



YAZAR :Saliha KESTİ

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST. YÜKSEK LİSANS TEZİ

GİRESUN -2019

T.C

**GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

***Meyerozyma guilliermondii*'DE PULSE FIELD JEL ELEKTROFOREZİ-
GENOMİK DNA'NIN RESTRİKSİYON ENZİM ANALİZİ İÇİN UYGUN
ENZİMİN BELİRLENMESİ**

SALİHA KESTİ

DR.ÖĞR.ÜYESİ NEJLA CEBECİ GÜLER

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GİRESUN-2019

T.C

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Meyerozyma guilliermondii'DE PULSE FIELD JEL
ELEKTROFOREZİ-GENOMİK DNA'NIN
RESTRİKSİYON ENZİM ANALİZİ İÇİN UYGUN
ENZİMİN BELİRLENMESİ

SALIHA KESTİ

TEZ DANIŞMANI

DR. ÖĞR. ÜYESİ NEJLA CEBECİ GÜLER

Giresun Üniversitesi ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Ortak Yüksek Lisans Tezi

Bu araştırma Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından

SAĞ-BAP-C-160317-16 proje numarası ile desteklenmiştir.

GİRESUN-2019

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı.

24.05/2019


Prof. Dr. Ayşegül ÇEBİ

Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.


Doç. Dr. Cihangir AKDEMİR

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarım.


Dr. Öğr. Üyesi Nejla CEBECİ GÜLER

Danışman

Jüri Üyeleri ve Üniversiteleri

Dr. Öğr. Üyesi Nejla CEBECİ GÜLER

Giresun Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Kemal BİLGİN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

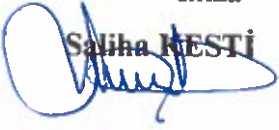
Doç. Dr. Şahin DİREKEL

Giresun Üniversitesi

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

İmza


Saliha NESTI

“Her koşulda yanımda olan canım aileme ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, çalışmanın her aşamasında sabırla bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, değerli zamanını esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan minnet duyduğum saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Nejla CEBECİ GÜLER'e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ders aldığım; bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Giresun Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer hocam Doç. Dr. Cihangir AKDEMİR'e, Giresun Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri, Doç. Dr. Şahin DİREKEL'e Doç. Dr. Emel UZUNOĞLU KARAGÖZ'e minnet ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ'e, Prof. Dr. Zihni Açar YAZICI'ya, Doç. Dr. Kazım ŞAHİN'e bilgilerini, desteklerini ve hoşgörülerini esirgemedikleri için sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisansta birlikte yol aldığım, her koşulda yanımda olan ve desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen candan öte arkadaşım Gamze KAÇMAZ'a ve Gökçe GÜNTEPE'ye çok teşekkür ederim.

Ayrıca SAĞ-BAP-C-160317-16 proje numarası ile tezimin yürütülmesinde maddi olarak sağlayan Giresun Üniversitesi BAP koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca bugünlere gelmemde maddi, manevi desteğini hep yanımda hissettiğim, çok büyük emek ve fedakarlık göstermiş olan canım aileme bir an olsun desteklerini, ilgilerini, sabırlarını esirgemedikleri için minnettarım. En büyük teşekkürü canım aileme borç bilirim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ	Sayfa
TEZ ONAYI.....	i
BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SEMBOLLER, KISALTMALAR VE FORMÜLLER DİZİNİ.....	x
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	3
2.1.1. Taksonomi ve Filogenetik	3
2.1.2. Fenotipik İdentifikasyon	4
2.1.2.1. Kültür ve Mikroskobi Özellikleri	4
2.1.2.2. Biyokimyasal Özellikler	5
2.1.3. Moleküler İdentifikasyon	6
2.1.3.1. Ribosomal RNA Geninin Sekanslanması	6
2.1.4. Moleküler Genotiplendirme	7
2.1.4.1. Pulse Field Jel Elektroforezi	8
2.1.5. Epidemiyoloji ve Klinik Önem	9
2.1.6. Antifungal Duyarlılık	12
2.1.7. Virülans Özellikleri	12

