili tesbit edilmiştir. Bu durum örnek toplama işlemi sırasında yapılan hataların hasta örneklerinin kontaminasyonuna neden olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada bir yıllık bir zaman aralığında kan örneklerinin %43'ünden *C. guilliermondii* izole edilmiştir (40).

Hindistan'dan bildirilen başka bir çalışmada, pediatrik popülasyondan başka bir fungemi yalancı salgını bildirilmiştir. Neonatal yoğun bakım ünitesinde 22 haftalık süreçte alınan kan kültürlerinin 43 (%47.7)'ünden *Candida* izole edilmiştir. Bu *Candida* izolatlarının 41 (%85.4)'i *C. guilliermondii* olarak tanımlanmıştır. Kan kültürlerinde *C. guilliermondii* üreyen hastalarda fungemi belirtileri gözlenmemiş ve bütün hastalar antifungal tedavi olmaksızın iyileşmiştir. Bu durum *C. guilliermondii* fungemilerinin yalancı salgın olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Yalancı salgın etkeninin kaynağını saptamak amacıyla yapılan sürveyans kültürlerinde bazı sağlık çalışanlarının el ve tırnakları ile intravenöz setlerden bu tür izole edilmiştir. Hastalar arasındaki bulaşın

muktemelen uygunsuz hijyen koşullarından, yetersiz el yıkama ve hastadan hastaya geçişlerde eldiven değiştirmemekten kaynaklandığı düşünülmüştür (42).

Candida guilliermondii'nin neden olduğu başka hastane kaynaklı salgınlar da bildirilmiştir. İtalya'da iki hastalık süreçte, 5 cerrahi hastasında *C. guilliermondii*'nin neden olduğu fungemi tespit edilmiştir. Tüm hastalar vasküler kataterin uzaklaştırılması ve flukonazol ile başarılı şekilde tedavi edilmiştir. Klinik veya çevresel bir salgın kaynağı tanımlanmamıştır. Ancak izolatların ortak bir RAPD paternini paylaştığı belirlenmiştir. Hastane kaynaklı bulaş, enfeksiyon kontrol önlemlerinin güçlendirilmesi ile durdurulmuştur (39).

İtalya'da 22 yıllık zaman aralığının değerlendirildiği bir çalışmada, *C. guilliermondii* 243 kandidemi epizotunun 29 (%11.7)'undan izole edilmiştir. İzolatların genotiplendirmesinin RAPD analizini ile yapıldığı çalışmada ortak bir enfeksiyon kaynağı tesbit edilmemiştir (28).

Candida guilliermondii'nin nadiren kutanöz ve subkutanöz enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (2). Amfoterisin B tedavisine rağmen ölen bir hastada *C. guilliermondii*'nin etken olduğu dissemine kandidiyazis vakası bildirilmiştir. Suş amfoterisin B'ye in vitro olarak da dirençli bulunmuştur (97). *C. guilliermondii* ve iki oral bakteri türünün tanımlandığı polimikrobiyal enfeksiyondan kaynaklı dento-alveolar apse vakası bildirilmiştir. Daha önce *Candida* kaynaklı bir odontojenik apse vakası bildirilmiştir (58). Aplastik anemili bir hastada yüksek doz amfoterisin B tedavisine rağmen gelişen pürülan perikarditis ilişkili dissemine *C. guilliermondii* vakası bildirilmiştir (98). Amfoterisin B ve flukonazol tedavisine rağmen gelişmiş *C. guilliermondii*'nin etken olduğu kristalin keratopati bildirilmiştir (99).

Candida guilliermondii'nin etken olduğu, parmakta osteomyelit vakası rapor edilmiştir. Üstelik bu suş flukonazol dirençli bulunmuştur. Enfeksiyon uzatılmış flukonazol tedavisine yanıt vermemiş ve sonuçta etkilenen parmağın amputasyonuna gerek duyulmuştur. Enfekte kemikten elde edilen *C. guilliermondii* izolatu flukonazol ve itrakonazol dirençli tesbit edilmiştir (100). *C. guilliermondii*, yapılan çok merkezli bir çalışmada *C. parapsilosis* ve *C. albicans*'dan sonra onikomikoz enfeksiyonlarından en sıklıkla izole edilen maya türü olmuştur. *C. guilliermondii* tüm onikomikoz etkenlerinin %2.3'ünü oluşturmuştur (101).

Candida guilliermondii, gingivitis ve periodontitis görülen bağışık yetmezliği olmayan bireylerin subgingival biyofilm örneklerinde *C. albicans* ve *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* ve *C. tropicalis* ile birlikte en sık izole edilen maya türleri arasında tesbit edilmiştir. Üstelik yalnızca *C. dubliniensis* ve *C. guilliermondii* izolatları azollere dirençli bildirilmiştir (29).

Eklemin primer *Candida* enfeksiyonu ile ilgili yalnızca birkaç vaka bildirilmiştir. Genellikle cerrahi gibi travmatik işlemler sırasında fungusun kazara bulaşı sonucu oluşmaktadır ve hastalarda immünsüpresyon, malignensi ve madde bağımlılığı gibi predispozan faktörler rapor edilmiştir. Ancak dejeneratif osteoartrit tanısı konan bir hastada travmatik prosedür ve predispozon faktör olmaksızın diz eklemine primer *C. guilliermondii* enfeksiyonu rapor edilmiştir (102).

Candida guilliermondii ile ilişkili klinik sendromlar Tablo 4’de görülmektedir (20-22, 26, 28, 29, 30, 32-35, 37-40, 58, 97, 100, 103).

Tablo 4. *Candida guilliermondii* ilişkili klinik sendromlar

Kronik onikomikoz
Dental araç ilişkili (subgingival biyofilmler) periodontitis
Hastane veya ev kaynaklı kandidemi
Katater girişinde selülit
Akut osteomiyelit
Septik artrit
Endokardit
Cilt lezyonları
Çoklu organ yetmezlikli dissemine kandidiyazis
Sessiz kandidiüri
Rekürren vulvovajinal kandidiyazis
Dento-alveolar abse ¹

¹ *C. guilliermondii* ’nin patojenik rolü tahmini (20-22, 26, 28, 29, 30, 32-35, 37-40, 58, 97, 100, 103)

Candida guilliermondii’nin neden olduğu enfeksiyonların risk faktörleri ve bu enfeksiyonlara eşlik eden tıbbi durumlar Tablo 5’de rapor edilmiştir (20-22, 26, 28, 29, 30, 32-35, 37-40, 58, 97, 100, 103).

Tablo 5. *Candida guilliermondii* enfeksiyonlarının risk faktörleri ve eşlik eden tıbbi durumlar

Solid tümörler
Hematolojik kanserler
Graft versus host hastalığı (GvHD)
AIDS
Tedaviler [antibiyotikler, steroidler, antifungallerin uzun dönem kullanımı (çoğunlukla flukonazol, amfoterisin B, nistatin, kaspofungin), bağışıklık sistemini baskılayan tedavi, kemoterapi, allojenik kan kök hücre nakli, olog kan kök hücre nakli]
Bakteriyemi
Nötropeni
Damar içi kataterler ve dental araçlar
Hasta veya hasta ile ilişkili kişilerin vasküler katatere teması
Total parenteral beslenme
Hastanede yatma, özellikle cerrahi ve neonatal yoğun bakım birimlerinde yatma
Aynı organizma ile kolonizasyon
Hastadan hastaya bulaş
Cerrahi
Sekonder pulmoner hipertansiyon
Supraventriküler aritmi
Kolesistektomi
Peritoneal diyaliz
Prematüre olma
Short bowel sendromu
Gastrik ülser tedavisi ilişkili alkalileşme ¹

¹Tahmini risk faktörü (20-22, 26, 28, 29, 30, 32-35, 37-40, 58, 97, 100, 103)

Sistemik fungal enfeksiyonların bağışık yetmezliği olan konaklarda, özellikle kanser hastalarında sıklıkla ölümcül olduğu bilinmektedir. Fungemili hastaların %29'unun ve diğer patojenlerden kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlu hastaların %17'sinin hastanede yatışları esnasında öldüğü belirtilmiştir (32). Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Organizasyonu (EORTC)'nin İnvaziv Fungal Enfeksiyon Grup (IFIG)'u tarafından yapılan çok merkezli prospektif çalışmada, değerlendirilen 249 kanser hastasının 97 (%39)'sinin kandidemi başlangıcından sonra öldüğü tesbit edilmiştir. Hastaların 21 (%8)'inde ölümden direkt olarak kandidemi sorumlu tutulmuş; 40 (%16) hastada ise fungal enfeksiyon ölüm nedeni (altta yatan primer hastalık, eşlik eden fungal olmayan enfeksiyon, hemoraji) ile ilişkili düşünülmüştür. Bu çalışmada kandidemi ilişkili mortalite oranı %24 bulunmuştur. Bu yüzden kandideminin primer veya sekonder olarak ölümlerin 2/3'ünde rol oynadığı görülmektedir (21). Literatürde sözü geçen *C. guilliermondii* fungemili 25 hasta değerlendirilerek; bu türün ölümle sonuçlanan sistemik fungal enfeksiyonlara neden olabildiği belirtilmiştir. *C. guilliermondii*'nin mortaliteye katkısı (%16), *C. albicans*'ın mortalitesinden (%40-60)

düşük bulunmuştur (20). Klinik örneklerinden *C. guilliermondii* izole edilen 8 vakanın bulunduğu bir çalışmada ise bu etkenin neden olduğu ölüm bildirilmemiştir (33). *C. guilliermondii* fungemili 47 hastanın değerlendirildiği başka bir çalışmada ise mortalite oranı %45 olarak belirlenmiştir (34).

Candida guilliermondii izolatlarının coğrafik bölgelere göre dağılımı değerlendirilmiştir. ARTEMİS DISK Antifungal Sürveyans Programı'nın bir parçası olarak 2001-2003 yılları süresince 127 tıp merkezinden toplanan klinik *Candida* izolatu sayısının 75.761 olduğu çalışmada, toplam 1029 (%1.4) *C. guilliermondii* izolatu tanımlanmıştır. Asya-Pasifik'den gelen *Candida* izolatlarının 190 (%1.1)'i, Avrupa'dan gelen *Candida* izolatlarının 392 (%1.0)'si, Latin Amerika'dan gelen *Candida* izolatlarının 413 (%3.7)'ü ve Kuzey Amerika'dan gelen *Candida* izolatlarının 34 (%0.6)'ü *C. guilliermondii* olarak tanımlanmıştır. *C. guilliermondii* en sık Latin Amerika'dan gelen *Candida* izolatları arasında tesbit edilmiştir (26).

4.1.7. Antifungal Duyarlılık ve Tedavi

4.1.7.1. Azoller

Candida guilliermondii'de flukonazol duyarlılığı *C. albicans* ile karşılaştırıldığında (sırasıyla %75.2 ve %97.8) daha düşüktür. Ancak *C. guilliermondii* flukonazole *C. glabrata* (%81.7) ve *C. krusei*'den (%83.2) daha duyarlıdır. Ayrıca bu türde itraconazol duyarlılığı flukonazol duyarlılığından daha düşük tesbit edilmiştir. Flukonazol dermatoloji ve cerrahi servisleri hastalarının örneklerinden elde edilen izolatlara karşı daha zayıf aktiviteye sahiptir. Deri enfeksiyonlarını tedavi etmede kullanılan oral ve topikal azollerin sık kullanımı bu duruma katkı sağlamış olabileceği düşünülmektedir. Vorikonazol *C. guilliermondii*'ye karşı flukonazolden daha etkilidir. Azoller arasındaki en etkili molekül vorikonazol kabul edilmektedir. Suşların çoğu pan-azol duyarlılığı göstermektedir (22, 26, 28, 29, 34, 104-117).

Tablo 6. *Candida guilliermondii*'nin antifungal duyarlılık oranları

Flukonazol
Duyarlılık %75.2-94.11 (MİK $\leq$ 8)
Doz bağımlı duyarlılık %2.94 - 100 (MİK: 16-32)
İtrakonazol
Duyarlılık %10-94.1 (MİK $\leq$ 0.125)
Doz bağımlı duyarlılık %2.94 (MİK: 0.25 - 0.5)
Vorikonazol
Duyarlılık %91.2-100 (MİK $\leq$ 1)
Doz bağımlı duyarlılık %2.94 - 3.9 (MİK: 2)
Posakonazol
Duyarlılık %94-96 (MİK $\leq$ 1)
Doz bağımlı duyarlılık %0.0
Amfoterisin B
Duyarlılık %97-100 (MİK $\leq$ 1)
Kaspofungin, anidulafungin ve mikafungin
Duyarlılık %33-100 (MİK $\leq$ 2)
Flusitozin
Duyarlılık %86-100 (MİK $\leq$ 4)

(1)

Azollere çapraz direnç bildirilmiştir. Flukonazol ve itrakonazol dirençli bir izolat, flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol dirençli bir izolat, vorikonazol ve posakonazol dirençli üç izolat bildirilmiştir (38, 100, 109, 117). Azol direncine efluks pompalarındaki ve azollerin hedef enzimindeki (14 α -demetilaz) değişikliklerin neden olduğu tahmin edilmektedir (1).

4.1.7.2. Polyenler

Bu maya türü (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* ve *C. rugosa* ile birlikte) polyenlere intrensik olarak diğer *Candida* türlerinden daha az duyarlı olmasına (polyen toleran olarak ifade edilmiştir) rağmen birçok *C. guilliermondii* suşu amfoterisin B duyarlılığı göstermektedir (20, 22, 26, 28, 97, 110, 111, 113, 114, 118-122).

4.1.7.3. Ekinokandinler

Candida guilliermondii'nin intrensik olarak ekinokandinlere düşük duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir. Bu tür *C. parapsilosis* ile birlikte en az ekinokandin duyarlı maya olarak etikenlenmiştir. Özellikle kaspofungin, anidulafungin ve mikafungin için MİK değerleri *C. guilliermondii* ve *C. parapsilosis* için diğer *Candida* türlerinden 2-100

kat daha yüksek olarak bilinmektedir. *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*'den daha yüksek MİK değerlerine sahiptir. Ancak ekinokandinler *C. guilliermondii*'ye karşı nadiren test edilmiştir (28, 37, 119, 123-125)

Doğal ve kazanılmış ekinokandin direnci bu türde yalnızca sporadik olarak gözlenmiştir. Bir ekinokandin bileşiğine direnç gözleendiği zaman bu antifungal sınıfı içinde çapraz reaksiyon beklenmektedir (28, 37, 109, 115, 117, 119, 126, 127).

Ekinokandinlerde yüksek MİK ile klinik sonuç arasında zayıf korelasyon gözlenmiştir. Bu durum muhtemelen MİK'in altına düşen kan konsantrasyonlarında bile ekinokandinin renal devamlılığından kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak in vivo olarak in vitro'dan daha fazla antifungal etki gözlenebilir. Ancak oküler ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonları istisnadır. Çünkü böyle dokularda yeterli serbest ilaç düzeylerine hızlı ulaşamaz (1).

Amfoterisin B ve ekinokandinlerle tedavi edilen bağışık yetmezliği olan konaklarda, bu ilaçlara duyarlılığı düşük olarak bilinen mayalarla (*C. guilliermondii*'yi de içeren) breakthrough fungemiler vuku bulabilir. Böyle türlerle kolonizasyon durumunda alternatif bir antifungal ile yerdeğiştirme önerilebilir (37).

4.1.7.4. Flusitozin

Candida guilliermondii'ye karşı 5-flusitozin aktivitesi ile ilgili olarak, izolatların çoğunun ilaca duyarlı olduğunu belirten az sayıda çalışma bulunmaktadır (39, 113).

Tedavi, duyarlılık testlerinin sonuçları ile en iyi şekilde yönlendirilmelidir. Birçok non-*albicans Candida* türü için in vitro duyarlılık testleri ve yabancı cismin uzaklaştırılması tedavide birlikte uygulanmalıdır (22).

4.1.8. Virülans ve Patojenite Özellikleri

Konak hücreye invazyon, öncelikle penetrasyonu ve hücre zarının hasarını gerektirir. Bu hasar büyük olasılıkla fiziksel ve/veya enzimatik yoldan gerçekleşmektedir. Mantarlar, konağın hücre zarlarında işlev bozukluğuna sebep olarak dokuda ilerlemelerine yani invazyona yardımcı olan enzimler oluşturmaktadırlar. Zarların yapısında bulunan temel bileşenler olan lipid ve proteinler bu enzimlerin hedefidir. Mantarların salgıladığı ve patogenezele ilişkili olduğu düşünülen enzimler,

peptid bağlarını hidrolizleyen proteinazlar ve fosfogliseridleri hidrolizleyen fosfolipazlar ile lizofosfogliseridleri hidrolizleyen lizofosfolipazlar olmak üzere iki ana grupta toplanmaktadır (44, 45).

4.1.8.1. Salgı Aspartik Proteaz Enziminin Genel Özellikleri

Candida proteaz enzimi için asit proteaz, karboksil proteaz, aspartik proteaz gibi farklı adlandırmalar kullanılmıştır. Salgı aspartik proteaz günümüzde kabul gören adlandırmadır (44, 45). *Candida* cinsinin hidrolitik enzimleri arasında en iyi tanımlanmış olan salgı aspartik proteaz (Sap) enzimidir (128). Blank ve ark.'ları 1957 yılında *Candida* türlerinin üremek için nitrojen kaynağı olarak keratinden yararlanabilme yeteneğine sahip olduğunu keşfetmişlerdir. Bu bulgu hücre dışı proteolitik aktivite olasılığını düşündürmüştür (129). İlk kez Staib, 1965 yılında *C. albicans* suşlarında Sap üretimini tesbit etmiştir. *C. albicans* ve diğer bazı *Candida* türleri, tek nitrojen kaynağı olarak protein içeren besiyerlerinde çoğaldıklarında proteaz salgırlar. Sap enziminin sentezlendikten hemen sonra hücre dışına salındığı gösterilmiştir (45). *Candida* aspartik proteaz aktivitesi asit pH'da gerçekleşmektedir (47, 48).

Salgı aspartik proteaz'ın geniş bir substrat özgüllüğüne sahip olduğu görülmüştür. *Candida* proteazının albümin, hemoglobin, kazein, keratin, kollajen, laktoferrin, laktoperoksidaz ve musini parçaladığı in vitro çalışmalarla tespit edilmiştir. Hücre dışına salınan enzimin aktivitesi, bu proteinlerin bulunduğu basit agar besiyerlerinde, triklor-asetik asit gibi çözücülerde çözünebilir ürünlerin ölçümüne dayanan yöntemler ile saptanabilmektedir (47, 48, 131-133).

Enzim glikoprotein yapısındadır. Enzimin en güçlü ve özgül olarak, bir karboksil peptidaz inhibitörü olan pepstatin tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (132).

C. albicans, *C. tropicalis* ve *C. parapsilosis* aspartik proteazlarının moleküler ağırlığı farklıdır ancak antijenik özellikleri benzerdir. Biyokimyasal farklılıklar gösterebilen bu izoenzimler, patolojik aktiviteleri açısından fark göstermemektedir (134).

4.1.8.2. Salgı Aspartik Proteaz Enziminin Virölans Özellikleri

Salgı aspartik proteaz enziminin virölans faktörü olarak değerlendirildiği çalışmalar genellikle *C. albicans* suşlarında yapılmıştır. En fazla *C. albicans*'da olmak üzere, daha az derecede *C. tropicalis*'de, orta derecede *C. parapsilosis* suşlarında olmak üzere yalnızca en patojen *Candida* türleri tarafından salgılanmaktadır. Klinikle ilişkili diğer *Candida* türleri, hücre dışı proteaz üretmiyor gibi görünmektedir. Bu durum *Candida* türlerinin virölans sıralamasına yansımaktadır (45).

Proteaz pozitif suşlar farelerde öldürücü olurken, proteaz negatif suşların öldürücü olmadığı tesbit edilmiştir (135). Başka bir çalışmada, yalnızca proteaz üreten *C. albicans* suşlarının civciv koryoallantoik membranına invazyon yaptıkları gösterilmiştir. Konak dokusunda *Candida* proteazının varlığı ve kandidozlu hastaların serumlarında aspartik proteaza karşı yüksek titrede özgül antikorlar saptanmıştır. Bu bulgu, enzimin in vivo salgılandığını ve *Candida* enfeksiyonunun patogeneğinde önemli rolü olduğunu kuvvetle desteklemektedir. Yapılan çalışmaların çoğunun sonuçları hücre dışı proteazın *Candida* suşlarının virölans ve patojenite derecesinde önemli bir faktör olduğunu göstermiştir (136). Bir diğer çalışmada proteolitik aktivitenin miktarı ile *C. albicans* suşlarının invazivliği arasında korelasyon kurulamamıştır (101).

Candida parapsilosis'in deri ve kan izolatlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, kutanöz izolatların hepsinin Sap aktivitesi gösterdiği, kan izolatlarının ise bir kısmının Sap aktivitesi gösterdiği; deri izolatlarının enzim aktivitesinin 4 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır. (137). *Candida* vajinitli HIV+ kadınların, HIV+ *Candida* taşıyıcısı ve HIV- *Candida* vajinitli kadınlardan anlamlı derecede daha yüksek Sap düzeyi gösteren suşlarla enfekte oldukları bildirilmiştir (138).

Test edilen *Candida* proteazlarının çoğunun IgG'yi ve mukoz membranların major Ig'i olan salgısal IgA'yı parçaladığı belirlenmiştir. Ayrıca aspartik proteaz üreten *C. albicans* suşlarının, üretmeyen suşlara oranla daha zor fagosit olduğu gözlenmiştir (136).

Candida guilliermondii'nin SAP gen ailesine sahip olduğu bilinmesine rağmen (46) *C. guilliermondii* izolatlarında salgı aspartik proteaz aktivitesi çalışmaları, az

sayıda izolat ile yapılmış birkaç çalışmadan ibarettir. Bu çalışmalar ile türe ait izolatlarda enzim aktivitesi saptanamamış ya da düşük düzeyde saptanmıştır (6, 47-49).

4.1.9. Biyoteknolojik Uygulamalar

4.1.9.1. Riboflavin

Riboflavin (RF, B₂ vitamini) kullanım çeşitliliği ile önemli bir biyoteknolojik üründür. Yaygın şekilde gıda katkısı olarak kullanılmasının yanında çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç olarak ve bazı içeceklerde renklendirici (sarı renk) olarak kullanılmaktadır (139).

Candida guilliermondii, RF üretimi için model organizmadır (139-142). *C. guilliermondii*'nin demir sınırlandırması altında aşırı RF üretme yeteneği ilk olarak 1945'de tanımlanmıştır. Bu tarihten itibaren aynı özellik "flavinojenik mayalar" olarak bilinen başka maya türlerinde de tanımlanmıştır (143, 144). Demir sınırlandırması altında RF atılımı, çözünmeyen Fe⁺³'ün daha çözünür Fe⁺²'ye enzimatik olmayan indirgenme reaksiyonunda rol oynar ve bu şekilde hücreler ilave bir demir kaynağı sağlar (139).

4.1.9.2. Ksilitol

Ksilitol özellikle şekerlerde, sakız ve diş macununda tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Ksilitol tat olarak sukrozla aynıdır. *C. guilliermondii* ksiloz'un ksilitol'e biyolojik dönüşümü için en etkili organizmalardan biri olarak görülmektedir. Farklı kaynaklardan elde edilen *C. guilliermondii* suşları, suştan suşa oldukça değişmekle birlikte yüksek miktarda ksilitol ürünü oluşturmaktadır. Bazı *C. guilliermondii* suşları eş zamanlı olarak hem ksilitol hem de RF üretmektedir. Ksilitol geleneksel olarak huş ağacı odunundan kimyasal bir işlem ile üretilmektedir ve kısmen pahalıdır. Biyolojik dönüşüm işleminin daha ekonomik bir alternatif sunabileceği belirtilmektedir (145-148).

4.1.9.3. Endüstriyel Enzimler

Candida guilliermondii endüstriyel olarak önemli enzimlerin umut vaat eden üreticisi konumundadır. İnülinaz'ın en aktif üreticileridir (149-151). İnülinaz, inülin'i

fruktoz şurubuna, sonrasında ise biyoetanol ve inülo-oligosakkaritlere dönüştürülebilmektedir (152).

Candida guilliermondii amilaz üretmektedir. Belli koşullar altında atıklardan etanol sentezleyebilmektedir (153). *C. guilliermondii* ve *S. cerevisiae*'nin protoplast füzyonu ile elde edilen hibrid, ksiloz ve selobiyoz'u etanole fermante edebilir (154). *C. guilliermondii*'nin bazı doğal izolatları ramnosidaz enziminin zengin bir kaynağıdır. Bu enzim ramnoz üretiminde ve şarap yapımı sırasında üzüm işlemede kullanılmaktadır (155, 156). *C. guilliermondii* izolatları tarafından nitrilaz (157) ve fitaz (158) gibi endüstriyel olarak önemli başka enzimlerin de üretildiği rapor edilmektedir.

4.1.9.4 Bitki Patojenlerinin Biyolojik Kontrolü

Candida guilliermondii izolatlarının bazıları, sebze ve meyvelerin depolanma sırasında bozulmalarına neden olan hasat sonrası mantar hastalıklarının biyolojik kontrolünde (bitki hastalıklarını baskılamak için mikrobiyal antogonistlerin kullanımı) önemli bir potansiyel göstermektedir. Hasat sonrası bozulma büyük bir ekonomik öneme sahiptir. Çünkü hasatlanmış sebze ve meyvaların %20-25'idir. Bu maya aracılı biyolojik kontrol, fungisid muamelesine alternatif potansiyel teknik olarak ortaya çıkmaktadır (159-161).

Candida guilliermondii'nin biyolojik kontrol ajanı olarak kullanımı ilk kez 1991'de tanımlanmıştır (162). *C. guilliermondii*, hasat sonrası meyve çürütücü *Botrytis cinerea* ve *Penicillium expansum* mantarlarından elmaları korumak için kullanılmıştır. O günden bu yana çeşitli suşlar izole edilmiş ve çok sayıda bitki patojeninin neden olduğu hasat sonrası hastalıklardan korunmak için hasatlanmış çeşitli ürünlere yapay olarak uygulanmıştır. *C. guilliermondii* domates kök-ur nematodu *Meloidogyne incognita*'e öldürücü etkiye sahiptir (163).

Candida guilliermondii'nin besin yarışı yolu ile patojenik mantarları kontrol ettiği düşünülmektedir. *C. guilliermondii* antagonizmi, diğer antagonist mayalarda gözlenen patojenik mantarlara karşı öldürücü toksin üretimini kapsamaz (164). *C. guilliermondii* bazı bitkilerde (domates ve yeni dünyada) bitki savunma enzimlerinde aktivasyon ile hastalık direncine neden olmaktadır (165, 166).

4.1.9.5. Biyoremidasyon

Tek karbon ve enerji kaynağı olarak alkan'larda çoğalabilen oldukça nadir bir maya türüdür. Bu nedenle hidrokarbon kirleticilerin parçalanması için kullanılabilir (167). Asit hidrolizi ile elde edilen hemiselülozik hidrolizatı bile enerji kaynağı olarak kullanabilme yeteneğindedir (168, 169, 146). Biyoyakıt (170) ve aroma (171) üretimi açısından potansiyel kabul edilmektedir. Krom iyonlarına oldukça dirençlidir (172, 173).

Tablo 7. Çeşitli CTG klad türleri için klinik önem, biyoteknolojik uygulama, biyolojik kontrol potansiyeli, genom sekansı ve moleküler araç bilgileri

Tür	Klinik önem	Biyoteknolojik uygulama	Biyolojik kontrol	Genom sekansı	Moleküler araçlar
<i>Candida albicans</i>	++++	-	-	Mevcut ^a	++++
<i>Candida parapsilosis</i>	+++	+	-	Mevcut ^a	+++
<i>Candida tropicalis</i>	+++	++	-	Mevcut ^a	++
<i>Candida dubliniensis</i>	++	-	-	Mevcut ^a	++
<i>Candida lusitanae</i>	++	-	-	Mevcut ^a	+
<i>Candida guilliermondii</i>	++	+++	+++	Mevcut ^a	+++
<i>Candida famata</i>	+	+++	+	Mevcut ^a	++
<i>Candida rugosa</i>	+	++	-	-	+
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	+	-	-	Mevcut ^a	+
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	-	++++	-	Mevcut ^b	+++
<i>Candida maltosa</i>	-	++	+	-	++
<i>Candida oleophila</i>	-	-	++++	-	+

^a http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/candida_group/MultiHome.html

^b <http://www.genome.jp/kegg/genome.html> (57)

Çeşitli CTG klad türleri için klinik önem, biyoteknolojik uygulama, biyolojik kontrol potansiyeli, genom sekansı ve moleküler araç bilgilerinin karşılaştırılması Tablo 7'de görülmektedir (57).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Çalışma Grubu İzolatları

Bu çalışmada, Karadeniz Teknik üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarı'na Ocak 2006-Aralık 2012 tarihleri arasındaki 7 yıl süresince gönderilen 119 hastaya ait farklı örneklerden (klinik ve sürveyans) izole edilen toplam 136 *Meyerozyma guilliermondii* izolatı kullanıldı.

Her hastanın klinik örneklerinden ilk izole edilen *M. guilliermondii* izolatı çalışmaya katıldı. Aynı hastaya ait ardışık örneklerden ≥ 4 hafta aralıklarla izole edilen izolatlar farklı fungemi epizotlarına ait kabul edilerek (174) her epizotu temsil eden bir izolat çalışmaya dahil edildi.

Meyerozyma guilliermondii çalışma grubu izolatlarının hasta no, izolat kodu, izolasyon tarihi, örnek tipi, örneğin gönderildiği servis bilgileri Tablo 8'de belirtildi.

Tablo 8. *Meyerozyma guilliermondii* çalışma grubu izolatlarının izolasyon tarihi, örnek tipi ve servis bilgileri

Hasta no	İzolat kodu	İzolasyon tarihi	Örnek tipi	Örneğin gönderildiği servis
1	C-579	12.07.2006	Kan	Pediyatrik Hematoloji Servisi
2	C-569	28.07.2006	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
3	C-610	21.08.2006	Kan	Dahiliye Onkoloji Servisi
4	C-650	31.01.2007	Kan	Pediyatri Süt Çocuğu Servisi
5	C-749	15.11.2007	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
6	C-787	26.04.2008	Kan	Pediyatrik Hematoloji Onkoloji Servisi
7	C-840	28.12.2008	Kan	Dahiliye Onkoloji Servisi
8	C-875	26.05.2009	Kan	Pediyatri Süt Çocuğu Servisi
9	C-873	11.06.2009	Kan	Pediyatri Süt Çocuğu Servisi
10	C-878	27.07.2009	Kan	Dahiliye Yoğun Bakım Servisi
11	C-877	27.07.2009	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
12	C-876	29.07.2009	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
13	C-919	14.08.2009	Kan	Pediyatri Süt Çocuğu Servisi
14	C-918	16.08.2009	Kan	Kardiyoloji Servisi
15	C-921	17.08.2009	Kan	Göğüs Hastalıkları Servisi
16	C-922	27.08.2009	Kan	Pediyatrik Cerrahi Servisi
17	C-890	31.08.2009	Kan	Anestezi Yoğun Bakım Servisi
18	C-914	01.09.2009	Kan	Anestezi Yoğun Bakım Servisi
19	C-892	18.09.2009	Kan	Pediyatrik Hematoloji Onkoloji Servisi

Tablo 8'in devamı

20	C-897	25.09.2009	Katater kanı	Kardiyoloji Servisi
21	C-888	28.09.2009	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
22	C-899	28.09.2009	Kan	Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Servisi
23	C-906	28.09.2009	Kan	Dahiliye Onkoloji Servisi
24	C-909	30.09.2009	Kan	Pediyatrik Hematoloji Onkoloji Servisi
25	C-910	01.10.2009	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-903	06.10.2009	Kan	
26	C-925	03.11.2009	TPN* solüsyonu	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-942	09.11.2009	Kan	
27	C-907	08.10.2009	Kan	Dahiliye Onkoloji Servisi
28	C-895	08.10.2009	Kan	Dahiliye Servisi
29	C-898	08.10.2009	Kan	Dahiliye Gastroenteroloji Servisi
	C-891	11.10.2009	Kan	
30	C-886	21.10.2009	TPN solüsyonu	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-1010	03.11.2009	TPN solüsyonu	
	C-894	13.10.2009	Kan	
31	C-927	13.10.2009	TPN solüsyonu	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
32	C-904	13.10.2009	Kan	Nöroloji Servisi
	C-908	17.10.2009	Kan	
33	C-887	21.10.2009	TPN solüsyonu	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
34	C-1018	26.10.2009	Kan	Dahiliye Servisi
35	C-979	26.10.2009	Kan	Enfeksiyon Servisi
36	C-995	27.10.2009	Kan	Dahiliye Onkoloji Servisi
	C-938	27.10.2009	Kan	
37	C-926	03.11.2009	TPN solüsyonu	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
38	C-953	28.10.2009	Kan	Dahiliye Onkoloji Servisi
39	C-949	29.10.2009	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
40	C-960	30.10.2009	Katater kanı	Anestezi Yoğun Bakım Servisi
41	C-962	01.11.2009	Kan	Pediyatrik Hematoloji Onkoloji Servisi
42	C-954	02.11.2009	Kan	Dahiliye Nefroloji Servisi
43	C-928	02.11.2009	Kan	Dahiliye Yoğun Bakım Servisi
	C-945	02.11.2009	Kan	
44	C-1020	13.12.2009	Kan	Nöroşirurji Yoğun Bakım Servisi
45	C-931	04.11.2009	Kan	Dahiliye Yoğun Bakım Servisi
46	C-1017	04.11.2009	Kan	Pediyatrik Hematoloji Servisi
47	C-929	05.11.2009	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
48	C-961	08.11.2009	Kan	Nöroloji Servisi
49	C-988	09.11.2009	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-935	03.11.2009	TPN solüsyonu	
50	C-924	11.11.2009	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-976	11.11.2009	TPN solüsyonu	
51	C-969	13.11.2009	Katater kanı	Anestezi Yoğun Bakım Servisi
52	C-940	17.11.2009	Kan	Kardiyoloji Servisi
53	C-939	17.11.2009	Kan	Pediyatrik Hematoloji Servisi

Tablo 8'in devamı

54	C-955	18.11.2009	Kan	Dahiliye Servisi
55	C-959	18.11.2009	Kan	Kardiyoloji Servisi
56	C-991	22.11.2009	Kan	Anestezi Yoğun Bakım Servisi
57	C-987	27.11.2009	Kan	Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Servisi
58	C-1015	29.11.2009	Kan	Kulak Burun Boğaz Servisi
59	C-1023	29.11.2009	Kan	Dahiliye Yoğun Bakım Servisi
60	C-992	29.11.2009	Kan	Dahiliye Servisi
61	C-975	29.11.2009	Kan	Pediyatrik Hematoloji Servisi
62	C-968	29.11.2009	Kan	Pediyatrik Hematoloji Onkoloji Servisi
63	C-934	01.12.2009	Kan	Enfeksiyon Servisi
64	C-944	01.12.2009	Kan	Dahiliye Servisi
65	C-1013	09.12.2009	Kan	Dahiliye Onkoloji Servisi
66	C-999	10.12.2009	Kan	Dahiliye Onkoloji Servisi
67	C-1000	13.12.2009	Kan	Pediyatrik Hematoloji Servisi
68	C-990	15.12.2009	Kan	Pediyatrik Cerrahi Servisi
69	C-1029	16.12.2009	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
70	C-974	17.12.2009	Kan	Genel Cerrahi Servisi
71	C-983	17.12.2009	Kan	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
72	C-1033	17.12.2009	Kan	Pediyatrik Cerrahi Servisi
73	C-1026	21.12.2009	Katater kanı	Dahiliye Nefroloji Servisi
74	C-1028	07.01.2010	Kan	Nöroloji Yoğun Bakım Servisi
75	C-1045	25.01.2010	Kan	Kadın Doğum Servisi
76	C-1051	31.01.2010	Kan	Yanık Ünitesi
	C-1086	12.04.2010	Kan	
77	C-1048	07.02.2010	Kan	Pediyatri Süt Çocuğu Servisi
78	C-1082	01.03.2010	Kan	Nöroloji Servisi
79	C-1084	04.03.2010	Kan	Pediyatri Enfeksiyon Servisi
80	C-1081	05.03.2010	Kemik iliği	Enfeksiyon Servisi
81	C-1105	15.11.2010	Kan	Dahiliye Yoğun Bakım Servisi
82	C-1132	30.07.2011	Trakea aspirasyonu	Kulak Burun Boğaz Servisi
83	C-1206	10.10.2011	Katater kanı	Dahiliye Yoğun Bakım Servisi
84	C-1148	08.11.2011	Kan	Göğüs Hastalıkları Yoğun bakım Servisi
85	C-1149	19.11.2011	Kan	Pediyatri Yoğun Bakım Servisi
	C-1254	03.02.2012	Port kanı	
86	C-1153	21.11.2011	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-1162	29.11.2011	Rektal sürüntü	
87	C-1147	22.11.2011	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
88	C-1165	24.11.2011	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-1164	29.11.2011	Rektal sürüntü	
89	C-1171	24.11.2011	Kan	Dahiliye Yoğun Bakım Servisi
90	C-1151	24.11.2011	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi

Tablo 8'in devamı

91	C-1181	29.11.2011	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-1231	04.01.2012	Kan	
92	C-1179	06.12.2011	Kan	Göğüs Hastalıkları Servisi
93	C-1178	09.12.2011	Kan	Pediatric Adölesan Servisi
94	C-1202	19.12.2011	Kan	Pediatric Adölesan Servisi
95	C-1199	23.12.2011	Kan	Dahiliye Onkoloji Servisi
96	C-1220	26.12.2011	Katater kanı	Dahiliye Nefroloji Servisi
97	C-1218	28.12.2011	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
98	C-1215	31.12.2011	Kan	Pediatric Hematoloji Servisi
99	C-1216	31.12.2011	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
100	C-1213	02.01.2012	Kan	Dahiliye Yoğun Bakım Servisi
101	C-1227	03.01.2012	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
102	C-1224	04.01.2012	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
103	C-1226	06.01.2012	Kan	Dahiliye Yoğun Bakım Servisi
104	C-1225	08.01.2012	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
105	C-1229	10.01.2012	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
106	C-1222	12.01.2012	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
107	C-1236	17.01.2012	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-1241	18.01.2012	TPN solüsyonu	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
108	C-1249	18.01.2012	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
109	C-1245	18.01.2012	TPN solüsyonu	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-1251	18.01.2012	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
110	C-1248	19.01.2012	TPN solüsyonu	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
111	C-1240	19.01.2012	Kan	Dahiliye Yoğun Bakım Servisi
112	C-1269	28.01.2012	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
113	C-1253	31.01.2012	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
114	C-1264	08.02.2012	Kan	Pediatric Yoğun Bakım Servisi
	C-1262	15.02.2012	TPN solüsyonu	Pediatric Yoğun Bakım Servisi
115	C-1257	13.02.2012	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
116	C-1259	14.02.2012	Kan	Nöroşirurji Yoğun Bakım Servisi
117	C-1265	16.02.2012	TPN solüsyonu	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
118	C-1272	03.03.2012	Kan	Dahiliye Endokrin Servisi
119	C-1300	26.09.2012	Katater kanı	Anestezi Yoğun Bakım Servisi

*TPN: Total parenteral beslenme

Çalışmalara dahil edilen referans suşların adları ve farklı suş koleksiyonlarındaki kodları Tablo 9'da belirtildi.

