

CANDIDA ALBICANS KLİNİK İZOLATLARININ "RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA" YÖNTEMİYLE GENOTİPLENDİRMESİNDE KULLANILAN FARKLI PRİMERLERİN KARŞILAŞTIRILMASI*

COMPARISON OF DIFFERENT PRIMERS USED FOR THE GENOTYPING OF *CANDIDA ALBICANS* CLINICAL ISOLATES BY RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA METHOD

Begüm SARAN¹, Zeynep Ceren KARAHAN¹, Handan AĞIRBAŞLI², Alper TEKELİ¹,
A. Murat AKSOY¹

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
(ckarahan@medicine.ankara.edu.tr)

² İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Bizim Lösemili Çocuklar Vakfı, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.

ÖZET

Candida albicans, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda olmak üzere yüksek mortalite ile seyreden ciddi enfeksiyonlara yol açmaktadır. Bu çalışmanın amacı; *C. albicans* izolatlarının genotiplendirilmesinde RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) yönteminin etkinliğinin değerlendirilmesi ve kullanılan farklı primerlerin ayırım gücünün karşılaştırılmasıdır. Çalışmamızda, Haziran 1999-Nisan 2003 tarihleri arasında yatarak tedavi gören hematolojik maligniteli 65 çocuk hastanın boğaz, balgam, kan, dışkı, idrar, vajen ve yara kültürlerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 109 *C. albicans* suşu, 10 farklı primer (OPE-03, OPE-04, OPE-12, OPE-18, OPE-19, OPE-20, OPF-10, OPF-12, P1 ve P2) kullanılarak RAPD yöntemi ile incelenmiştir. Her primer ile elde edilen bant paternleri değerlendirilerek suşlar gruplandırılmış ve ayırım gücü hesaplanmıştır. Yöntemin tekrarlanabilirliği, rastgele seçilen 20 suşun aynı ve farklı PCR cihazlarında aynı PCR şartlarında çalışılması ile değerlendirilmiştir. *C. albicans* izolatları, kullanılan primere bağlı olmak üzere, 1-16 arasında bant oluşturmuş, 41-80 arasında genotipe ayrılmıştır. RAPD yönteminin ayırım gücü, her bir primer için -güvenilir değer olarak kabul edilen- ≥ 0.90 (0.90-0.99 arasında) olarak bulunmuştur. Ancak, bir primer ile çalışıldığında aynı grupta yer alan suşların bir başka primer ile farklı gruplara dağılabildiği gözlenmiştir. Yöntemin tekrarlanabilirliği zayıf, özellikle çok sayıda bant oluşturan izolatlarda, bant paternlerinin karşılaştırılmasının zor olduğu saptanmıştır. RAPD yöntemi ile genotiplendirmede güvenilir sonuçlar elde etmek için birden fazla primer kullanılması ve bunların karşılaştırmalı analizlerinin yapılması uygundur. Yöntem, az sayıda izolatin değerlendirildiği küçük salgınları araştırmada uygun olmakla birlikte, yöntemin tekrarlanabilirliğinin zayıf ve çok sayıda bant oluşturan izo-

* Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2001K120240).

latların değerlendirilmesinin zor oluşu nedeniyle, uzun bir zaman dilimine yayılmış çok sayıda izolatin değerlendirilmesinde zahmetli ve güvenilirliğinin düşük olduğu kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Candida albicans*, genotiplendirme, RAPD, ayırım gücü.

ABSTRACT

Candida albicans causes severe infections with high mortality rates especially in immunocompromised patients. The aim of this study was to evaluate the efficiency of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method and compare the discriminatory powers (DP) of different primers used for genotyping *Candida albicans* isolates. A total of 109 *C. albicans* strains recovered from throat, sputum, blood, feces, urine, vagina and wound cultures of 65 hospitalized paediatric patients with haematologic malignancy were evaluated by RAPD method using 10 different primers (OPE-03, OPE-04, OPE-12, OPE-18, OPE-19, OPE-20, OPF-10, OPF-12, P1 and P2) between June 1999-April 2003. Strains were separated into groups by analyzing band patterns derived from each primer and the DP was calculated. Reproducibility of the method was determined by evaluating randomly chosen 20 isolates with the same and different PCR devices under the same PCR conditions. *C. albicans* isolates generated 1-16 bands and were grouped in 41-80 genotypes depending on the primers used. DP of the RAPD method was calculated as ≥ 0.90 for each primer (range between 0.90-0.99), which were accepted as reliable values. However, the strains clustered in the same group when studied with a primer could be dispersed into different groups by another primer. The reproducibility of the method was poor and the comparison of band patterns was difficult especially in isolates which generated many bands. In conclusion, for obtaining reliable results by RAPD method, using more than one primer and comparative analysis of these primers are appropriate. RAPD is an adequate method for studying small outbreaks in which a few number of isolates are evaluated, but it is laborious and unreliable for many number of isolates recovered in a long time period because of its poor reproducibility and difficulties in evaluating the strains generating many bands.