2.1.8. Biyoteknolojik Uygulamalar	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Gereç	15
3.1.1. Çalışma Grubu İzolatları	15
3.1.2. Araç ve Gereçler	16
3.1.3. Kimyasallar	16
3.1.4. Solüsyonlar	17
3.1.4.1. Pulse Field Jel Elektroforezi Solüsyonları	17
3.2. Yöntem	19
3.2.1. Pulse Field Jel Elektroforezi Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi Optimizasyonu	19
3.2.1.1. Maya Kültürü Hazırlanma.....	19
3.2.1.2. Low Melting Point Agaroz (%1.2) Hazırlanması.....	20
3.2.1.3. Litikaz Solüsyonu Hazırlanması.....	20
3.2.1.4. Maya Hücre Pelleti Hazırlanması.....	20
3.2.1.5. Plug Hazırlanması.....	20
3.2.1.6. EDTA-Tris-β Merkaptoetanol Solüsyonu Hazırlanması.....	21
3.2.1.7. Proteinaz Solüsyonu Hazırlanması.....	21
3.2.1.8. Genomik DNA'nın Retriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilmesi..	22
3.2.1.9. Megabaz Agaroz (%1.0) Jel Hazırlanması.....	23
3.2.1.10. Elektroforez.....	23

3.2.1.11. Boyama ve Görüntüleme.....	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. Pulsed Field Jel Elektroforezi-Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi Sonuçları.....	25
4.1.1. Genomik DNA'nın <i>SfiI</i> Restriksiyon Enzimi Analizi.....	25
4.1.2. Genomik DNA'nın <i>NotI</i> Restriksiyon Enzimi Analizi.....	26
4.1.3. Genomik DNA'nın <i>PacI</i> Restriksiyon Enzimi Analizi.....	27
5. TARTIŞMA.....	28
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	38
7. KAYNAKLAR.....	39
ÖZGEÇMİŞ.....	50

TABLolar DİZİNİ	Sayfa
Tablo 2-1: <i>Meyerozyma guilliermondii</i> 'ye ait biyokimyasal reaksiyonlar ve çoğalma özellikleri.....	5
Tablo 2-2: Çeşitli CTG klad türleri için klinik önem, biyoteknolojik uygulama, biyolojik kontrol potansiyeli, genom sekansı ve moleküler araç bilgileri.....	14
Tablo 3-1: <i>Meyerozyma guilliermondii</i> çalışma grubu izolatlarının izolasyon tarihi, örnek tipi ve servis bilgileri.....	15
Tablo 3-2: Referans suşlar ve suş koleksiyonlarındaki kodları.....	16
Tablo 3-3: Pulse field jel elektroforezi-genomik DNA'nın restriksiyon enzim kesimi için kullanılan bileşenler ve miktarları.....	22
Tablo 3-4: Pulse field jel elektroforezi-genomik DNA'nın restriksiyon enzim kesimi için kullanılan enzimlere ait bilgiler.....	23

ŞEKİLLER DİZİNİ	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Meyerozyma guilliermondii</i> ribozomal RNA genlerinin organizasyonu.....	7
Şekil 4.1. Çalışma suşlarının pulsed field jel elektroforezi-genomik DNA'nın <i>SfiI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bant profilleri.....	25
Şekil 4.2. Çalışma suşlarının pulsed field jel elektroforezi-genomik DNA'nın <i>NotI</i> enzimi ile kesimi sonucu oluşan bant profilleri.....	26
Şekil 4.3. Çalışma suşlarının pulsed field jel elektroforezi-genomik DNA'nın <i>PacI</i> enzimi ile kesilmesiyle oluşan jel görünümü.....	27
Şekil 5.1. <i>Meyerozyma guilliermondii</i> izolatlarının PFGE-EK bant profillerinin görünümü.....	31

SEMBOLLER, KISALTMALAR VE FORMÜLLER DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
Ade	Adenin hemisülfat
AFLP	Amplifiye Fragment Uzunluk Polimorfizmi
ATCC	Amerikan Tip 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
Cm	Santimetre
Ddw	İki kere distile su
Dk	Dakika
DSM	Alman Kültür Koleksiyonu
DNA	Deoksiribonükleik Asit
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 İmmun Yetmezlik Virüsü
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
MİK	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
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 Dekstroza Agar
Sn	Saniye
SSU	Küçük Alt Ünite
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
TPN	Total Parenteral Beslenme
U	Ünite
V	Volt