Tablo 9. Referans suşlar ve suş koleksiyonlarındaki kodları

Referans suş adı	CBS kodu	ATCC kodu	NRRL kodu	Diğer
<i>Candida guilliermondii</i>	CBS 566	ATCC 6260	NRRL Y-324	DSM 6381 JCM 1539
<i>Pichia guilliermondii</i>	CBS 2030	ATCC 46036	NRRL Y-2075	
<i>Candida fermentati</i>	CBS 2022	-	-	JCM 2282
<i>Candida carpophila</i>	CBS 5256	-	NRRL Y-17905	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CBS 768	ATCC 10622	NRRL Y-1455	
<i>Candida famata</i>	CBS 1795	-	NRRL Y-173	JCM 1521
<i>Candida albicans</i>	-	ATCC MYA-2876	-	SC5314
<i>Candida albicans</i>	CBS 6431	ATCC 10231	-	DSM 1386

5.1.2. Araç ve Gereçler

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ait; etüv (Memmert B 50, Almanya; Dedeoğlu E 4032, Türkiye), sınıf II biyogüvenlik kabini (Chemocell LRCX-UV, Türkiye), -20 °C (BEKO D7210 SMF, Türkiye) ve -80 °C soğutucu (New Brunswick Scientific U570 premium, ABD), 4 °C buzdolabı (Arçelik, Türkiye), pastör fırını (nüve FN 500, Türkiye), dikey model otoklav (Kermanlar, Türkiye), CrystalSpec™ Nephelometer™ (Becton Dickinson, ABD), otomatik pipetler (Gilson, ABD), çalkalamalı su banyosu (Memmert GFL 1086, Almanya; nüve ST 402, Türkiye), pH metre (Hanna HI 121, Romanya), manyetik karıştırıcı (yellow^{line} MSC basic C, ABD), vorteks (Heidolph Reax Top, Almanya), orbital karıştırıcı (Nüve SL 350, Türkiye), santrifüj (Sigma 1-15, Almanya), buz makinesi (IceTech Myco CD90_A, İspanya), hassas terazi (Shimadzu, Filipinler; Mettler toledo AB204-S, İsviçre), mikrodalga fırın (Vestel MW-23, Çin), termal döngü cihazı (Techne TC-512, İngiltere), elektroforez sistemi (RunOne™ güç kaynağı ve Embi Tec RunOne™ elektroforez tankı, ABD), elektroforez tankı (Owl Scientific Easy-Cast™ mini jel elektroforez sistemi model B1A, ABD), dijital güç kaynağı (Owl Separation Systems-Lightning Volt™ Power Supply model OSP-300, ABD), CHEF DR III pulse field jel elektroforezi sistemi (BioRad, ABD), VersaDoc™ Imaging Systems 4000 (Bio-Rad, ABD), UV transillüminatör (Cleaver Scientific, MUV21-254/312, İngiltere), distile su cihazı (Kros A.Ş. Krosclinic®, Türkiye), deiyonize su cihazı (Barnstead Easypure UV/UF D8612-33, ABD), bunsen beki, jel dökme tray'i, tarak ve manyetik bar kullanıldı. Farklı hacimlerde cam

erlenmayer, mezür, balon joje ve şişe kullanıldı. 50 mL'lik ve 15 mL'lik falkon tüpler, 1.5 mL'lik santrifüj tüpleri, 0.2 mL'lik PCR tüpleri (Greiner Bio-One GmbH, Almanya), pipet ucu (10 µL, 100 µL, 1000 µL) sarf malzemeleri kullanıldı. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na ait genetik analizör 3130 (Applied Biosystems, ABD), termal döngü cihazı 9700 (Applied Biosystems, ABD) ve Gel Logic 2000 jel görüntüleme sistemi (Kodak, ABD) kullanıldı.

5.1.3. Kimyasallar

Sabouraud dextrose agar (Oxoid, İngiltere), Yeast Extract (Merck, Almanya), Bacto® dextrose (Difco, ABD), Bacteriological peptone (Oxoid, İngiltere), Glycerol (C₃H₈O₃) (Riedel-de Haen, Almanya), Phosphate buffered saline (Dulbecco A) tabletleri pH:7.3±0.2 (Oxoid, İngiltere), Bacteriological agar (acumedia®, Maryland, Oxoid, İngiltere), Proponal-2 (C₃H₈O) (Sigma, ABD), Tris (C₄H₁₁NO₃) (Amresco®, ABD), Boric acid (H₃BO₃) (Bio Basic, Kanada), EDTA disodium salt dihydrate (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O) (Bio Basic, Kanada), Hydrochloric acid (HCl) (Riedel-de Haen, Almanya), D(+)-Glucose monohydrate (C₆H₁₂O₆.H₂O) (Merck, Almanya), D-Sorbitol (C₆H₁₄O₆) (Sigma, ABD), Citric acid 1-hydrate [C(OH)(OOOH)(CH₂.OOOH)₂.H₂O] (Surechem Products, İngiltere), Sodium chloride (NaCl) (Merck, Almanya), Sodium hydroxide (NaOH) (Merck, Almanya), Yeast Carbon Base (Himedia, Hindistan), tri-Sodium citrate dihydrate (C₆H₅Na₃O₇.2H₂O) (Merck, Almanya), Calcium chloride (CaCl₂.2H₂O) (Sigma, ABD), N-Lauroylsarcosine sodium salt (C₁₅H₂₈NO₃Na) (Sigma, ABD), Adenine hemisulfate salt (Sigma, ABD), Amido Black Stain (Napthalene Black 12B) (Hopkins&Williams Limited, İngiltere), Acetic acid (CH₃COOH) (Merck, Almanya), Methanol (CH₃OH) (Chromanorm® VWR™ BDH Prolabo, İngiltere), 2-Mercaptoethanol (C₂H₆OS) (Sigma, ABD), Agarose II™ low gelling temperature (Amresco, ABD), Prona agarose plus (Conda Laboratuvarları, İspanya), Etidyum bromür (Merck, Almanya), Loading dye (Fermentas, ABD), Litikaz (Sigma, ABD), Sephadex DNA Grade G-50 Medium (Sigma, ABD), Amplifikasyon seti (Promega, ABD), dNTP seti (Dr. Zeydanlı, Türkiye), Primerler (ITS1 ve ITS4: Ella Biotech GmbH, Almanya; LR13 ve SR21: Bio Basic, Kanada), 100-1500 bp DNA marker/mass ladder (Bioron, Almanya), 50-10000 bp Hi-Lo DNA marker/mass ladder (Bionexus,

ABD), 0.225-2.2 Mb *S. cerevisiae* DNA marker (BioRad, ABD), 50-800 kb Lambda ladders (Promega, ABD) kullanıldı.

5.1.4. Kitler

- API 20 C AUX (bio-Merieux, Fransa)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Almanya)
- NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel, Almanya)
- BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ABD)
- Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems, ABD)

5.1.5. Solüsyonlar

5.1.5.1. Pulse Field Jel Elektroforezi Solüsyonları

Açıkça belirtilmedikçe, bütün çözeltiler ve besiyerler 121 °C’de 15 dakika otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

YEPD (ade) broth: 1 g yeast ekstrat, 2 g pepton tartıldı ve hacim distile su ile 94.45 mL’ye tamamlanarak çözüldü. Kullanmadan önce, %40 (w/v) dekstroz solüsyondan 5 mL, %1 (w/v) adenin’den 0.55 mL eklendi.

YEPD (ade) agar: 5 g yeast ekstrat, 10 g pepton, 10 g agar tartıldı ve hacim distile su ile 472.25 mL’ye tamamlanarak çözüldü. Otoklanlandıktan sonra 60 °C’ye kadar soğutuldu. %40 (w/v) dekstroz solüsyonundan 25 mL, %1 (w/v) adenin’den 2.75 mL eklendi. Her petrinin içine yaklaşık 25 mL döküldü.

%40 (w/v) Dekstroz: 100 g D-glukoz tartıldı ve hacim deiyonize su ile 250 mL’ye tamamlanarak çözüldü.

%1 (w/v) Adenin: 0.25 g Adenin hemisülfat tartıldı ve hacim 5 M HCl ile 25 mL’ye tamamlanarak çözüldü. Filtre ile steril edildi. 4 °C’de saklandı.

5M Hidroklorik asit (HCl): 10.42 mL %37 (=12 M) HCl ölçüldü ve hacim distile su ile 25 mL’ye tamamlandı.

0.5 M pH:8.0 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): 46.525 g disodyum dihidrat EDTA tartıldı ve 200 mL deiyonize su eklendi. NaOH eklenerek çözüldü ve pH 8.0’e ayarlandı. Hacim deiyonize su ile 250 mL’ye tamamlandı.

50 mM pH:8.0 EDTA: 10 mL 0.5 M pH:8.0 EDTA, 90 mL deiyonize suya eklendi.

0.125 M pH:7.0 EDTA: 25 mL 0.5 M pH:8.0 EDTA, 50 mL deiyonize suya eklendi. HCl ile pH 7.0'ye ayarlandı. Hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı.

SCE solüsyonu: 9.11 g sorbitol, 1.47 g sodyum sitrat, 1.12 g disodyum EDTA tartıldı ve 40 mL deiyonize suya eklendi. NaOH pelletleri ile pH:7.0'ye ayarlandı. Hacim deiyonize su ile 50 mL'ye tamamlandı.

1 M pH:8.0 Tris (hydroxymethyl) methylamine: 30.275 g tris baz tartıldı ve 200 mL deiyonize su eklendi. HCl ile pH 8.0'e ayarlandı. Hacim deiyonize su ile 250 mL'ye tamamlandı.

1 M sodyum klorür (NaCl): 5.844 g NaCl tartıldı. Hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlanarak çözöldü.

10 M sodyum hidroksit (NaOH): 20 g NaOH tartıldı. Hacim deiyonize su ile 50 mL'ye tamamlanarak çözöldü.

RNaz çözöcö: 25 µL Tris-HCl pH:7.5, 37.5 µL NaCl, 2437.5 µL deiyonize su karışımı hazırlandı. Kontaminan DNaz'ları yıkmak için 15 dk kaynatıldı. Oda sıcaklığına soğutuldu.

10 mg/ml RNaz A: Toz haldeki 25 mg RNaz, 2.5 mL RNaz çözöcöde çözöldü ve tüplere bölünerek -20 °C'de saklandı.

Proteinaz K çözme solüsyonu: 0.029 g CaCl₂, 100 µL 1 M pH:8.0 Tris-HCl, 5 mL gliserol, 5 mL deiyonize su karışımı hazırlandı. 4 °C'de saklandı.

100 mg/ml Proteinaz K solüsyonu: Toz halindeki 100 mg proteinaz K, 1 mL proteinaz K çözme solüsyonunda çözöldü ve tüplere bölünerek -20 °C'de saklandı.

%10'luk N-Lauroylsarcosine sodyum tuzu: 10 g N-Lauroylsarcosine tartıldı ve 80 mL 0.5 M pH:8.0 EDTA içinde çözöldü. 0.5 M pH:8.0 EDTA ile hacim 100 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı. Bu çözeltiyi otoklavlamaya ihtiyaç yok.

1X pH:8.0 Tris-EDTA (TE): 1 mL 1 M pH:8.0 Tris-HCl, 200 µL 0.5 M pH:8.0 EDTA karıştırıldıktan sonra hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Saklama solüsyonu: 45 mL 0.5 M pH:8.0 EDTA ile 5 mL 1 M pH:8.0 Tris-HCl karıştırıldı.

10X TBE: 109 g tris baz, 55.6 g borik asit, 3.72 g EDTA disodyum tuzu tartıldı ve 500 µL deiyonize suda çözöldü. HCl ile pH:8.3'e ayarlandı. Hacim deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı.

0.5X TBE: 150 mL 10X TBE ölçöldü ve hacim deiyonize su ile 3 L'ye tamamlandı.

10 mg/ml Etidyum Bromür (EtBr) stok solüsyonu: 100 mg EtBr tartıldı ve hacim deiyonize su ile 10 mL'ye tamamlanarak çözöldü.

0.5 µg/ml EtBr solüsyonu: 15 µL 10 mg/ml EtBr stok solüsyonu 300 mL deiyonize suya eklendi.

5.1.5.2. Salgı Aspartik Proteaz Aktivitesi Solüsyonları

0.1 M Sitrik asit solüsyonu: 21.01 g sitrik asit monohidrat tartıldı ve toplam hacim 1 L olacak şekilde deiyonize su ile çözöldü.

0.1 M Tri-sodyum sitrat solüsyonu: 29.41 g tri-sodyum sitrat dihidrat tartıldı ve toplam hacim 1 L olacak şekilde deiyonize su ile çözöldü.

Sitrik asit-sodyum sitrat buffer (pH:4.1, pH:4.6, pH:5.1): pH:4.1 sitrik asit-sodyum sitrat buffer hazırlamak için 56.5 mL 0.1 M sitrik asit ve 43.5 mL 0.1 M trisodyum sitrat karıştırıldı. pH 4.6 sitrik asit-sodyum sitrat buffer hazırlamak için 44.5 mL 0.1 M sitrik asit ve 55.5 mL 0.1 M trisodyum sitrat karıştırıldı. pH 5.1 sitrik asit-sodyum sitrat buffer hazırlamak için 32.75 mL 0.1 M sitrik asit ve 67.25 mL 0.1 M trisodyum sitrat karıştırıldı (175).

Dekolarizasyon solüsyonu: Metanol, asetik asit ve distile sudan sırasıyla 45:10:45 oranında hazırlandı.

%0.06 Amido black boya solüsyonu: 0.06 gr amido black boyası, 100 mL dekolazasyon solüsyonu içinde çözölerek hazırlandı.

5.2. Yöntem

5.2.1. *Meyerozyma guilliermondii* İzolatlarının İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Saklanması

Klinik örneklerden *C. guilliermondii* izolatlarının izolasyonu, identifikasyonu ve saklanması işlemleri KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarında gerçekleştirildi. Hastanemiz kliniklerinden gelen kan inoküle edilmiş kan kültürü vasatları otomotize sistem kabinine yerleştirildi. İnkübasyon süresi içinde üreme sinyali veren şişelerden gram boyama için preperat hazırlandı ve gram boyanan preperatlar immersiyon yağı ile 100X objektif kullanılarak ışık mikroskopunda incelendi. Gram pozitif (mor renk), maya görünümünde hücreler gözlenen kan örneklerinden izolasyon amacı ile SDA besiyerine inokülasyon yapıldı ve SDA besiyerleri 35 °C etüvde 24-48 saat inkübe edildi. Kan kültürü vasatında gönderilmeyen diğer klinik örnekler direkt SDA'a inoküle edildi. SDA besiyerinde üreyen kolonilerin maya görünümünde olup olmadığı tekrar mikroskopik olarak değerlendirildi. Maya görünümüne sahip kolonilere germ tüp testi uygulandı ve germ tüp pozitif olanlar *C. albicans*, olmayanlar ise "*C. albicans* dışındaki diğer *Candida* türleri (non-*albicans Candida*)" olarak tanımlandı. Steril vücut bölgelerine ait klinik örneklerden üretilen maya kolonileri için ileri identifikasyon basamaklarına geçildi. Maya kolonilerinin tür düzeyinde identifikasyonu amacı ile karbohidrat asimilasyonu temelli, ticari identifikasyon kiti olan API 20 C AUX (bio - Merieux, Fransa) üreticinin talimatları doğrultusunda uygulandı ve üretici tarafından sağlanan apiweb™ identifikasyon yazılımı kullanılarak değerlendirildi. *C. guilliermondii* olarak identifiye edilen izolatlar %20 gliserollü YEPD saklama besiyerine konularak -80 °C derin dondurucuda saklandı.

5.2.2. rDNA Tüm ITS Gen Bölgesinin Sekanslanması

Candida guilliermondii olarak identifiye edilen ve -80 °C'de saklanan maya izolatları SDA'a inoküle edildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra üreyen kültürden tekrar SDA'a tek koloni pasajları yapıldı ve 24 saatlik inkübasyon sonunda izolatların DNA izolasyonu "High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche" kitine ait "Bakteri veya Mayalardan Nükleik Asit İzolasyonu" protokolü ile gerçekleştirildi. İzole edilen DNA daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

rDNA tüm ITS gen bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan primerler Tablo 10'da, amplifikasyonda kullanılan bileşenler ve miktarları ise Tablo 11'de belirtildi.

Tablo 10. rDNA tüm ITS gen bölgesinin amplifikasyonda kullanılan primerler

Primer	Sekans (5'-3')	Ürün uzunluğu (bp)	Kaynak
ITS1 (forward)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	607	176
ITS4 (reverse)	TCCTCCGCTTATTGATATGC		

Tablo 11. rDNA tüm ITS gen bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Stok Konsantrasyonu	1X Miktar (µL)
Taq Buffer (+KCl, -MgCl ₂)	10X	5
dNTP karışımı	2.5 mM	4
MgCl ₂	25 mM	3
Primer 1 (ITS1, forward)	10 pmol/µL	1.5
Primer 2 (ITS4, reverse)	10 pmol/µL	1.5
Taq DNA polimeraz	5 U/µL	0.3
ddw		29.7
Toplam hacim		45
Template (Kalıp DNA)	10 ng/µL	5
Toplam reaksiyon hacmi		50

Tablo 11'de gösterilen bileşenlerden hazırlanan karışım PCR tüplerine 45 µL hacimde bölündü ve 5 µL genomik DNA bu tüplere eklendi. Hazırlanan karışım otomatik termal döngü cihazına yerleştirildi ve Tablo 12'de belirtilen koşullarda amplifikasyon gerçekleştirildi.

Tablo 12. rDNA tüm ITS gen bölgesinin amplifikasyonu için termal döngü cihazının koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	94	5	1
Denatürasyon	94	1	35
Annealing	53	1	
Extension	72	1	
Final extension	72	7	1

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri %2'lik agaroz jele 2 µL yüklendi ve 0.5X TBE tamponu içeren elektroforez tankında elektroforez gerçekleştirildi. Bir kuyucuğa 100-1500bp DNA marker/mass ladder (Bioron, Almanya) yüklendi. Elektroforez 80 volt'ta 10 dk, 100 volt'ta 30 dk şeklinde uygulandı. Elektroferezi sonuçları jel görüntüleme sistemi (Gel Logic 2000, Kodak, ABD) ile değerlendirildi.

Polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri, NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel, Almanya) kiti ile üreticinin önerdiği protokol doğrultusunda temizlendi. Temizleme işleminden sonra PCR ürünü %2'lik agaroz jelde 100 bp'lık DNA marker/mass ladder ile elektroforez yapılarak bant kalınlığı kontrol edildi.

Temizlenen PCR ürünleri döngüsel dizileme reaksiyonu için kullanıldı. Döngüsel dizileme reaksiyonunda ITS4 (reverse) primeri ve BigDye® Terminatör v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılarak Tablo 13'de belirtilen karışım hazırlandı.

Tablo 13. DNA sekans reaksiyonda kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Stok konsantrasyonu	1X Miktar (µL)
BigDye reaksiyon karışımı	2.5X	1
Sekanslama buffer'ı	5X	1.5
Primer (ITS4, Reverse)	10 pmol/µL	0.5
PCR ürünü		0.5
ddw		6.5
Toplam reaksiyon hacmi		10

Döngüsel dizileme reaksiyonu, Applied Biosystems 9700 termal döngü cihazında (Applied Biosystems, ABD) Tablo 14'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 14. DNA sekans reaksiyonu için termal döngü cihazının koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	96	60	1
Denatürasyon	96	15	25
Annealing	50	15	
Extension	60	120	

Sephadex G-50 stoğu hazırlamak için 1.5 gr sephadex G-50 üzerine 20 mL deiyonize su eklendi ve karıştırıldı. Kullanmadan önce 4 °C'de 30 dk bekletildi. Hazırlanan sephadex G-50 stoğundan her kolona 600 mL aktarıldı. Sephadex içeren kolonlar 750 g'de 2 dk santrifüjlenerek kullanıma hazır hale getirildi.

Termal döngü cihazından alınan döngüsel dizileme ürünleri sephadex G-50 kolonlarına aktarıldı ve 750 g'de 5 dk santrifüjlendi. Bu şekilde temizlenen döngüsel dizileme ürününe Genetik Analizör 3130 (Applied Biosystems, ABD) cihazında kapiller elektroforez işlemi uygulandı.

Elde edilen sekans verileri Chromas Lite 2.1 (Technelysium Pty Ltd) programı ile Pubmed-Nucleotid (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>) kaynağından elde edilen referans *Candida guilliermondii* ATCC 6260 suşu 18S ribosomal RNA geni kısmi sekansı, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA geni, internal transcribed spacer 2 tam sekansı ve 28S ribosomal RNA geni kısmi sekansı (accession no: AY939792) ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Tüm izolatlar için elde edilen sekanslar online Clustal Omega (EMBL-EBI, Hinxton, Cambridgeshire, İngiltere) programı kullanılarak birbirleriyle karşılaştırıldı.

Test edilen izolatın identifikasyonu, ITS sekansının tip suş veya kontrol izolat ile yüzde (%) benzerliği ile tanımlanmaktadır. Tanımlanmaya çalışılan izolatın ITS sekansı tip suş ITS sekansı ile ≥ 99 aynı ise izolat tip suş ile aynı tür, %93-99 aynı ise aynı cins, ≤ 93 aynı ise sonuçsuz olarak kabul edilmektedir (65).

5.2.3. rDNA Tüm IGS Gen Bölgesi PCR Ürünlerinin *AluI* Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi

Ribozomal DNA tüm IGS gen bölgesi PCR ürünlerinin *AluI* restriksiyon endonükleaz enzimi restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi, C-840 izolatı hariç çalışmaya dahil olan diğer tüm izolatlara uygulandı. *Candida guilliermondii* CBS 566, *Pichia guilliermondii* CBS 2030, *Candida fermentati* CBS 2022, *Candida carpophila* CBS 5256, *Debaryomyces hansenii* CBS 768 ve *Candida famata* CBS 1795 referans suşları da çalışmanın bu aşamasına dahil edildi (17).

Çalışma izolatlarından rDNA ITS gen bölgesi PCR ürünlerinin sekansı amacıyla izole edilen genomik DNA, rDNA tüm IGS gen bölgesinin amplifikasyonunda da kalıp olarak kullanıldı.

Ribozomal DNA tüm IGS gen bölgesinin amplifikasyonu amacı ile kullanılan primerler Tablo 15’de, amplifikasyonun için kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 16’da belirtildi.

Tablo 15. rDNA tüm IGS gen bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan primerler

Primerin adı	Primer sekansı (5’-3’)	Ürün uzunluğu (kb)	Referans
LR13 (forward)	CGATCTGCTGAGATTAAG	2.5 - 2.8	177
SR21 (reverse)	CTTAATCTTTGAGACAAGC		

Tablo 16. rDNA tüm IGS gen bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Stok Konsantrasyonu	1X Miktar (µL)
GoTaq® Flexi Buffer	5X	10
dNTP karışımı	2.5 mM	2
MgCl ₂	25 mM	3
Primer 1 (LR13, forward)	10 pmol/µL	0.5
Primer 2 (SR21, reverse)	10 pmol/µL	0.5
GoTaq® DNA polimeraz	5 U/µL	0.3
ddw		23.7
Toplam hacim		40
Template (Kalıp DNA)	5 ng/µL	10
Toplam reaksiyon hacmi		50

Hazırlanan amplifikasyon karışımı Tablo 17’de belirtilen koşullarda termal döngü cihazına yerleştirildi.

Tablo 17. rDNA tüm IGS gen bölgesinin amplifikasyonu için termal döngü cihazının koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	94	4	1
Denatürasyon	94	0.5	35
Annealing	48	0.5	
Extension	72	4	
Final extension	72	10	1

Ribozomal DNA tüm IGS gen bölgesi PCR ürünleri %0.7'lik agaroz jelde 50-10000 bp Hi-Lo DNA marker/mass ladder (Bionexus, ABD) kullanılarak 25 V'da 10 dk, 50V'da 30 dk elektroforez yapıldı ve görüntülendi.

Ribozomal DNA tüm IGS gen bölgesi PCR ürünlerinin *AluI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi için Tablo 18'de belirtilen reaksiyon karışım hazırlandı ve 37 °C su banyosunda 90 dk inkübe edildi.

Tablo 18. rDNA tüm IGS gen bölgesi PCR ürünün *AluI* ile kesim reaksiyonu bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Stok konsantrasyonu	1X miktar (μL)
Buffer Tango (+BSA)	10X	2
<i>AluI</i>	10 u/μL	0.2
PCR ürünü		17.8
Toplam reaksiyon hacmi		20

Klinik izolatların ve referans suşların rDNA tüm IGS gen bölgesi PCR ürünün *AluI* ile kesim reaksiyonu ürünleri %3'lük agaroz jelde Hi-Lo DNA marker/mass ladder (Bionexus, ABD) kullanılarak 50V'da 40 dk elektroforez yapıldı ve görüntülendi.

5.2.4. Pulse Field Jel Elektroforezi Karyotipleme ve Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi Optimizasyonu

Candida guilliermondii CBS 566 ve *Pichia guilliermondii* CBS 2030 referans suşlarının ve çalışma izolatlarının PFGE'i Maringele ve Lydall (2006)'in "tomurcuklanan maya kromozomlarının pulsed field jel elektroforezi" protokolü üzerinde bir dizi değişiklik yapılarak aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi (178).

5.2.4.1. Maya Kültürü Hazırlanması

- -80 °C'de %20 gliserollü YEPD broth içinde saklanan suşlardan YEPD agara pasaj yapıldı ve koloniler görünür hale gelene dek yaklaşık 24 saat 30 °C'de inkübe edildi.
- YEPD agarda çoğalan suşlardan YEPD agara tek koloni pasajı yapıldı ve 24 saat inkübe edildi.

- YEPD agar'daki kolonilerden steril bir plastik öze ile 4 mL YEPD broth besiyerine inokülasyon yapıldı.
- Sıvı kültürler çalkalayıcı su banyosunda 100 devir/dk hızda, 30 °C'de gece boyu (< 16 saat) inkübe edildi.

5.2.4.2. Low Melting Point Agaroz (%1.2) Hazırlanması

- 0.24 g Low Melting Point (LMP) agaroz tartıldı ve hacim 0.125 M pH:7.0 EDTA ile 20 ml'ye tamamlandı. Mikrodalgaya yerleştirildikten sonra 5-10 saniyede bir çıkarılıp yavaşça karıştırıldı. LMP agarozu kaynatmamaya dikkat edildi. Eritilen agaroz, 50 °C su banyosunda bekletildi.

5.2.4.3. Litikaz Solüsyonu Hazırlanması

15 plug için,

- 150 µl SCE çözeltisi
- 150 µl Litikaz (0.5 mg/ml)
- 7.5 µl β -mercaptoethanol

Karışım yüksek hızda 10 sn vorteks yapıldıktan sonra quick spin yapıldı. Kullanana kadar 4 °C'de bekletildi. Litikaz solüsyonu kullanmadan hemen önce hazırlandı.

5.2.4.4. Maya Hücre Pelleti Hazırlanması

Her izolattan 1 plug hazırlamak için,

- YEPD broth'da çoğalan kültürden 1.5 mL'lik steril eppendorf tüpe konuldu. Oda sıcaklığında en yüksek hızda 30 sn santrifüj edildi. Süpernatant döküldü. Her suş için yaklaşık 10 µL hacimde hücre pelleti oluşana kadar işlem tekrarlandı.
- Hücre pelletine 200 µL 50 mM pH 8.0 EDTA eklendi. Yavaşça vortekslendi. En yüksek hızda 30 sn santrifüj edildi. Süpernatant döküldü. İşlem 2 kez tekrarlandı.

5.2.4.5. Plug Hazırlanması

Hücre pelletinin üstüne,

- 20 µl 50 mM pH 8.0 EDTA
- 20 µl Litikaz solüsyonu
- 55 µl %1.2'lik LMP agaroz

eklendi. Homojen bir karışım oluşana kadar yavaşça karıştırıldı ve önceden altı bantlanarak kapatılmış olan plug kalıbındaki kuyucuğun içine hemen pipetlendi. Plugların şekil alması için önce oda sıcaklığında 15 dk, sonra -20 °C dondurucuda 5 dk bekletildi. Pluglar şekillendikten sonra plug kalıplarının altındaki bant uzaklaştırıldı ve her plug mini spatula ile 50 mL'lik falkonun içine çıkarıldı.

5.2.4.6. EDTA-Tris-β Merkapttoetanol Solüsyonu Hazırlanması

15 plug için,

- 6.75 mL 0.5 M pH 8.0 EDTA
- 0.75 mL 1 M pH 8.0 Tris-HCl
- 0.375 mL β-Mercaptoethanol

karışımı hazırlandı. 1 plug bulunan her falkona 0.5 mL EDTA-Tris-β Merkapttoetanol (ETB) solüsyonu eklendi. EDTA-Tris-β Merkapttoetanol solüsyonu kullanmadan hemen önce hazırlandı. 37 °C'de 80 devir/dk hızda bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra ETB solüsyonu döküldü. Bir plug içeren her falkona 1 mL 50 mM pH:8.0 EDTA eklendi. Su banyosunda 37 °C'de, 80 devir/dk hızda 15 dk yıkama işlemi yapıldı. Bu aşama 3 kez tekrarlandı.

5.2.4.7. Proteinaz Solüsyonu Hazırlanması

15 plug için,

- 6.75 mL 0.5 M pH:8.0 EDTA
- 0.75 mL %10 N-Lauroylsarcosine
- 75 µL 100 mg/mL Proteinaz K
- 15 µL 50 mg/mL RNaz solüsyonu

karişımı hazırlandı. Proteinaz solüsyonu kullanmadan hemen önce hazırlandı. 1 plug bulunan her falkona 500 µL proteinaz solüsyonu eklendi. Su banyosunda 37 °C’de, 80 devir/dk hızda 1 gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra proteinaz solüsyonu döküldü. Bir pluglu her falkon için 1 mL 50 mM pH:8.0 EDTA eklendi. Su banyosunda 37 °C’de, 80 devir/dk hızda 15 dk yıkama işlemi yapıldı. Bu aşama 3 kez tekrarlandı. Oda sıcaklığında 1 mL 1X TE içinde 30 dk inkübe edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Pluglar karyotipleme ve genomik DNA’nın restriksiyon enzim analizi için hazır duruma geldi.

Pluglar bu aşamada 4 °C’de saklama solüsyonunda haftalarca saklanabilir. Pluglar kullanmadan önce saklama solüsyonundan uzaklaştırılır, 1 mL 1X TE içinde 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilir. Bu işlem 2 kez tekrarlanır.

5.2.4.8. Genomik DNA’nın Retriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilmesi

Her plug steril petri içinde steril bistüri ile 4 eşit eşit parçaya bölündü. Her plug’ın ¼’lük parçası (2.5 mm) 1.5 mL’lik steril eppendorfa kondu. Her restriksiyon enzimi için Tablo 19’da belirtilen reaksiyon karışımı hazırlandı ve plug dilimi bu karışımın içine daldırıldı. Karışım Tablo 20’de belirtilen sıcaklıktaki su banyosunda inkübe edildi.

Tablo 19. Pulse field jel elektroforezi-genomik DNA’nın restriksiyon enzim kesimi için kullanılan bileşenler ve miktarları

Restriksiyon enziminin adı	Restriksiyon enzimi µL (U)	10mg/ml Acetylated BSA (µL)	10X buffer (µL)	Deiyonize su (µL)	Toplam reaksiyon hacmi (µL)
<i>BsaI</i>	1 µL (10 U)	2	20	177	200
<i>BssHII</i>	1 µL (4 U)	-	20	179	200
<i>HindIII</i>	1 µL (10 U)	2	20	177	200
<i>NaeI</i>	1 µL (10 U)	-	20	179	200
<i>NheI</i>	1 µL (10 U)	-	20	179	200
<i>NotI</i>	1 µL (10 U)	2	20	177	200
<i>PacI</i>	1 µL (10 U)	-	20	179	200
<i>SapI</i>	1 µL (10 U)	-	20	179	200
<i>SfiI</i>	2 µL (20 U)	2	20	177	200
<i>SmaI</i>	2 µL (20 U)	2	20	177	200
<i>SphI</i>	1 µL (10 U)	-	20	179	200
<i>XbaI</i>	1 µL (10 U)	2	20	177	200

Tablo 20. Pulse field jel elektroforezi-genomik DNA'nın restriksiyon enzim kesimi için kullanılan enzimlere ait bilgiler

Restriksiyon enziminin adı	Restriksiyon bölgesi 5' - 3' 3' - 5'	Stok konsantrasyonu	Buffer (10X)	Reaksiyon Sıcaklığı (°C)	Firma
<i>BsaI</i>	GGTCTC(N) ₁ CCAGAG(N) ₅	10U/μl	NEBuffer 3	50	New England BioLabs
<i>BssHII</i>	G/CGCGC CGCGC/G	4 U/μl	NEBuffer 3	50	New England BioLabs
<i>HindIII</i>	A/AGCTT TTCGA/A	10 U/μl	Buffer E	37	Promega
<i>NaeI</i>	GCC/GGC CGG/CCG	10 U/μl	L Buffer	37	Takara
<i>NheI</i>	G/CTAGC CGATC/G	10 U/μl	Tango buffer	37	Thermo Scientific Fermantas
<i>NotI</i>	GC/GGCCGC CGCCGG/CG	10 U/μl	Buffer D	37	Promega
<i>PacI</i>	TTAAT/TAA AAT/TAATT	10 U/μl	PacI buffer (Unique)	37	Thermo Scientific Fermantas
<i>SapI</i>	GCTCTTC(N) ₁ / CGAGAAG(N) ₄ /	10 U/μl	NEBuffer 4	37	New England BioLabs
<i>SfiI</i>	GGCCNNNN/NGGCC CCGGN/NNNNCCGG	10 U/μl	Buffer B	50	Promega
<i>SmaI</i>	CCC/GGG GGG/CCC	10 U/μl	T Buffer	30	Takara
<i>SphI</i>	GCATG/C CGTAC/G	10 U/μl	NEBuffer 2	37	New England BioLabs
<i>XbaI</i>	T/CTAGA AGATC/T	12 U/μl	Buffer D	37	Promega

N: Herhangi bir nükleotid (A, T, G, C), /: kesim noktası

İnkübasyon süresi sonunda eppendorf tüplerdeki restriksiyon enzim karışımı döküldü. Plug dilimi üzerine 1 mL 1X TE eklenerek oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Pluglar megabaz agaroz jel içine gömme ve elektroforez için hazır duruma geldi.