Key words: *Candida albicans*, genotyping, RAPD, discriminatory power.

GİRİŞ

Candida türleri hastane enfeksiyonlarının önemli etkenlerinden biridir. Sağlıklı bireylerde flora elemanı olarak bulunmasına rağmen, bağışıklık sistemi baskılanmış kişilerde fırsatçı patojen olarak ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır^{1,2}. Son 15 yılda cerrahi yoğun bakım ünitelerinde yatanlarda, kanser hastalarında ve nötropenik kişilerde kandidemi sıklığında ciddi artış görülmüştür. *Candida* türleri, dolaşım sistemi enfeksiyonlarının %8-15'inden sorumludur ve %38 oranında mortalite ile seyretmektedir. *Candida* cinsi içerisinde *Candida albicans*, insanlardan izole edilen mantarlar arasında en sık görülenidir³⁻⁵.

C. albicans izolatlarının genotiplendirmesi; enfeksiyon salgınlarını belirlemek, çapraz geçişi saptamak, enfeksiyon kaynağını tespit etmek, eğer varsa kısmi virülen suşları tespit etmek veya dirençli suşların ortaya çıkışını saptamak gibi epidemiyolojik değerlendirmeler açısından önemlidir. Genotiplendirmenin bir diğer geniş kullanım alanı da *C. albicans* popülasyon genetiğinin çalışılmasıdır⁶.

Bu çalışmanın amacı, aynı klinikte yatarak tedavi gören hematolojik maligniteli çocuk hastalardan enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *C. albicans* suşlarının 10 ayrı primer kullanılarak "Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)" yöntemi ile genotiplendirile-

rek farklı primerlerin ayırım gücünün karşılaştırılması ve yöntemin *C.albicans* genotiplendirmesindeki kullanılabilirliğinin değerlendirilmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

C.albicans İzolatları

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Bizim Lösemili Çocuklar Vakfı Hastanesinde Haziran 1999-Nisan 2003 tarihleri arasında yatarak tedavi gören hematolojik maligniteli 63 çocuk hastanın boğaz, balgam, kan, dışkı, idrar, vajen ve yara kültürlerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 109 *C.albicans* suşu çalışmaya alındı. Aynı hastadan, aynı yatışta, aynı enfeksiyon alanından izole edilen sadece bir suş değerlendirildi.

DNA Ekstraksiyonu

Sabouraud dekstroz agar (SDA)'da üretilen *C.albicans* suşlarından DNA ekstraksiyonu Kayser ve arkadaşlarının⁷ kullandığı yöntemde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla, cam boncuklarla hücre duvarlarının parçalanmasını takiben klasik fenol-kloroform ekstraksiyonu ve alkol ile presipitasyona dayanan yöntem kullanıldı. Kısaca, SDA üzerinden alınan koloniler 2 kere 0.5 ml steril distile su içerisinde yıkandı ve santrifüj sonrasında elde edilen çökeltiye 200 µl erime tamponu [10 mM Tris-HCl (pH= 8), 1mM EDTA, 100 mM NaCl, %2 (wt/vol) Triton X-100, %1 SDS (wt/vol)] eklenerek 95°C'de 5 dakika bekletildi. Üzerine 200 µl fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) ve 300 mg 0.5 mm çaplı cam boncuk (Sigma, Almanya) eklenen örnekler, 5 dakika maksimum hızda karıştırıldı ve hemen ardından üzerine 200 µl TE tamponu [10 mM Tris-HCl (pH= 8) ve 1 mM disodyum EDTA] eklenerek 10 dakika 15.000 rpm'de, +4°C'de santrifüj edildi. Üstteki faz ayrılarak 1:1 oranında kloroform eklendi. Vorteks ile karıştırma ve santrifüj işlemleri tekrarlandı. Üstteki faz alınarak bu hacmin 2 katı kadar soğuk etanol eklendi ve nükleik asitler çöktürüldü. %70'lik soğuk etanol ile yıkandıktan sonra santrifüj edilen örneklerin üzerinde kalan süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen çökeltinin üzerine 1 µg RNaz içeren 100 µl TE tamponu eklenerek tekrar süspanse edildi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Inkübasyonu takiben tekrar 200 µl soğuk etanol eklenerek DNA presipitasyonu sağlandı ve %70 alkol ile yıkama işlemleri tekrarlandı. Çökelti tamamen kurutulduktan sonra elde edilen DNA, 100 µl steril distile su içerisinde çözdürüldü ve içerdiği DNA miktarı spektrofotometrik (Hitachi, Japonya) olarak ölçüldü. DNA örnekleri çalışılincaya kadar -20°C'de saklandı.