YEPD
μl

Yeast Ekstrat Pepton Dekstroz
Mikrolitre

ÖZET

***Meyerozyma guilliermondii*' DE PULSE FIELD JEL ELEKTROFOREZİ- GENOMİK DNA'NIN RESTRİKSİYON ENZİM ANALİZİ İÇİN UYGUN ENZİMİN BELİRLENMESİ**

Amaç: *Meyerozyma guilliermondii*, fırsatçı insan patojeni olarak kan dolaşımı enfeksiyonu (kandidemi) gibi ciddi enfeksiyonların etkeni bir maya türüdür. Bu çalışmada, *M. guilliermondii* suşlarının moleküler epidemiyolojik analizlerinde kullanılabilen Pulse Field Jel Elektroforezi-Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi (PFGE-REAG) yöntemi için uygun restriksiyon enziminin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmaya, Karadeniz Teknik Üniversitesi Farabi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen, 9 hastanın epidemiyolojik olarak ilişkili 12 *M. guilliermondii* suşu dahil edildi. PFGE-REAG yöntemi, CHEF DR III (BioRad, ABD) cihaz sistemi kullanılarak *SfiI*, *NotI* ve *PacI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile çalışıldı.

Bulgular: *SfiI* ile kesim reaksiyonu sonucunda, moleküler büyüklük marker'ı aralığına dağılmış ve daha net ayırt edilebilen bantlar izlendi. *SfiI* ve *NotI* bant profilleri, karyotipleme bant profilleriyle karşılaştırıldığında; REAG protokolünün karyotiplemeden daha ayırt edici olduğu sonucuna varıldı.

Sonuç: REAG-*SfiI*, epidemiyolojik olarak ilişkili *M. guilliermondii* suşlarının klonal ilişkisini belirlemede kullanılabilir. Bu çalışmayla, epidemiyolojik olarak ilişkili *M. guilliermondii* klinik izolatlarının klonal ilişkisinin değerlendirilmesine yardımcı olacak REAG metodunun belirlenmesine katkı sağlandı.

Anahtar Kelimeler: *Meyerozyma guilliermondii*, Pulse Field Jel Elektroforezi, Restriksiyon Enzimi

ABSTRACT

DETERMINATION OF SUITABLE ENZYME FOR PULSE FIELD GEL ELECTROPHORESIS-RESTRICTION ENZYME ANALYSIS OF GENOMIC DNA IN THE *Meyerozyma guilliermondii*

Objective: *Meyerozyma guilliermondii* is a species of yeast that causes serious infections such as bloodstream infection (candidaemia) as an opportunistic human pathogen. In this study, it was aimed to determine the appropriate restriction enzyme for Pulse Field Gel Electrophoresis-Restriction Enzyme Analysis of Genomic DNA (PFGE-REAG) method which can be used in molecular epidemiological analysis of *M. guilliermondii* strains.

Materials and Methods: In this study, epidemiologically related 12 *M. guilliermondii* strains of 9 patients isolated in the Medical Microbiology Laboratory of the Medical School Hospital of the Karadeniz Technical University were included. PFGE-REAG method was studied by using CHEF DR III (BioRad, USA) device system with *SfiI*, *NotI* and *PacI* restriction endonuclease enzymes.

Results: As a result of restriction reaction with *SfiI*, bands that were scattered across the range of molecular size markers and were more clearly distinguishable were observed. *SfiI* and *NotI* band profiles were compared with the karyotyping band profiles; It was concluded that the REAG protocol was more distinctive than the karyotyping.

Conclusion: REAG-*SfiI* can be used to determine the clonal relationship of epidemiologically related *M. guilliermondii* strains. This study contributed to the determination of the REAG method which will help to evaluate the clonal relatedness of epidemiologically related *M. guilliermondii* clinical isolates.