5.2.4.9. Megabaz Agaroz (%0.8 ve %1.2) Jel Hazırlanması

Karyotipleme için 0.8 g megabaz agaroz, enzim kesim ürünlerini yürütmek için 1.2 g megabaz agaroz tartıldı ve hacim pH:8.3 0.5X TBE ile 100 mL'ye tamamlandı. Agaroz solüsyonu mikrodalgada 3 dk kaynatıldı ve 60 °C'ye soğutuldu. Kaynatılan agarozun 1 mL'si eppendorf tüp içine ayrılarak aynı sıcaklıkta saklandı.

Megabaz agaroz jel içine gömme ve elektroforez için hazır plug dilimleri, CHEF DR III PFGE sistemine (BioRad, ABD) ait tarak dişlerinin uç kısmına yerleştirildi ve plug dilimlerinin tarak dişlerine tutunması için 30 dk beklendi. Jel dökme standı firmanın talimatları doğrultusunda hazırlandı ve tarak standın üst kısmına yerleştirildikten sonra hazırlanan megabaz agaroz döküldü. Jelin katılaşması için 1 saat beklendikten sonra tarak jelden uzaklaştırıldı. 60 °C’de bekletilen 1 ml megabaz agaroz kullanılarak tarak dişlerinin oluşturduğu kuyucukların üstü kapatıldı.

5.2.4.10. Elektroforez

CHEF DR III PFGE sistemi (BioRad, ABD) üreticinin talimatları doğrultusunda kuruldu. Elektroforez hücresinin içine 2 L pH:8.3 0.5X TBE döküldü. Plug dilimlerinin gömüldüğü megabaz agaroz jeli elektroforez hücresinin içine yerleştirildi. Elektroforez sistemi aşağıdaki şekilde ayarlandı.

- Pompa: 80 (> 0.75 L/dk)
- Sıcaklık: 14 °C

Elektroforetik karyotipleme için PFGE koşulları:

<u>Blok 1</u>		<u>Blok 2</u>	
Başlangıç switch süresi	100 sn	Başlangıç switch süresi	300 sn
Son switch süresi	200 sn	Son switch süresi	400 sn
Elektroforez süresi	24 sa	Elektroforez süresi	24 sa
Açı	120°	Açı	120°
Voltaj	4.5 V/cm	Voltaj	3 V/cm

Genomik DNA’nın enzim kesim ürünleri için PFGE koşulları:

Başlangıç switch süresi	5 sn
Son switch süresi	20 sn
Elektroforez süresi	19 sa
Açı	120°
Voltaj	6 V/cm

5.2.4.11. Boyama ve Görüntüleme

Elektroforez sonrası jel, 0.5 µg/mL son konsantrasyonda EtBr solüsyonu içine yerleştirildi ve 45 rpm çalkalamada 30 dk inkübe edildi. EtBr solüsyonundan alındıktan sonra deiyonize su ile 45 rpm çalkalamada 1 saat süre ile jelden boya uzaklaştırıldı. Gel Logic 2000 jel görüntüleme sistemi (Kodak, ABD) ile görüntülendi ve tiff dosyası olarak kaydedildi.

5.2.5. Antifungal (Flukonazol, Vorikonazol, İtrakonazol, Flusitozin) Duyarlılık Testleri

Flukonazol, vorikonazol, itrakonazol ve flusitozin için antifungal duyarlılık testleri izole edilen ilk 46 izolata, ticari olarak mevcut Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems, ABD) mikrodilüsyon kiti ile üreticinin talimatları doğrultusunda uygulandı ve 24 saatlik inkübasyon sonunda değerlendirildi. Test edilen minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) aralığı flukonazol için 0.12 µg/mL-256 µg/mL, vorikonazol için 0.008 µg/mL-8 µg/mL, itrakonazol için 0.008 µg/mL-16 µg/mL ve flusitozin için 0.03 µg/mL-64 µg/mL aralığındadır. Vorikonazol için 11 dilüsyon, diğer antifungaller için 12 farklı dilüsyon test edilmektedir. Antifungallerin MİK değerleri, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) M27-A3 standartlarına göre [flukonazol ≤8 (S), 16-32 (SDD), ≥64 (R); vorikonazol ≤1 (S), 2 (SDD), ≥4 (R); itrakonazol ≤0.125 (S), 0.25-0.5 (SDD), ≥1 (R); flusitozin ≤4 (S), 8-16 (I), ≥32 (R)] yorumlandı (179). Bu dört antifungal için MİK50 ve MİK90 değerleri de hesaplandı (180).

5.2.6. Ekstraselüler Salgı Aspartik Proteaz Aktivitesinin Semikantitatif Belirlenmesi

5.2.6.1. Albümin Agar (pH: 4.0, 4.5, 5.0) Hazırlanması

1.17 g yeast karbon baz (YCB), 0.01 g yeast ekstrat ve 0.2 g sığır serum albümini (BSA) tartıldı ve toplam hacim 50 mL olacak şekilde üç farklı pH'daki sitrik asit-sodyum sitrat buffer içinde ayrı ayrı çözüldü. Hazırlanan besiyerlerin pH'sı ölçülerek sırasıyla 4.0, 4.5, 5.0 bulundu. Besiyerler 0.45 µm'lik filtre ile steril edildi. 2 g agar tartılarak toplam hacim 50 mL olacak şekilde deiyonize su içine eklendi. Otoklavlandıktan sonra 55 °C su banyosunda bekletildi. Hazırlanan agar solüsyonlarının her biri, üç farklı pH'da sitrik asit-sodyum sitrat buffer içinde hazırlanan besiyerlerden

biri ile karıştırıldı ve 4 mm kalınlıkta petrilere döküldü. Bu şekilde pH'sı 4.0, 4.5 ve 5.0 olan albümin agar besiyerleri hazırlanmış oldu.

5.2.6.2. Albümin Agar'a İnokülasyon, İnkübasyon, Boyama ve Değerlendirme

Her izolatın SDA'da 35 °C'de 24 saatlik inkübasyonu sonrası elde edilen tek koloni kültüründen serum fizyolojik içinde 1.0 McFarland yoğunluğunda (6.10^6 hücre/mL) maya hücre süspansiyonu hazırlandı.

Her izolatın süspansiyonundan 10 µL miktarda üç farklı pH'daki (4.0, 4.5, 5.0) albümin agar yüzeyine damlatıldı ve bir süre kuruması için beklendi. Tüm izolatlar için bu şekilde iki seri hazırlanarak, biri 35 °C, diğeri 30 °C etüvde 20 gün inkübe edildi. İnkübasyonun gerçekleştirildiği etüvlere su konularak nemli bir ortam sağlandı.

İnkübasyon süresi sonunda agar yüzeyi amido black solüsyonu ile kaplandı ve bir saat süre ile boyandı. Fazla boyanın uzaklaştırılması amacı ile petrilere dekolorizasyon solüsyonu ile 5'er dk süre ile 3-4 kez, ardından PBS ile 5'er dk süre ile 2-3 kez yıkandı ve petrilere kurumaya bırakıldı.

Pozitif kontrol olarak *Candida albicans* ATCC 10231 referans suşu kullanıldı. Pozitif kontrolün etrafında şeffaf renkli, proteolitik aktiviteyi (BSA'nın hidrolizi) gösteren zonun görülmesi ile hazırlanan albümin agarın ekstraselüler proteolitik aktiviteyi ölçtüğü kabul edildi. Ekstraselüler proteolitik aktiviteyi değerlendirmek amacıyla, albümin agar yüzeyinde suşların inokülasyon yerinde oluşan yuvarlak üreme bölgesinin etrafında proteolitik aktiviteyi gösteren zonun varlığı ve varsa zon yarı çapı belirlendi. Zon yarı çapı üreme zonunun bitiminden proteolitik aktivite zonunun bitimine kadar olan uzaklık olarak ölçüldü. İnokülasyon yerinde oluşan yuvarlak üreme bölgesinin etrafında proteolitik aktiviteyi gösteren şeffaf zonun oluşmaması veya zon yarı çapının <1 mm olması durumunda "proteolitik aktivite yok" kabul edildi; $1 \leq$ zon yarı çapı <2 olması durumunda "zayıf proteolitik aktivite"; $2 \leq$ zon yarı çapı ≤ 3 olması durumunda "orta proteolitik aktivite"; zon yarı çapı >3 olması durumunda "yüksek proteolitik aktivite" olduğu düşünüldü. Zon yarı çaplarına göre ekstraselüler proteolitik aktivite yok, zayıf, orta ve yüksek olarak gruplandırıldı (181).

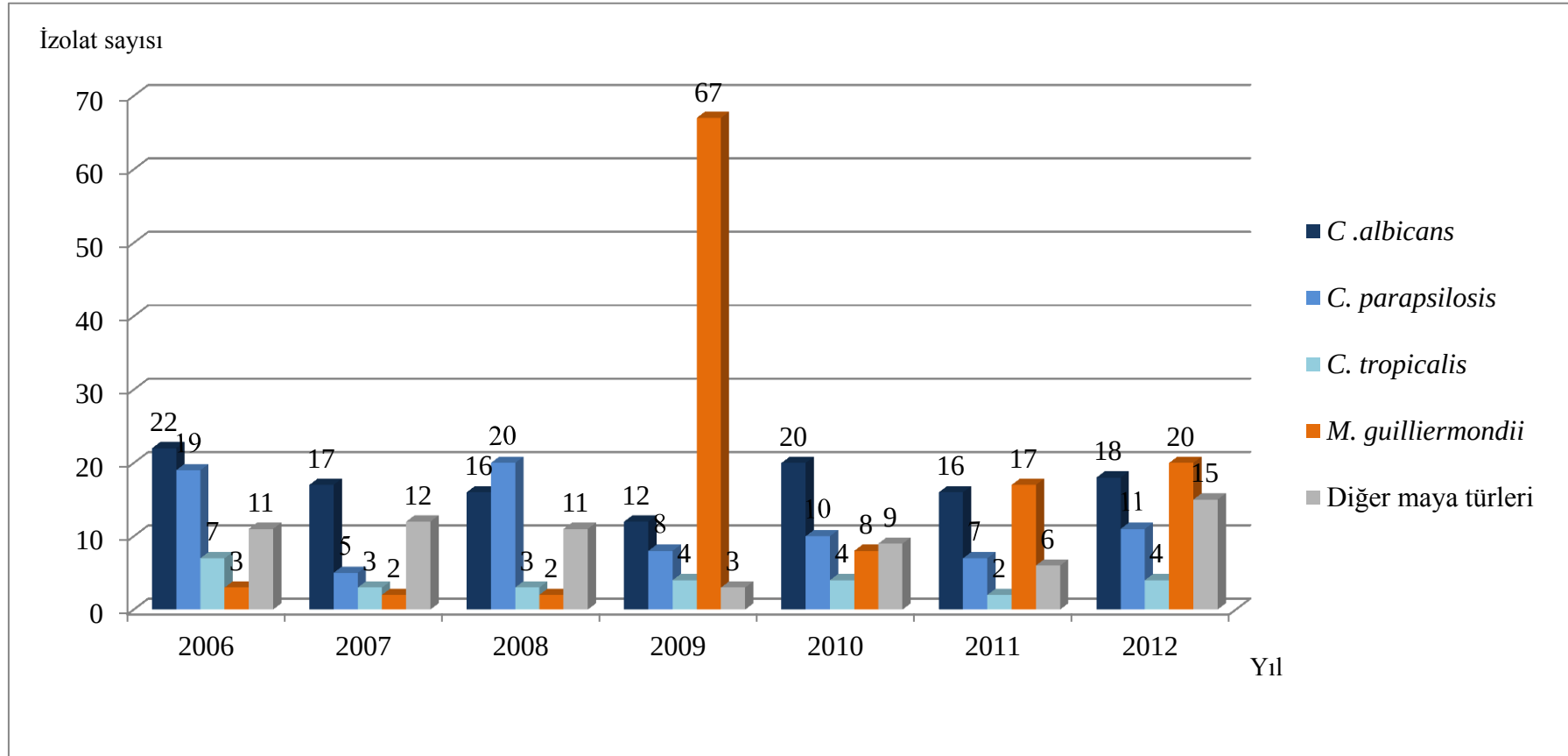
6. BULGULAR

6.1. Kan Kùltürlerinden İzole Edilen Maya Türleri

Ocak 2006-Aralık 2012 tarihleri arasındaki 7 yıllık süreçte kan kùltürlerinden 121 *Candida albicans*, 119 *Meyerozyma guilliermondii*, 80 *Candida parapsilosis*, 27 *Candida tropicalis* izolatu ve diğér maya türlerine ait 67 izolat tesbit edildi. Şekil 6’da kan kùltürlerinden izole edilen maya türlerinin yıllara göre dağılımı gör÷lmektedir.

Meyerozyma guilliermondii, 2006 ve 2007 yıllarında *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*’i takiben en sık izole edilen 4. tür; 2008 yılında *C. parapsilosis*, *C. albicans* ve *C. tropicalis*’i takiben yine en sık izole edilen 4. tür olmuştur. 2009 yılında ise en sık izole edilen tür olmuştur. 2009 yılında *M. guilliermondii*’yi *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* takip etmiştir. 2010 yılında *C. albicans* ve *C. parapsilosis*’i takiben en sık izole edilen 3. tür olmuş, *M. guilliermondii*’yi *C. tropicalis* takip etmiştir. 2011 yılında tekrar (2009 yılındaki gibi) en sık izole edilen tür olmuş, *M. guilliermondii*’yi *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* takip etmiştir. 2012 yılında tekrar (2009 ve 2011 yıllarındaki gibi) en sık izole edilen tür olmuş ve *M. guilliermondii*’yi *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* takip etmiştir. 2006-2012 yılları arasındaki 7 yıllık süreç değérlendirildiğinde *C. albicans* (121 izolat, %29.2)’ı takiben *M. guilliermondii* (119 izolat, %28.7) en sık izole edilen tür olmuştur. *M. guilliermondii*’yi *C. parapsilosis* (80 izolat, %19.3) ve *C. tropicalis* (27 izolat, %6.5) takip etmiştir. Diğér maya türleri 67 izolat ile kan kùltürlerinden izole edilen tüm maya izolatlarının % 16.2’sini oluşturmıştır.

Tablo 21’e bakıldığında, kan kùltürlerinden izole edilen *M. guilliermondii* ve tüm maya izolatu sayısının ve *M. guilliermondii* izolatlarının tüm maya izolatlarına yüzde (%) oranının yıllara göre dağılımı gör÷lmektedir.



Şekil 6. Kan kültürlerinden izole edilen maya türlerinin yıllara göre dağılımı (Diğer maya türleri: *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Kodamaea (Pichia) ohmeri*, *Geotrichum capitatum*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon beigeli*, *Rhodotorula rubra*, *Cryptococcus neoformans*)

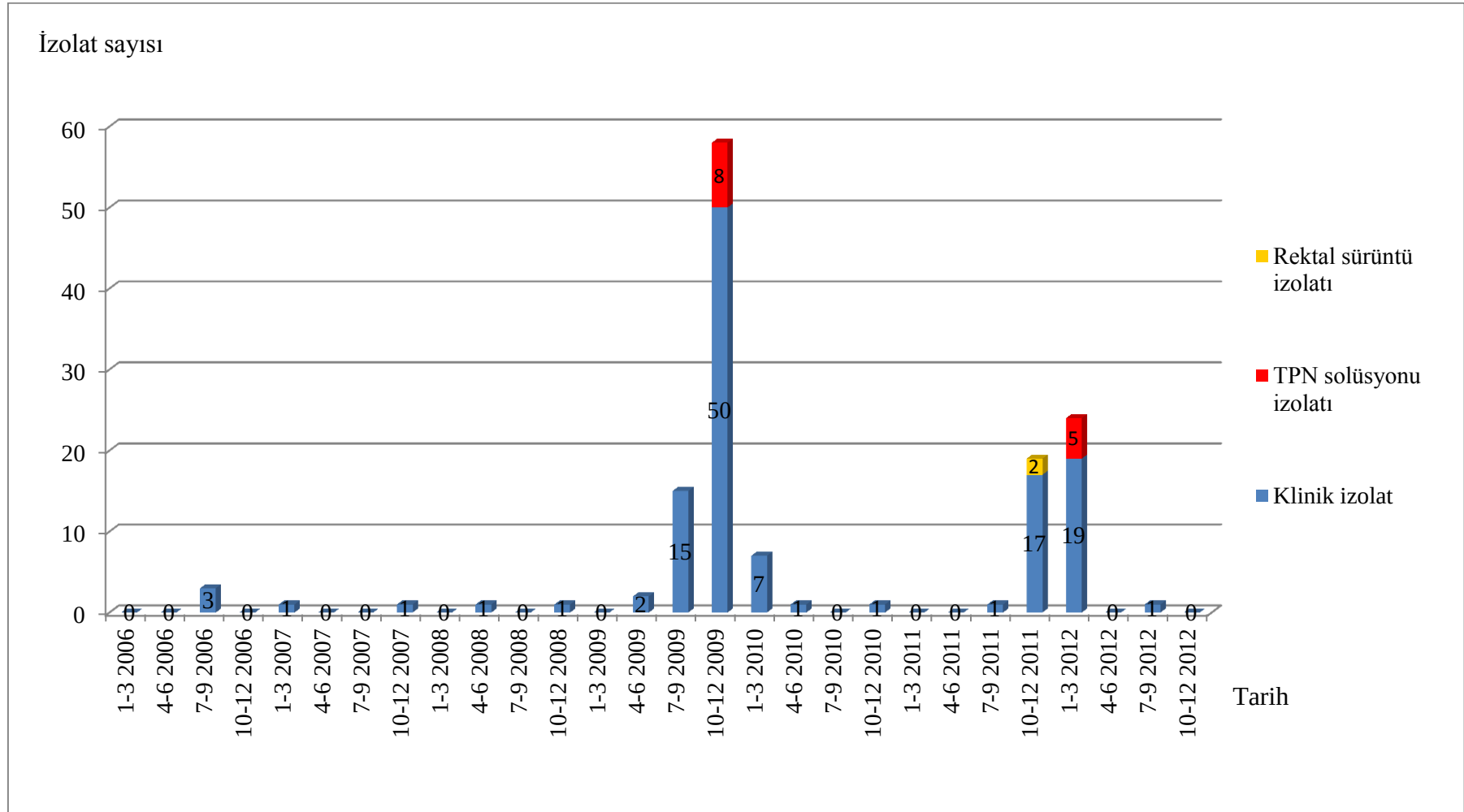
Tablo 21. Kan kültürlerinden izole edilen *Meyerozyma guilliermondii* ve tüm maya izolatu sayılarının yıllara göre dağılımı

Yıl	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatı sayısı (a)	Tüm maya izolatlarının sayısı (b)	% (a/b)
2006	3	62	4.8
2007	2	39	5.1
2008	2	52	3.8
2009	67	94	71.3
2010	8	51	15.7
2011	17	48	35.4
2012	20	68	29.4
Toplam	119	414	28.7

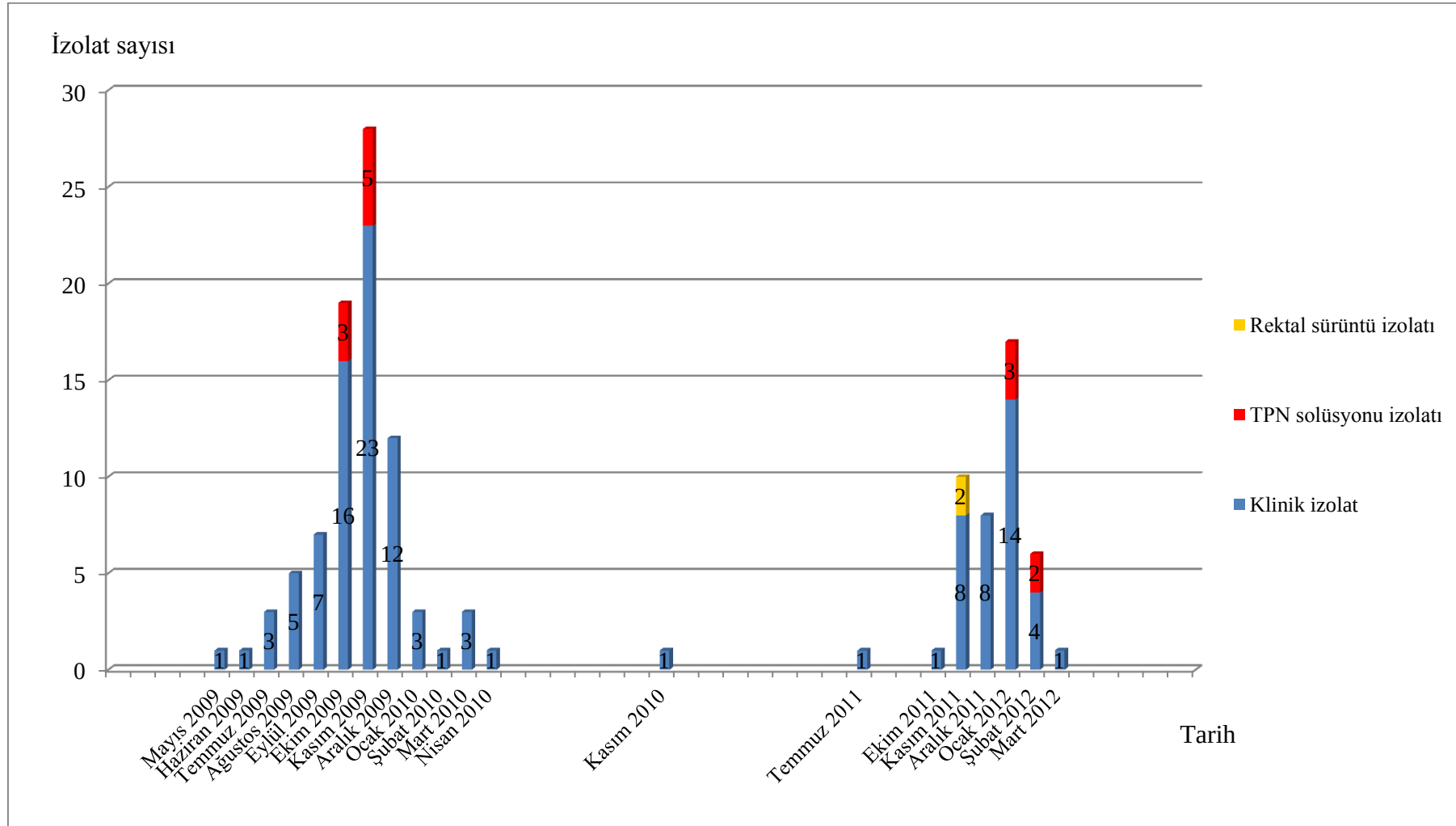
6.2. *Meyerozyma guilliermondii* İzolatlarına Ait Genel Bulgular

Çalışmaya 119 hastaya ait toplam 136 *M. guilliermondii* klinik (n:121) ve sürveyans örneği izolatu (n:15) dahil edildi. 117 hastaya ait 121 izolat (4 hastanın 8 epizotu vardı) çalışmanın klinik izolatlarını oluşturdu. 119 hastadan 2'sinin klinik izolatu yoktu, yalnızca TPN solüsyonu izolatu mevcuttu. Yalnızca TPN solüsyonlarından *M. guilliermondii* izole edilen 2 hasta hariç sürveyans izolatu bulunan bütün hastaların klinik izolatu da mevcuttu.

Şekil 7'de *M. guilliermondii* klinik izolatlarının üçer aylık dönemlerle dağılımı, Şekil 8'de ise aylara göre dağılımı gösterilmektedir. Şekil 8'e bakıldığında, 05.2009-04.2010 tarihleri arasındaki 12 aylık süreçte izole edilen izolatların ilk salgın pikini ve 10.2011-03.2012 tarihleri arasındaki 6 aylık süreçte izole edilen izolatların ikinci salgın pikini oluşturduğu belirlendi. Birinci salgın döneminde, *M. guilliermondii* izolatlarının dağılımı 76 klinik, 8 sürveyans izolatu (TPN solüsyonu izolatu); ikinci salgın döneminde 35 klinik, 7 sürveyans izolatu (5 TPN solüsyonu, 2 rektal sürüntü izolatu) şeklindeydi. Toplamda salgın dönemlerine ait 111 klinik, 15 sürveyans izolatu olmak üzere 126 *M. guilliermondii* izolatu bulunduğu belirlendi. Çalışma kapsamındaki toplam 136 izolatın yalnızca 10'u salgın dönemlerine ait değildi.



Şekil 7. *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının üçer aylık dönemlere göre dağılımı



Şekil 8. *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının aylara göre dağılımı

Meyerozyma guilliermondii klinik izolatlarının örnek tipine göre dağılımı Tablo 22’de, klinik örneklerinden *M. guilliermondii* izole edilen hastaların kliniklere göre dağılımı Tablo 23’de, *Meyerozyma guilliermondii* süveyans izolatlarının örnek tipine göre dağılımı Tablo 24’te gösterilmiştir.

Tablo 22. *Meyerozyma guilliermondii* klinik izolatlarının örnek tipine göre dağılımı

Klinik örnek tipi	İzolat sayısı (%)
Kan*	119 (98.3)
Trakea aspirasyonu	1 (0.85)
Kemik iliği	1 (0.85)
Toplam	121

*Kan izolatlarının 7’si katater kanı, 1’i port kanı izolatıdır.

Katater kanı ve port kanı izolatları çalışmaya dahil edilen hastaların aynı epizod içindeki kan örneklerinden de *M. guilliermondii* izole edildi. Ancak ilk izolat olmaları nedeni ile çalışmaya katater kanı ve port kanı izolatları dahil edildi.

Tablo 23. *Meyerozyma guilliermondii* izole edilen hastaların kliniklere göre dağılımı

Klinik	Hasta Sayısı: 117 (%*)	Klinik: Hasta sayısı (%*)
Pediatri Servisleri	58 (%49.6)	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi: 34 (%29.0)
		Pediyatrik Hematoloji Onkoloji Servisi: 11 (%9.4)
		Pediyatri Adölesan Süt Çocuğu Servisi: 7 (%5.9)
		Pediyatrik Cerrahi Servisi: 3 (%2.5)
		Pediyatri Yoğun Bakım Servisi: 2 (%1.7)
		Pediyatrik Enfeksiyon Servisi: 1 (%0.8)
Yoğun Bakım Servisleri	58 (%49.6)	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi: 34 (%29.0)
		Dahiliye Yoğun Bakım Servisi: 9 (%7.6)
		Aneztezi Yoğun Bakım Servisi: 6 (%5.1)
		Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım Servisi: 3 (%2.5)
		Nöroloji Yoğun Bakım Servisi: 2 (%1.7)
		Nöroşirurji Yoğun Bakım Servisi: 2 (%1.7)
Hematoloji Onkoloji Servisleri	21 (%17.9)	Pediyatri Hematoloji Onkoloji Servisi: 11(%9.4)
		Dahiliye Onkoloji Servisi: 10 (%8.5)
Cerrahi Servisleri	4 (%3.4)	Pediyatrik Cerrahi Servisi: 3 (%2.5)
		Genel Cerrahi Servisi: 1 (%0.8)
Diğer	26 (%22.2)	Dahiliye Servisleri (Gastroenteroloji, Nefroloji, Endokrin): 10 (%8.5)
		Kardiyoloji Servisi: 4 (%3.4)
		Nöroloji Servisi: 3 (%2.5)
		Enfeksiyon Servisi: 3 (%2.5)
		Göğüs Hastalıkları Servisi: 2 (%1.7)
		Kulak Burun Boğaz Servisi: 2 (%1.7)
		Kadın Doğum Servisi: 1 (%0.8)
		Yanık Ünitesi: 1 (%0.8)

*Toplam hasta sayısına (n:117) göre % hesabını gösterir

Tablo 24. *Meyerozyma guilliermondii* süveyans izolatlarının örnek tipine göre dağılımı

Süveyans örneği tipi	İzolat sayısı (%)
TPN solüsyonu	13 (86.6)
Rektal sürüntü	2 (13.3)
Toplam	15

Çalışmamızda ilk salgın piki ve ikinci salgın piki sırasında sürveyans amacıyla alınan 13 farklı TPN solüsyonundan *M. guilliermondii* izole edildi. İlk salgın piki döneminde 8 TPN solüsyonu örneğinden *M. guilliermondii* izolasyonu gerçekleştirilirken, ikinci salgın piki döneminde 5 TPN solüsyonu örneğinden *M. guilliermondii* izolasyonu gerçekleştirildi. 13 TPN solüsyonu 11 farklı hastaya aitti. Yani 2 hastanın 2’şer TPN solüsyonundan *M. guilliermondii* izole edildi. Ayrıca hastalardan 2’sinin yalnızca TPN solüsyonundan bu türün izolasyonu gerçekleştirilirken; 11 hastanın yakın tarihli kan kültürlerinden de türün izolasyonu gerçekleştirildi. Bu hastalar ve izolatlara ait bilgiler Tablo 25’de görülmektedir.

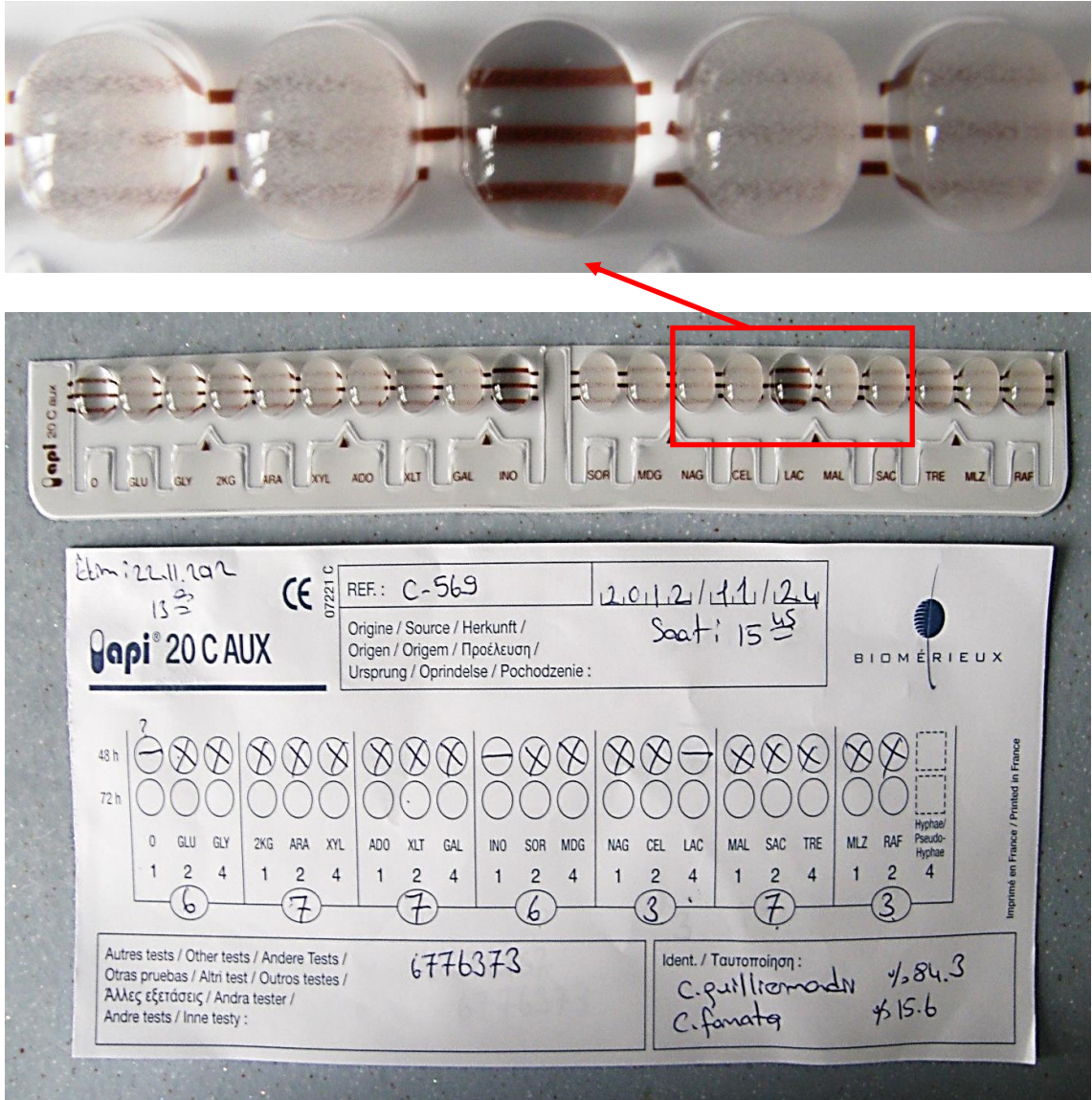
Tablo 25. TPN solüsyonu ve kan kültürlerinden *Meyerozyma guilliermondii* izole edilen hastaların kliniklere göre dağılımı

Hasta no	İzolat kodu	İzolasyon tarihi	Salgın dönemi	Örnek tipi	Örneğin gönderildiği servis
1	C-903	06.10.2009	1	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-925	03.11.2009		TPN	
2	C-891	11.10.2009		Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-886	21.10.2009		TPN	
	C-1010	03.11.2009		TPN	
3	C-894	13.10.2009		Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-927	13.10.2009		TPN	
4	C-908	17.10.2009		Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-887	21.10.2009		TPN	
5	C-938	27.10.2009		Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-926	03.11.2009		TPN	
6	C-935	03.11.2009		TPN	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-924	11.11.2009		Kan	
	C-976	11.11.2009		TPN	
7	C-1236	17.01.2012	2	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-1241	18.01.2012		TPN	
8	C-1251	18.01.2012		Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
	C-1245	18.01.2012		TPN	
9	C-1248	19.01.2012		TPN	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
10	C-1264	08.02.2012		Kan	Pediatri Yoğun Bakım servisi
	C-1262	15.02.2012		TPN	
11	C-1265	16.02.2012		TPN	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi

6.3. Biyokimyasal İdentifikasyon Sonuçları

Çalışma izolatlarının çoğu Resim 2’de gösterilen karbohidrat asimilasyon profiline sahipti. İzolatlar %84.3 *C. guilliermondii*, %15.6 *C. famata* (identifikasyon kodu: 6776373) olarak identifiye edildi. İzolatlar D-glukoz (GLU), gliserol (GLY),

kalsiyum 2-Keto-Glukonat (2KG), L-arabinoz (ARA), D-ksiloz (XYL), adonitol (ADO), ksilitol (XLT), D-galaktoz (GAL), D-sorbitol (SOR), metil- α D-glukopironosid (MDG), N-asetil-glukozamin (NAG), D-sellobiyoz (CEL), D-maltoz (MAL), D-sakkaroz (sukroz, SAC), D-trehaloz (TRE), D-melezitoz (MLZ) ve D-rafinoz (RAF) içeren kuyucuklarda çoğalma gösterirken (beyazımsı, bulanık görünüm); boş (0), inositol (INO), D-laktoz (LAC) içeren kuyucuklarda çoğalma gözlenmedi (şeffaf-çizgili görünüm).