RAPD Analizi

RAPD analizinde 10 ayrı primer (OPE-03, OPE-04, OPE-12, OPE-18, OPE-19, OPE-20, OPF-10, OPF-12, P1 ve P2) kullanıldı. İlk 8 primer Pujol ve arkadaşları¹⁹ tarafından *C.albicans* suşlarında kullanımı uygun bulunan primerler olup, son ikisi (P1 ve P2) tarafımızdan belirlenen dizilerdi. Kullanılan primer dizileri ve PCR döngüleri Tablo 1'de gösterildi. PCR karışımı, 25 µl toplam hacim içerisinde 1 ng DNA, uygun tampon içerisinde 1 U Taq DNA polimeraz (Sigma, Almanya), 200 µM dNTP (Fermentas, Lithuania), 0.2 µM primer ve 1.5 mM MgCl₂ içerecek şekilde, pipetlemeden kaynaklanabilecek hataları önlemek amacıyla her bir primer için bir seferde hazırlandı. Tüm örnekler termal döngü cihazın-

Tablo I. Kullanılan Primer Dizileri ve PCR Koşulları

Primer adı	Dizi	PCR koşulları	Kaynak
OPE-03	CCAGATGCAC	94°C'de 5 dakika ilk denatürasyonu	19
OPE-04	GTGACATGCC	takiben 40 döngü olacak şekilde;	
OPE-12	TTATCGCCCC	94°C'de 1 dakika denatürasyon,	
OPE-18	GGACTGCAGA	36°C'de 1 dakika yapışma ve 73°C'de	
OPE-19	ACGGCGTATG	1 dakika uzama uygulanmış, son döngüye	
OPE-20	AACGGTGACC	72°C'de 5 dakika son uzama eklendi.	
OPF-10	GGAAGCTTGG		
OPF-12	ACGGTACCAG		
P1	GGGTACCGCC	94°C'de 5 dakika ilk denatürasyonu	Bu çalışma
P2	GTTGCGATCC	takiben 40 döngü olacak şekilde;	
		94°C'de 1 dakika denatürasyon,	
		42°C'de 1 dakika yapışma ve 73°C'de	
		1 dakika uzama uygulandı, son döngüye	
		72°C'de 5 dakika son uzama eklendi.	

da (Primus, Hoffmann-La Roche Ltd., Almanya) tabloda belirtilen şartlarda çalışıldı. Yöntemin tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesi için rastgele seçilen 20 suş, aynı PCR cihazında farklı zamanda ve farklı PCR cihazında (Techne, Barloworld Scientific Ltd., İngiltere) eş zamanlı olarak, PCR karışımları aynı şekilde hazırlanarak çalışıldı. Amplifikasyon ürünlerinden 10 µl alınarak %3 agaroz jelde 100 V'da 6 saat yürütüldü ve agaroz jeller etidyum bromür ile boyandıktan sonra UV transilüminatör ile görüntüledi. Her örnek için elde edilen koyu boyanan bant profilleri görsel olarak değerlendirildi ve gruplar belirlendi.

Ayırım Gücünün Hesaplanması

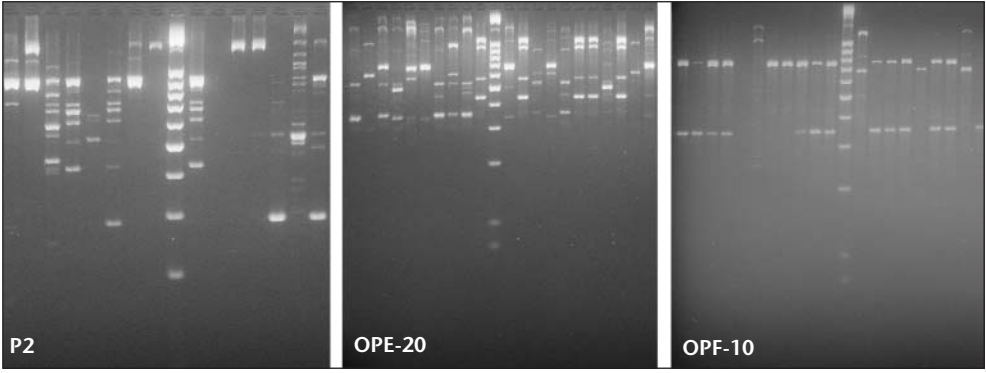
Her bir primerin ayırım gücü aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplandı. Ayırım gücü ≥ 0.90 bulunan yöntemler, örnek karşılaştırmasında güvenle kullanılabilir (genotiplendirme için uygun) olarak kabul edildi⁸⁻¹⁰.