Key Words: *Meyerozyma guilliermondii*, Pulse Field Gel Electrophoresis, Restriction Enzyme

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Candida guilliermondii (*C. guilliermondii*), ilk defa 1912 yılında bronkomikoz hastalarından izole edilmiş bir maya türüdür (Savini ve ark. 2011). Günümüze kadar çok sayıda sinonim ile adlandırılmıştır (De Hoog ve ark. 2000; Kurtzman, 2011). Sıklıkla *C. guilliermondii* (telemorf *Pichia guilliermondii*) sinonimi ile karşımıza çıkmakla birlikte; 2010 yılında Kurtzman ve Suzuki tarafından *Meyerozyma* yeni cinsine dahil edilmesi ile, günümüzde telemorf tür adı olan *M. guilliermondii* sinonimi ile adlandırılmaktadır (Kurtzman, 2010).

Candida guilliermondii, topraktan, bitkilerden, böceklerden ve deniz suyundan sıklıkla izole edilmesinin yanında insan deri ve mukozal yüzey mikroflorasının da bir üyesidir. Bunların yanında fırsatçı insan patojeni olarak, kan dolaşımı enfeksiyonu (fungemi, kandidemi) gibi ciddi enfeksiyonların etkeni olarak bildirilmiştir (Savini ve ark. 2011). Klinik maya izolatları arasında *C. guilliermondii*'nin izolasyon sıklığının yaklaşık %2 olarak bildirilmektedir. *C. guilliermondii*, kandidemilerin de yaklaşık %2'sinden sorumludur (Cheng ve ark. 2004; Peman ve ark. 2008). Ancak İtalya, Brezilya ve Hindistan gibi belli coğrafik alanlarda bu oran sırasıyla %11.7, %43 ve %85.4 olarak bildirilmiştir (Girmenia ve ark. 2006; Medeiros ve ark. 2007; Shah ve Bhatia, 2012). Ülkemizden bildirilen bir çalışmada, on yıllık süreçte *C. guilliermondii*'nin kan kültürlerinden izole edilen maya izolatlarının %20.6'sını oluşturduğu ve yıllık değerlendirmede bu oranın %71.3'lere çıktığı belirtilmiştir (Cebeci Güler, 2014). Yetişkin popülasyonda *C. guilliermondii*'nin neden olduğu hastane kaynaklı salgınlar bildirilmiştir (Masala ve ark. 2003; Medeiros ve ark. 2007). Aynı şekilde pediatrik popülasyonda da salgın ve yalancı salgınlar bildirilmiştir (Yagupsky ve ark. 1991; Shah ve Bhatia, 2012). *C. guilliermondii*, çoklu ilaç direnci gösterebilmesi nedeniyle de önemlidir (Savini ve ark. 210; Diba ve ark. 2012). Fungemiler yüksek mortaliteye sahip enfeksiyonlardır (Beck-Sague ve Jarvis, 1993; Posqualotto ve ark. 2006; Chen ve ark. 2013).

Pulse field jel elektroforezi (PFGE), direk olarak genom DNA'sının elektroforetik ayrılması [kromozomal uzunluk polimorfizmi ya da Elektroforetik Karyotipleme (EK)] veya restriksiyon endonükleazlarla genomun kesilmesi ile elde edilen restriksiyon bant paternlerinin karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Çok iyi

saflaştırılmış genomik DNA 6rneğinin, t6r6n genomunda nadir bulunan restriksiyon b6lgelerini tanıyan restriksiyon endon6kleazlarla kesilmesi ise Pulse Field Gel Elektroforezi-Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi (PFGE-REAG) olarak bilinmektedir. Kesim sonucu oluşan DNA parçaları agaroz jelde b6y6kl6ęe bağlı olarak ayrılmaktadır. Bu elektroforezde jel boyunca elektrik alanının y6n6 periyodik olarak değiştirilmektedir. Ayrılmış DNA fragmentleri band olarak jelde g6zlenir ve belli bir paterni şekillendirir (Sabat ve ark. 2013).

Epidemiyolojik olarak ilişkili *M. guilliermondii* kan k6lt6r6 izolatları kullanılarak, PFGE- REAG için t6re uygun restriksiyon enziminin belirlenmesi ve bu t6re ait suşların klonal yakınlığının ve epidemiyolojik ilişkisinin değerlendirilmesine yardımcı olacak REAG metodunun belirlenmesine katkı sağlamak amaçlanmıştır. Ayrıca EK ve REAG y6ntemleri karşılaştırılarak, epidemiyolojik olarak ilişkili *M. guilliermondii* izolatlarının ayrılmasında ayırım g6c6 y6ksek olan y6ntemin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Meyerozyma guilliermondii*

2.1.1. Taksonomi ve Filogenetik

Candida guilliermondii, ilk defa 1912 yılında Castellani tarafından Sri Lanka'da bronkomikoz hastalarından izole edilmiş ve *Endomyces guilliermondii* olarak tanımlanmıştır (Savini ve ark. 2011).