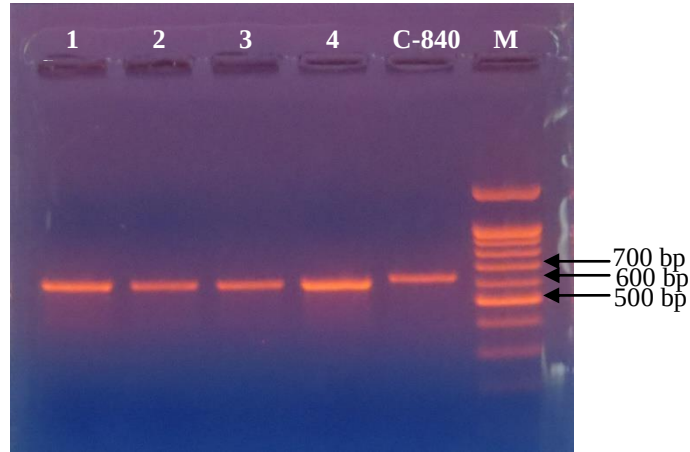


Resim 2. *Meyerozyma guilliermondii* klinik çalışma izolatının (C-569) Api 20 C AUX identifikasyon sistemindeki karbohidrat asimilasyon profilinin görünümü (üstte) ve sayısal değerlendirme çizelgesi (altta)

C-840 ve C-987 izolatlarının karbohidrat asimilasyon profili farklıydı. C-840 izolatu, %60.3 *C. guilliermondii* ve %39.6 *C. famata* (identifikasyon kodu:6756373) olarak identifiye edildi. 0, XLT, INO, LAC içeren kuyucuklarda çoğalma gözlenmezken diğer tüm kuyucuklarda çoğalma gözlemlendi. Bu izolat SDA'daki koloni görünümünün R tipi, pürüklü ve krem rengi olması, kolonilerin besiyeri içine invaze olmaları ve pasajlandıkça koloni şeklinin daha pürüklü hale gelmesi ile farklıydı. C-987 izolatu, %53.8 *C. famata*, %46.1 *C. guilliermondii* (identifikasyon kodu: 6576333) olarak identifiye edildi. 0, ARA, INO, LAC, TRE içeren kuyucuklarda çoğalma gözlenmezken diğer tüm kuyucuklarda çoğalma gözlemlendi. C-987 izolatu, SDA'da diğer çalışma izolatlarına göre daha yavaş çoğalması ve daha küçük koloniler oluşturması ile dikkat çekti. Bütün çalışma izolatları INO ve LAC karbohidratlarını asimile etmedi.

6.4. rDNA Tüm ITS Gen Bölgesi DNA Sekansı

Çalışmaya dahil edilen 136 izolatın genomik DNA'ları kalıp olarak kullanarak ITS1 ve ITS4 primerleri ile yapılan PCR çalışmasında C-840 izolatında 636-638 bp, diğer tüm izolatlarda 607 bp PCR ürünü gözlemlendi (Resim 3).



Resim 3. *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının rDNA tüm ITS bölgesi PCR ürünlerinin agaroz jelde görünümü **1, 2.** *M. guilliermondii* izolatlarını temsil eder **3.** *Candida guilliermondii* CBS 566 **4.** *Pichia guilliermondii* CBS 2030 **C-840.** Çalışma izolatu **M.** 100-1500 bp DNA marker/mass ladder

Çalışma izolatlarının rDNA tüm ITS gen bölgesinin ITS4 primeri ile döngüsel dizileme reaksiyonu sonucu elde edilen DNA dizileri öncelikle Pubmed-Blast-Nucleotide blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) kaynağında sorgulandı ve elde

edilen sonuçlara göre izolat DNA sekansları Pubmed-Nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>) kaynağından elde edilen *Candida guilliermondii* ATCC 6260 referans suşunun tüm ITS gen bölgesi DNA sekansı (accession no: AY939792) ile Chromas Lite 2.1 (Technelysium Pty.Ltd.) programı kullanılarak karşılaştırıldı ve izolatların sekansları belirlendi. C-840 izolatı *Candida friedrichii* CBS 4114 referans suşunun tüm ITS gen bölgesi DNA sekansı (accession no: HQ283377) ile karşılaştırıldı. Ayrıca elde edilen tüm DNA sekansları online Clustal Omega (EMBL-EBI, Hinxton, Cambridgeshire, İngiltere) programı kullanılarak birbirleriyle karşılaştırıldı. Çalışma izolatlarında üç farklı DNA sekansı belirlendi. Elde edilen DNA sekansları K1, K2 ve C-840 ile kodlandı ve aşağıdaki metinde gösterildi. K1 ve K2, 564 baz; C-840'da ise 589 bazlık DNA sekanslandı. *Pichia* ve *friedrichii* çalışma izolatlarımızın sekans sonuçlarını karşılaştırdığımız referans suşların sekanslarıdır.

Pichia	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGTATTCTTTTGCCAGCGCTTAACCTGCGC	60
K1	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGTATTCTTTTGCCAGCGCTTAACCTGCGC	60
K2	TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACAGTATTCTTTTGCCAGCGCTTAACCTGCGC	60

Pichia	GGCGAAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTGATACAGAACTCTTGCTTTGGTTTGGCCTA	120
K1	GGCGAAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTGATACAGAACTCTTGCTTTGGTTTGGCCTA	120
K2	GGCGAAAAACCTTACACACAGTGTCTTTTGATACAGAACTCTTGCTTTGGTTTGGCCTA	120

Pichia	GAGATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAAACAAAACACAATTTAATTATTTTACAGTTAGTCAA	180
K1	GAGATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAAACAAAACACAATTTAATTATTTTACAGTTAGTCAA	180
K2	GAGATAGGTTGGGCCAGAGGTTTAAACAAAACACAATTTAATTATTTTACAGTTAGTCAA	180

Pichia	ATTTTGAATTAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAG	240
K1	ATTTTGAATTAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAG	240
K2	ATTTTGAATTAATCTTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAG	240

Pichia	AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTT	300
K1	AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTT	300
K2	AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATATGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTT	300

Pichia	GAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATCCAGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTCTCT	360
K1	GAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATCCAGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTCTCT	360
K2	GAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATCCAGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTCTCT	360

Pichia	CTCAAACCCCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTTAGTCGACTAGGCGTTTGCTTGAA	420
K1	CTCAAACCCCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTTAGTCGACTAGGCGTTTGCTTGAA	420
K2	CTCAAACCCCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTTAGTCGACTAGGCGTTTGCTTGAA	420

Pichia	AAGTATTGGCATGGGTAGTACTAGATAGTGCTGTCGACCTCTCAATGTATTAGGTTTATC	480
K1	AAGTATTGGCATGGGTAGTACTAGATAGTGCTGTCGACCTCTCAATGTATTAGGTTTATC	480
K2	AAGTATTGGCATGGGTAGTACTAGATAGTGCTGTCGACCTCTCAATGTATTAGGTTTATC	480

Pichia	CAACTCGTTGAATGGTGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGTTGGCCCGGCCTTACAACAAC	540
K1	CAACTCGTTGAATGGTGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGTTGGCCCGGCCTTACAACAAC	540
K2	CAACTCGTTGAATGGTGTGGCGGGATATTTCTGGTATTGTTGGCCCGGCCTTACAACAAC	540

Pichia	CAACAACCTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAG	600
K1	CAACAACCTTTGACCTCAAATCAG-----	564
K2	CAACAACCTTTGACCTCAAATCAG-----	564

Pichia	CGGAGGA	607
K1	-----	
K2	-----	

```

friedrichii   TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATAGTTTGTGCTGCGCTTA 60
C-840         TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGATAGTTTGTGCTGCGCTTA 60
*****

friedrichii   ATTGCGCGGTGACAAGCAAACACCTTACACACTGTGTTTTGTTTTATTGAAAACCTTGCT 120
C-840         ATTGCGCGGTGACAAGCAAACACCTTACACACTGTGTTTTGTTTTATTGAAAACCTTGCT 120
*****

friedrichii   TTGGTTTGGCGCAAGCTGGGCCAAAGACTTTACACAACTTCAATTGCGAAATTGAATTG 180
C-840         TTGGTTTGGCGCAAGCTGGGCCAAAGACTT-ACACAACTTCAATTGCGAAATTGAATTG 179
*****

friedrichii   TTTTAAATTTTATTGTCAATTTGTTTGATTAATTCAAATAATCTTCAAACCTTTC 240
C-840         TTTT-AAATTTTATTGTCAATTTGTTTGATTAATTCAAATAATCTTCAAACCTTTC 238
***

friedrichii   AACACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGAGCGAAATGCGATAAGTAATA 300
C-840         AACACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGAGCGAAATGCGATAAGTAATA 298
*****

friedrichii   TGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATT 360
C-840         TGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATT 358
*****

friedrichii   CCAAAGGCATGCTGTGTTGAGCGTCATTTCTCCTTCAAACCTTTGGGTTTGGTGTGAG 420
C-840         CCAAAGGCATGCTGTGTTGAGCGTCATTTCTCCTTCAAACCTTTGGGTTTGGTGTGAG 418
*****

friedrichii   TGATACTCTTAGTCAACTAAGTGTGCTTTAAATATAATGGCAGGAGTGTACTGGATAG 480
C-840         TGATACTCTTAGTCAACTAAGTGTGCTTCAAATATAATGGCAGGAGTGTACTGGATAG 478
*****

friedrichii   TACGAACTGGTTATTCAATGTATTAGGTTTATCCAACCTCGTTGAAGACTGGGGTAGTAAA 540
C-840         TACGAACTGGTTATTCAATGTATTAGGTTTATCCAACCTCGTTGAAGACTGGGGTAGTAAA 538
*****

friedrichii   TTTCTAGTAATTGGCTCGGCCTTATAATAACAACTAAGTTGACCTCAAATCAGTAAGAT 600
C-840         TTTCTAGTAATTGGCTCGGCCTTATAATAACAACTAAGTTGAC----- 582
*****

friedrichii   GCC 603
C-840         ---

```

Altı çizili sekans bölgeleri yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla ITS1, ITS2-ITS3 ve ITS4 primerlerinin bağlanma bölgelerini göstermektedir. Açıkve koyu dolgulu sekanslar sırasıyla ITS1 ve ITS2 bölgesini göstermektedir (182).

K1 ve K2 DNA sekanslı bütün izolatların IT1 sekansı 169 bp ve ITS2 sekansı 197 bp büyüklüğündedir. ITS1 ve ITS2 DNA sekansı büyüklükleri referans sekans ile aynıdır. K1 DNA sekansı referans sekans ile tümüyle aynıdır. K1 sekansı ile K2 sekansı arasındaki tek fark K1 sekansında ITS2 bölgesinde, 443. pozisyonda "A (adenin)" nükleotidi bulunurken K2 sekansında aynı pozisyonda "G (guanin)" nükleotidinin bulunmasıdır. C-840 sekansı K1 ve K2 sekanslarından tümüyle farklıdır.

C-840 izolatının ITS1 DNA sekansı 199 bp, ITS2 DNA sekansı 181 bp büyüklüğündedir. Referans suş sekansı ile karşılaştırıldığında; ITS1 sekansının referans suş sekansından 2 bp daha küçük olduğu, ITS2 sekansının ise aynı büyüklükte olduğu görüldü. Referans sekansta, 151. ve 185. pozisyonlardaki T nükleotidine karşılık C-840'da nükleotid (-) bulunmamaktadır. Referans sekansta 70., 451. ve 534.

pozisyonundaki T nükleotidi yerine C-840'da C nükleotidi bulunmaktadır. Referans sekansta 132 pozisyonunda C nükleotidi bulunurken, C-840'da A bulunmaktadır.

Tablo 26. *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının tüm ITS DNA sekansı blast sonucu

İzolat kodu	Tüm ITS DNA sekansı	Tüm ITS DNA sekansı blast sonucu	E değeri	İdentifikasyon	Accession no
C-569	K2	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> DMRF-5	0.0	%100	KC237294
C-610		<i>Candida carpophila</i> N12C	0.0	%99	DQ666191
C-650		<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryi</i> CBS 8417	0.0	%99	AF209874
C-840	C-840	<i>Candida membranifaciens</i> W14-3	0.0	%99	EF197812
		<i>Candida friedrichii</i> CBS 4114	0.0	%99	HQ283377
Diğer izolatlar	K1	<i>Pichia guilliermondii</i> ATCC 6260	0.0	%100	AY939792
		<i>Candida carpophila</i> strain N12C	0.0	%100	DQ666191
		<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryi</i> CBS 8417	0.0	%99	AF209874

Tablo 27. *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının ITS1 DNA sekansı blast sonucu

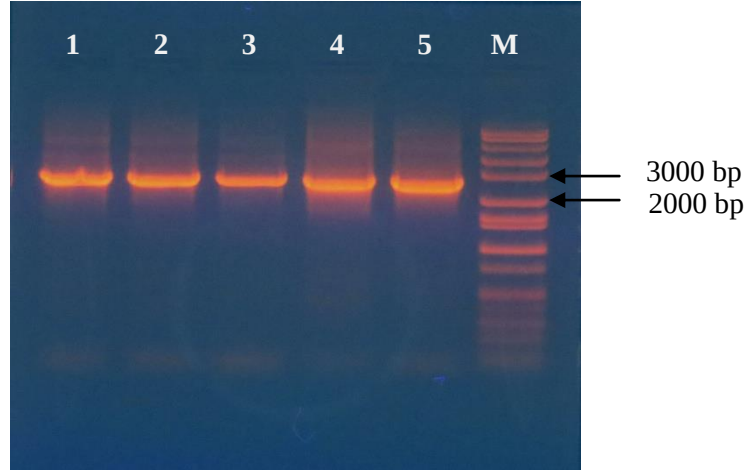
İzolat kodu	Tüm ITS DNA sekansı	ITS1 DNA sekansı blast sonucu	E değeri	İdentifikasyon	Accession no
C-569	K2	<i>Pichia guilliermondii</i> ATCC 6260	3e-82	%100	AY939792
C-610					
C-650					
C-840	C-840	<i>Candida membranifaciens</i> W14-3	3e-98	%100	EF197812
		<i>Candida friedrichii</i> CBS 4114	4e-92	%98	HQ283377
Diğer izolatlar	K1	<i>Pichia guilliermondii</i> ATCC 6260	3e-82	%100	AY939792

Tablo 28. *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının ITS2 DNA sekansı blast sonucu

İzolat kodu	Tüm ITS DNA sekansı	ITS2 DNA sekansı blast sonucu	E değeri	İdentifikasyon	Accession no
C-569	K2	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> DMRF-5	1e-97	%100	KC237294
C-610		<i>Debaryomyces sp.</i> R99	1e-97	%100	JQ665430
C-650					
C-840	C-840	<i>Candida membranifaciens</i> W14-3	8e-89	%100	EF197812
		<i>Candida friedrichii</i> CBS 4114	2e-85	%99	HQ283377
Diğer izolatlar	K1	<i>Pichia guilliermondii</i> ATCC 6260	1e-97	%100	AY939792

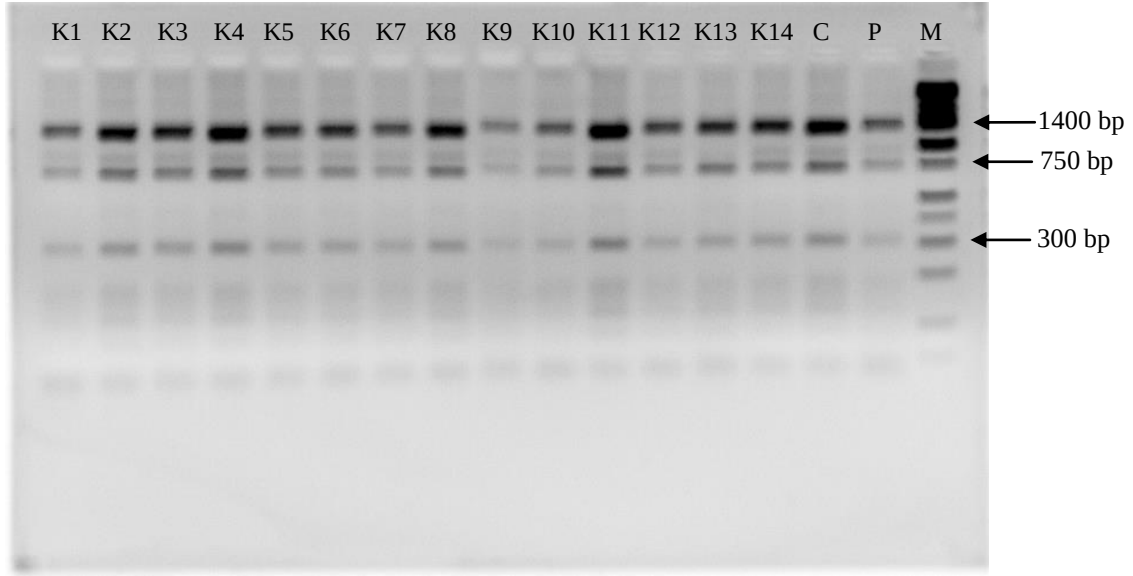
6.5. rDNA Tüm IGS Gen Bölgesi PCR Ürünlerinin *AluI* Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi

Tüm çalışma izolatlarına ait genomik DNA örneklerinden (C-840: *C. membranifaciens* bu aşamaya dahil edilmedi) 2.0-3.0 kb aralığında rDNA tüm IGS bölgesi amplifikasyon ürünü elde edildi. *C. guilliermondii* CBS 566, *P. guilliermondii* CBS 2030 (2.8 kb), *C. fermentati* CBS 2022 (2.5 kb), *C. carpophila* CBS 5256 (2.5 kb), *D. hansenii* CBS 768 (2.7 kb) ve *C. famata* CBS 1795 (2.7 kb) referans suşlarına ait genomik DNA örneklerinden de 2.0-3.0 kb aralığında rDNA tüm IGS bölgesi amplifikasyon ürünü elde edildi (17). Resim 4'te LR13 (forward) ve SR21 (reverse) primerleri kullanılarak rDNA tüm IGS gen bölgesi PCR ürünü büyüklükleri %0.7'lik agaroz jelde gösterildi.



Resim 4. *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının rDNA tüm IGS gen bölgesi PCR ürünlerinin agaroz jelde görünümü 1. *M. guilliermondii* izolatlarını temsil eder 2. *Candida guilliermondii* CBS 566 ve *Pichia guilliermondii* CBS 2030 3. *Debaryomyces hansenii* CBS 768 ve *Candida famata* CBS 1795 5. *Candida fermentatii* CBS 2022 ve *Candida carpophila* CBS 5256 izolatlarının IGS PCR ürünü M. 50-10000 bp HiLo DNA büyüklük marker'ı

rDNA tüm IGS gen bölgesi PCR ürünlerinin *AluI* restriksiyon endonükleaz ile kesimi ile tüm çalışma izolatlarında *C. guilliermondii* CBS 566 ve *P. guilliermondii* 2030 referans suşları ile aynı restriksiyon bant profili gözlemlendi. Resim 5'de çalışma izolatlarının ve referans suşların rDNA tüm IGS bölgesi PCR ürünlerinin *AluI* restriksiyon endonükleaz ile kesilmesi oluşan bant profili gösterildi.

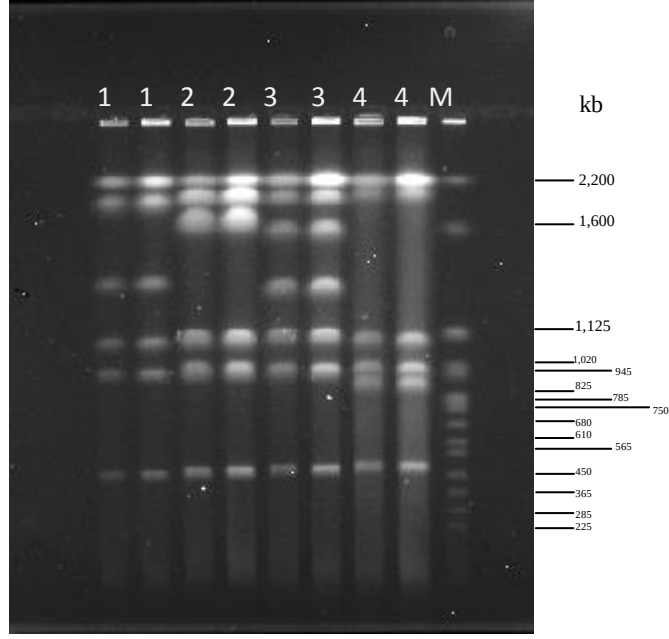


Resim 5. *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının rDNA tüm IGS bölgesi PCR ürünlerinin *AluI* ile kesilmesiyle oluşan bant profillerinin agaroz jelde görünümü **1-14**. Farklı *M. guilliermondii* izolatlarını temsil eder **C.** *Candida guilliermondii* CBS 566 **P.** *Pichia guilliermondii* CBS 2030 **M.** 50-10000 bp HiLo DNA büyüklük marker'ı

6.6. Pulse Field Jel Elektroforezi

6.6.1. Pulsed Field Jel Elektroforezi-Elektroforetik Karyotipleme Sonuçları

Pulse Field Jel Elektroforezi (PFGE)-Elektroforetik Karyotipleme (EK) protokolü sonunda *Pichia guilliermondii* CBS 2030 ve *C. guilliermondii* CBS 566 referans suşlarının ikisinde de 6 kromozom bandı gözlemlendi. Ancak bu iki referans suşa ait karyotip bant profilleri farklıydı (Resim 6). Suşların 1, 2, 4 ve 5. bantları (Kuyucuğa yakın olan banttan uzak olan banta doğru 1-5 şeklinde numaralandırma yapıldı) aynı büyüklükte gözlenirken 3. bantlar farklı büyüklükteydi.



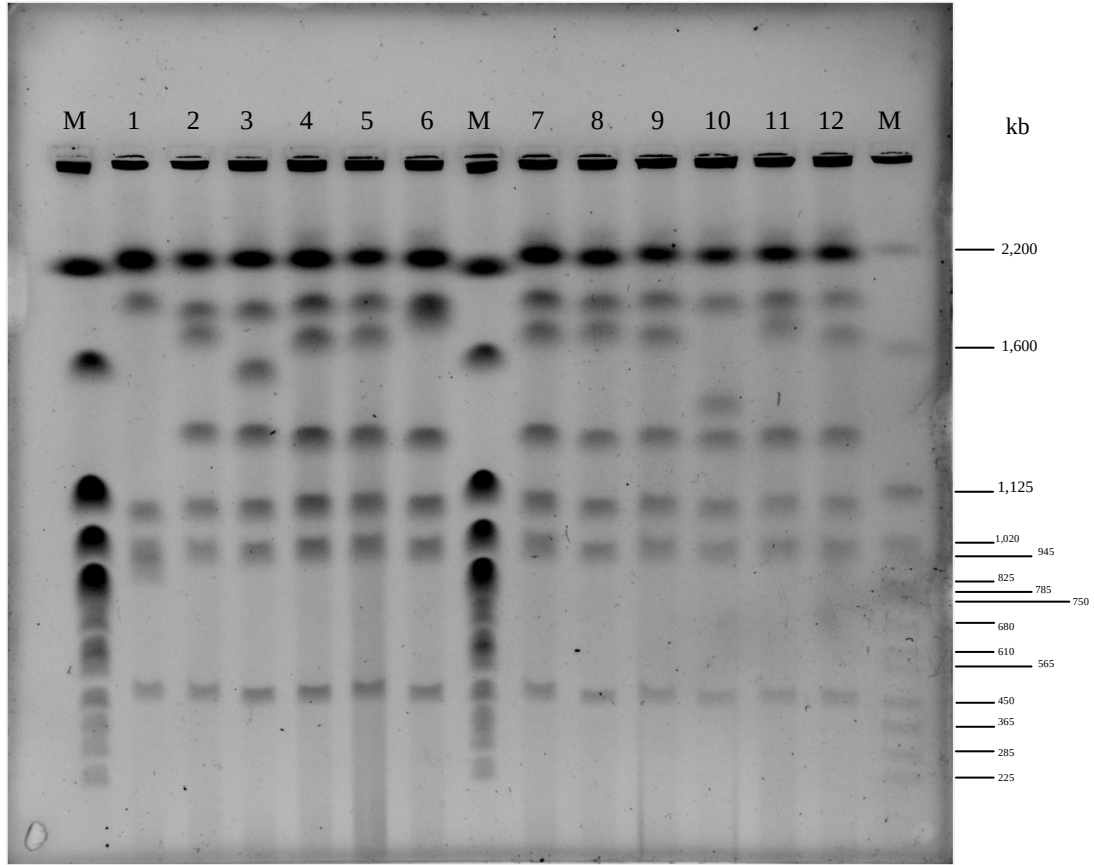
Resim 6. *Pichia guilliermondii* CBS 2030 ve *Candida guilliermondii* CBS 566 suşlarının PFGE-EK bant profillerinin görünümü **1.** *P. guilliermondii* CBS 2030 **2.** *C. guilliermondii* CBS 566 **3.** C-569 çalışma izolatu **4.** C-579 çalışma izolatu **M.** 0.225-2.2 Mb *Saccharomyces cerevisiae* kromozomal DNA marker

Meyerozyma guilliermondii çalışma izolatlarının PFGE-EK çalışması için, çalışma grubu izolatları arasından her yılı temsil eden en az 1 izolat seçildi. İzolatların gönderildiği servisler (pediatri servisleri:8, yoğun bakım servisleri:5, hematoloji-onkoloji servisleri:3, diğer:3 izolat) Tablo 24'deki (Klinik örneklerinden *M. guilliermondii* izole edilen hastaların kliniklere göre dağılımı) dağılımı temsil edecek şekilde seçildi. 2 hastanın (hasta no: 4 ve 8) birden fazla izolatu çalışmaya dahil edilirken diğer tüm hastaların 1 izolatu kullanıldı. 4 nolu hastanın 2 kan ve 1 TPN solüsyonu izolatu olmak üzere farklı tarihlerde izole edilen 3 izolatu; 8 nolu hastanın ise 1 kan ve 1 rektal sürüntü izolatu olmak üzere farklı tarihlerde izole edilen 2 izolatu çalışmaya katıldı. 2 farklı hastaya (hasta no: 5 ve 6) ait örnekler aynı tarihte (08.10.2009) gönderilmişti. Toplam 9 hastaya ait 12 izolat bu çalışma için kullanıldı. PFGE-EK çalışmasında kullanılan *Meyerozyma guilliermondii* çalışma izolatlarına ait bilgiler Tablo 28'de gösterildi.

Tablo 29. PFGE-EK uygulanan *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının izolasyon tarihi, örnek tipi ve servis bilgileri

Hasta no	İzolat no	İzolat kodu	İzolasyon tarihi	Örnek tipi	Örneğin gönderildiği servis
1	1	C-579	12.07.2006	Kan	Pediyatrik Hematoloji Servisi
2	2	C-650	31.01.2007	Kan	Pediyatri Süt Çocuğu Servisi
3	3	C-787	26.04.2008	Kan	Pediyatri Hematoloji Onkoloji Servisi
4	4	C-903	06.10.2009	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
4	5	C-925	03.11.2009	TPN solüsyonu	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
4	6	C-942	09.11.2009	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
5	7	C-907	08.10.2009	Kan	Dahiliye Onkoloji Servisi
6	8	C-898	08.10.2009	Kan	Dahiliye Gastroenteroloji Servisi
7	9	C-1051	31.10.2010	Kan	Yanık Ünitesi
8	10	C-1153	21.11.2011	Kan	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
8	11	C-1162	29.11.2011	Rektal sürüntü	Yenidoğan Yoğun Bakım Servisi
9	12	C-1272	03.03.2012	Kan	Dahiliye Endokrin Servisi

Tablo 29’da özellikleri belirtilen izolatların PFGE-EK çalışması sonucu Resim 7’de belirtilen jel görünümü elde edildi. 9 hastanın 12 izolatında 5 farklı karyotip (A, B, C, D ve E) elde edildi (Tablo 30’a bakınız). Klinik izolatların 8 tanesinde (2, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12) aynı karyotip (B) gözlemlendi. Dolayısıyla karyotip B çalışılan 12 izolat arasında baskın karyotipti. Diğer 4 izolatta (1,3,6,10) birbirlerinden ve diğer tüm izolatlardan farklı karyotipler gözlemlendi. 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11 ve 12 nolu izolatlarda 7 kromozom bandı gözlemlenirken 1 ve 6 nolu izolatlarda 6 kromozom bandı gözlemlendi.



Resim 7. *Meyerozyma guilliermondii* çalışma izolatlarının PFGE-EK bant profillerinin görünümü **1-12**. *M. guilliermondii* izolatları **M**. 0.225-2.2 Mb *Saccharomyces cerevisiae* kromozomal DNA marker

Meyerozyma guilliermondii izolatlarının PFGE-EK bant profilleri değerlendirilerek belirlenen karyotipleri ve izolasyon yılları Tablo 30’da belirtilmiştir.

Tablo 30. *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının PFGE karyotipleri

İzolat no	İzolat kodu	Karyotip	İzolasyon yılı
1	C-579	A	2006
2, 4, 5, 7, 8, 9, 11, 12	C-650, C-903, C-925, C-907, C-898, C-1051, C-1162, C-1272	B	2007, 2009, 2009, 2009, 2009, 2010, 2011, 2012
3	C-787	C	2008
6	C-942	D	2009
10	C-1153	E	2011

Şekil 8’e bakıldığında 05.2009-04.2010 tarihleri arasındaki 12 aylık süreçte izole edilen izolatların ilk salgın pikini ve 10.2011-03.2012 tarihleri arasındaki 6 aylık süreçte

izole edilen izolatların ikinci salgın pikini oluşturduğu düşünüldüğünde; her iki salgın döneminde de karyotip B'nin hakim olduğu görüldü. 2006 ve 2008 yıllarında izole edilen ve salgın dönemlerine ait olmayan 1 ve 3 nolu izolatlar, diğer tüm izolatlardan farklı karyotipe sahipti. İlginç şekilde, 2007 yılında izole edilen ve salgın dönemlerine ait olmayan 2 nolu izolat ise salgın izolatlarıyla aynı karyotipe sahipti.

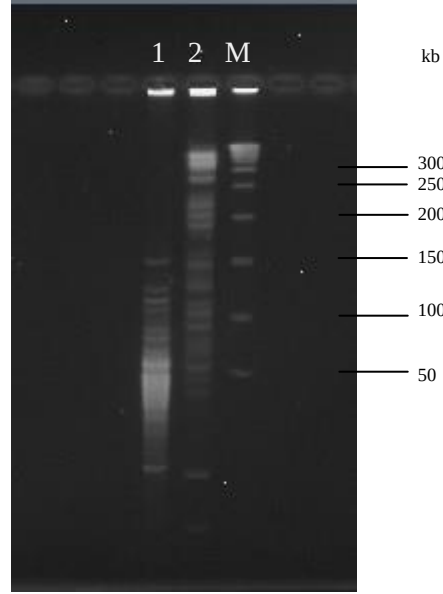
Aynı hastanın (hasta no:4) iki farklı epizotundan izole edilen kan izolatları (izolat no: 4 ve 6) ve bir TPN izolatının (izolat no:5) bant profilleri değerlendirildiğinde; ilk epizod kan izolatu ile TPN izolatının aynı karyotipe sahip olduğu ancak ikinci epizodkan izolatının diğer tüm izolatlardan farklı bir karyotipe sahip olduğu belirlendi.

Farklı servislerden (Dahiliye Onkoloji ve Dahiliye Gastroenteroloji Servisi) gönderilen kan kültürlerinden aynı tarihte (08.10.2009) izole edilen iki izolat (izolat no: 7 ve 8) aynı karyotipe sahipti.

Aynı hastaya ait kan ve rektal sürüntü izolatlarında (sırasıyla izolat no: 10 ve 11) farklı karyotipler görüldü. İlginç şekilde, rektal sürüntü izolatu salgın dönemleri izolatları ile aynı karyotipe (karyotip B) sahipken kan izolatu diğer tüm izolatlardan farklı bir karyotipe sahipti.

6.6.2. Pulsed Field Jel Elektroforezi-Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi Sonuçları

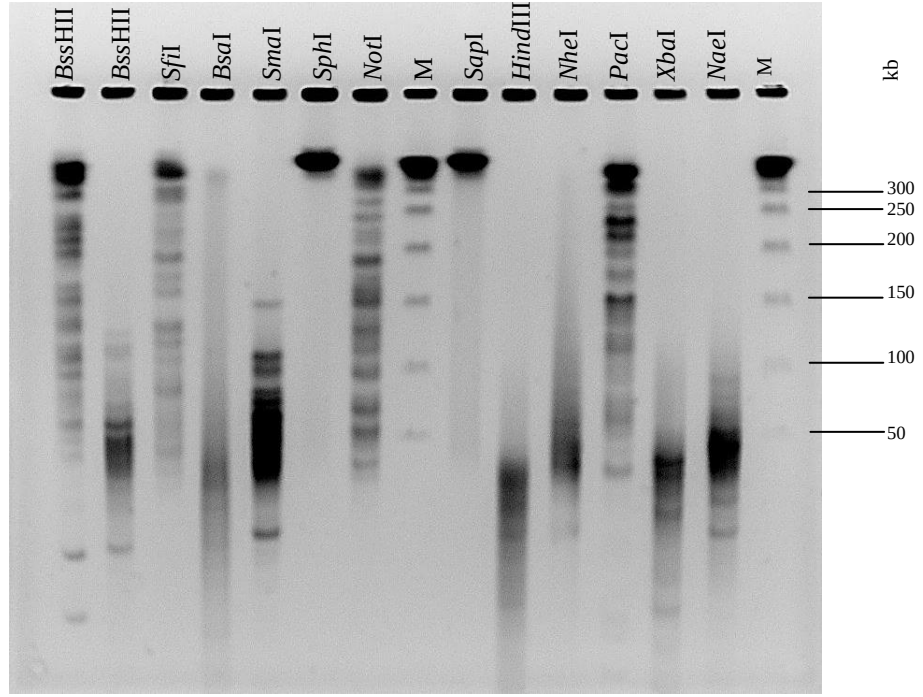
Meyerozyma guilliermondii türü için pulsed field jel elektroforezi (PFGE)-genomik DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzim analizi (REAG) protokolünün optimizasyonu amacı ile ilk olarak *C. guilliermondii* CBS 566 referans suşu *Bss*HII restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi (PFGE-REAG *Bss*HII). *Candida albicans* SC5314 suşu protokolün optimizasyonu için referans suş olarak kullanıldı (183).



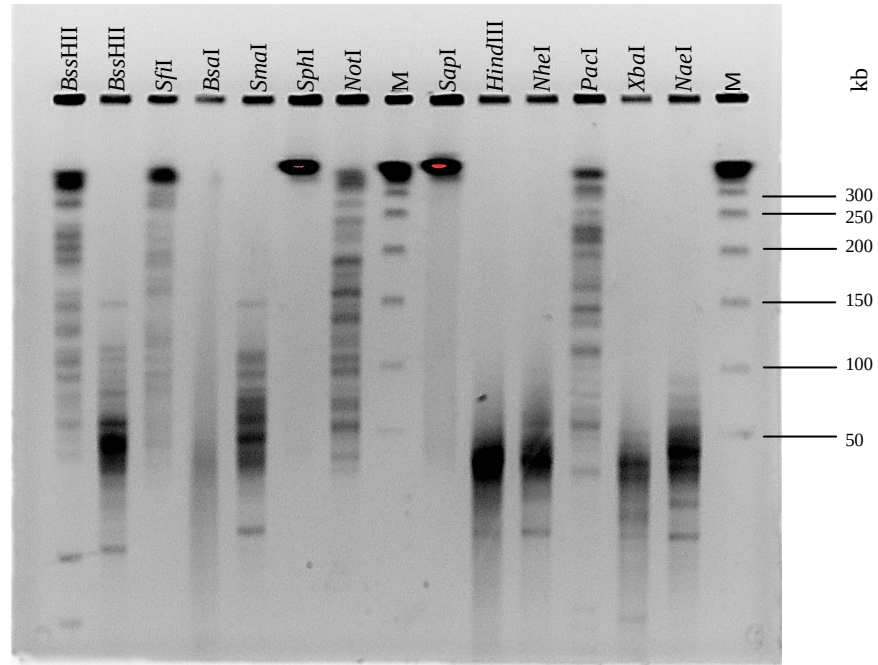
Resim 8. *Candida guilliermondii* CBS 566 ve *Candida albicans* SC5314 referans suşlarının pulsed field jel elektroforezi-genomik DNA'nın BssHII enzimi ile kesimi sonucu oluşan bant profilleri. **1.** *Candida guilliermondii* CBS 566 **2.** *Candida albicans* SC5314 **M.** 50-800 kb Lambda ladder DNA büyüklük marker'ı

Candida albicans SC5314 suşunun BssHII enzimi ile kesimi sonucu agaroz jelde görüntülenen bant profili (Resim 8) protokolün optimize olduğunu gösterdi. *C. guilliermondii* CBS 566 referans suşunun BssHII ile PFGE-REAG sonucu oluşan bant profili Lambda ladder DNA büyüklük marker'ı ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde; en büyük bantın 150 kb olduğu gözlemlendi. 50 kb civarında oluşan smear, yakın büyüklüklerde çok fazla bantın aynı bölgede yığıldığı ve birbirinden ayıramadığı şeklinde yorumlandı. Dolayısıyla BssHII enziminin *M. guilliermondii* türünün PFGE-REAG için uygun olmadığı sonucuna varıldı.