$$DP = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s x_j(x_j-1)$$

DP: Ayırım gücü, s: Elde edilen profil (tip) sayısı, x_j: j. tipe düşen örnek sayısı, N: Popülasyon büyüklüğü.

BULGULAR

Çalışmamızda 109 *C. albicans* DNA örneği, 10 primer ile ayrı ayrı çalışılmış ve her bir primer ile farklı sayı ve yoğunlukta bant profili ve farklı sayıda grup elde edilmiştir (Resim 1). Her bir primer ile elde edilen bant ve grup sayıları ile her RAPD yöntemi için hesaplanan ayırım güçleri Tablo II'de verilmiştir. Kullanılan tüm primerlerin ayırım gücünün (≥ 0.90) epidemiyolojik çalışmalarda kullanmak için yeterli olduğu görülmüştür.



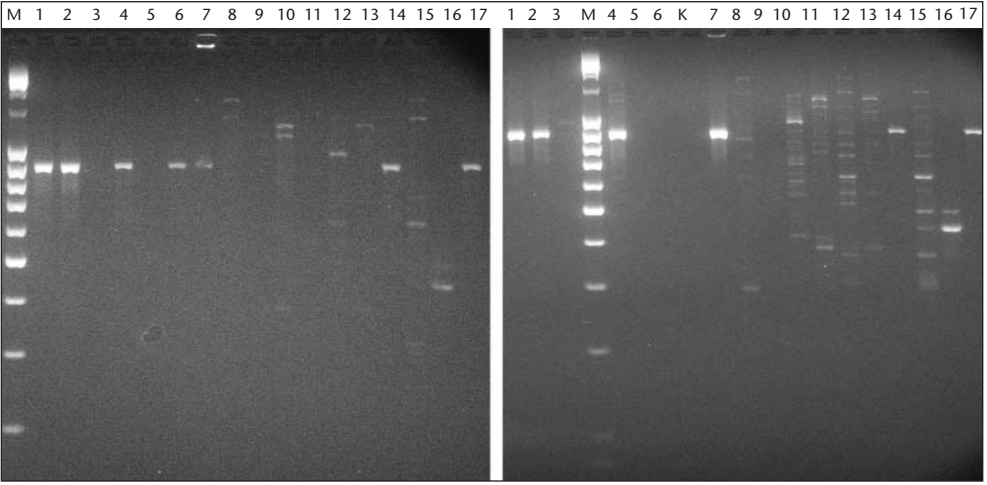
Resim 1. Farklı *C.albicans* izolatlarının P2, OPE-20 ve OPF-10 primerleri kullanılarak elde edilen RAPD örnekleri.

Tablo II. Farklı Primerlerle Elde Edilen Bant ve Grup Sayıları ve Ayırım Güçleri

Primer	Bant oluşturmeyan örnek sayısı	En az bant sayısı (örnek)	En çok bant sayısı (örnek)	Elde edilen grup sayısı	Bir gruba düşen en az örnek sayısı	Bir gruba düşen en çok örnek sayısı	Ayırım gücü
OPE-03	11	1 (8)	10 (1)	80	1	5	0.99
OPE-04	21	1 (17)	15 (1)	66	1	15	0.94
OPE-12	20	1 (8)	7 (6)	52	1	23	0.91
OPE-18	19	1 (16)	10 (1)	63	1	8	0.96
OPE-19	15	1 (5)	11 (1)	67	1	15	0.95
OPE-20	10	1 (2)	11 (1)	76	1	8	0.98
OPF-10	9	1 (5)	9 (1)	41	1	23	0.90
OPF-12	12	1 (5)	12 (1)	65	1	15	0.96
P1	2	1 (2)	11 (1)	52	1	29	0.92
P2	17	1 (23)	16 (1)	52	1	17	0.94

RAPD analizlerinin tekrarlanabilirliğinin, çalışma koşullarındaki Mg^{++} konsantrasyonu, primer miktarı, PCR koşulları gibi çok küçük değişikliklerden bile etkilenebileceği bilinmektedir¹¹. Tekrarlanabilirlik değerlendirildiğinde, aynı cihazda farklı zamanlarda yapılan çalışmalar arasında koyu boyanan bant paternlerinde fark gözlenmezken; özellikle zayıf boyanan bantlarda değişiklikler (mevcut bir bantın silinmesi veya yeni bir zayıf bant ortaya çıkması gibi) saptanmıştır. Aynı şekilde hazırlanan PCR karışımı, aynı anda farklı cihazlarda çalışıldığında ise hem zayıf hem de koyu boyanan bant paternlerinde ciddi farklılıklar ortaya çıkmıştır (Resim 2).