Candida guilliermondii CBS 566 (anamorf) ve *P. guilliermondii* CBS 2030 (telemorf) referans suşlarının farklı restriksiyon enzimleri kullanılarak gerçekleştirilen PFGE-REAG agaroz jel görüntüleri Resim 9 ve Resim 10'da görülmektedir.



Resim 9. *Candida guilliermondii* CBS 566 suşu genomik DNA'sının farklı restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan PFGE bant profillerinin görünümü **M.** 50-800 kb Lambda ladder DNA büyüklük marker'ı



Resim 10. *Pichia guilliermondii* CBS 2030 suşu genomik DNA'sının farklı restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi sonucu oluşan PFGE bant profillerinin görünümü **M.** 50-800 kb Lambda ladder DNA büyüklük marker'ı

Her iki referans suşta aynı enzimin aynı restriksiyon bant profilini verdiği gözlemlendi. *BsaI* enzimi ile kesim sonucu yalnızca smear gözlemlendi. Bu görünüm enzimin çok sayıda küçük DNA parçası oluşturduğu ve bu parçaların megabaz agaroz jel içinde hızla ilerleyerek jelden uzaklaştığı şeklinde yorumlandı. *SphI*, *SapI* enzimleri ile hiç kesim gerçekleşmediği görüldü. *BssHII* ve *SmaI* enzimleri ile kesimde en büyük bant 150 kb büyüklüğündeydi ve bantların çoğu 50 kb civarına yığılmıştı. *HindIII*, *NheI*, *XbaI* ve *NaeI* restriksiyon enzimleri ile kesimde de bantlar 50 kb civarına yığılmıştı. *BssHII*, *SmaI*, *HindIII*, *NheI*, *XbaI* ve *NaeI* enzimleri ile kesim sonucu oluşan bantların marker aralığına dağılmadığı; marker' ın en küçük bandına yakın büyüklükte olduğu ve jel içinde ayırt edilemeyen bantlar olduğu görüldü. Bu nedenle bu enzimlerin *M. guilliermondii* çalışma izolatlarının PFGE-REAG için uygun olmadığına karar verildi.

NotI, *PacI* ve *SfiI* kesim ürünleri marker aralığına dağılmış, ayırt edilebilir bantlar şeklindeydi. *SfiI* kesim ürünleri daha silik gözlenmekle birlikte *NotI* ve *PacI* ürünleri daha net ayırt edilebilen bantlar şeklindeydi. Bu nedenle *NotI*, *PacI* ve *SfiI* restriksiyon enzimlerinin *M. guilliermondii* izolatlarının PFGE-REAG için uygun enzim adayları olduğu sonucuna varıldı.

6.7. Antifungal (Flukonazol, Vorikonazol, İtrakonazol, Flusitozin) Duyarlılık Sonuçları

Meyerozyma guilliermondii izolatlarının flukonazol, vorikonazol, itrakonazol ve flusitozin MİK değerleri Tablo 31'de; antifungal duyarlılık sonuçları, MİK aralıkları, MİK50 ve MİK90 değerleri ise Tablo 32'de belirtildi. *Candida membranifaciens* izolatının (C-840) MİK değerleri Tablo 33'de gösterildi.

Tablo 31. *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının flukonazol, vorikonazol, itrakonazol ve flusitozin MİK değerleri (µg/mL)

Sıra	İzolat kodu	Tarih	Flukonazol	Vorikonazol	İtrakonazol	Flusitozin
1	C-579	12.07.2006	2	0.03	0.25	≤ 0.03
2	C-610	21.08.2006	4	0.06	0.5	0.03
3	C-650	31.01.2007	8	0.12	0.5	≤ 0.03
4	C-749	15.11.2007	4	0.06	0.25	0.03
5	C-787	26.04.2008	16	0.12	0.5	0.03
6	C-875	26.05.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
7	C-873	11.06.2009	8	0.12	0.5	≤ 0.03
8	C-878	27.07.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
9	C-877	27.07.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
10	C-876	29.07.2009	32	0.25	1	0.03
11	C-918	16.08.2009	4	0.12	0.5	≤ 0.03
12	C-922	27.08.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
13	C-890	31.08.2009	4	0.12	0.5	≤ 0.03
14	C-914	01.09.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
15	C-892	18.09.2009	4	0.12	0.5	≤ 0.03
16	C-897	25.09.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
17	C-888	28.09.2009	8	0.12	0.5	≤ 0.03
18	C-899	28.09.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
19	C-906	28.09.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
20	C-909	30.09.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
21	C-910	01.10.2009	4	0.12	0.5	≤ 0.03
22	C-903	06.10.2009	8	0.12	0.5	≤ 0.03
23	C-907	08.10.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
24	C-898	08.10.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
25	C-895	08.10.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
26	C-904	13.10.2009	8	0.12	0.5	≤ 0.03
27	C-894	13.10.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
28	C-908	17.10.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
29	C-1018	26.10.2009	4	0.06	0.25	≤ 0.03
30	C-979	26.10.2009	4	0.12	0.5	≤ 0.03
31	C-995	27.10.2009	8	0.12	0.5	0.06
32	C-938	27.10.2009	4	0.12	0.5	0.06
33	C-953	28.10.2009	8	0.06	0.5	≤ 0.03
34	C-949	29.10.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
35	C-960	30.10.2009	4	0.12	0.5	≤ 0.03
36	C-962	01.11.2009	> 256	> 8	> 16	2
37	C-928	02.11.2009	8	0.12	0.5	≤ 0.03
38	C-945	02.11.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
39	C-1017	04.11.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
40	C-931	04.11.2009	8	0.12	0.5	≤ 0.03
41	C-924	11.11.2009	4	0.06	0.5	≤ 0.03
42	C-991	22.11.2009	4	0.06	0.25	0.03
43	C-1045	25.01.2010	4	0.06	0.5	0.03
44	C-1051	31.01.2010	2	0.06	0.25	0.03
45	C-1082	01.03.2010	4	0.06	0.25	0.03
46	C-1081	05.03.2010	4	0.06	0.25	0.03

Not: Kırmızı renk direnci, sarı renkler doz bağımlı duyarlılığı göstermektedir.

Tablo 32. *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının (n:46) antifungal duyarlılık sonuçları, MİK aralıkları, MİK50 ve MİK90 değerleri (µg/mL)

Antifungal	S	SDD	I	R	MİK aralığı	MİK50	MİK90
Flukonazol	43	2	-	1	1 - > 256	4	8
Vorikonazol	45	0	-	1	0.03 - > 8	0.06	0.12
İtrakonazol	0	44	-	2	0.25 - > 16	0.5	0.5
Flusitozin	46	-	0	0	≤ 0.03 - 2	≤ 0.03	0.03

S: Duyarlı, SDD: Doz bağımlı duyarlı, I: Intermediate, R: Dirençli

Tablo 33. *Candida membranifaciens* izolatının (C-840) flukonazol, vorikonazol, itrakonazol ve flusitozin MİK değerleri (µg/mL)

İzolat kodu	Tarih	Flukonazol	Vorikonazol	İtrakonazol	Flusitozin
C-840	28.12.2008	4	≤ 0.008	0.25	> 64

Not: Kırmızı renk direnci, sarı renk doz bağımlı duyarlılığı göstermektedir.

6.8. Salgı Aspartik Proteaz Aktivitesi Sonuçları

Salgı aspartik proteaz aktivitesini tesbit etmek için çalışma grubu izolatlarının her biri BSA içeren üç farklı pH (4.0, 4.5, 5.0)'daki albümin agarda ve iki farklı inkübasyon sıcaklığında (30 °C ve 35 °C) test edildi. İzolatların albümin agarda oluşturdukları hidroliz zonlarının büyüklüğü (mm) Tablo 34'de belirtildi.

Tablo 34. *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının albümin agarda oluşturdukları hidroliz zonlarının büyüklüğü (mm)

İzolat kodu	30 °C			35 °C		
	pH 4.0	pH 4.5	pH 5.0	pH 4.0	pH 4.5	pH 5.0
C-569, C-579, C-888, C-892, C-895, C-897, C-903, C-907, C-914, C-918, C-922, C-942, C-979, C-953, C-949, C-1018, C-926, C-935	0	0	0	<1	<1	<1
C-610, C-650, C-749, C-1000, C-1051, C-983, C-999, C-987, C-1226, C-1245, C-1249, C-1251, C-1222, C-1236, C-1248, C-1269, C-1240, C-1224, C-1264, C-1257, C-1259, C-1272	<1	<1	<1	<1	<1	<1
C-787, C-840, C-1082, C-1081, C-1148, C-1084, C-1149, C-1213, C-1220, C-1178, C-1199, C-1202, C-1206, C-1181, C-1132, C-1215, C-1162, C-1231, C-1179, C-1218, C-1227, C-1165, C-1171, C-1164, C-1151, C-1254, C-1105, C-1153, C-1216, C-1147, C-1253, C-1229, C-1241, C-1225, C-1262, C-1265, C-954, C-924, C-961, C-988, C-894, C-928, C-945, C-938, C-904, C-962, C-1020, C-925, C-1033, C-1023, C-1048, C-1086, C-1026, C-1015, C-990, C-1045, C-940, C-1029, C-939, C-1028, C-959, C-1013, C-944, C-991, C-969, C-976	<1	<1	0	<1	<1	<1
C-960, C-898, C-1017, C-931, C-929, C-891	1	<1	0	<1	1	<1
C-974, C-968, C-934, C-975, C-955, C-992, C-887, C-1010, C-908, C-886	<1	<1	0	0	<1	<1
C-995, C-927	<1	<1	0	0	<1	0
C-875, C-899, C-921	0	0	0	0	0	0
C-909	0	0	0	0	<1	<1
C-873, C-876, C-877, C-878, C-890, C-906, C-910, C-919	0	0	0	0	<1	0
<i>Candida albicans</i> ATTC 10231	8-10	5-8	2-3	7-10	6-7	2-4

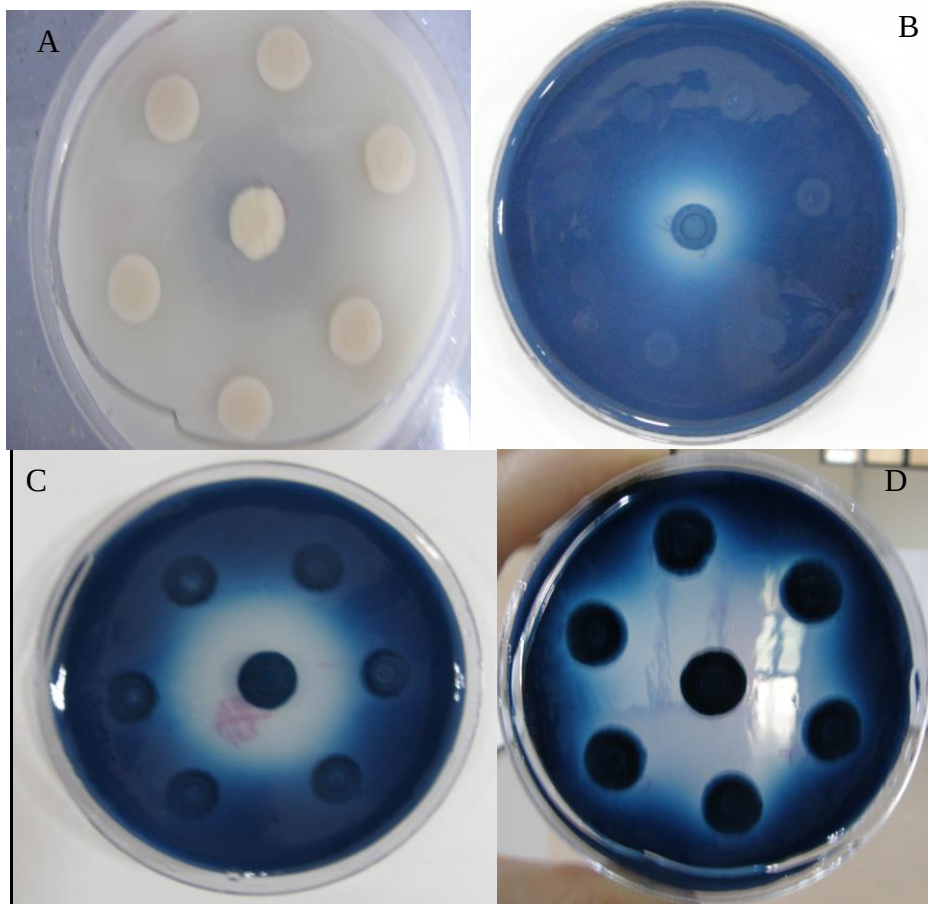
Çalışma izolatlarından hazırlanan inokulumlar, albümin agar üzerinde 14-15 mm çapında üreme zonu oluşturdular.

Tablo 34'te görüldüğü gibi, izolatların çoğunda inokülasyon yerinde oluşan yuvarlak üreme bölgesinin etrafında proteolitik aktiviteyi gösteren şeffaf zon oluşmadı veya zon yarı çapı < 1 mm idi. Bu izolatlarda "proteolitik aktivite yok" olarak belirlendi.

C-960, C-898, C-1017, C-931, C-929 ve C-891 izolatlarında zon yarı çapı 1 mm ölçüldü ve "zayıf proteolitik aktivite" belirlenmiş oldu. Farklı pH değerleri ve inkübasyon sıcaklıkları arasında proteolitik aktivitenin tesbit edilmesinde fark görülmedi. Pozitif kontrol olarak kullanılan *Candida albicans* ATTC 10231 referans

suşunda, pH azaldıkça her iki inkübasyon sıcaklığında da daha büyük zon yarı çapı ölçüldü.

İnkübasyon süresinin ardından albümin agar petripleri oda sıcaklığında parafinlenerek bekletildi. Oda sıcaklığında birkaç haftalık inkübasyonun ardından albümin agar'da pozitif kontrolün proteolitik aktivite zonu büyümeye devam etti ve giderek çalışma izolatlarının etrafında pozitif kontrol suşunun proteolitik aktivite zonuyla birleşen proteolitik aktivite zonu belirdi (Resim 11).



Resim 11. *Meyerozyma guilliermondii* izolatlarının albümin agar besiyerinde görünüşleri **A**. İnkübasyon süresi sonunda albümin agar'ın amido black ile boyanmamış görünümü **B**. Amido black ile boyanmış görünümü **C-D**. Oda sıcaklığında uzatılan inkübasyon sonunda görünüşler. Besiyerlerin ortasında pozitif kontrol suşunun inokülasyon zonu ve hidrolitik zonlar, pozitif kontrol suşu etrafında çalışma izolatlarının inokülasyon zonları görülmektedir.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Meyerozyma guilliermondii, çok sayıda sinonim ile nomenlatürü ve taksonomisi oldukça kafa karıştırıcı bir tür olarak karşımıza çıkmaktadır. Fenotipik identifikasyon yöntemleri ile filogenetik olarak yakın ilişkili olduğu türlerden ayıramadığı belirlenmiştir. *M. guilliermondii*'nin taksonomik pozisyonunun ve tür düzeyinde tam identifikasyonunun sağlanabilmesi için farklı moleküler yöntemler tanımlanmıştır (3, 4, 11, 14, 18, 177).

Candida guilliermondii, *C. albicans* ile karşılaştırıldığında düşük doğal virülans göstermesine rağmen, insan hastalıklarına neden olma eğilimi ve çoklu ilaç direnci ortaya koyması ile ilgiyi üzerine çekmiştir (1, 26, 38, 31, 102). *C. guilliermondii*, non-*albicans Candida* türleri arasında yeni ortaya çıkan bir patojen olarak dikkat çekmektedir (22). Çoğunlukla kanser hastalarında enfeksiyon oluşturmakla (20, 22, 28, 34-38) birlikte pediatri hastalarında da kandidemi etkeni olarak öne çıkmaktadır. Sporadik kandidemi vakaları yanında türün neden olduğu hastane kaynaklı salgınlar da tanımlanmıştır (30, 41, 42).

Çalışmamızda, kan kültürlerinden izole edilen *M. guilliermondii* izolatlarının kan kültürlerinden izole edilen tüm maya izolatlarına oranı değerlendirilmiştir. Bu oran 2006 yılında %4.8, 2007 yılında %5.1, 2008 yılında %3.8 ile literatürde belirtilen oranlara yakındır. Birçok literatürde *C. guilliermondii*'nin tüm kandidemilerin yaklaşık %2'sinden sorumlu olduğu belirtilmiştir (1, 19, 20-26, 29-31). Ancak *M. guilliermondii* 2009 yılında, %71.3 ile kan kültürlerinden izole edilen maya izolatlarının büyük çoğunluğunu oluşturmuştur. Önceki yılların *M. guilliermondii* izolasyon oranları ve literatür verileri değerlendirildiğinde %71.3'lük oranın şaşırtıcı derecede yüksek olduğu açıktır. Yalnızca Shah ve ark.'ları (42) 2012 yılında Hindistan'dan bildirdikleri çalışmalarında, 22 haftalık süreçte pediatrik popülasyonda kan kültürlerinin %85.4 *C. guilliermondii* izole etmişlerdir. Çalışmamızda, 2010 yılında bu oran %15.7'ye gerilemiştir. Girmenia ve ark.'larının (28) 2006 yılındaki 22 yıllık zaman aralığının değerlendirildiği çalışmalarında *C. guilliermondii* 243 kandidemi epizotunun 29 (%11.7)'undan izole edilmiştir. 2011 yılında yeniden %35.4'e yükselmiş; 2012 yılında da %29.4 ile benzer oran devam etmiştir. Medeiros ve ark.'ları (40) 2007 yılında, bir yıllık bir zaman aralığında kan örneklerinin %43'ünden *C. guilliermondii* izole

edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda yedi yıllık sürecin tamamı değerlendirildiğinde kan kültürlerinden izole edilen *M. guilliermondii* izolatlarının kan kültürlerinden izole edilen tüm maya izolatlarına oranı %28.7 bulunmuştur. Üstelik çalışmamızda oldukça uzun bir zaman aralığı değerlendirilmiştir.

Candida albicans fungemilerden en sık izole edilen fungal patojen olarak bildirilmektedir. *C. albicans*'ı *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* türleri takip etmektedir (22, 28, 92-95). Çalışmamızda *M. guilliermondii*, 2006 ve 2007 yıllarında *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis*'i takiben en sık izole edilen 4. tür olmuştur. Dolayısıyla 2006 ve 2007 yıllarında tür dağılımı literatürle uyumlu bulunmuştur. *M. guilliermondii*, 2008 yılında *C. parapsilosis*, *C. albicans* ve *C. tropicalis*'i takiben yine en sık izole edilen 4. tür olmuştur. İlginç olarak 2008 yılında *C. parapsilosis*, *C. albicans*'ı geçerek en sık izole edilen tür olmuştur. 2009 yılında ise *M. guilliermondii* en sık izole edilen tür olmuştur. *M. guilliermondii*'yi *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* takip etmiştir. *C. guilliermondii*, 2010 yılında *C. albicans* ve *C. parapsilosis*'i takiben en sık izole edilen 3. tür olmuş, *M. guilliermondii*'yi *C. tropicalis* takip etmiştir. 2011 ve 2012 yıllarında *M. guilliermondii* tekrar (2009 yılındaki gibi) en sık izole edilen tür olmuş, *M. guilliermondii*'yi *C. albicans*, *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* takip etmiştir. 2006-2012 yılları arasındaki 7 yıllık süreç değerlendirildiğinde *C. albicans*'ı (%29.2) takiben 2. en sık izole edilen tür *M. guilliermondii* (%28.7) olmuştur. *M. guilliermondii*'yi *C. parapsilosis* (%19.3) ve *C. tropicalis* (%6.5) takip etmiştir. Diğer tüm maya türleri, kan kültürlerinden izole edilen mayaların %16.2'sini oluşturmuştur.

Candida guilliermondii'nin fungemilerden en sık izole edilen tür ya da türlerden olması literatür genelinde çok az rastlanan bir durumdur (40, 42). Dolayısıyla çalışma bulgularımız hayli şaşırtıcıdır. Bu veriler dikkate alındığında "salgın" tanımı akla gelmektedir. Ancak burada "yalancı salgın" durumuna dikkat etmek gerekmektedir. Eğer hastada fungemi klinik belirtileri yoksa; laboratuvarında izole edilen mikroorganizma doğal ve/veya yapay bir çevreden kaynaklanmış olabilir. Bu durumda yalancı enfeksiyondan ve yalancı salgından söz edilmektedir (184). Literatürde *C. guilliermondii*'nin etken olduğu fungemi yalancı salgınları bildirilmiştir (40-42). Çalışmamızda hasta dosyaları incelenmediğinden fungemiye ait klinik belirtilerin varlığı değerlendirilememiştir.

Fungal patojenlerden kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarının (fungemi) oranı hastaların katater varlığı, TPN alma ve yoğun bakım biriminde yatma durumlarıyla ilişkili bulunmuştur. Santral intravasküler katateri olan kan dolaşımı enfeksiyonlu hastalardan fungal patojen izole edilme oranı [14,963 hastanın 1840'ı (%12.3)] santral intravasküler katateri olmayan kan dolaşımı enfeksiyonlu hastalardan [7240 hastanın 276'sı (%3.8)] üç kat daha fazla bulunmuştur. Aynı şekilde TPN alan veya yoğun bakım birimindeki hastalarda fungemi gelişme olasılığı (sırasıyla %15.6, %11.0) TPN almayan veya yoğun bakım biriminde bulunmayan hastalardan (sırasıyla %6.4, %8.1) daha yüksektir. TPN alan, santral intravasküler kataterli, yoğun bakım birimlerindeki hastalarda fungemi gelişmesi daha olasıdır (32). Damar içi kataterler, TPN alma ve yoğun bakım birimlerinde yatma, çok sayıda literatür kaynağında bu maya türünün neden olduğu enfeksiyonların risk faktörleri arasında bildirilmektedir (20-22, 26, 28-30, 32-35, 37-40, 58, 97, 100, 103).

Çalışmamızda ilk salgın piki ve ikinci salgın piki sırasında sürveyans amacıyla alınan 13 farklı TPN solüsyonundan *M. guilliermondii* izole edildi. İlk salgın piki döneminde 8 TPN solüsyonu örneğinden, ikinci salgın piki döneminde 5 TPN solüsyonu örneğinden *M. guilliermondii* izolasyonu gerçekleştirildi. Ayrıca hastalardan 2'sinin yalnızca TPN solüsyonundan izolasyon gerçekleştirilirken; 11 hastanın yakın tarihli kan kültürlerinden de türün izolasyonu gerçekleştirildi. TPN solüsyonundan *M. guilliermondii* izole edilen ilk hastanın 27 gün öncesindeki kan kültüründen; ikinci hastanın ilk TPN solüsyonu örneğinden 10 gün önceki, ikinci TPN solüsyonu örneğinden 22 gün öncesinde gönderilen kan kültüründen; üçüncü hastanın aynı tarihli kan kültüründen; dördüncü hastanın 4 gün önceki kan kültüründen; beşinci hastanın 6 gün önceki kan kültüründen *M. guilliermondii* izolasyonu gerçekleştirildi. Altıncı hastanın ilk TPN solüsyonu örneğinden *M. guilliermondii* izolasyonu öncesinde kan kültüründen *M. guilliermondii* izolasyonu sözkonusu değilken, ikinci TPN solüsyonu ile aynı tarihli kan kültüründen *M. guilliermondii* izolasyonu gerçekleştirildi. Yedinci hastanın TPN solüsyonundan yalnızca 1 gün önce gelen kan kültüründen, sekizinci hastanın TPN solüsyonu ile aynı tarihte gönderilen kan kültüründen türün izolasyonu gerçekleştirildi. Dokuzuncu hastanın yalnızca TPN solüsyonundan izolasyon gerçekleştirildi. Onuncu hastanın TPN solüsyonundan 7 gün önceki kan kültüründen

türün izolasyonu gerçekleştirildi. Onbirinci hastanın yalnızca TPN solüsyonundan izolasyon gerçekleştirildi.

Çalışmamızdaki *M. guilliermondii* kan izolatlarının 7'si katater kanı, 1'i port kanı (%6.8, 8/119) izolatıdır. Ayrıca hastalardan 16' sının kan izolatıyla aynı epizod içinde yer alan katater kanlarından da *M. guilliermondii* izole edilmiştir (Aynı epizod içinde yer alan izolatlardan ilk izole edilen çalışmaya dahil edildiğinden; bu izolatlar çalışma suşları arasında bulunmamaktadır). Toplam 24 hastanın (117 hastadan, %20.5) katater kanından (santral, arterial, periferik venöz katater kanı, diyaliz katater kanı, kanül kanı, port kanı, katater parçası) *M. guilliermondii* izole edilmiştir. Çalışma grubu hastaların ne kadarının kataterinin bulunduğu bilgisine sahip olmamakla birlikte; çalışma grubundaki hastaların ne kadarının katater kanlarından *M. guilliermondii* izole edildiği bilgisi verilmiştir. Kan kültürlerinden *M. guilliermondii* izole edilen çalışma grubu hastalarının %20.5'unun katater kanlarından izolasyonun gerçekleşmiş olması, *M. guilliermondii* fungemilerinde kataterin önemini vurgulamaktadır.

Çalışmamızdaki toplam 117 hastanın 58'i (%49.6) yoğun bakım servislerinde yatmaktaydı. 7 farklı yoğun bakım biriminden hasta bulunmakla birlikte, yoğun bakım hastalarının yarısından fazlasını tek başına yenidoğan yoğun bakım hastaları (34 hasta, %58.6) oluşturmaktaydı. Diğer yoğun bakım servislerini dahiliye yoğun bakım servisi (9 hasta, %15.5), anestezi yoğun bakım servisi (6 hasta, %10.3), göğüs hastalıkları yoğun bakım servisi (3 hasta, %5.2), nöroloji yoğun bakım servisi (2 hasta, %3.4), nöroşirürji yoğun bakım servisi (2 hasta, %3.4) ve pediatri yoğun bakım servisi (2 hasta, %1.7) oluşturmaktadır.

Bulgularımız TPN solüsyonu alma, katateri olma ve yoğun bakım birimlerinde yatma durumlarının fungemi gelişmesi açısından risk faktörü olduğu yönündeki literatür bilgilerini desteklemektedir. Bu faktörler *M. guilliermondii* fungemilerinde de göze çarpmaktadır.

Hastane klinik laboratuvarlarının çoğu günlük çok sayıda klinik örnekle çalışmaktadır. Bu nedenle bakteri ve mantar türlerini, hızlı ve biyokimyasal olarak tanımlayan sistemler (Vitek, API, Microscan, AuxaColor gibi), rutin çalışmayı kolaylaştıran identifikasyon yöntemleri olarak kullanılmaktadır (185). API 20C AUX mayaların rutin identifikasyonu amacı ile sık kullanılan biyokimyasal, ticari bir

yöntemdir (59). API 20C AUX sisteminin en büyük zorluğu kuyucuklar içindeki türbiditenin gözle okunmasıdır. Bu durum okumanın gözlemciler arasında kaydadeğer değişiklikle sonuçlanmasına yol açmaktadır. Buna karşılık tür düzeyinde identifikasyonun moleküler olarak doğrulanması, yalnızca yeterli kaynağa (insan ve ekonomi) sahip merkezlerde yapılabilmektedir. Oysa yanlış identifikasyon hem epidemiyolojik hem klinik etki ile sonuçlanabilir. Hatalı identifikasyon ve etiyolojik teşhis, klinik açıdan uygunsuz antifungal kullanımı ve tedavi başarısızlığına neden olabilir.

API 20C AUX (BioMerieux, Fransa) biyokimyasal identifikasyon sistemi, 19 karbohidratın asimilasyonunu test etmek yoluyla 43 maya türünü tanımlamaktadır. Tablo 3’de, *C. guilliermondii* ve *C. famata* türlerinin API 20C AUX V4.0 sisteminde inkübasyon süresi sonunda karbohidrat asimilasyonlarının pozitif reaksiyon yüzdelarını gösteren identifikasyon tablosu verilmektedir. Tablodan da anlaşıldığı gibi bu iki tür bu sistemle birbirinden tam olarak ayırlanamamaktadır.

Çalışma izolatlarının çoğu Resim 2’deki karbohidrat asimilasyon profiline sahipti. İzolatlar %84.3 *C. guilliermondii*, %15.6 *C. famata* olarak identifiye edildi. İzolatlar 0, INO, LAC içeren kuyucuklarda çoğalma göstermezken (şeffaf-çizgili görünüm) diğer tüm kuyucuklarda çoğaldı (beyaz, bulanık görünüm). C-840 ve C-987 izolatlarının karbohidrat asimilasyon profili farklıydı. C-840 izolatu, %60.3 *C. guilliermondii* ve %39.6 *C. famata* olarak identifiye edildi. 0, XLT, INO, LAC içeren kuyucuklarda çoğalma gözlenmezken diğer tüm kuyucuklarda çoğalma gözlendi. Bu izolat SDA’daki koloni görünümünün R tipi, pürüklü ve krem rengi olması, kolonilerin besiyeri içine invaze olmaları ve pasajlandıkça koloni şeklinin daha pürüklü hale gelmesi ile farklıydı. C-987 izolatu, %53.8 *C. famata*, %46.1 *C. guilliermondii* olarak identifiye edildi. 0, ARA, INO, LAC, TRE kuyucukların çoğalma gözlenmezken diğer tüm kuyucuklarda çoğalma gözlendi. C-987 izolatu, SDA’da diğer çalışma izolatlarına göre daha yavaş üremesi ve daha küçük koloniler oluşturması ile dikkat çekti. Çalışma izolatlarının tamamı INO ve LAC karbohidratlarını asimile etmedi. Test sisteminden de beklendiği gibi çalışma izolatlarımızın biyokimyasal identifikasyonu *C. guilliermondii/C. famata* şeklinde sonuçlandı ve net tür ayırımı yapılamadı.

Karbon asimilasyonlarının ticari yöntemle (ID32C; bioMerieux, Marcy l'Etoile, Fransa) değerlendirildiği bir çalışmada, 3 *D. hansenii* izolatının tamamı laktatı asimile ederken, *P. guilliermondii* ve *P. caribbica* izolatları asimile etmemiştir. Aynı çalışmada 33 *C. guilliermondii* izolatı için sekiz, 18 *P. caribbica* izolatı için dokuz farklı karbon asimilasyon paterni dökümente edilmiştir. Bu paternlerin bazıları her iki tür tarafından da paylaşılmış; biri her iki türde de sıklıkla görülmüştür. Ancak her *D. hansenii* izolatı benzersiz bir profile karşılık gelmiş ve bu profillerin hiçbiri *P. guilliermondii* ve *P. caribbica* suşlarında görülmemiştir (14). ID32C, API 20 C AUX sisteminden farklı olarak *P. caribbica*'yı da tanımlamaktadır ancak Desnos-Ollivier ve ark.'larının çalışmasından da anlaşıldığı gibi *P. guilliermondii* ve *P. caribbica* arasında tam ayrım yapamamaktadır. Desnos-Ollivier ve ark.'ları ID32C sisteminin *D. hansenii*'yi bu iki türden ayırdığını belirtse de; çalışmada kullanılan *D. hansenii* suşu sayısı (n: 3) oldukça azdır.

Görüldüğü gibi kullandığımız rutin biyokimyasal identifikasyon sistemi (diğer rutin biyokimyasal identifikasyon sistemleri gibi) *M. guilliermondii* türünün identifikasyonunda yetersiz kalmaktadır. *M. guilliermondii*'yi *C. famata*'dan fenotipik olarak farklılaştırmak oldukça zordur ve bu nedenle sıklıkla hatalı identifikasyon gerçekleşmektedir. Üstelik *C. famata* gibi *C. guilliermondii*'den ayrılamayan, hatta rutin biyokimyasal identifikasyon sistemleri ile tanımlanamayan türlerden söz edilmektedir.

Candida guilliermondii olarak sınıflandırılan suşlar ve telemorfu *P. guilliermondii*, özellikle *Candida fermentati* (telemorf *Pichia caribbica*) ve *Candida carpophila* sinonimlerinin dahil olduğu, fenotipik olarak ayrılamayan, genetik olarak heterojen bir kompleks olarak düşünülmüştür (5, 6). RAPD paternleri ve izoenzim profilleri ile *C. fermentati*'nin *C. guilliermondii*'den ayrılan bir tür olduğu gösterilmiştir (6). Karşılaştırmalı elektroforetik karyotipleme ile *P. guilliermondii* grubunun türleri arasındaki ilişki çalışılmıştır. Altı elektroforetik karyotip tesbit edilmiş ve çalışmanın sonuçlarının bir kısmına göre *Blastodendron arztii*, *B. krausi*, *Candida amidovorans*, *Candida guilliermondii* var. *japonica*, *Candida mamillae*, *Candida parapsilosis* var. *tokyoensis* ve *Candida parapsilosis* var. *tuxtlensis* *C. guilliermondii*'nin sinonimleri olarak belirlenmiş fakat *Candida guilliermondii* var. *carpophila*'nın *C. guilliermondii*

var. *guilliermondii* ile aynı türde olmadığı bildirilmiştir. Kalan dört elektrokaryotip muallak ilave bilgi olarak kalmıştır (10).

Kurtzman ve Robnett bir dizi çalışmada, nüklear DNA yeniden birleşme deneyleri ile *C. fermentati* ile aynı tür olduğu belirlenen bir suшта askosporulasyon rapor etmişlerdir. Bu askosporogenez tür *P. caribbica*, anamorfu *C. fermentati* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca bu çalışma *P. guilliermondii*, *Pichia caribbica* ve *C. guilliermondii* var. *carpophila*'nın ayrı taksonlar olarak temsil edildiğini göstermiştir. Fakat türler arası nDNA ilişkisi, %30-70 aralığında tesbit edildiği için yakın ilişkili türler oldukları belirlenmiştir. *C. fukuyamaensis* ve *C. xestobii*'nin rRNA LSU D1/D2 gen sekansı *C. guilliermondii*'den tek bir nükleotid farklı bulunmuştur. Sonuç olarak, bu klad'daki yakın ilişkili türler arasında D1/D2 farklılıklarının büyüklüğü bazı diğer ascomycota maya klad'larının türlerinde görülenden daha azdır (8, 9, 13).

Vaughan-Martini ve ark.'ları 2005'deki çalışmalarında *Pichia guilliermondii* klad içinde iki yeni tür tanımlamışlardır. Bu çalışma ile *Candida fermentati*'nin askosporik şekli olan *Pichia caribbica* ve *Candida guilliermondii* var. *carpophila*, *Candida carpophila* olarak tür konumuna yükseltilmiştir. Geleneksel taksonomik kriterlerle ayıramayan bu yeni taksonlar; düşük DNA sekansı benzerliği, farklı elektroforetik karyotipler ve 26S rDNA'nın D1/D2 bölgesindeki nükleotid farklılığı ile birbirlerinden ve *Pichia guilliermondii*'den farklıdır. D1/D2 sekansları ile tür tanımlanmasına dayanarak; *C. caribbica* ve *C. guilliermondii* üç nükleotit, *C. caribbica* ve *C. carpophila* iki nükleotid ve *C. guilliermondii* ve *C. carpophila* bir nükleotid farklı bulunmuştur. *C. carpophila*, *C. fukuyamaensis* ve *C. xestobii*'nin aynı tür olduğu bulunmuştur. Türün bu grubundaki suşlar D1/D2 farklılığı göstermemiştir (11).

Lan ve ark.'ları 2006'da *C. guilliermondii* suşlarından *C. fermentati* suşlarını ayırmak için farklı gen bölgelerinin ve restriksiyon endonükleazların kullanılabildiği PCR-RFLP yöntemini geliştirmişler ve 37 *C. guilliermondii* suşunun 32'sini *C. guilliermondii*, 5'ini (%13.5) *C. fermentati* olarak tanımlamışlardır (12). Medeiros ve ark.'ları 2007'deki çalışmalarında *C. guilliermondii* izolatları arasındaki klonal yakınlığı RAPD ile çalışmış ve ayrıca RAPD-*Hinf*I profili ile *C. fermentati* ve *C. carpophila* taksonlarının ayırımını sağlamaya çalışmışlardır (40). Lockhart ve ark.'ları 2009'da, Lan

ve ark.'larının geliştirdiği PCR-RFLP yöntemini kullanarak 149 *C. guilliermondii* kompleks izolatından 13 (%8.7)'n *C. fermentati* olarak tanımlamışlardır (15).

Desnos-Ollivier ve ark.'ları 2008'de yaptıkları çalışmada, ITS ve D1/D2 bölgelerinin birlikte sekanslanmasının, *C. guilliermondii* ve *D. hansenii* türlerinin doğru identifikasyonunda etkili bir yol olduğunu belirtmişlerdir. İki farklı rRNA gen bölgesinin sekanslanması sonucunda, fenotipik olarak *D. hansenii* şeklinde identifiye edilen 26 izolatın, yalnızca 3' *D.hansenii*, 6'sı *P. caribbica*, 10'u *P.guilliermondii*, 2'si *C. haemulonii* type II, 2'si *Clavispora lusitaniae*, 3' *Candida palmioleophila* olarak identifiye edilmiştir. Bu nedenle *D. hansenii*'nin önceden düşünüldüğü kadar yaygın bir insan patojeni olmayabileceği sonucuna varılmıştır. Bu alışmadaki 36 *C. guilliermondii* izolatının, 23' *P. guilliermondii*, 12'si *P. caribbica*, 1'i *P. jadinii* olarak identifiye edilmiştir. *C. guilliermondii* ve *D. hansenii* izolatlarının %58'inin fenotipik identifikasyonun yanlış olduğu belirlenmiştir (14).

Romi ve ark.'ları 2014'deki çalışmalarında, *M. guilliermondii*'nin *M. caribbica*'dan güvenilir şekilde farklılaştırılabilmesi için ITS bölgesi ürünlerinin kesildiği bir PCR-RFLP yöntemini geliştirmişlerdir. *C. guilliermondii* ATCC 6260 ve *M. caribbica* CBS 9966 tip suşlarının ITS sekansları *in silico* olarak oğaltılmış ve çok sayıda enzimle kesilmiştir. Bu iki türün birbirinden ayrılmasını sağlayan bant profili *TaqI* ile elde edilmiştir. API 20 C AUX ve D1/D2 sekansı ile ayrılamayan 55 *M. guilliermondii* kompleks izolatı, *TaqI* enzimi kullanılan ITS PCR-RFLP ile, 48 izolat *M. guilliermondii* ve 7 izolat *M. caribbica* olarak ayrılmıştır. Bu alışmada ITS-RFLP yönteminin güvenilirliği ITS sekanslama, mitokondriyal DNA RFLP ve elektroforetik karyotipleme ile doğrulanmıştır (18).

Son yirmi yılı aşkındır, farklı çalışmalarda *Candida famata/Debaryomyces hansenii* ve *C. guilliermondii* türlerinin ayrımını sağlamak amacıyla PCR primerleri dizaynına çalışılmıştır. Ayrıca ITS, 26S rRNA (D1/D2) ve IGS sekans karşılaştırma çalışmaları, elektroforetik karyotipleme, PCR ve PCR-RFLP ile *P. guilliermondii* klad'daki taksonların ayrımına katkı sağlanmıştır (7, 11, 12, 14-18, 38).

Meyerozyma guilliermondii izolatlarının yanlış identifikasyonundan ve *M. guilliermondii* olmayan suşların bu türe yanlışlıkla ilavesinden tam olarak kaçınmak için moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. İdentifikasyon moleküler yöntemlerle

gerçekleştirilmedikçe; bu türün prevelansı ve insidansının hatalı belirlenmesi olasıdır. Üstelik tür düzeyinde doğru identifikasyona maya benzeri organizmalar tarafından neden olunan tedavisi zor enfeksiyonların üstesinden gelmek için ihtiyaç duyulur. Türe ait doğal direncin var olup olmadığı bilgisine ancak bu şekilde ulaşılabilir. Tam suş karakterizasyonu sonrasında servisler içinde direnç yayılımının takibi ve fungal epidemiyoloji ilgili araştırmalar sürdürülebilir. Böylece enfeksiyon ve kolonizasyon arasındaki bağlantı ve maya türlerinin klinik etkileri anlaşılabilir. Tür düzeyinde güvenilir bir karakterizasyonun, özellikle yaşamı tehdit eden sistemik enfeksiyonlu (fungemi, endokardit gibi) hastalarda, hem epidemiyolojik hem de klinik etki açısından önemli olduğu açıktır.

Fungal organizmaların kesin identifikasyonu için bir dizi gen bölgesinin değerli olduğu kanıtlanmıştır. Bu amaçla en sık rDNA gen kompleksi kullanılmaktadır (63, 64). "Molecular Detection of Human Fungal Pathogens" başlıklı 2011 basım kitapta bu amaçla kullanılan primerlerin geniş bir listesi bulunmaktadır. Bu listede, rRNA gen bölgelerinin tümü için 115 primer dizayn edildiği, bu primerlerden 49'unun 28S rRNA, 47'sinin 18S rRNA, 11'inin ITS, 4'ünün 5.8S rRNA ve 4'ünün IGS bölgesinin amplifikasyonu ve sekanslanması için tasarlandığı görülmektedir (65). Bu listeye bakıldığında çalışmanın amacına uygun rRNA gen bölgesinin ve amplifikasyon-sekanslama işlemi için o bölgeye özgü primer seçiminin hayli kafa karıştırıcı olduğu anlaşılmaktadır.

20 yıldan fazladır, nükleer rRNA sistronları fungal teşhis ve filogenetik çalışmalar için kullanılmıştır. Ribozomal sistronlar arasında ITS bölgesi, fungusların en geniş kapsamlı şekilde identifikasyonunda en iyi olasılık olarak değerlendirilmiştir. Çünkü ITS bölgesi için türler arasındaki ve tür içindeki nükleotid varyasyonları daha açık şekilde tanımlanabilmiştir. ITS, "Fungal Barkodlama Konsorsiyumu" tarafından "primer fungal DNA marker'ı" olarak düşünülmüştür. Ayrıca mayalar için, büyük alt ünitenin D1/D2 bölgesi de tür karakterizasyonu için benimsenmiştir (186). Ancak Kurtzman-Robnett ve Vaughan-Martini çalışmalarında *P. guilliermondii* klad içindeki türlerin ayrımında D1/D2 bölgesinin sekanslanmasının yeterli olmadığını belirtmişlerdir (8, 9, 11, 13). Bu nedenle çalışma izolatlarımızın identifikasyonu amacıyla ITS bölgesinin sekanslanmasına karar verilmiştir.

Tıbbi önemi olan mayaların ITS bölgesinin sekanslanması yoluyla identifikasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada, 86 türe ait 373 izolatın (299 referans suş ve 74 klinik izolat) hem ITS1 hem de ITS2 sekansları gerçekleştirilmiştir. ITS1 ve ITS2 sekans analizi ile doğru identifikasyon oranları sırasıyla %96.8 (361/373) ve %99.7 (372/373) olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, tıbbi önemi olan mayaların identifikasyonunda ITS bölgesinin güvenilir ve konvansiyonel identifikasyon yöntemlerine alternatif olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada 4 referans suş, 3 klinik suş olmak üzere 7 *C. guilliermondii* izolatı kullanılmış; klinik izolatlardan biri ITS1, ITS2 ve D1/D2 bölgesi sekansları ile *C. parapsilosis* olarak tesbit edilmiştir. Böylece bir *C. guilliermondii* klinik izolatının fenotipik yöntemle gerçekleştirilen hatalı identifikasyonu düzeltilmiştir (176).

SENTRY ve ARTEMIS sürveyans programları sırasında toplanan ve çeşitli ticari sistemler (Vitek, MicroScan, API ve AuxaColor) tarafından *C. famata* olarak tanımlanan 53 suşun rRNA gen bölgelerinin (ITS, D1/D2, IGS) sekanslanması ile, suşların 19'u *C. guilliermondii*, 14'ü *C. parapsilosis*, 5'i *C. lusitaniae*, 4'ü *C. albicans*, 3'ü *C. tropicalis* ve 5'i diğer *Candida* türleri (2'si *C. fermentati* ve 1'er izolat *C. intermedia*, *C. pelliculosa* ve *P. fabianni*) olarak tanımlanmıştır. Ayrıca 3 *C. famata* suşu da, *Kodomaea ohmeri*, *Debaryomyces nepalensis* ve *Debaryomyces fabryi* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada farklı ticari sistemler tarafından tanımlanan suşlar, Vitek 2 ile yeniden tanımlanmıştır. Vitek 2 sistemi sonuçları DNA sekanslama sonuçları ile %56.6 uyumlu bulunmuştur. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) sonuçları ise DNA sekanslama sonuçlarıyla %81.1 uyumlu bulunmuştur. Bu çalışmada DNA sekanslama ile tanımlanan *K. ohmeri*, *D. nepalensis* ve *D. fabryi*, MALDI Biotyper veritabanında mevcut değildir. Bu sonuçlar *C. famata*'nın fungal enfeksiyonlardaki varlığının kabul edilenden çok daha az olduğunu göstermektedir (185). Bu sonuçlar rutin identifikasyon sonuçlarının *C. famata* olarak bildirilmemesi gerektiğini göstermektedir.

Çalışma izolatlarımızın ITS bölgesinin sekanslanması sonucu elde edilen sekans verileri, tüm ITS sekansı, ITS1 ve ITS2 sekansı olmak üzere üç ayrı sekans olarak GenBank' da değerlendirildi. C-569, C-610 ve C-650 izolatları, tüm ITS sekansı sonuçları *Meyerozyma guilliermondii* DMRF-5 (accession no: KC237294), *Candida*

carpophila N12C (accession no: DQ666191), *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi* CBS8417 (accession no: AF209874) referans sekansları ile sırasıyla %100-%99-%99 uyumlu; ITS1 sekansı ile *Pichia guilliermondii* ATCC 6260 (accession no: AY939792) referans sekansı ile %100 uyumlu; ITS2 sekansı ile *Meyerozyma guilliermondii* DMRF-5 (accession no: KC237294), *Debaryomyces* sp. R99 (accession no: JQ665430) referans sekansları ile %100 uyumlu bulundu. C-569, C-610 ve C-650 izolatları, tüm ITS sekansı ile *M. guilliermondii* olarak tanımlanırken; tüm ITS sekansının *C. carpophila* ve *D. hansenii* var. *fabryi* izolatlarında aynı olduğu belirlendi. Söz konusu üç izolat ITS2 sekansı ile *Debaryomyces* sp. türlerinden ayrılmadı. Ancak ITS1 sekansı bu izolatları *Pichia guilliermondii* olarak tanımladı.

Diğer izolatların (C-840 hariç) tüm ITS sekansı sonuçları, *Pichia guilliermondii* ATCC 6260 (accession no: AY939792), *Candida carpophila* strain N12C (accession no: DQ666191), *Debaryomyces hansenii* var. *fabryi* CBS8417 (accession no: AF209874) referans sekansları ile sırasıyla %100-%100-%99; ITS1 ve ITS2 sekansı sonuçları *Pichia guilliermondii* ATCC 6260 (accession no: AY939792) referans sekansı ile %100 uyumlu bulundu. Söz konusu izolatlarda tüm ITS sekansı ile *P. guilliermondii* ve *C. carpophila* türleri birbirinden ayrılmadı. Ancak ITS1 ve ITS2 sekansları ise bu izolatları *Pichia guilliermondii* olarak tanımladı.

Meyerozyma guilliermondii'nin tanımlanmasında, ITS1 bölgesinin diğer ITS bölgelerinden daha ayırt edici olduğu görülmektedir. Ancak biyokimyasal identifikasyonda olduğu gibi ITS bölgelerinin sekanslanması ile de bu türün *C. famata*/*D. hansenii* kompleksden ve *Candida carpophila* gibi filogenetik olarak yakın ilişkili olduğu türlerden ayrımının netlik kazanmadığı görülmektedir. Üstelik özellikle *C. carpophila* ve *M. guilliermondii* ile birlikte *Meyerozyma* yeni cinsine dahil edilen *M. caribbica* türü ile ilgili GenBank' da yeterli DNA sekans verisi bulunmamaktadır.

Çalışma izolatlarının ITS bölgesi DNA sekans sonuçları, 1 izolat hariç (C-840), biyokimyasal identifikasyon ile uyumlu (135/136, %99.3) bulunmuştur. Dolayısıyla ITS bölgelerinin sekanslanması sonucunda, *C. guilliermondii* izolatlarının API 20C AUX ile biyokimyasal identifikasyonunun oldukça güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır.

C-840 izolatı tüm ITS, ITS1 ve ITS2 bölgesi DNA sekanslarının tümünde *Candida membranifaciens* W14-3 (accession no: EF197812)/*Candida friedrichii* CBS

4114 (accession no: HQ283377) referans sekansları ile sırasıyla %99-%99, %100-%98 ve %100-%99 uyumlu bulundu. Tüm ITS sekansı ile bu iki tür arasında ayırım yapılamazken; ITS1 ve ITS2 sekansları, *C. membranifaciens* lehine yorumlanabilir. ITS1 sekansı bu iki türün ayırımı için daha doğru bir tercih olarak görünmektedir. Üstelik *C. membranifaciens* kullandığımız biyokimyasal identifikasyon kiti tarafından tanımlanamamaktadır.

Çalışmamızda, C-840 izolatının API 20C AUX ile gerçekleştirilen karbohidrat asimilasyonu (%60.3 *C. guilliermondii*, %39.6 *C. famata*) ve SDA'daki kültür özellikleri diğer tüm çalışma izolatlarından farklıydı. Bu izolat tüm çalışma izolatlarından farklı olarak XLT'yi asimile etmedi. Bu durum, biyokimyasal identifikasyon sonucunda bu suşu *C. famata*'ya yaklaştırmış olsa da ITS1 ve ITS2 sekansları, bu izolatın *C. membranifaciens* olduğunu göstermektedir. Bu izolatta ITS sekansı ile hatalı biyokimyasal identifikasyon düzeltilmiştir. Bu sonuç ile biyokimyasal identifikasyon sonuçlarının ve koloni görünümünün, moleküler identifikasyona gidilmesi gereken suşların belirlenmesinde yönlendirici olabileceği anlaşılmaktadır. Bu durumdaki izolatlar için sekans yoluyla identifikasyona gidilmesi doğru epidemiyolojik verilerin elde edilmesine katkı sağlayacaktır.

Candida membranifaciens göl suyu, bitkiler ve böceklerden izole edilmiştir (187). Çok nadir olmakla birlikte klinik örneklerden türün izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Üstelik AIDS'li bir hastadan fungemi etkeni olarak izole edilmiştir (188, 189). *C. membranifaciens*, *C. guilliermondii* gibi biyoteknolojik öneme sahiptir. Deniz çevresinden izole edilen *Candida membranifaciens* subsp. *flavinogenie* W14-3 suşunun riboflavin ürettiği (190) ve bitki patojenlerinin biyolojik kontrolünde rol oynadığı gösterilmiştir (191). D1/D2 gen sekansı filogenetik analizi ile *P. guilliermondii*'nin *Pichia* cinsinin tip türü *P. membranifaciens* ile uzaktan akraba olduğu gösterilmiştir (9). Filogenetik olarak yakın ilişkili (4) *C. membranifaciens* ve *C. friedrichii* türlerinin ayırımının sağlanması için D1/D2 bölgesinin sekanslanması tavsiye edilse de (192); önceleri *C. membranifaciens* klad'ın üyeleri olarak tanımlanan (187) şimdilerde *Yamadazyma* klad'a ait bu maya türlerinin tanımlanmasında ITS1 bölgesinin yeterli olduğu belirtilmiştir (193).

C-987 izolatının karbohidrat asimilasyonu (%53.8 *C. famata*, %46.1 *C. guilliermondii*) ve SDA'daki koloni görünümü, diğer tüm izolatlardan farklı bulundu. Bu izolat tüm çalışma izolatlarından farklı olarak ARA, TRE'yi asimile etmedi. Karbohidrat asimilasyon profilindeki farklılık ve ve kültür özellikleri ile diğer çalışma izolatlarından farklı olan bu suşta tür düzeyinde doğru identifikasyon için ITS sekansı yeterli olmamış olabilir. Bu izolat için başka rDNA gen bölgelerinin (D1/D2, IGS) sekanslanması faydalı olabilir.

Castanheira ve ark.'larının 2013'deki çalışmasında, *C. famata* suşlarından biri Vitek 2 ve DNA sekanslama ile *Kodamaea ohmeri* olarak tanımlanmış ancak MALDI-TOF ile düşük skorlu (<2.00) olarak *C. guilliermondii* olarak tanımlanmıştır. Çünkü *Kodamaea ohmeri* MALDI-TOF veritabanında bulunmamaktadır (185). Bizim çalışmamızda 1 *C. guilliermondii* izolatı (C-1261) farklı koloni görünümü (*C. tropicalis* kolonisine benzeyen, mat görünümlü, besiyeri içine invaze olan koloni) nedeni ile API 20C AUX ile yeniden identifiye edildi ve *Kodamaea ohmeri* (%99.9, identifikasyon kodu: 6106172) olarak tanımlandı. Bu izolatın ITS PCR ürünü yaklaşık 350 bp büyüklüğündeydi. *C. guilliermondii* izolatlarından oldukça farklı asimilasyon profili ve ITS PCR ürün büyüklüğü nedeni ile bu suş çalışma izolatları arasında yer almadı. Anlaşıldığı üzere *Kodamaea ohmeri* mevcut tüm sistemlerde identifikasyonu problemli; *C. famata* ve *C. guilliermondii* türleri ile karışması olası bir türdür.

Debaryomyces hansenii tam sekansı 2004'de gerçekleştirildikten sonra GeneBank sekans verilerinin bazılarının hatalı olduğu anlaşılmıştır. *D. hansenii* var. *fabryii* olarak 2001'de girilen CBS 8417 suşunun ITS sekansı bunlardandır; 2006'da CBS verilerinde *P. guilliermondii* olarak yeniden tanımlanmıştır. Benzer şekilde 2002'de *D. hansenii* var. *fabryii* olarak GenBank'da kaydedilen BPY-01 suşu ITS sekansının *P. guilliermondii* tip suş CBS 566'nın ITS sekansı ile aynı olduğu tesbit edilmiştir (1).

Moleküler identifikasyonun güvenilirliği, karşılaştırmaların yapıldığı veri tabanının güvenilirliğine bağlıdır. Her araştırmacı ücretsiz şekilde GenBank'a yeni bir DNA sekansı gönderebilir. Bu yüzden veritabanındaki sekansların sayısı sürekli olarak artmaktadır. GenBank veritabanının ana dejavantajı gönderilen verilerin bir sorumlu tarafından kontrol edilmeyişidir. Hatalı veri girişleri reddedilmez ve cins/tür adlarındaki filogenetik değişiklikler düzenli olarak güncellenmez. Daha kısıtlı CBS veritabanı ise

fenotipik ve taksonomik olarak iyi valide edilmiş identifikasyona sahip izolatların sekanslarını içermektedir (61).

Günümüzde 172.000 tam uzunlukta fungal ITS sekansı Genbank' da depolanmıştır. Bunların %56'sı çift isimli organizmalarla ilişkilidir. ITS bölgesi sekansları, yaklaşık 500 yayındaki 11.500 bilimsel çalışmadan ortaya çıkan, 2.500 cins ve 15.500 türe aittir (186).

Nguyen ve ark.'ları 2009 yılında *D. hansenii* ve *C. famata* türlerinin farklılaştırılması için IGS bölgelerinin amplifikasyon ürününün *AluI* ile kesilmesine dayalı bir PCR/RFLP yöntemi (IGSAF) geliştirmişlerdir. Bu çalışmada tüm IGS bölgesinin amplifikasyonu için LR13 ve SR21 primerleri dizayn edilmiştir (177). Bu yöntem, yine Nguyen ve ark.'ları tarafından 2011'de *C. guilliermondii* ve yakın ilişkili olduğu türlerin ayırımına uyarlanmıştır. Bu yolla *D. hansenii*, *C. famata* ve *Pichia guilliermondii* kompleks adı altında *P. guilliermondii*, *C. carpophila*, *C. fermentati*, *C. xestobii* taksonlarının, tüm IGS bölgeleri amplifikasyon ürünlerinin *AluI* restriksiyon endonükleaz kesimi ile oluşan bant profilleri baz alınarak ayırımı sağlanmıştır (17).

Nguyen ve ark.'larının 2011'de geliştirdikleri bu yöntem, ITS sekanslarının *C. guilliermondii*'nin tanımlanmasında yeterli ayırımı sağlayamadığı fikrinden yola çıkarak, çalışma izolatlarımıza uygulandı. rDNA tüm IGS gen bölgesi PCR ürünlerinin *AluI* restriksiyon endonükleaz kesimi ile tüm çalışma izolatlarında *C. guilliermondii* CBS 566 ve *P. guilliermondii* CBS 2030 referans suşları ile aynı restriksiyon bant profili gözlemlendi. Böylece ITS DNA sekansı sonuçlarında yer alan *M. guilliermondii* dışındaki identifikasyonlar dışlanmış, çalışma izolatlarının net identifikasyonu sağlanmış oldu. Bu çalışma IGSAF yönteminin klinik izolatlara uygulandığı ilk çalışma olma özelliğindedir. Nguyen ve. ark. 2011'de yaptıkları çalışmaya göre, IGS bölgesinin PCR/RFLP'si veya sekanslanması, ITS veya D1/D2 sekanslamaya alternatif veya tamamlayıcı olarak kullanılabilir. Bu çalışmada bahsi geçen *P. guilliermondii*, *C. carpophila*, *C. fermentati*, *C. xestobii*, *D. hansenii* ve *C. famata* türlerinin tüm IGS sekans uzunlukları 2.5-2.8 kb büyüklüğünde, IGS2 bölgesinin agaroz jeldeki molekül büyüklüğü ise 2.1-2.4 kb arasında bildirilmiştir (17). Bu büyüklükteki PCR ürünlerinin sekansı pratik olmadığından IGS1 (NTS1) bölgesinin sekansının bu türlerin identifikasyonunda alternatif olabileceğini düşünmekteyiz. Bu bölgenin uzunluğu *C.*

guilliermondii CBS 2030T suşu için GenBank’da (accession no: AM992960) 400 bp olarak bildirilmiştir (177). Bizim çalışmamızda IGS bölgesinin PCR/RFLP’si, ITS sekanslamanın tamamlayıcısı olarak kullanılmıştır.

Çalışma izolatlarının identifikasyonunda ve taksonomik pozisyonunun belirlenmesinde ITS gen bölgesinin sekanslanmasının ve IGSAF yönteminin kullanılmasıyla, çalışmanın sonraki aşamalarında yapılacak moleküler epidemiyolojik çalışmaların sağlam bir temele oturtulması sağlandı. Çalışmamız kan kültürlerinden izolasyon oranı oldukça düşük olan *M. guilliermondii* türüne ait, literatür genelindeki en büyük klinik izolat koleksiyonuna sahiptir. Bu durum, izolatların rutin biyokimyasal identifikasyonlarının hatalı olabileceğini akla getirmektedir. Çalışma izolatlarının identifikasyonun moleküler olarak doğrulanmasıyla hatalı biyokimyasal identifikasyon olasılığı ortadan kaldırılmıştır.

Çalışmamızda pulse field jel elektroforezi-karyotipleme protokolü sonunda *P. guilliermondii* CBS 2030 ve *C. guilliermondii* CBS 566 referans suşlarında 6’şar kromozom bandı gözlemlendi. Ancak bu iki referans suşa ait karyotipleme bant profilleri farklıydı. Literatürde bu türe ait çok az elektroforetik karyotipleme çalışması bulunmaktadır. Bai 1996’da referans suşlarla yaptığı çalışmada karyotipleme ve DNA baz içeriğini kullanarak *C. guilliermondii* suşları arasında *C. fermentati* türünü tanımlamıştır (5). Bai ve ark.’ları 2000’deki çalışmalarında, *C. guilliermondii* kompleks’de yer alan taksonlar arasındaki taksonomik ilişkiyi elektroforetik karyotipleri karşılaştırarak çalışmışlardır. (10). Vaughan Martini ve ark.’ları 2005’deki çalışmalarında karyotiplemeyi *P. guilliermondii* klad’daki yeni türlerin tanımlanmasında DNA sekans karşılaştırmaları ile beraber kullanmışlardır (11).

Çalışmamızda, kullandığımız referans suşların PFGE-EK bant profilleri literatür çalışmaları ile aynı bulundu. Çalışmamızda referans suşların PFGE-EK çalışması, türe ait klinik izolatlar arasında klonal ilişkiyi değerlendirebilmek için protokolünün optimizasyonu amacıyla yapıldı. Yani bu yöntem çalışmamızda moleküler epidemiyolojik analiz amaçlı kullanıldı; taksonomik amaçlı değildi.

Çalışmamızda EK sonuçları, farklı her karyotipleme bant profili bir karyotipi temsil edecek şekilde yorumlandı. 9 hastaya ait 12 klinik ve sürveyans izolatında 5 farklı karyotip elde edildi. Karyotip B (8 izolat) çalışılan 12 izolat arasında baskın

karyotipti. Az sayıda izolatta 5 farklı karyotipin belirlenmesi; karyotiplemenin, *M. guilliermondii* türüne ait epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların klonal ilişkisinin araştırılması için faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

Her iki salgın döneminde de karyotip B'nin hakim olduğu görüldü. Salgın dönemlerine ait olmayan 1 ve 3 nolu izolatlar, diğer tüm izolatlardan farklı karyotipe sahipti. Bu sonuç karyotiplemenin, *M. guilliermondii*'nin epidemiyolojik olarak ilişkili izolatlarının ayırımında faydalı olabileceğini desteklemektedir. İlginç şekilde, 2007 yılında izole edilen ve salgın dönemlerine ait olmayan 2 nolu izolat ise salgın izolatlarıyla aynı karyotipe sahipti.

Aynı hastanın (hasta no:4) iki farklı fungemi epizotundan izole edilen klinik izolatlar (izolat no: 4, tarih: 06.10.2009 ve izolat no: 6, tarih: 09.11.2009) ve bir TPN izolatının (izolat no:5, tarih: 03.11.2009) EK bant profilleri değerlendirildiğinde; ilk epizod kan izolatu ile TPN izolatının aynı karyotipe sahip olduğu ancak ikinci epizod kan izolatu ile diğer tüm izolatlardan farklı bir karyotipe sahip olduğu belirlendi. Bu durum aynı hastanın iki ayrı epizotta, *M. guilliermondii*'ye ait iki farklı suşla enfekte olmuş olabileceğini ve TPN ve kan izolatu ile aynı suş olabileceğini düşündürmektedir. Üstelik TPN izolatu, klinik izolatlar arasında en yaygın olarak tesbit edilen karyotip B genotipindedir.

Aynı tarihte (08.10.2009) farklı servislerden (Dahiliye-Onkoloji ve Dahiliye-Gastroenteroloji Servisi) gönderilen örneklerden izole edilen iki kan izolatu (izolat no: 7 ve 8) aynı karyotipe (B) sahipti. Üstelik karyotip B, çalışılan izolatlar arasında en yaygın olarak tesbit edilen karyotipti. Bu durum aynı *M. guilliermondii* suşunun hastanenin farklı servislerinde bulunduğuna işaret etmektedir. Üstelik bu servisler fiziksel olarak hastane içinde yakın yerleşimlidir.

Aynı hastaya ait kan ve rektal sürüntü izolatlarında (sırasıyla izolat no: 10 ve 11) farklı karyotipler görüldü. İlginç şekilde, rektal sürüntü izolatu salgın dönemleri izolatları ile aynı karyotipe (karyotip B) sahipti ancak kan izolatu diğer tüm izolatlardan farklı karyotipe sahipti. Salgın dönemlerine ait baskın genotipin rektal sürüntü izolatında bulunması ve hastanın kan izolatu ile farklı bir karyotipe sahip olması, aynı hastada farklı *M. guilliermondii* suşlarının kolonizasyon ve enfeksiyonunun birlikte seyrettiği şeklinde yorumlanabilir.

Pulse field jel elektroforezi-Genomik DNA'nın restriksiyon enzim analizi için uygun restriksiyon enzimini belirlemeye çalışan tek çalışmayı Chou ve ark.'ları 2007'de *C. tropicalis* türünde yapmışlardır. *C. tropicalis* izolatlarının PFGE analizi için uygun enzim seçimi amacıyla *C. tropicalis* referans suşunda (ATCC 13803) denenecek enzimlere, *S. cerevisiae* genomunun (12.1 Mb) 34 farklı restriksiyon endonükleaz enziminin kesimi ile oluşan ortalama fragment büyüklükleri baz alınarak karar verilmiştir (194). *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* türü gibi AT zengin bir genoma sahiptir. Bu kaynakta *BssHII*'nin ortalama fragment büyüklüğü 27.000 bp'dir ve bu enzim ile benzer büyüklükte fragment oluşturan 11 enzim *C. tropicalis* referans suşunda deneme için seçilmiştir. *BbvCI*, *BssHII*, *EagI*, *NaeI*, *NheI*, *PacI*, *PmeI*, *RsrII*, *SbfI*, *SfiI*, *SgrAI* ve *SmaI* enzimleri denenmiş ve *BssHII*, *NaeI* ve *RsrII* *C. tropicalis*'de PFGE-REAG için faydalı enzimler olarak tesbit edilmiştir. Bu üç enzim 9 klinik *C. tropicalis* izolatında çalışılmış ve *NaeI* en çok PFGE tipi ve en yüksek ayırım gücü gösterdiği için en uygun enzim olarak belirlenmiştir. Restriksiyon enziminin seçimi fungal türlerin PFGE protokollerinin standardizasyonu için anahtar konumundadır (195).

Pulse field jel elektroforezi için uygun restriksiyon enziminin seçiminde en önemli faktör hedef DNA'nın %GC içeriğidir. %GC içeriği yüksek genomlar için AT tanıma bölgesi restriksiyon enzimleri seçilmektedir. Yani genomun GC içeriği ne kadar fazla ise restriksiyon enziminin tanıma bölgesindeki GC oranı o kadar az olmalıdır. Ancak bu konudaki genellemeler prokaryot genomları üzerinden yapılmıştır (196). PFGE-REAG için hedef DNA üzerinde kısmen az sayıda bölgeden kesen ve büyük DNA fragmentleri veren enzimlerin kullanılması tavsiye edilmektedir. Çok sayıda küçük fragment (10 kb'dan daha düşük) oluşturan enzimlerin bu amaçla kullanılması mümkün değildir. 6 bp'dan daha büyük sekansları tanıyan restriksiyon enzimleri, büyük fragmentler oluşturdıkları için potansiyel olarak daha faydalıdır. Şimdilerde ticari olarak mevcut 8 bp tanıma bölgesi olan dokuz restriksiyon enzimi bulunmaktadır. Bunlardan *NotI*, *SfiI*, *SrfI*, *AscI*, *PacI* ve *SwaI* GC içeriği yaklaşık %35-55 olan genomlarda nadir kesen enzimler olarak bilinmektedir. (85).

Çalışmamızda *M. guilliermondii* türünde PFGE-REAG protokolünün optimizasyonu çalışmasına *BssHII* restriksiyon enzimi ile başlandı. Çünkü *BssHII*, maya PFGE çalışmalarında en sıklıkla kullanılan restriksiyon enzimidir (87, 91, 183,

197-200). *Bss*HII enzimi ile restriksiyon işleminin doğruluğunu kontrol etmek için *C. albicans* SC5314 referans suşu kullanıldı. Ancak *Bss*HII enzimi ile kesimde en büyük bant 150 kb büyüklüğündeydi ve bantların çoğu 50 kb civarına yığılmıştı. 50 kb civarında oluşan smear, yakın büyüklüklerde çok fazla bandın aynı bölgede yığıldığı ve birbirinden ayıramadığı şeklinde yorumlandı. Dolayısıyla bu enzimin türün PFGE-REAG çalışması için uygun olmadığı sonucuna varıldı.

Bizim çalışmamızda 6 bp tanıma bölgesi *Bsa*I, *Bss*HII, *Hind*III, *Nae*I, *Nhe*I, *Sma*I, *Sph*I, *Xba*I; 7 bp tanıma bölgesi *Sap*I; 8 bp tanıma bölgesi *Not*I, *Pac*I ve *Sfi*I restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanıldı. *C. guilliermondii* %GC içeriği (%43.8, %44.4) (3, 54), *C. tropicalis*'in %GC içeriğinden (%33.1) (54) daha yüksek olduğu için, *S. cerevisiae* suşunun restriksiyon endonükleaz kesimleri ile oluşan ortalama fragment büyüklükleri ve enzimlerin tanıma bölgelerindeki GC içeriği dikkate alınmadan; referans *M. guilliermondii* suşlarında denenecek enzimler Chou ve ark.'larının kullandığı kaynaktan seçildi (195). Söz konusu kaynağa ilave olarak *Bsa*I da çalışıldı.

Üreme durumu bilinmeyen (anamorf-telemorf) *M. guilliermondii* klinik izolatlarının PFGE-REAG yönteminin optimize edilmesinde, üreme durumunun etkili olup olmadığını anlamak için hem anamorf hem de telemorf referans suş çalışıldı. Hem anamorf hem telemorf referans suşta, çalışılan tüm enzimler için aynı enzimin aynı restriksiyon bant profilini verdiği gözlemlendi. Böylece çalışılacak klinik izolatlarda üreme durumunun etkili olmayacağı sonucuna varıldı. Restriksiyon bant profili daha silik gözlenen *Sfi*I ile birlikte *Not*I ve *Pac*I kesim ürünleri, moleküler büyüklük marker'ı aralığına dağılmış ve daha net ayırt edilebilen bantlar şeklindeydi. Bu nedenle *Not*I, *Pac*I, *Sfi*I restriksiyon enzimleri *M. guilliermondii* klinik izolatlarının PFGE-REAG için daha uygun enzim adaylarıdır. *Not*I ve *Pac*I 8 bp tanıma bölgesi enzimlerdir. *Not*I tanıma bölgesi GC, *Pac*I tanıma bölgesi ise AT nükleotidlerini içermektedir. *Sfi*I ise GC yanında 5N (herhangi bir nükleotitten ard arda 5 tane) içermektedir. Bu sonuçlara bakıldığında *M. guilliermondii* izolatlarının PFGE-REAG için, genomun %GC içeriğinin enzim seçiminde yönlendirici olmadığı ancak 8 bp tanıma bölgesi restriksiyon enzimlerinin daha uygun olduğu sonucuna varıldı. Buna göre ilave olarak *Asc*I, *Ase*I, *Pme*I, *Sbf*I, *Srf*I, *Swa*I 8 bp tanıma bölgesi ve *Bbv*CI 7 bp restriksiyon endonükleazlar da *C. guilliermondii* ve *P.guilliermondii* referans suşlarında denenebilir. Literatür

genelinde farklı maya türlerinin PFGE-REAG çalışması için *Sfi*I (87, 91, 183, 201, 202) ve *Not*I enzimlerine rastlanmaktadır (203). *Pac*I ise henüz bu amaçla kullanılmamıştır.

Voss ve ark.'ları 1998'deki çalışmalarında 7 farklı *Candida* türüne (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis* ve *C. guilliermondii*) ait referans izolatları PFGE EK, REAG-*Bss*HII ve RAPD (sonra CA2 olarak adlandırılan primer 1283 ile) analizi gerçekleştirmişlerdir. Çalışma bu yöntemlerin epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlarda ayırım gücünü belirlemek için yapılmıştır. Bu tiplendirme yöntemlerinden hiçbirinin ve kombinasyonlarının *C. guilliermondii* referans suşları arasında ayırım sağlayamadığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışma ile 4 *C. guilliermondii* referans suşunda tek bant farklılığı içeren 2 farklı bant paterni bildirilmiştir (198). Çalışmada türlere ait kromozom sayısı belirtilmemiş, sadece karyotipler ifade edilmiştir. Ayrıca 7 farklı tür için aynı enzim ve aynı elektroforez koşulları kullanılmış; üstelik hiç jel görüntüsü verilmemiştir.

Chen ve ark.'ları 2005'de yaptıkları çalışmada, 53 *C. albicans* klinik izolatının genetik ilişkisini değerlendirmek için PFG-EK, *Bss*HII ve *Sfi*I restriksiyon enzimlerini kullanarak PFGE-REAG ve rep-PCR yöntemlerini karşılaştırmışlar ve bu yöntemlerin hepsinin aynı hastadan izole edilen klonal olarak ilişkili izolatları tanımlayabildiğini bulmuşlardır. PFGE-*Bss*HII, 40 genotip tanımlayarak en yüksek ayırım gücünü sergilerken, PFGE-*Sfi*I 35 genotip, rep-PCR 31 genotip tanımlamıştır. Karyotipleme 19 genotip tanımlayarak en düşük ayırım gücüne sahip yöntem olarak belirlenmiştir (87).