Aynı hastadan farklı anatomik lokalizasyonlardan veya farklı yatışta aynı lokalizasyondan izole edilen *C.albicans* suşları karşılaştırıldığında, bir primer ile aynı grupta toplanan bazı suşların, bir diğeri ile farklı gruplara ayrılacağı görülmüştür (Tablo III).



Resim 2. Aynı primer (OPE-04) ile farklı PCR cihazlarında (a: Techne, b: Primus) çalışılan 17 *C.albicans* suşunun (sütunların üzerinde verilen aynı numaralar aynı örnekleri göstermektedir) oluşturduğu bant paternleri.

TARTIŞMA

Enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *C.albicans* suşlarının tiplendirilmesi, özellikle epidemiyolojik açıdan önem taşımaktadır^{12,13}. Mantarların tiplendirilmesi; biyotiplendirme (fenotipik özelliklere dayanan tiplendirme) ve genotiplendirme (genetik özelliklere dayanan tiplendirme) olmak üzere iki şekilde yapılmaktadır. Uzun yıllar boyunca, biyotiplendirme yöntemlerinin, DNA düzeyindeki farklılıkları ve benzerlikleri ölçmeden suşlar arasındaki farklılığı ortaya koyabildiği görüşü hakim olmuştur¹¹. Ancak *C.albicans*'ın fenotipik özelliklerinde spontan değişikliklerin görülmesi, tüm genotipik değişikliklerin fenotipe yansımaması ve fenotipik mikroevrimin genotipik mikroevrime göre yavaş olması biyotiplendirme yöntemlerinin güvenilirliğini gölgelemiştir. Ayrıca, suşların üretildiği ortam ve kültürün değerlendirme zamanındaki minör değişiklikler ile laboratuvarlar arasındaki uygulama farklılıklarına bağlı olarak fenotipik özelliklerin değişmesi ve biyotiplendirme çalışmalarının zaman alıcı olması, bu yöntemlerin etkinlik, güvenilirlik ve tekrarlanabilirliğini azaltmaktadır. Genotiplendirme yöntemleri, bu kriterler açısından önemli avantajlar sağlamış ve günümüzde mantar tiplendirmesinde biyotiplendirme yöntemlerinin yerini almıştır^{12,14,15}.

Enfeksiyöz mantarların genotiplendirmesinde kullanılan yöntemler arasında; SB (Southern blot) hibridizasyon, bDNA (branched DNA), HC (hybrid capture) sistemi, SSCP (single strand conformational polymorphism), elektroforetik karyotipleme, MLEE (multi-locus enzyme electrophoresis), TMA (transcription mediated amplification), LCR (ligase chain reaction), PFGE (pulsed field gel electrophoresis), SDA (strain displacement analysis), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temeline dayalı yöntemler [RFLP (restriction fragment length polymorphism), REA (restriction endonuclease analysis), AP-PCR (arbitrarily primed PCR), RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), mikrosatellit analizi, RT (real-time)-PCR vb.] ve genom dizi analizi yer almaktadır^{12,16-19}. PCR temeline dayalı yön-