Heo ve ark.'ları 2011'deki çalışmalarında, mekanik ventilasyonlu yoğun bakım birimi hastalarının dental plak, trakea ve bronkoalveolar lavaj sıvısından izole edilen 50 *C. albicans* izolatının genetik ilişkisini PFGE-EK ve *Bss*HII (REAG-B) ve *Sfi*I (REAG-S) kullanarak PFGE-REAG ile çalışmışlardır. Bu yöntemler ile aynı hastanın izolatları genetik olarak ayrılamazken, farklı hastaların izolatları genellikle farklı genotiplere sahip bulunmuştur. Bu yöntemler arasında REAG-B, ayırım gücü en yüksek yöntem olarak belirlenmiştir. Aynı hastanın oral ve trakea-bronşial bölgelerinde genetik olarak benzer suşların bulunması, oral kavitenin mekanik ventilasyonlu hastaların trakea ve akciğerine *C. albicans*'ın yayılımı için önemli bir kaynak olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (183).

Abdeljelil ve ark.'ları 2011'deki çalışmalarında, neonatal yoğun bakım birimindeki hastalardan ve sağlık çalışanlarından izole edilen 89 *C. albicans* izolatının moleküler tiplendirmesini EK ve RAPD (CA1 ve CA2 primerleri) analizi ile gerçekleştirmişlerdir. EK'nin en düşük ayırım gücüne sahip olduğu bildirilmiştir. Çalışma bulguları, neonatal yoğun bakım biriminde sağlık çalışanlarından hastalara suş transferini ve hastane kaynaklı bulaşı ortaya koymuştur (204). EK, bu çalışmada tiplendirme sonuçlarına katkı sağlamak için tamamlayıcı teknik olarak kullanılmıştır. Çünkü *C. albicans* suşlarında ayrımı iyileştirmek ve doğru sonuçlar elde etmek için en az iki farklı molekülerin tekniğin birlikte kullanılması tavsiye edilmektedir (205).

Abdeljelil ve ark.'ları 2012'deki çalışmalarında, neonatal yoğun bakım biriminde invaziv kandidiyazis salgınının araştırılması amacıyla, 6 hastadan elde edilen 18 *C. albicans* izolatı ve aynı ünite de çalışan onikomikozisli 2 sağlık çalışanından izole edilen 2 izolatı, PFGE-EK ve REAG-S (*Sfi*I) kullanarak genotiplendirmişlerdir. PFGE-*Sfi*I, epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların ayırımında daha etkili bulunmuştur. Sonuçlara göre, sağlık çalışanlarına ait suşlar spesifik suşlardı, yani hasta izolatlarıyla ilişkisizdi. Neonatal 3 hastanın izolatları ise aynı klonal orjine sahip bulunmuştur ve bu durum horizontal geçişe işaret etmiştir. Diğer 3 hastanın izolatları ise vakaların rastlantısal olduğunu gösterecek şekilde spesifik bulunmuştur. Katater ilişkili kandidemi vakasından izole edilen suşta (horizontal geçiş izolatı), mikroevoim EK ile gözlenmezken *Sfi*I ile gözlenmiştir. (202).

Khattak ve Bruine 1999'da, iki hastanenin yoğun bakım birimlerindeki ciddi *C. parapsilosis* salgınlarını PFGE-EK ile araştırmışlardır. Çalışılan toplam 9 izolatın 2'si, yoğun bakım birimlerinden birindeki iki hemşirenin ellerinden izole edilmiştir. Bu çalışma ile genetik olarak farklı üç grup tanımlanmıştır. Hemşirelerin ellerinden izole edilen iki izolat ile bir hastaya ait kan kültürü izolatı; iki hastanın kan kültürü izolatları; bir hastanın intra-abdominal abse izolatı ile umbilikal swap izolatı aynı PFGE tipine sahip bulunmuştur. PFGE ile karyotipleme, *C. parapsilosis* suşları arasındaki ayrımı sağlamak için yararlı bir moleküler araç olarak tanımlanmış ve gelecek *C. parapsilosis* enfeksiyonlarının epidemiyolojisini değerlendirmek için yararlı olacağı sonucuna varılmıştır (206). Literatür genelinde klinik *C. parapsilosis* izolatlarının PFGE-EK ve *Bss*HII ile DNA subtiplemesini içeren çalışmalar bulunmaktadır (197, 207).

Bir üniversite hastanesinin cerrahi yoğun bakım birimindeki 34 hastayı etkileyen *C. tropicalis*'in etken olduğu kandidiüri salgını PFGE-BssHII ile değerlendirilmiştir. Salgının kaynağını ve risk faktörlerini belirlemek için çevreden ve sağlık çalışanlarından çok sayıda örnek alınarak süveyans çalışması yapılmıştır. İdrar atık yolu ile ilişkili 6 çevresel örnekte *C. tropicalis* üremiştir. PFGE-BssHII analizi ile yoğun bakım birimindeki 19 hastadan izole edilen 22 *C. tropicalis* izolatının tümü ve 6 çevresel örnek izolatı aynı PFGE-REAG paternine sahip bulunmuştur. Çalışmaya katılan 22 epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolat ise farklı bant paternleri oluşturmuşlardır. Vaka kontrol çalışması ile risk faktörü belirlenememesine rağmen moleküler tekniklerin kullanıldığı bu epidemiyolojik araştırma, söz konusu yoğun bakım biriminde infeksiyöz tıbbi atıkların uygunsuz uzaklaştırılması sonucu tek bir klonun çapraz kontaminasyon ile *C. tropicalis* kandidiüri salgınına yol açtığını göstermiştir. Bu sonuçlar BssHII kullanılarak gerçekleştirilen PFGE-REAG yönteminin *Candida* salgınlarının kaynağını belirlemede ve *C. tropicalis* suşlarını ayırmada faydalı olduğunu göstermiştir (199). Çalışmada *S. cerevisiae* kromozomal DNA'sı moleküler ağırlık marker'ı olarak kullanılmış ve jel görüntülerinin gözle değerlendirildiği dikkat çekmektedir.

Chen ve ark.'larının 2009'daki, yoğun bakım hastalarından izole edilen seri *C. tropicalis* klinik ve süveyans izolatlarının moleküler epidemiyolojisinin MLST ve PFGE-*NaeI* ile değerlendirildiği çalışmalarında, 14 hastaya ait 50 izolat çalışılmış ve iki yöntemin sonuçları uyumlu bulunmuştur. Çoklu izolatı olan 14 hastanın 11' inde çoklu izolatlar aynı veya hayli ilişkili MLST ve PFGE-*NaeI* genotipi göstermiştir. Bu durum her hastada bir *Candida* suşunun ısrarcı kolonizasyonu şeklinde yorumlanmıştır. Yine bu çalışmada, aynı hastaya ait izolatlarda mikrovaryasyon ve türün başka bir suşu ile yer değişikliğinden söz edilmektedir (208).

Lin ve ark.'ları 2007'de yaptıkları çalışmada, 80 *C. glabrata* suşunun genetik ilişkisini PFGE ve MLST yöntemleri ile değerlendirmiş ve MLST' nin PFGE-BssHII'den daha düşük ayırım gücü sergilediğini bulmuşlardır. Elde edilen genotip ve sekans tipleri flukonazol, vorikonazol ve amfoterisin B ilaç duyarlılıklarından bağımsız bulunmuştur. Çoklu izolatı bulunan 25 hastadan 19 hastanın (%76) izolatları değerlendirildiğinde, her hastanın izolatları kendi içinde aynı veya hayli ilişkili izolatlar

olarak tanımlanmıştır. Bu durum her hastanın *C. glabrata* izolatında genetik sürekliliğin veya mikrovaryasyonun varlığı olarak yorumlanmıştır. Bu hastalardan 6'sının (%24) izolatları ise kendi içinde farklı genotip ve sekans tipleri göstermiştir. Bu durum ise zamanla bir klondan fazlasıyla kolonizasyon veya farklı bir suş ile yerdeğiştirme olarak yorumlanmıştır (200). *C. glabrata* izolatlarının EK ile değerlendirildiği çalışmalar da bulunmaktadır (209).

Fenotipik identifikasyonu ITS2 bölgesinin sekanslanmasıyla doğrulanmış, *Kodamaea (Pichia) ohmeri* fungemili 6 hastanın bütün izolatları ve referans suş, benzer EK bant profiline sahip bulunmuştur. Fenotipik izolasyonu ITS sekansı ile *K. ohmeri* olarak doğrulanmayan 3 hastanın izolatlarında tamamen farklı EK profili elde edilmiştir. Bu durum bu türün diğer türlerden ayırımında PFGE-EK'nin etkili olduğu şeklinde yorumlanmıştır. EK ile bu türün seri izolatları arasında 1-2 bant farklılığı görülmüştür. *NotI* ile kesim sonucunda, 6 hastanın izolatlarında 6 farklı genotip tanımlanmıştır. Aynı zamanda aynı hastanın seri izolatlarında da aynı patern görülmüştür. Bütün hastaların farklı kesim profili göstermesi, fungemilerin sporadik olarak gerçekleştiğini göstermiştir. Ayrıca aynı hastanın izolatları amfoterisin B, flukonazol, vorikonazol, itrakonazol, kaspofungin ve mikafugin için aynı MİK değerlerinde bulunmuştur (203).

Dib ve ark.'ları 1996'da, 18 *C. rugosa* izolatında tiplendirme sistemi olarak PFGE EK ve RFLP-*SfiI* kullanmışlardır. İzolatların 10'u önceden tanımlanan (9 izolat yanık ünitesi, 1 izolat diğer) bir salgına aitti. Karyotipleme ile yanık ünitesinden elde edilen 9 izolat aynı, diğer servisten gelen izolat farklı paterne sahip bulunmuştur. Salgın izolatı olmayan izolatlarda farklı karyotip paternleri görülmüştür. Salgın izolatlarının RFLP-*SfiI* uygulaması, EK ile aynı sonucu verirken; salgın izolatı olmayanlarda EK, RFLP paterni ile ayrılamayan bazı izolatları ayırmıştır. PFGE-EK, *C. rugosa* suşları arasındaki ayırımı sağlamak için en yararlı moleküler tiplendirme aracı olarak görülmektedir (201).

Literatür çalışmaları gözden geçirildiğinde, PFGE-EK yönteminin tür ayırımı amacıyla taksonomide hem de suşlar arasındaki klonal ilişkiyi çalışmak amacıyla moleküler epidemiyolojide kullanıldığı görülmektedir. Çalışmamızda EK, tür düzeyinde identifikasyonu moleküler yöntemlerle doğrulanmış *M. guilliermondii* türüne ait klinik ve sürveyans izolatlarının klonal yakınlığını değerlendirmek için kullanılmıştır. PFGE-

REAG çalışmalarının ise daha sıklıkla *C. albicans* izolatlarında olmak üzere *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* izolatlarında ve 2000 yılından itibaren yoğunlaştığı görülmektedir. Ancak maya literatüründe moleküler epidemiyolojik analiz çalışmalarının ve moleküler epidemiyolojik analiz yöntemi olarak PFGE'nin kullanıldığı çalışmaların az kabul edilebilecek sayıda olduğu görülmektedir. Bu durum, maya enfeksiyonları endojen kaynaklı (210) düşünüldüğünden funguslarda "salgın" kavramına az rastlanmasından ve bu yöntemin uygulama zorluğundan kaynaklanıyor olabilir. Çalışmamız *M. guilliermondii* türüne ait klinik izolatların moleküler epidemiyolojisinin PFGE-EK ile çalışıldığı ve bu türe ait PFGE-REAG protokolünün optimize edildiği yegane çalışma olması bakımından önemlidir.

Salgın analizi için tüm *M. guilliermondii* çalışma izolatlarının PFGE-EK ve REAG bant profillerinin belirlenmesi gerekmektedir. Her iki yöntemin ayırım gücü hesaplanarak epidemiyolojik olarak ilişkili *M. guilliermondii* izolatlarının ayrılmasında ayırım gücü yüksek olan yöntemin kullanılması gerekmektedir. Hasta dosyalarının incelenmesi ve hastane enfeksiyon kontrol komitesi aracılığıyla ulaşılabilecek epidemiyolojik verilerin elde edilmesi gerekmektedir. Bu şekilde epidemiyolojik ve moleküler epidemiyolojik verilerin birlikte yorumlanması ile salgın analizine katkıda bulunulabilecektir.

Çalışmamızda antifungal duyarlılık testleri flukonazol, vorikonazol, itrakonazol ve flusitozin için Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems, ABD) mikrodilüsyon kiti ile çalışılmıştır. Klinik çalışma izolatlarının %39'u (47 izolat) için antifungal duyarlılık testleri yapılmıştır. Antifungal duyarlılıkları belirlenen izolatların 46'sı *M. guilliermondii*, 1'i *C. membranifaciens* idi.

Çalışmamızda antifungal duyarlılık çalışılan 46 *M. guilliermondii* klinik izolatından, yalnızca 1'i (C-962) flukonazol dirençli, 2'si (C-787 ve C-876) flukonazol doz bağımlı duyarlı (SDD) tesbit edilmiştir. Flukonazol dirençli izolat aynı zamanda vorikonazol ve itrakonazol de dirençli bulunmuştur. Üstelik bu izolatta her üç antifungal için de MİK değeri, test edilen MİK değerlerinin üstünde görünmektedir. Flukonazol SDD izolatlardan biri (C-876) aynı zamanda itrakonazol dirençli iken diğeri (C-787) itrakonazol SDD olarak belirlenmiştir. Sözü geçen itrakonazol dirençli iki izolat hariç test edilen tüm izolatlar itrakonazol SDD tesbit edilmiştir. Vorikonazol dirençli bir

izolat hariç diğer tüm izolatlar vorikonazol duyarlı bulunmuştur. Üstelik vorikonazol için MİK değerleri oldukça düşük belirlenmiştir.

Candida guilliermondii izolatları çoğunlukla flukonazol duyarlı olmakla birlikte flukonazol dirençli izolatlar rapor edilmiştir (14, 22, 28, 26, 29, 34, 104-117). Üstelik azollere çapraz direnç de rapor edilmiştir. Tietz ve ark.'ları flukonazol ve itrakonazol dirençli; Chakrabarti ve ark.'ları da flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol dirençli bir izolat tanımlamışlardır. Vorikonazol ve posakonazol çapraz direnci ise literatürde üç kez bildirilmiştir (38, 100, 109, 117). Vorikonazolün *C. guilliermondii*'ye karşı flukonazolden daha etkili olduğu, azoller arasındaki en etkili molekülün vorikonazol olabileceği belirtilmektedir (26, 34, 110-115) *C. guilliermondii* çalışma izolatlarımızın azol duyarlılığı sonuçları literatürle uyumludur. İzolatlarımızın flukonazol ve vorikonazol MİK değerleri, vorikonazolün *C. guilliermondii*'ye karşı flukonazolden daha etkili olduğu yönündeki literatür bilgisini desteklemektedir.

Çalışmamızda test edilen bütün *C. guilliermondii* izolatları flusitozin duyarlı bulunmuştur. Üstelik bir izolat hariç bütün izolatlarda MİK değerleri test edilen en düşük MİK değerlerinde seyretmiştir. Flusitozin MİK değeri diğer tüm izolatlardan yüksek çıkan bu izolat (C-962), flukonazol, vorikonazol ve itrakonazol dirençli olan izolattır.

Masala ve ark.'larının hastane kaynaklı salgın varlığını moleküler olarak doğruladıkları çalışmada, *C. guilliermondii* fungemi etkeni 5 izolatın tümü 5-flusitozin dirençli bulunmakla birlikte (39) bu türe ait izolatların çoğu flusitozin duyarlı olarak bildirilmiştir (113).

Candida membranifaciens (C-840) izolatının flukonazol duyarlı, itrakonazol SDD olduğu ve bu antifungaller için MİK değerlerinin *M. guilliermondii* izolatlarına yakın olduğu tesbit edilmiştir. Bu izolat vorikonazol duyarlı bulunmakla birlikte MİK değeri *M. guilliermondii* izolatlarında görüldenden en az iki MİK düşük tesbit edilmiştir. Bu izolat çalışmanın flusitozin dirençli tek izolatı olma özelliğindedir. *C. membranifaciens* izolatı için test edilen antifungal duyarlılık profili *M. guilliermondii* izolatlarından farklı bulunmuştur. Bu durum klinik izolatlarda antifungal duyarlılık profilinin takibinin DNA sekanslama yoluyla identifikasyona gidilmesi gereken izolatların belirlenmesinde yönlendirici olabileceğini düşündürmektedir. Cendejas-Bueno ve ark.'larının 2010

yılındaki çalışmalarında, ITS sekanslama ile identifiye edilmiş bir *Candida membranifaciens* izolatının antifungal duyarlılık sonuçları flukonazol dirençli, vorikonazol duyarlı (MİK:1 µg/ml), itrakonazol dirençli, flusitozin intermediate bildirilmiştir. Vorikonazol MİK değerinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu izolat in vitro olarak test edilen bütün azol bileşiklerine karşı yüksek MİK veya direnç göstermiştir (210). Fenotipik olarak identifiye edilmiş, flukonazol duyarlı ve dirençli birer izolat bildirilmiştir (211). Literatürdeki çalışmalarda bu türe ait antifungal duyarlılık sonuçları çok az sayıda izolata aittir. Bu türe ait antifungal duyarlılık sonuçları, klinik örneklerden nadiren izole edilen türlerin antifungal duyarlılıklarının anlaşılması ve klinik başarı açısından oldukça değerlidir.

Candida guilliermondii nadiren de olsa antifungal ajanların birkaç farklı sınıfına (polyenlere, azollere ve ekinokandinlere) azalmış duyarlılık ve direnç gösterebilmektedir (1). Bu nedenle farklı gruplardan antifungallerin test edilmesi ile tedavi en iyi şekilde yönlendirilebilir ve klinik başarıya katkı sağlanabilir. Çalışmamızda azol ve flusitozin olmak üzere iki grup antifungal test edilirken polyen ve ekinokandin grubu antifungal test edilmemiştir.

Çalışmamız, antifungal duyarlılık testi uygulanan *M. guilliermondii* izolatı sayısının (n:46) literatür çalışmalarının çok üstünde olması ve bu suşların identifikasyonlarının moleküler olarak doğrulanmış olması ile önem taşımaktadır.

Ray ve ark.'ları 1990'da yaptıkları çalışmada, *C. guilliermondii* izolatında proteolitik aktiviteyi pH 4.5 ve 7.0 albümin agar'da değerlendirmiş ve pH 4.5'da zayıf proteolitik aktivite rapor etmişlerdir. Bu çalışmada inkübasyon oda sıcaklığında ve 4 gün süre ile gerçekleştirilmiştir (47). San Millan ve ark.'ları 1997'de az sayıda *C. guilliermondii* izolatında, albümin agarda 20 güne uzayan inkübasyon sonunda salgı aspartik proteaz aktivitesini -yok- veya -zayıf- olarak bildirmişlerdir (6). Dostal ve ark.'larının 2003'de yaptıkları çalışmada substrat olarak hemoglobin kullanılmış ve 9 *C. guilliermondii* izolatında 30 °C'de 7 günlük inkübasyonun ardından proteolitik aktivite saptanamamış ancak uzayan inkübasyon sonucunda çok düşük proteolitik aktivite oluşturdukları bildirilmiştir (48). Bramono ve ark.'larının 2006'da yaptıkları çalışmada, 4 klinik *C. guilliermondii* izolatının proteaz aktivitesi Lowry yöntemi ile ölçülmüş ve

zayıf aktivite rapor edilmiştir. Substrat olarak yine albümin kullanılmıştır (49). *M. guilliermondii*'nin *SAP* gen ailesine sahip olduğu bilinmektedir (46).

Çalışmamızda kan kültürlerinden izole edilmiş çok sayıda *M. guilliermondii* izolatında salgı aspartik proteaz aktivitesini -yok- veya -zayıf- tesbit etmemiz, literatür sonuçlarıyla ve *M. guilliermondii*'nin virülansının düşük olduğu yönündeki genel yargıyla uyumludur. Bu sonuç, proteaz aktivitesinin patojenite için olmazsa olmaz bir virülans faktörü olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Ancak hem mayayla hem de konakla ilgili diğer faktörler de değerlendirilmelidir. Çalışmamız *M. guilliermondii* izolatlarında, sadece olası bir virülans faktörü araştırılmıştır. Üstelik çalışma izolatlarımızın izole edildiği hastaların büyük çoğunluğu yoğun bakım, pediatri ve hematoloji-onkoloji servislerinde yatan hastalar olduğundan; hasta dosyalarının incelenmesi yoluyla bağışık durumu, altta yatan hastalık durumu, invaziv girişim varlığı gibi konağa ait faktörlerin belirlenmesi gerekmektedir. Aynı şekilde hastalarda fungemi ilişkili klinik semptomların varlığı araştırılarak gerçek fungemi ve örneğin kontaminasyonu durumunun ayrımı sağlanmalıdır.

Literatür çalışmaları değerlendirildiğinde, çalışmalarda az sayıda *C. guilliermondii* suşunun proteaz aktivitesi bakımından değerlendirildiği görülmektedir. Proteaz aktivitesini tesbit etmek için kullanılan agar yönteminde substrat, inkübasyon süresi, inkübasyon sıcaklığı ve besiyeri pH değerinde değişiklikler olduğu; agar yöntemi yanında Lowry gibi spektrofotometrik ölçüm yöntemlerinin de kullanıldığı görülmektedir. Ancak substrat olarak sıklıkla albümin kullanılmıştır. Bu nedenle çalışmamızdaki deneylerde, albümin içeren farklı pH değerlerindeki besiyerler, uzun inkübasyon süresi ve farklı inkübasyon sıcaklıkları kullanılmıştır. Literatürde farklı inokulum miktarlarından söz edilmekte ya da inokulum miktarı belirtilmemektedir. Çalışmamız inokulum miktarı, 1.0 McFarland maya süspansiyonundan 10 µl olacak şekilde literatür değerlerinin üstünde hücre sayısına sahipti. Bu şekilde proteaz aktivitesinin tesbit edilebileceği koşullar yakalanmaya çalışıldı. Ancak bu koşullara rağmen proteaz aktivitesi belirlenemedi yada zayıf düzey aktivite belirlendi. Ancak inkübasyon süresinin bitiminden itibaren oda sıcaklığında bekletilen albümin agar besiyerlerinde, pozitif kontrol suşunun proteolitik aktivite zon yarıçapının genişleyerek çalışma izolatlarının inokülasyon zonu etrafını çevrelediği ve çalışma izolatları etrafında

1-2 mm'lik bir proteaz aktivitesi zonu oluşturduğu görülmüştür (Resim 11). Bu gözlem kullanılan yöntemin proteaz aktivitesini belirlemek için yeterli olmayabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, biyokimyasal olarak *M. guilliermondii* olarak doğrulanmış izolatlardan 135'i ITS DNA sekans analizlerine göre *M. guilliermondii* ve bir izolat *C. membranifaciens* olarak tanımlanmıştır. *M. guilliermondii* izolatlarının tümünün identifikasyonları PCR-RFLP analizi ile doğrulanmıştır. Flukonazol ve itrakonazol doz bağımlı duyarlı bir izolat; flukonazol doz bağımlı duyarlı, itrakonazol dirençli bir izolat; pan-azol (flukonazol, vorikonazol, itrakonazol) dirençli bir izolat belirlenmiştir. İtrakonazol dirençli iki izolat hariç tüm izolatlar itrakonazol doz bağımlı duyarlı bulunmuştur. İzolatlarda proteolitik aktivite yok veya zayıf saptanmıştır. *M. guilliermondii*'nin identifikasyonunda biyokimyasal ve moleküler yöntemlerin %99.3 uyumlu olduğu gösterilmiştir. ITS gen bölgesi içinde yer alan ITS1 bölgesinin bu türlerin tanımlanmasında daha spesifik olduğu saptanmıştır. PFGE-EK sonuçları, aynı hastada aynı türe ait farklı suşların kolonizasyon ve enfeksiyonunun birlikte seyrettiği, aynı suşun hastanenin farklı servislerinde bulunduğu, aynı hastanın iki ayrı epizotta türe ait iki farklı suşla enfekte olduğu ve aynı hastanın TPN ve kan izolatının aynı suş olduğu şeklinde yorumlanmıştır. *M. guilliermondii* suşlarının PFGE-REAG için *NotI*, *PacI* ve *SfiI* enzimlerinin uygun olduğu belirlenmiştir. Böylece *M. guilliermondii* suşlarının epidemiyolojik analizlerinde PFGE-EK ve PFGE-REAG yöntemlerinin kullanılabilirliği gösterilmiştir.

8. SONUÇLAR

Ocak 2006-Aralık 2012 tarihleri arasındaki 7 yıl süresince 119 hastaya ait 121 klinik örnekten ve 15 sürveyans örneğinden izole edilen toplam 136 *Meyerozyma guilliermondii* izolatu çalışma kapsamına alındı.

1. Tüm çalışma izolatlarının rDNA ITS gen bölgesinin DNA sekanslaması ile oluşan, tüm ITS, ITS1 ve ITS2 bölgesi sekanslarının ayrı ayrı değerlendirilmesi sonucu tür düzeyinde identifikasyon gerçekleştirildi. ITS1 bölgesi sekansı, türü biyokimyasal identifikasyonla uyumlu olarak *M. guilliermondii* olarak tanımlandı ancak ITS2 ve tüm ITS sekansları, izolatların *Debaryomyces hansenii* ve *Candida carpophila* türlerinden ayrımını sağlayamadı.

2. Tüm çalışma izolatlarının rDNA tüm IGS gen bölgesi amplifikasyon ürünlerinin *AluI* restriksiyon profillerinin belirlendiği PCR-RFLP yöntemiyle, *M. guilliermondii* türünün biyokimyasal identifikasyonla ve ITS sekanslama ile ayıramadığı taksonlardan ayrımı sağlandı. ITS DNA sekanslama ve PCR-RFLP yöntemleriyle, türe ait çok sayıda izolatin biri hariç kalanının tür düzeyinde identifikasyonu *M. guilliermondii* olarak moleküler olarak doğrulandı. Bir izolat DNA ITS sekanslama ile *Candida membranifaciens* olarak tanımlandı.

3. *Pichia guilliermondii* CBS 2030 ve *Candida guilliermondii* CBS 566 referans izolatları kullanılarak PFGE-EK ve PFGE-REAG protokolü optimize edildi. Söz konusu türde PFGE-REAG işlemi için uygun restriksiyon endonükleaz enzimi tesbit edildi. Türün PFGE-REAG işlemi için *NotI*, *PacI* ve *SfiI* enzimlerinin uygun olduğu belirlendi.

4. Klinik ve sürveyans izolatlarından 12'sinin PFGE-EK bant profilleri belirlenerek; klonal yakınlıkları değerlendirildi. Az sayıda izolatin 5 farklı EK'e sahip olduğu bulundu. Bu durum EK'nin epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların klonal yakınlığının değerlendirilmesinde bu yöntemin kullanılabileceği şeklinde yorumlandı. 12 izolatin 8'inde aynı karyotip tesbit edildi ve bu izolatlar arasında TPN solüsyonu ve rektal sürüntü sürveyans izolatu da vardı. Bu çalışma sonuçları ile, aynı hastada aynı türe ait farklı suşların kolonizasyon ve enfeksiyonunun birlikte seyrettiği, aynı suşun hastanenin farklı servislerinde bulunduğu, aynı hastanın iki ayrı epizotta türe ait iki

farklı suşla enfekte olduğu ve aynı hastanın TPN ve kan izolatının aynı suş olduğu düşünüldü.

5. *Meyerozyma guilliermondii* olarak tanımlanan 46 klinik çalışma izolatının ve 1 *C. membranifaciens* izolatının flukonazol, vorikonazol, itraconazol ve 5-flusitozin antifungal duyarlılıkları belirlendi. *M. guilliermondii* izolatları arasında flukonazol doz bağımlı duyarlı, itraconazol doz bağımlı duyarlı bir izolat; flukonazol doz bağımlı duyarlı, itraconazol dirençli bir izolat; flukonazol, vorikonazol ve itraconazol dirençli bir izolat belirlendi. Dirençli ve doz bağımlı duyarlı bildirilen bu üç izolat dışındaki tüm izolatlar flukonazol, vorikonazol ve flusitozin duyarlı bulundu. İtraconazol dirençli iki izolat hariç test edilen tüm izolatlar itraconazol doz bağımlı duyarlı tesbit edildi. Flusitozin dirençli *M. guilliermondii* izolatı belirlenmedi. Çalışmamızda pan-azol dirençli bir izolat edildi. *C. membranifaciens* izolatının belirlenen antifungal duyarlılık profili *M. guilliermondii* izolatlardan farklı bulundu.

6. Tüm çalışma izolatlarının salgı aspartik proteaz aktivitesi farklı pH değerlerindeki albümin gar besiyerlerde, farklı inkübasyon sıcaklıklarında ve uzun inkübasyon sürelerinde test edildi. İzolatlarda -proteolitik aktivite yok- veya -zayıf- olarak belirlendi.

Çalışmamız rutin biyokimyasal yöntemlerle *M. guilliermondii* olarak tanımlanmış çok sayıda izolatın identifikasyonunun moleküler yöntemlerle doğrulanmış olması, klinik ve sürveyans izolatlarının klonal yakınlığının PFGE-EK ile değerlendirilmesi, bu türe ait moleküler epidemiyolojik çalışmalarda kullanılabilecek PFGE-REAG protokolünün optimize edilmesi ve identifikasyonu moleküler olarak doğrulanmış izolatların antifungal duyarlılıklarının ve salgı aspartik proteaz aktivitesinin değerlendirilmiş olması ile önem taşımaktadır.

Salgın analizi için, tüm çalışma izolatlarının PFGE-EK ve REAG profillerinin belirlenmesi ile elde edilecek moleküler epidemiyolojik verilerin, hasta dosyalarının incelenmesi ve hastane enfeksiyon kontrol komitesi aracılığıyla ulaşılabilecek epidemiyolojik verilerle birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca hasta dosyalarının incelenmesi yoluyla hastalarda fungemi ilişkili klinik semptomların varlığı araştırılarak gerçek fungemi-gerçek salgın veya örneğin kontaminasyonu-yalancı salgın durumunun ayrımı sağlanmalıdır. Çalışmamızdaki *M. guilliermondii* izolatlarında

sadece olası bir virölans faktörü (Sap) araştırıldığından, izolatların mantarlarda virölans faktörü olarak kabul edilen lipaz, fosfolipaz ve biyofilm açısından da değerlendirilmesi uygun olacaktır.

9. KAYNAKLAR

1. Savini V, Catavittello C, Onofrillo D, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Febbo F, Claudio D'Amario, D'Antonio D (2011). What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses* 54(5): 434-441.
2. De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ (2000). Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovirai Virgili, 201.
3. Kurtzman CP (2011). The yeasts: A taxonomic study. 5th ed. Elsevier, 622-623.
4. Kurtzman CP, Suzuki M (2010). Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*, *Mycoscience* 51: 2-14.
5. Bai FY (1996). Separation of *Candida fermentati* com. nov. from *Candida guilliermondii* by DNA base composition and electrophoretic karyotyping. *Systematic and Applied Microbiology* 19: 178-181.
6. San Millan RM, Wu LC, Salkin IF, Lehmann PF (1997). Clinical isolates of *Candida guilliermondii* include *Candida fermentati*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47(2): 385-393.
7. Nishikawa A, Sugita T, Shinoda T (1997). Differentiation between *Debaryomyces hansenii*/*Candida famata* complex and *Candida guilliermondii* by polymerase chain reaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 19: 125-129.
8. Kurtzman CP, Robnett CJ (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* 35(5): 1216-1223.
9. Kurtzman CP, Robnett CJ (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371.

10. Bai FY, Liang HY, Jia JH (2000). Taxonomic relationships among the taxa in the *Candida guilliermondii* complex, as revealed by comparative electrophoretic karyotyping. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 417-422.
11. Vaughan-Martini A, Kurtzman CP, Meyer SA, O' Neill EB (2005). Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. *FEMS Yeast Research* 5: 463-469.
12. Lan L, Xu J (2006). Multiple gene genealogical analyses suggest divergence and recent clonal dispersal in the opportunistic human pathogen *Candida guilliermondii*. *Microbiology* 152: 1539-1549.
13. Kurtzman CP, Robnett CJ, Basehoar-Powers E (2008). Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov. *FEMS Yeast Research* 8: 939-954.
14. Desnos-Ollivier M, Ragon M, Robert V, Raoux D, Gantier JC, Dromer F (2008). *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *Journal of Clinical Microbiology* 46(10): 3237-3242.
15. Lockhart SR, Messer SA, Pfaller MA, Diekema DJ (2009). Identification and susceptibility profile of *Candida fermentati* from a worldwide collection of *Candida guilliermondii* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1): 242-244.
16. Yamamura M, Makimura K, Fujisaki R, Satoh K, Kawakami S, Nishiya H, Ota Y (2009). Polymerase chain reaction assay for specific identification of *Candida guilliermondii* (*Pichia guilliermondii*). *Journal of Infection and Chemotherapy* 15: 214-218.

17. Cornet M, Sendid B, Fradin C, Gaillardin C, Poulain D, Nguyen HV (2011). Molecular identification of closely related *Candida* species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. *The Journal of Molecular Diagnostics* 13(1): 12-21.
18. Romi W, Keisam S, Ahmed G, Jeyaram K (2014). Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. *BMC Microbiology* 14: 52.
19. Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzcowski H, Vartivarian S (1997). The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clinical Infectious Diseases* 24: 1122-1128.
20. Krcmery V, Grausova S, Mraz M, Pichnova E, Jurga L (1999). *Candida guilliermondii* fungemia in cancer patients: Repor of three cases. *Japan Society of Chemotherapy* 5: 58-59.
21. Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, Collette L, Martino P, Vandercam B, Doyen C, Lebeau B, Spence D, Krcmery V, De Pauw B, Meunier F, the Invasive Fungal Infection Group of the EORTC (1999). Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clinical Infectious Diseases* 28: 1071-1079.
22. Krcmery V, Barnes AJ (2002). Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection* 50: 243-260.
23. Cheng MF, Yu KW, Tang RB, Fan YH, Yang YL, Hsieh KS, Ho M, Lo HJ (2004). Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 48: 33-37.

24. Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, Biraghi E, Canton E, Zimmermann K, Seaton S, Grillot R (2004). Epidemiology of candidemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 23: 317-322.
25. Bedini A, Venturelli C, Mussini C, Guaraldi G, Codeluppi M, Borghi V, Rumpianesi F, Barchiesi F, Esposito R (2006). Epidemiology of candidemia and antifungal susceptibility patterns in an Italian tertiary care hospital. *Clinical Microbiology and Infection* 12: 75-80.
26. Pfaller MA, Diekema DJ, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang SC, Gibbs DL, Newell VA, the Global Antifungal Surveillance Group (2006). *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. *Journal of Clinical Microbiology* 44(10): 3551-3556.
27. Page BT, Shields CE, Merz WG, Cletus P, Kurtzman CP (2006). Rapid identification of ascomycetous yeasts from clinical specimens by a molecular method based on flow cytometry and comparison with identifications from phenotypic assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (9): 3167-3171.
28. Girmenia C, Pizzarelli G, Cristini F, Barchiesi F, Spreghini E, Scalise G, Martino P (2006). *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. *Journal of Clinical Microbiology* 44(7): 2458-2464.
29. Jewtuchowicz VM, Brusca MI, Mujica MT, Gliosca LA, Finkelievich JL, Lovannitti CA, Rosa AC (2007). Subgingival distribution of yeast and their antifungal susceptibility in immunocompetent subjects with and without dental devices. *Acta Odontologica Latinoamericana* 20(1): 17-22.
30. Peman J, Bosch M, Canton E, Viudes A, Jarque I, Gomez-Garcia M, Garcia-Martinez JM, Gobernado M (2008). Fungemia due to *Candida guilliermondii* in a pediatric and adult population during a 12-year period. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 60: 109-112.