Tablo III. Aynı Hastaya Ait İzolatların Farklı Primerlerle Gruplandırılması

Hasta no	Örnek no	Aynı sonuç veren primer	Hasta no	Örnek no	Aynı sonuç veren primer	
1	3	YOK	12	64	OPE-03 (64=65)	
	4			65	OPE-12 (64=65=68)	
2	5	OPE-12 (5=6=8) OPF-10 (6=7)	13	66	OPE-19 (64=65)	
	6			67	OPF-10 (64=65=66=67=68=69)	
	7			68	P1 (64=65) (67=69)	
	8			69		
3	11	YOK	14	72	YOK	
	12			73		
4	16	OPF-10 (16=19) P1 (16=17=18=19)	15	74	YOK	
	17			75		
	18			77		OPE-03 (79=81)
	19			78		OPE-04 (78=79=80: bant Ø)
				79		OPE-12 (79=80)
5	23	OPE-03 OPF-10 OPE-19 P1	16	80	OPE-19 (78=79=81=82)	
	24			81	OPF-10 (79=81=82)	
				82	P1 (79=80=81=82)	
				83	P2 (78=79=80=81=82)	
				84		
6	27	OPE-03 (27=28: bant Ø) OPE-04 (27=28: bant Ø) OPE-19 (28=29) OPF-10 (27=28) OPF-12 (27=28) P1 (27=28)	17	85	P2	
	28			86		
	29			87		
7	34	OPE-12 (35=36: bant Ø) OPE-18 (35=36: bant Ø)	18	94	OPF-10	
	35			95		
	36					
8	38	OPE-12 (bant Ø) OPE-19 (bant Ø) OPE-20 (bant Ø) OPF-12 (bant Ø) P2	19	99	OPE-04	
	39			100		
9	43	OPE-12 (bant Ø)	20	101	OPE-04 (101=103=104: bant Ø)	
	44			102	OPF-10 (101=102, 103=104)	
	45			103	OPF-12 (101=103)	
				104	P2 (101=103)	
10	53	OPF-10 (54=55) OPF-12 (53=54)	21	109	OPF-10	
	54			110		
	55					
11	60	OPE-03 (60=61=62=63) OPE-12 (62=63) OPE-18 (61=63: bant Ø) OPE-19 (60=61=62=63) OPF-10 (60=61=62=63) OPF-12 (62=63) P1 (61=62=63)	22	111	OPE-20	
	61			112		
	62					
	63					
			23	116	YOK	
				117		

temler arasında en popüler olanı RAPD'dir. RAPD, yaklaşık 10 bazlık rastgele dizilmiş primerler kullanılarak yapılan PCR amplifikasyonu sonucunda oluşan değişik büyüklüklerdeki ürünlerin elektroforez uygulanarak agaroz jelde ayırımına dayanan bir yöntemdir^{11,12}. RAPD analizleri, göreceli olarak kolay ve hızlıdır ve daha az teknik donanım gerektirir. Yapılan çalışmalarda, *C. albicans* izolatları için RAPD'nin ayırım gücü, REA, MLEE ve tekrarlayan dizilere yönelik problemlerin kullanıldığı yöntemlerle benzer; PFGE'den ise yüksek bulunmuştur^{1,16,20}. Bu özellikleri nedeniyle, *Candida* türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda, salgın incelemesi ve insandan insana geçiş insidansının belirlenmesi açısından değerli bir yöntem olarak kabul edilmektedir²¹. Bununla birlikte, amplifikasyon temeline dayanması ve özgül olmayan primerler kullanılması nedeniyle, reaksiyon koşullarına bağlı olarak duyarlılıklarının değişkenlik göstermesi gibi önemli bir dezavantaja sahiptir. PCR şartlarındaki çok ufak değişiklikler (yapışma sıcaklığı, reaksiyon süreleri, kullanılan polimeraz kaynağı, MgCl₂ konsantrasyonu, kalıp DNA kalite ve konsantrasyonu, primer konsantrasyonu vb.) bile fragmanların çoğaltılabilirliğini, dolayısıyla yöntemin tekrarlanabilirliğini etkilemektedir. Bu nedenle, bu metodun veritabanı oluşturmak için uygunluğu kanıtlanmamıştır¹¹. Bizim çalışmamızda da, PCR karışımları aynı şekilde hazırlandığı halde, cihaz değişikliğinin bile elde edilen bant paternlerini değiştirdiği gözlenmiştir. Bu farklılığın, farklı cihazların döngüler arası sıcaklık değişim hızlarının farklılığına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda kullanılan tüm primerler, yüksek ayırım gücüne sahip olmakla birlikte kendi aralarında bazı önemli farklılıklar sergilemiştir. Bütün primerlerle bant vermeyen örnek olmamıştır. OPE-04 (AG: 0.94), OPE-12 (AG: 0.91) ve OPE-18 (AG: 0.96) primerleri kullanıldığında, örneklerin yaklaşık beşte biri bant vermemiştir. Bu yüksek oranlar, bu primerlerin güvenilirliğini ciddi oranda düşürmektedir. Buna karşılık P1 primeri ile sadece iki örnekte bant görülmemiş, yine tek bant veren örnek sayısı iki olarak bulunmuştur. Ayırım gücü 0.92 olmakla birlikte değerlendirme kolaylığı ve az sayıda bant veren örnek sayısının az olması nedeniyle bu primer diğerlerine kıyasla daha kullanılabilir bulunmuştur.

Aynı hastaya ait farklı örnekler değerlendirildiğinde (Tablo III), farklı primerlerin bu örnekleri aynı veya farklı gruplara dahil edebildiği gözlenmiştir. Sadece 1, 3, 13, 14 ve 23 numaralı hastalara ait örnekleri aynı bulan hiçbir primer olmaması, bu örneklerin farklı kökenlerden geldiğini düşündürmektedir. Diğer hastalara ait farklı izolatlar bazı primerlerle aynı, bazıları ile farklı gruplarda bulunmuştur. Bu sonuç, RAPD yönteminin özellikle geniş zaman diliminde elde edilen çok sayıda suşun yakınlığını belirlemede yetersiz bir yöntem olduğunu göstermektedir. Aynı kökenden gelen suşlar, gen dizilerindeki minör değişiklikler nedeniyle farklı gruplara sokulabileceği gibi, birbirinden çok farklı suşlar da primer bağlanma bölgelerinin benzerlikleri nedeniyle aynı grupta değerlendirilebilmektedir.

Candida genotiplendirilmesinde birçok yöntem kullanılabilirle birlikte, altın standart olarak kabul edilen bir yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle, *C. albicans* genotiplenmesi için yöntem seçerken tekrarlanabilirlik, sonuçların yorumlanabilme kolaylığı ve yöntemin ayırım gücü göz önünde bulundurulmalıdır¹⁶. Bizim çalışmamızın sonuçları, çalışılacak örnek grubunun büyüklüğü ve şüphelenilen salgının boyutu gibi çeşitli faktörlerin de genotiplenme yöntemi seçiminde göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir.

Genotiplendirmede yüksek ayırım gücü elde etmek için, moleküler hedefleri farklı olan tekniklerin kombine edilmesi ya da bir tekniğin farklı varyasyonlarının kullanılması önerilmektedir^{12,22}. Bu çalışmada primerler ayrı ayrı değerlendirildiğinde ayırım güçleri yeterli düzeyde bulunmakla birlikte; bir primer ile çalışıldığında aynı grupta yer alan bazı suşların, başka bir primer ile farklı gruplara dağılabildiği gözlenmiştir. Her ne kadar bu sonuç, RAPD analizlerinde birden fazla primer kullanımının ve bunların kıyaslamalı analizlerinin yapılmasının suşlar arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koymada çok daha etkili olacağını düşündürmekteyse de, çok sayıda suş söz konusu olduğunda bantların değerlendirilmesi ve suşların gruplandırılmasında karşılaşılan zorluklar nedeniyle bunun yapılması çok kolay olmayacaktır. Ayrıca, elde edilen farklı sonuçlardan hangisinin daha güvenilir olduğuna dair bir veri de bulunmamaktadır.

Esas olarak *Candida* enfeksiyonlarının kaynağının endojen olduğu kabul edilir. Ancak ekzojen kaynaklı enfeksiyonlar da bildirilmiştir²³⁻²⁵. Ekzojen bulaş kaynakları arasında cansız objeler (parenteral nütrisyon solüsyonları vb.) ve sağlık çalışanları ya da diğer hastalar sayılabilir¹⁸. Ekzojen bulaş, özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonların hatta salgınların gelişmesinde önemli rol oynamaktadır²⁶. *Candida* suşları elden ele geçiş gösterebilir ve inokülasyondan 45 dakika sonra ellerden izole edilebilir. Hastane sağlık çalışanlarının el taşıyıcılığı, daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilmiş ve bunlardan birinde prevalans %81 olarak bulunmuştur²³. Hastane kaynaklı *Candida* enfeksiyonunun kaynağını belirlemek, morbidite ve mortalitenin azalmasında önemli rol oynamaktadır. Bu da ancak uygun genotiplendirme yönteminin seçilmesi ile mümkün olacaktır. RAPD analizleri, kısa sürede ortaya çıkan az sayıda olgudan elde edilen izolatları değerlendirmede uygun olabilir, ancak uzun bir zaman dilimine yayılmış çok sayıda izolatin değerlendirilmesinde yorucu ve güvenilirliği düşük bir yöntem gibi görünmektedir. Özellikle çalışma koşullarındaki minör değişikliklerden bile etkilenmesi ve farklı primerler kullanıldığında suşların genetik yakınlığı ile ilgili farklı sonuçlar alınması en önemli dezavantajlarını oluşturmaktadır. Sonuç olarak, RAPD yöntemi ile *C.albicans* suşlarının genotiplendirilmesi, az sayıda suşun değerlendirilmesinde, bir klinikte ortaya çıkan küçük salgınlarda kaynağın araştırılmasında yararlı olsa da; çok sayıda suşun değerlendirilmesinde uygun bir yöntem değildir.