31. Diba K, Namaki A, Ayatollahi H, Hanifian H (2012). Rapid identification of drug resistant *Candida* species causing recurrent vulvovaginal candidiasis. Medical Mycology Journal 53: 193-198.
32. Beck-Sague CM, Jarvis WR (1993). National Nosocomial Infections Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. The Journal of Infectious Diseases 167: 1247-51.
33. Posqualotto AC, Antunes AGV, Seveo LC (2006). *Candida guilliermondii* as the aetiology of candidosis. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 48(3): 123-127.
34. Chen CY, Huang SY, Tang JL, Tsay W, Yao M, Ko BS, Chou WC, Tien HF, Hsueh PR (2013). Clinical features of patients with infections caused by *Candida guilliermondii* and *Candida fermentati* and antifungal susceptibility of the isolates at a medical centre in Taiwan, 2001-10. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 68: 2632-2635.
35. Colombo AL, Nucci M, Salomao R, Branchini MLM, Richtmann R, Derossi A, Wey SB (1999). High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 34: 281-286.
36. Mardani M, Hanna HA, Girgawy E, Raad I (2000). Nosocomial *Candida guilliermondii* fungemia in cancer patients. Infection Control and Hospital Epidemiology 21(5): 336-337.
37. Kabbara N, Lacroix C, Latour RP, Socie G, Ghannoum M, Ribaud P (2008). Breakthrough *C. parapsilosis* and *C. guilliermondii* blood stream infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients receiving long-term caspofungin therapy. Haematologica 93(4): 639-640.
38. Savini V, Catavittello C, Marzio I, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Bianco A, Pompilio A, Bonaventura G, D'Amario C, D'Antonio D (2010). Pan-azole-resistant *Candida guilliermondii* from a leukemia patient's silent funguria. Mycopathologia 169(6): 457-459.

39. Masala L, Luzzati R, Maccacaro L, Antozzi L, Concia E, Fontana R (2003). Nosocomial cluster of *Candida guilliermondii* fungemia in surgical patients. European Journal of Clinical Microbiology&Infectious Diseases 22: 686-688.
40. Medeiros EAS, Lott TJ, Colombo AL, Godoy P, Coutinho AP, Braga MS, Nucci M, Brandt ME (2007). Evidence for a pseudo-outbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in a university hospital in Brazil. Journal of Clinical Microbiology 45(3): 942-947.
41. Yagupsky P, Dagan R, Chipman M, Goldschmied-Reouven A, Zmora E, Karplus M (1991). Pseudooutbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in a neonatal intensive care unit. Pediatric Infectious Disease Journal 10(12): 928-932.
42. Shah P, Bhatia P (2012). Pseudooutbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in neonatal intensive care unit. Internatinal Journal of Scientific Research 1(5): 112-113.
43. Ghannoum MA, Hajjeh RA, Scher R, Konnikov N, Gupta AK, Summerbell R, Sullivan S, Daniel R, Krusinski P, Fleckman P, Rich P, Odom R, Aly R, Pariser D, Zaiac M, Rebill G, Leshner J, Gerlach B, Ponce-de-Leon GF, Ghannoum A, Warner J, Isham N, Elewski B. (2000). A large-scale North American study of fungal isolates from nails: the frequency of onychomycosis, fungal distribution, and antifungal susceptibility patterns. Journal of the American Academy of Dermatology 43: 641-648.
44. Yücel A, Kantarcıoğlu AS (2000). *Candida*'ların patojenlik belirtgenleri, Cerrahpaşa Tıp Dergisi 30(3): 176-180.
45. Schaller M, Borelli C, Korting CH, Hube B (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. Mycoses 48: 365-377.
46. Monod M, Togni G, Hube B, Sanglard D (1994). Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. Molecular Microbiology 13: 357-368.

47. Ray TL, Payne CD (1990). Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infection and Immunity* 58: 508-514.
48. Dostal J, Hamal P, Pavlickova L, Soucek M, Ruml T, Pichova I, Hruskova-Heidingsfeldova O (2003). Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. *Journal of Clinical Microbiology* 41(2): 712-716.
49. Bramono K, Yamazaki M, Tsuboi R, Ogawa H (2006). Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 59(2): 73-76.
50. Wickerham LJ, Burton KA (1954). A clarification of the relationship of *Candida guilliermondii* to other yeasts by a study of their mating types. *Journal of Bacteriology* 68(5): 594-597.
51. Wickerham LJ (1966). Validation of the species *Pichia guilliermondii*. *Journal of Bacteriology* 92(4): 1269.
52. Kurtzman CP (1992). DNA relatedness among phylogenetically similar species of *Pichia*. *Mycologia* 84: 72-76.
53. Fitzpatrick DA, Logue ME, Stajich JE, Geraldine Butler G (2006). A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. *BMC Evolutionary Biology* 6: 99.
54. Butler G and et. al. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature* 459(7247): 657-662.
55. Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L (2009). Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Current Genetics* 55: 497-509.
56. Papon N, Courdavault V, Clastre M, Simkin AJ, Creche J, Giglioli-Guivarc'h N (2012). Deus ex *Candida* genetics: overcoming the hurdles for the development of a molecular toolbox in the CTG clade. *Microbiology* 158: 585-600.

57. Papon N, Savini V, Lanoue A, Simkin AJ, Creche J, Giglioli-Guivarc'h N, Clastre M, Courdavault V, Sibirny AA (2013). *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Current Genetics* 59: 73-90.
58. McManners J, Samaranayake LP (1990). Suppurative oral candidosis: Review of the literature and report of a case. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 19(5): 257-259.
59. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger, Woods G (2006). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 1231.
60. <http://www.docstoc.com/docs/75435422/COMPOSITION-OF-THE-MEDIA> [17.10.2012].
61. Richardson MD, Warnock DW (2012). *Fungal infection: Diagnosis and management*. 4th ed. Somerset, NJ: Wiley-Blackwell, 25-26.
62. Moore D, Frazer LN (2002). *Essential Fungal Genetics*. Secaucus, NJ: Springer, 249.
63. Bruns TD, White TJ, Taylor JW (1991). Fungal molecular systematics. *Annual Review Ecology Systematics* 22: 525-564.
64. Bruns TD, Vilgalys R, Barns SM, Gonzalez D, Hibbett DS, Lane DJ, Simon L, Stickel S, Szaro TM, Weisburg WG, Sogin ML (1992). Evolutionary relationships within the fungi: Analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1(3): 231-241.
65. Liu D (2011). *Molecular detection of human fungal pathogens*. CRC Press Taylor & Francis Group, 15-19.
66. Hillis DM, Dixon MT (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66(4): 411-453.

67. Gargas A, Taylor JW (1992). Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing 18S rDNA from lichenized fungi. *Mycologia* 84(4): 589-592.
68. Gardes M, Bruns TD (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
69. Gargas A, DePriest PT (1996). A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing SSU rDNA. *Mycologia* 88: 745-748.
70. Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Statzell-Tallman A (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1351.
71. White TJ and et. al. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: A guide to methods and applications (Eds: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ). New York: Academic Press, 315-322.
72. Vilgalys R, Gonzalez D (1990). Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. *Current Genetics* 18: 277.
73. Elias Costa MR, Carnovale S, Relloso MS (1999). Oropharyngeal candidosis in AIDS patients: an epidemiological study using restriction analysis of *Candida albicans* total genomic DNA. *Mycoses* 42: 41-46.
74. Chen YC, Chang SC, Tai HM, Hsueh PR, Luh KT (2001). Molecular epidemiology of *Candida* colonizing critically ill patients in intensive care units. *Journal of the Formosan Medical Association* 100: 791-797.
75. Clemons KV, Feroze F, Holmberg K, Stevens DA (1997). Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 1332-1336.

76. Poikonen E, Vuopio-Varkila J, Kaukoranta-Tolvanen SS, Sivonen A, Siren E, Ruutu P (2001). Epidemiological typing of *Candida albicans* from bloodstream infections by restriction enzyme analysis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 33: 140-144.
77. Taylor BN, Harrer T, Pscheidl E, Schweizer A, Rollinghoff M, Schroppel K (2003). Surveillance of nosocomial transmission of *Candida albicans* in an intensive care unit by DNA fingerprinting. *Journal of Hospital Infection* 55: 283-289.
78. Kanellopoulou M, Stamos G, Petinnelli I, Savala M, Tzimogianni A, Legakis NJ, Foustoukou M, Papafragas E, Velegraki A (2001). Subtyping and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. in the intensive care unit of a Greek general hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18: 179-183.
79. Riederer K, Fozo P, Khatib R (1998). Typing of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*: species-related limitations of electrophoretic karyotyping and restriction endonuclease analysis of genomic DNA. *Mycoses* 41: 397-402.
80. Samaranayake YH, Samaranayake LP, Dassanayake RS, Yau JY, Tsang WK, Cheung BP, Yeung KW (2003). 'Genotypic shuffling' of sequential clones of *Candida albicans* in HIV-infected individuals with and without symptomatic oral candidiasis. *Journal of Medical Microbiology* 52: 349-359.
81. Ball LM, Bes MA, Theelen B, Boekhout T, Egeler RM, Kuijper EJ (2004). Significance of amplified fragment length polymorphism in identification and epidemiological examination of *Candida* species colonization in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 1673-1679.
82. Redkar RJ, Dube MP, McCleskey FK, Rinaldi MG, Del Vecchio VG (1996). DNA fingerprinting of *Candida rugosa* via repetitive sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1677-1681.

83. Bournoux ME, Tavanti A, Bouchier C, Gow NA, Magnier A, Davidson AD, Maiden MC, D'Enfert C, Odds FC (2003). Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 5265-5266.
84. Soll DR (2000). The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 13(2): 332–370.
85. Hacıoğlu Basım E, Basım H (2001). Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) technique and its use in molecular biology. *Turkish Journal of Biology* 25:405-418.
86. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sa-Leao R, van Dijk JM, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW, on behalf of the ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM) (2013). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveillance* 18(4): 20380.
87. Chen KW, Lin YH, Li S (2005). Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* isolates in Taiwan. *Journal of Medical Microbiology* 54 (3): 249-58.
88. Lopez-Ribot JL, Kaufman-McAtee R, Kirkpatrick WR, Perea S, Frost-Patterson T (2000). Comparison of DNA-based typing methods to assess genetic diversity and relatedness among *Candida albicans* clinical isolates. *Revista Iberoamericana de Micología* 17(2): 49-54.
89. Shin JH, Park MR, Song JW, Shin D, Jung SI, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang (2004). Microevolution of *Candia albicans* strain during catheter-related candidemia. *Journal of Clinical Microbiology* 42(9): 4025-31
90. Fridkin SK, Jarvis WR (1996). Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews* 9(4): 499-511.

91. Pfaller MA, Messer SA, Houston A, Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Edwards JE, Jarvis W, Martin MA, Neu HC, Saiman L, Patterson JE, Dobb JC, Roldan CM, Rinaldi MG, Wenzel RP (1998). National epidemiology of mycoses survey: A multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 31: 289-296.
92. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP (1999). Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical Infectious Diseases* 29: 239-244.
93. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases* 39: 309-317.
94. Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, Medeiros EAS, Ribeiro J, Girao E, Correa L, Guerra C, Brites C, Pereira CAP, Carneiro I, Reis M, de Souza MA, Tranchesi R, Barata CU, Edmond MB, the Brazilian SCOPE Study Group (2011). Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: Analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Journal of Clinical Microbiology* 49(5): 1866-1871.
95. Perlroth J, Choi B, Spellberg B (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology* 45: 321-346.
96. Çalışkan E, Dede A, Biten Güven G (2013). Kan kültürlerinde saptanan *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *ANKEM Dergisi* 27(1): 25-30.
97. Dick JD, Rosengard BR, Merz WG, Stuart RK, Hutchins GM, Saral R (1985). Fatal disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida guilliermondii*. *Annals of Internal Medicine* 102: 67-68.

98. Vazquez JA, Lundstrom T, Dembry L, Chandrasekar P, Boikov D, Parri MB, Zervos MJ (1995). Invasive *Candida guilliermondii* infection: in vitro susceptibility studies and molecular analysis. Bone Marrow Transplant 16(6): 849-53.
99. Ainbinder DJ, Parmley VC, Mader TH, Nelson ML (1998). Infectious crystalline keratopathy caused by *Candida guilliermondii*. American Journal of Ophthalmology 125(5): 723-725.
100. Tietz HJ, Czaika V, Sterry W. (1999). Case report. Osteomyelitis caused by high resistant *Candida guilliermondii*. Mycoses 42: 577-580.
101. Ghannoum MA, Abu-Elteen KH (1990). Pathogenicity determinants of *Candida*. Mycoses 33 (6): 265-282.
102. Lee GW, Kim TH, Son JH (2012). Primary *Candida guilliermondii* infection of the knee in a patient without predisposing factors. Case Reports in Medicine 2012: 375682.
103. Borg-von Zepelin M, Kunz L, Ruchel R, Reichard U, Weig M, Groß U (2007). Epidemiology and antifungal susceptibilities of *Candida* spp. to six antifungal agents: results from a surveillance study on fungaemia in Germany from July 2004 to August 2005. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 60: 424-428.
104. Wout JW (1996). Fluconazole treatment of candidal infections caused by non-*albicans Candida* species. European Journal of Clinical Microbiology&Infectious Diseases 15: 238-242.
105. Barry AL, Brown SD (1996). In vitro studies of two triazole antifungal agents (voriconazole [UK-109,496] and fluconazole) against *Candida* species. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 40: 1948-1949.
106. Manavathu EK, Cutright JL, Chandrasekar PH (1998). Organism dependent fungicidal activities of azoles. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42: 3018-3021.

107. Espinel-Ingroff A (1998). In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 198-202.
108. Espinel-Ingroff A, Boyle K, Sheehan DJ (2001). In vitro antifungal activities of voriconazole and reference agents as determined by NCCLS methods: review of the literature. *Mycopathologia* 150: 101-115.
109. Chakrabarti A, Mohan B, Shrivastava SK, Marak RS, Ghosh A, Ray P (2002). Change in distribution&antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from candidaemia cases in a tertiary care centre during 1996-2000. *Indian Journal of Medical Research* 116: 5-12.
110. Cuenca-Estrella M, Rodero L, Garcia-Effron G, Rodriguez-Tudela JL (2002). Antifungal susceptibilities of *Candida* spp. isolated from blood in Spain and Argentina, 1996-1999. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49: 981-987.
111. Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz HW, Powderly WG, Hyslop N, Kauffman CA, Cleary J, Mangino JE, Lee J (2003). Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 3149-3154.
112. Tortorano AM, Rigoni AL, Biraghi E, Prigitano A, Viviani MA, the FIMUA-ECMM Candidaemia Study Group (2003). The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: Antifungal susceptibility patterns of 261 non-*albicans* *Candida* isolates from blood. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 679-682.
113. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN, International Fungal Surveillance Participant Group (2003). In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 78-83.

114. Pfaller MA, Diekema DJ (2004). Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: Concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 4419-4431.
115. Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ (2005). In vitro activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida* spp., including 315 isolates resistant to fluconazole. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 5425-5427.
116. Johnson E, Espinel-Ingroff A, Szekely A, Hockey H, Troke P (2008). Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies. *International Journal of Antimicrobial Agents* 32: 511-514.
117. Chakrabarti A, Chatterjee SS, Rao KL, Zameer MM, Shivaprakash MR, Singhi S, Singh R, Varma SC (2009). Recent experience with fungaemia: Change in species distribution and azole resistance. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 41: 275-84.
118. To WK, Fothergill AW, Rinaldi MG (1995). Comparative evaluation of macrodilution and Alamar colorimetric microdilution broth methods for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2660-2664.
119. Barchiesi F, Spreghini E, Tomassetti S, Della Vittoria A, Arzeni D, Manso E, Scalise G (2006). Effects of caspofungin against *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 2719-2727.
120. Chiu YS, Chang SC, Hsueh PR, Wang JL, Sun HY, Chen YC (2006). Survey of amphotericin B susceptibility of *Candida* clinical isolates determined by E-test. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 39: 335-341.
121. Moen MD, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ (2009). Liposomal amphotericin B: A review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs* 69: 361-392.

122. Savini V, Catavittello C, Bianco A, Balbinot A, D' Antonio F, D' Antonio D (2009). Azole resistant *Candida glabrata* vulvovaginitis treated with boric acid. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 147: 112.
123. Park S, Kelly R, Kahn JN, Robles J, Hsu MJ, Register E, Li W, Vyas V, Fan H, Abruzzo G, Flattery A, Gill C, Chrebet G, Parent SA, Kurtz M, Teppler H, Douglas CM, Perlin DS (2005). Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 3264-3273.
124. Perlin DS (2007). Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resistance Updates* 10: 121-130.
125. Walker LA, Gow NA, Munro CA (2010). Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genetics and Biology* 47: 117-126.
126. Bonaventura G, Spedicato I, Picciani C, D' Antonio D, Piccolomini R (2004). In vitro pharmacodynamic characteristics of amphotericin B, caspofungin, fluconazole, and voriconazole against bloodstream isolates of infrequent *Candida* species from patients with hematologic malignancies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 4453-4456.
127. Dannaoui E, Lortholary O, Raoux D, Bougnoux ME, Galeazzi G, Lawrence C, Moissenet D, Poilane I, Hoinard D, Dromer F, the YEASTS Group (2008). Comparative in vitro activities of caspofungin and micafungin, determined using the method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, against yeast isolates obtained in France in 2005-2006. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 778-781.
128. Monod M, Borg-von ZM (2002). Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. *Biological Chemistry* 383(7-8): 1087-1093.
129. Kapica L, Blank F (1957). Growth of *Candida albicans* on keratin as sole source of nitrogen. *Dermatologica* 115: 81-105.

130. Staib F (1965). Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. *Sabouraudia* 4: 187-193.
131. R  chel R (1984). A variety of *Candida* proteinases and their possible targets of proteolytic attack in the host. *Zentralblatt f  r Bakteriologie Mikrobiologie, und Hygiene Series A* 257(2): 266-274.
132. Negi M, Tsuobi R, Matsui T, Ogawa H (1984). Isolation and characterization of proteinase from *Candida albicans*: Substrate specificity. *Journal of Investigative Dermatology* 83(1): 32-36.
133.   erikcio  lu N (1993). Klinik   rneklerden izole edilen *Candida* kökenlerinde asit proteinaz enzimi varlığının ve bunun virulans ile ilişkisinin araştırılması. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
134. Fusek M, Smith EA, Monod M, Dunn BM, Foundling SI (1994). Extracellular aspartic proteinases from *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida parapsilosis* yeasts differ substantially in their specificities. *Biochemistry* 33: 9791-9799.
135. Kuştimur   , EI-Nahi H, Altan N (1990). Proteinaz-pozitif ve proteinaz-negatif *Candida albicans*'ın farede virulansı ve normal insan lökositleri tarafından   ld  r  lmesi. *Turkish Journal of Medical Sciences* 14: 593-601.
136. Naglik JR, Challacombe SJ, Bernhard H (2003). *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(3): 400.
137. Bernardis F, Mondello F, Millan RS, Ponton J, Cassone A (1999). Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 37(11): 3481-3486.
138. De Bernardis F, Mondello F, Scaravelli G, Pachi A, Girolamo A, Agatensi L, Cassone A (1999). High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. *Journal of Clinical Microbiology* 37(5): 1376-1380.

139. Abbas CA, Sibirny AA (2011). Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75: 321-360.
140. Sibirnyi AA, Shavlovskii GM, Ksheminskaya GP, Orlovskaya AG (1977). Riboflavin transport in cells of riboflavin-dependent yeast mutants. *Microbiology* 46: 313-315.
141. Sibirny AA, Shavlovsky GL (1984) Strain *Pichia guilliermondii* ss16-8 accumulating large amounts of riboflavin inside the cells. Soviet Patent.
142. Boretsky YR, Pynyaha YV, Boretsky VY, Kutsyaba VI, Protchenko OV, Philpott CC, Sibirny AA (2007). Development of transformation system for gene knock-out in the flavinogenic yeast *Pichia guilliermondii*. *Journal of Microbiological Methods* 70: 13-19.
143. Shavlovskii GM, Logvinenko EM (1988) Supersynthesis of flavins in microorganisms and its molecular mechanism. *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiya* 24: 435-447.
144. Knight SA, Lesuisse E, Stearman R, Klausner RD, Dancis A (2002). Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and the TUP1 regulator. *Microbiology* 148: 29-40.
145. Leathers TD (2003). Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. *FEMS Yeast Research* 3: 133-140.
146. Rodrigues RC, Sene L, Matos GS, Roberto IC, Pessoa A Jr, Felipe MG (2006). Enhanced xylitol production by precultivation of *Candida guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. *Current Microbiology* 53: 53-59.
147. Guo C, Zhao C, He P, Lu D, Shen A, Jiang N (2006). Screening and characterization of yeasts for xylitol production. *Journal of Applied Microbiology* 101: 1096-1104.

148. Zou YZ, Qi K, Chen X, Miao XL, Zhong JJ (2010). Favorable effect of very low initial K_La value on xylitol production from xylose by a self-isolated strain of *Pichia guilliermondii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 109: 149-152.
149. Gong F, Sheng J, Chi ZM, Li J (2007). Inulinase production by a marine yeast *Pichia guilliermondii* and inulin hydrolysis by the crude inulinase. *Journal of Industrial Microbiology&Biotechnology* 34: 179-185.
150. Guo N, Gong F, Chi Z, Sheng J, Li J (2009). Enhanced inulinase production in solid state fermentation by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology&Biotechnology* 36: 499-507.
151. Wang GY, Chi Z, Song B, Wang ZP, Chi ZM (2012). High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22. *Bioresource Technology* 124:77-82.
152. Vijayaraghavan K, Yamini D, Ambika V, Sowdamini NS (2009). Trends in inulinase production-a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 29: 67-77.
153. Acourene S, Ammouche A (2012). Optimization of ethanol, citric acid, and alpha-amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology&Biotechnology* 39: 759-766.
154. Wang Y, Song L, Zhou Y (1992). Selection of strains capable of utilizing D-xylose and cellobiose to produce ethanol by electric field-induced protoplast fusion. *Chinese Journal of Biotechnology* 8: 51-56.
155. Rodriguez ME, Lopes CA, van Broock M, Valles S, Ramon D, Caballero AC (2004). Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *Journal of Applied Microbiology* 96: 84-95.
156. Rodriguez ME, Lopes CA, Valles S, Caballero AC (2010). Characterization of alpha-rhamnosidase activity from a Patagonian *Pichia guilliermondii* wine strain. *Journal of Applied Microbiology* 109: 2206-2213.

157. Dias JC, Rezende RP, Rosa CA, Lachance MA, Linardi VR (2000). Enzymatic degradation of nitriles by a *Candida guilliermondii* UFMG-Y65. Canadian Journal of Microbiology 46: 525-531.
158. Hellstrom AM, Vazques-Juarez R, Svanberg U, Andlid TA (2010). Biodiversity and phytase capacity of yeasts isolated from *Tanzanian togwa*. International Journal of Food Microbiology 136: 352-358.
159. Spadaro D, Gullino ML (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. International Journal of Food Microbiology 91: 185-194.
160. Zhang DP, Spadaro D, Valente S, Garibaldi A, Gullino ML (2011). Cloning, characterization and expression of an exo-1,3-betaglucanase gene from the antagonistic yeast, *Pichia guilliermondii* strain M8 against grey mold on apples. Biological Control 59: 284-293.
161. Sundh I, Melin P (2011). Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. Antonie Van Leeuwenhoek 99: 113-119.
162. Wisniewski M, Biles C, Droby S, McLaughlin R, Wilson C, Chalutz E (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. Physiological and Molecular Plant Pathology 39: 245-258.
163. Hashem M, Abo-Elyousr KA (2011). Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. Crop Protection 30: 285-292.
164. Petersson S, Schnürer J (1995). Biocontrol of mold growth in highmoisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology 61: 1027-1032.

165. Zhao Y, Tu K, Shao XF, Jing W, Su ZP (2008). Effects of the yeast *Pichia guilliermondii* against *Rhizopus nigricans* on tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 49: 113-120.
166. Liu FJ, Tu K, Shao XF, Zhao Y, Tu SC, Su J, Hou YP, Zou XR (2010). Effect of hot air treatment in combination with *Pichia guilliermondii* on postharvest anthracnose rot of loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology* 58: 65-71.
167. Zinjarde SS, Pant AA (2002). Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. *Marine Pollution Bulletin* 44: 118-121.
168. Canettieri EV, Almeida e Silva JB, Felipe MG (2001). Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 94: 159-168.
169. Carvalho W, Silva SS, Converti A, Vitolo M (2002). Metabolic behavior of immobilized *Candida guilliermondii* cells during batch xylitol production from sugarcane bagasse acid hydrolyzate. *Biotechnology and Bioengineering* 79: 165-169.
170. Schirmer-Michel AC, Flores SH, Hertz PF, Matos GS, Ayub MA (2008). Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. *Bioresource Technology* 99: 2898-2904.
171. Wah TT, Walaisri S, Assavanig A, Niamsiri N, Lertsiri S (2013). Coculturing of *Pichia guilliermondii* enhanced volatile flavor compound formation by *Zygosaccharomyces rouxii* in the model system of Thai soy sauce fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 160: 282-289.
172. Ksheminska H, Jaglarz A, Fedorovych D, Babyak L, Yanovych D, Kaszycki P, Koloczek H (2003). Bioremediation of chromium by the yeast *Pichia guilliermondii*: toxicity and accumulation of Cr(III) and Cr(VI) and the influence of riboflavin on Cr tolerance. *Microbiological Research* 158: 59-67.
173. Kaszycki P, Fedorovych D, Ksheminska H, Babyak L, Wojcik D, Koloczek H (2004). Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. *Microbiological Research* 159: 11-17.

174. Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Gísladóttir AL, Gottfredsson M (2011). Molecular epidemiology of late recurrent candidaemia-a population based study in Iceland. *Clinical Microbiology and Infection* 18: 195-201.
175. www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html [Giriş: 15.02.2013].
176. Leaw SN, Hsien Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC (2006). Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3): 693-699.
177. Nguyen HV, Gaillardin C, Neuveglise C (2009). Differentiation of *Debaryomyces hansenii* and *Candida famata* by rRNA gene intergenic spacer fingerprinting and reassessment of phylogenetic relationships among *D. hansenii*, *C. famata*, *D. fabryi*, *C. flareri* (= *D. subglobosus*) and *D. prosopidis*: description of *D. vietnamensis* sp. nov. closely related to *D. nepalensis*. *FEMS Yeast Research* 9: 641-662.
178. Maringele L, Lydall D (2006). *Methods in molecular biology-Yeast protocol methods in cell and molecular biology*. 2nd ed. Totawa-NJ: Humana Press Inc, 65-73.
179. Clinical and Laboratory Standards Institute-Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standards (2008). 3rd edition, volume 28, number: 14, PA, ABD.
180. Hall GS (2012). Interactions of yeasts, moulds, and antifungal agents. How to detect resistance. Chapter 2: Antifungal susceptibility testing: Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) methods (Ed: Fothergill AW). Humana Press, 69.
181. Tavanti A, Hensgens LAM, Mogavero S, Majoros L, Senesi S, Campa M (2010). Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis* sensu strictu strains isolated from different geographic regions and body sites. *BMC Microbiology* 10: 203.
182. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> [23.05.2013].

183. Heo SM, Robert S. Sung RS, Scannapieco FA, Haase EM (2011). Genetic relationships between *Candida albicans* strains isolated from dental plaque, trachea, and bronchoalveolar lavage fluid from mechanically ventilated intensive care unit patients. *Journal of Oral Microbiology* 3: 6362.
184. Yüce A, Çakır N (2009). Hastane enfeksiyonları, 2. Baskı, Güven Kitabevi, İzmir, 10.
185. Castanheira M, Woosley LN, Diekema DJ, Jones RN, Pfaller MA (2013). *Candida guilliermondii* and other species of *Candida* misidentified as *Candida famata*: Assessment by Vitek 2, DNA sequencing analysis, and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in two global antifungal surveillance programs. *Journal of Clinical Microbiology* 51(1): 117-124.
186. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Early Edition*. (www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1117018109).
187. Suh S-O, Nguyen NH, Blackwell M (2005). Nine new *Candida* species near *C. membranifaciens* isolated from insects. *Mycological Research* 109(9): 1045-1056.
188. Mandras N, Tullio V, Allizond V, Scalas D, Banche G, Roana J, Robbiano F, Fucale G, Malabaila A, Cuffini AM, Carlone N (2009). In vitro activities of fluconazole and voriconazole against clinical isolates of *Candida* spp. determined by disk diffusion testing in Turin, Italy. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 53 (4): 1657-1659.
189. Couto FMM, Macedo DPC, Neves RP (2011). Fungemia in a university hospital: an epidemiological approach. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(6): 745-748.

190. Wang L, Chi Z, Wang X, Ju L, Chi Z, Guo N (2008). Isolation and characterization of *Candida membranifaciens* subsp. *flavinogenie* W14-3, a novel riboflavin-producing marine yeast. *Microbiological Research* 163: 255-266.
191. Alavifard F, Etebarian HR, Sahebani N, Aminian H (2012). Induction of resistance in apple fruit inoculated with antagonistic *Candida membranifaciens* isolates and *Botrytis mali*. *Journal of Crop Protection* 1(3): 249-259.
192. Frutos RL, Fernandez-Espinar MT, Querol A (2004). Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie van Leeuwenhoek* 85: 175-185.
193. Groenewald M, Robert V, Smith MTh (2011). The value of the D1/D2 and internal transcribed spacers (ITS) domains for the identification of yeast species belonging to the genus *Yamadazyma*. *Persoonia* 26: 40-46.
194. <https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/average-fragment-size-generated-by-endonuclease-cleavage> [26.11.2002].
195. Chou HH, Chiou CS, Chen KW, Li SY (2007). Suitable restriction enzymes for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Candida tropicalis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 57: 451-454.
196. Dijkshoorn L, Towner KJ, Struelens M (2001). New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. First edition. Elsevier Science, 162.
197. Branchini ML, Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Frempong T, Isenberg HD (1994). Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 32(2): 452-456.
198. Voss A, Pfaller MA, Hollis RJ, Melchers WJG, Meis WJG (1998). Evaluation of the discriminatory power of pulsed-field gel electrophoresis and PCR fingerprinting for epidemiologic typing of *Candida* species. *Clinical Microbiology and Infection* 4(2): 82-87.

199. Jang SJ, Han HL, Lee SH, Ryu SY, Chaulagain BP, Moon YL, Kim DH, Jeong OY, Shin JH, Moon DS, Park YJ (2005). PFGE-Based epidemiological study of an outbreak of *Candida tropicalis* candiduria: The importance of medical waste as a reservoir of nosocomial infection. Japanese Journal of Infectious Diseases 58: 263-267.
200. Lin CY, Chen YC, Lo HJ, Chen KW, Li SY (2007). Assessment of *Candida glabrata* strain relatedness by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. Journal of Clinical Microbiology 45(8): 2452-2459.
201. Dib JC, Dube M, Kelly C, Rinaldi MG, Patterson JE (1996). Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a typing system for *Candida rugosa*: Comparison of karyotype and restriction fragment length polymorphisms. Journal of Clinical Microbiology 34(6): 1494-1496.
202. Abdeljelil JB, Saghrouni F, Khammari I, Gheith S, Fathallah A, Said MB, Boukadida J (2012). Investigation of a cluster of *Candida albicans* invasive candidiasis in a neonatal intensive care unit by pulsed-field gel electrophoresis. The ScientificWorld Journal. Article ID 138989, doi:10.1100/2012/138989.
203. Lee JS, Shin JH, Kim MN, Jung SI, Park KH, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW (2007). *Kodamaea ohmeri* isolates from patients in a university hospital: Identification, antifungal susceptibility, and pulsed-field gel electrophoresis analysis. Journal of Clinical Microbiology 45(3): 1005-1010.
204. Abdeljelil JB, Saghrouni F, Emira N, Valentin-Gomez E, Chatti N, Boukadida J, Said MB, Del Castillo Agudo L (2011). Molecular typing of *Candida albicans* isolates from patients and health care workers in a neonatal intensive care unit. Journal of Applied Microbiology 111: 1235-1249 .
205. Pfaller MA (1995). Epidemiology of fungal infections: the promise of molecular typing. Clinical Infectious Disease 20: 1535-1539.
206. Khattak MN, Bruine JP (1999). Pulse field gel electrophoresis (PFGE) as an epidemiological typing method in detecting nosocomial outbreak of *Candida parapsilosis*. Journal of Postgraduate Medical Institute 13(1): 90-94.

207. Silva CLP, Santos RMR, Parasitarias DDI, Colombo AL (2001). Cluster of *Candida parapsilosis* primary bloodstream infection in a neonatal intensive care unit the Brazilian. *Journal of Infectious Diseases* 5(1): 32-36.
208. Chen KW, Chen YC, Lin YH, Chou HH, Li SY (2009). The molecular epidemiology of serial *Candida tropicalis* isolates from ICU patients as revealed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Infection, Genetics and Evolution* 9: 912-920.
209. Khattak MN, Burnie JP, Matthews RC, Oppenheim BA (1992). Clamped homogeneous electric field gel electrophoresis typing of *Torulopsis glabrata* isolates causing nosocomial infections. *Journal of Clinical Microbiology* 30(8): 2211-2215.
210. Cendejas-Bueno E, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Manuel Cuenca-Estrella M (2010). Identification of pathogenic rare yeast species in clinical samples: Comparison between phenotypical and molecular methods. *Journal of Clinical Microbiology* 48(5): 1895-1899.
211. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lope A, Gutierrez MO, Buitrago MJ, Juan L. Rodriguez-Tudela JL (2008). Reliability of the WIDERYST susceptibility testing system for detection of in vitro antifungal resistance in yeasts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(3): 1062-1065.

10. ETİK KURUL ONAYI

KTÜ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 7	Tarih: 18/06/2012
	Doç.Dr.İlknur TOSUN'un sorumluluğunda yürütülen Doktora Öğr.Nejla CEBECİ GÜLER'e ait "Kan Kültürlerinden İzole Edilmiş <i>Candida Guilliermondii</i> Suşlarının Genotipik ve Virülans Özelliklerinin Araştırılması" başlıklı 2012/96 no'lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma/tez başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

KTÜ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU İLAÇ DIŞI KLİNİK ARAŞTIRMALARI KARAR FORMU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
Başkanın Unvanı / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Faruk AYDIN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Faruk AYDIN Başkan:	Tıbbi Mikrobiyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☒ H ☐	E ☐ H ☐	Oylamaya Katılmamıştır
Prof.Dr.Gamze ÇAN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.S.Caner KARAHAHAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	Özel Yıldızlı Güven Hastanesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☐	E ☐ H ☒	İZİNLI
Prof.Dr.Ümit ÇOBANOĞLU Üye:	Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Yüksel ALIYAZICIOĞLU Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİNLI
Doç.Dr.S. Murat KESİM Raportör:	Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Hülya ULUSOY Üye:	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİNLI
Doç.Dr.Hafız AYDIN Üye:	Ortopedi ve Travmatoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cer.	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr. Ahmet TIRYAKI Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Gülay KARAGÜZEL Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Fatih Mehmet GÖKÇE Üye:	Fizyoloji	Rize Üniv. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Miraç ÇELİK Üye:	Hukuk	KTÜ Hukuk Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Tufan SAĞLAM Üye:	Sağlık mesleği mensubu olmayan üye	Serbest (Tekstil Mühendisi)	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik/Pasaport:

Soyadı, Adı: CEBECİ GÜLER, Nejla

Uyruğu: T.C.

Doğum tarihi ve yeri: 05/01/1981, ORDU

Medeni hali: Evli

Telefon: 0462 377 7786

Faks: -

E-Posta: nejlacebeci52@hotmail.com

Yazışma adresi: KTÜ SABE Tıbbi Mikrobiyoloji AD

EĞİTİM BİLGİLERİ

DereceMezun Olduğu Kurumun Adı Mezuniyet Yılı

Doktora: KTÜ SABE Tıbbi Mikrobiyoloji-Devam ediyor

Yüksek Lisans: KTÜ SABE Tıbbi Mikrobiyoloji AD-2007

Lisans: KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü-2003

Lise: Ayşe Şahin Çok Programlı Lisesi-1998

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

GöreviKurumSüre(Yıl-Yıl)

1. Araştırma görevlisiKTÜ SABE Tıbbi Mikrobiyoloji AD 2005-2014

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

Aydın F, Bayramoğlu G, Cebeci-Güler N, Kaklıkaya N, Tosun I (2011). Bloodstream Yeast Infections in a University Hospital in Northeast Turkey: a 4-Year Survey. Medical Mycology 49: 316-319.

Cebeci-Güler N, Tosun I, Bayramoğlu G, Buruk K, Aydın F (2011). Genotypic identification and distribution patterns of *Candida parapsilosis* complex species (*C.parapsilosis* sensu stricto, *C.metapsilosis* and *C.orthopsilosis*) isolated from clinical samples. Mikrobiyoloji Bülteni 45(4): 723-728.

Tosun I, Akyüz Z, Cebeci-Güler N, Gülmez D, Bayramoğlu G, Kaklıkkaya N, Arıkan-Akdağlı S, Aydın F (2013). Distrubition, virulence attributes and antifungal susceptibility patterns of *Candida parapsilosis* complex strains isolated from clinical samples. Medical Mycology 51(5): 483-492.