KAYNAKLAR

1. Steffan P, Vazquez JA, Boikov D, Xu C, Sobel JD, Akins RA. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. J Clin Microbiol 1997; 35: 2031-9.
2. Metzgar D, Belkum AV, Field D, Haubrich R, Wills C. Random amplification of polymorphic DNA and microsatellite genotyping of pre- and post-treatment isolates of *Candida* spp. from human immunodeficiency virus-infected patients on different fluconazole regimens. J Clin Microbiol 1998; 36: 2308-13.
3. Dalle F, Franco N, Lopez J, et al. Comparative genotyping of *Candida albicans* bloodstream and nonbloodstream isolates at a polymorphic microsatellite locus. J Clin Microbiol 2000; 38: 4554-9.
4. Dalle F, Dumont L, Franco N, et al. Genotyping of *Candida albicans* oral strains from healthy individuals by polymorphic microsatellite locus analysis. J Clin Microbiol 2003; 41: 2203-5.
5. Hattori H, Iwata T, Nakagawa Y, et al. Genotype analysis of *Candida albicans* isolates obtained from different body locations of patients with superficial candidiasis using PCRs targeting 25S rDNA and ALT repeat sequences of the RPS. J Dermatol Sci 2006; 42: 31-46.

6. Garcia-Hermoso D, Cabaret O, Lecellier G, et al. Comparison of microsatellite length polymorphism and multilocus sequence typing for DNA-based typing of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 2007; 45: 3958-63.
7. Kaiser C, Michaelis S, Mitchell A. Methods in Yeast Genetics, pp: 137-147. 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
8. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 1988; 26: 2465-6.
9. Foulet F, Nicolas N, Eloy O, et al. Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. J Clin Microbiol 2005; 43: 4574-9.
10. Hunter PR. A critical review of typing methods for *Candida albicans* and their applications. Crit Rev Microbiol 1991; 17: 417-34.
11. Tekeli A. PCR amplifikasyon temelli mikrobiyal tiplendirme, s: 197-221. Tekeli A, Ustaçelebi Ş (ed), Moleküler Mikrobiyoloji, Tanı Prensipleri ve Uygulamalar. 2006, Palme Yayıncılık, Ankara.
12. Soll DR. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 332-70.
13. Vrioni G, Bernard PM. Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. J Infect 2001; 42: 50-6.
14. Melo ASA, Almeida LP, Colombo AL, Briones MRS. Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). Mycopathologia 1998; 142: 57-66.
15. Wilson MJ, Williams DW, Forbes MD, Finlay IG, Lewis MA. A molecular epidemiological study of sequential oral isolates of *Candida albicans* from terminally ill patients. J Oral Pathol Med 2001; 30: 206-12.
16. Clemons KV, Feroze F, Holmberg K, Stevens DA. Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. J Clin Microbiol 1997; 35: 1332-6.
17. Bretagne S, Costa JM, Besmond C, Carsique R, Calderone R. Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of the elongation factor 3 gene of *Candida albicans* as the basis for a typing system. J Clin Microbiol 1997; 35: 1777-80.
18. Versalovic J, Lupski JR. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. Trends Microbiol 2002; 10: 15-21.
19. Pujol C, Joly S, Lockhart SR, Tibayrenc M, Soll DR. Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe Ca3 for fingerprinting *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1997; 35: 2348-58.
20. Jain P, Khan ZK, Bhattacharya E, Ranade SA. Variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles specific to fluconazole-resistant and -sensitive strains of *Candida albicans*. Diagn Microbiol Infect Dis 2001; 41: 113-9.
21. Valério HM, Botelho RC, Oliveira W, Resende MA. Differentiation of *Candida* species obtained from nosocomial candidemia using RAPD-PCR technique. Rev Soc Bras Med Trop 2006; 39: 174-8.
22. Dassanayake RS, Ellepola ANB, Samaranyake YH, Samaranyake LP. Molecular heterogeneity of fluconazole-resistant and -susceptible oral *Candida albicans* isolates within a single geographic locale. APMIS 2002; 110: 315-24.
23. Lunel FMV, Meis JFGM, Voss A. Nosocomial fungal infections: candidemia. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; 34: 213-20.
24. Botterel F, Desterke C, Costa C, Bretagne S. Analysis of microsatellite markers of *Candida albicans* used for rapid typing. J Clin Microbiol 2001; 39: 4076-81.
25. Stephan F, Bah MS, Desterke C, et al. Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. Clin Infect Dis 2002; 35: 1477-83.
26. Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 499-511.