Wickerham ve Burton (1954)'de, *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii* olarak tanımlanan suşlarda askosporulasyonu keşfetmiş ve askosporik (seksüel) şeklini *Endomycopsis guilliermondii* olarak adlandırmıştır (Wickerham ve Burton, 1954). Wickerham (1966) yılında türün seksüel şeklini *P. guilliermondii* olarak adlandırmıştır (Wickerham, 1966). *P. guilliermondii* günümüzde, önceden asporogenous tür *C. guilliermondii* (Castellani) Langeron and Guerra'ya ait sporogenous suşların bir koleksiyonunu temsil etmektedir (Wickerham ve Burton, 1954; Wickerham, 1966). Kurtzman (1992)'de, *P. guilliermondii* ve anamorfı kabul edilen *C. guilliermondii*'nin aynı türe ait (conspesific) olduğunu bulmuştur (Kurtzman, 1992).

Kurtzman ve Suzuki'nin 2010 yılındaki çalışmaları ile *P. guilliermondii* ve *Pichia caribbica* türleri, yeni *Meyerozyma* cinsine dahil edilmiştir. *Candida carpophila* ve *Candida*'nın bazı diğer türleri *Meyerozyma* klad (clade)'inin üyeleridir (Kurtzman ve Suzuki, 2010).

M. guilliermondii'nin güncel sistematik yerleşimi şu şekildedir:

Alem: Fungi

Şube: Ascomycota

Alt şube: Saccharomycotina

Sınıf: Saccharomycetes

Takım: Saccharomycetales

Aile: Debaryomycetaceae

Cins: *Meyerozyma*

Meyerozyma cinsinin kabul gören türleri *M. 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 *M. guilliermondii* (Wickerham) Kurtzman&M. Suzuki (2010) kabul edilmektedir. Kurtzman ve Suzuki (2010)'nin çalışmalarına göre *C. guilliermondii*'nin yeni atanmış telemorf tür adı *M. guilliermondii*'dir (Kurtzman ve Suzuki, 2010).

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 (Kurtzman ve Suzuki, 2010).

Meyerozyma cinsi *Debaryomyces* cinsi ile filogenetik olarak yakın ilişkilidir (Kurtzman ve Suzuki, 2010; Kurtzman, 2011).

C. guilliermondii ATCC 6260 referans suşunun tüm genomu 2009 yılında sekanslanmıştır. *C. guilliermondii*, 10.6 Mb (GC içeriği: %43.8) büyüklüğünde, 8 kromozomlu ve haploid bir genoma sahiptir (Butler ve ark. 2009).

2.1.2. Fenotipik İdentifikasyon

2.1.2.1. Kültür ve Mikroskopi Özellikleri

C. guilliermondii aerobik bir mayadır. *C.guilliermondii* için standart üreme sıcaklığı 30 °C ve üst sınır 42 °C'dir (Papon ve ark. 2013). *C. guilliermondii*, maya kültürü amacı ile yaygın şekilde kullanılan Sabouraud dekstroz agar (SDA)'da kolayca üreyen bir organizmadır, fakat sabouraud broth yüzeyinde çoğalmaz. Koloniler krem renkli, düzgün yüzeyli-kenarlı ve ıslak görünümlüdür (Savini ve ark. 2011).

Mısır unu-tween 80 agar'da, 25 °C'de 72 saat inkübasyon sonunda küçük blastospor yığınları oluşturmaktadır. Tomurcuklanan hücre yığınının merkezinden dışarıya doğru uzayan çoğunlukla az sayıda, kısa pseudohifa gözlenmektedir. Tüm izolatlarda pseudohifa oluşumu görülmezken hiçbir izolat gerçek hifa oluşturmaz (Vaughan-Martini ve ark. 2005; Medeiros ve ark. 2007; Desnos-Ollivier ve ark. 2008).

M. guilliermondii ve *M. caribbica* farklı şekillere sahip askosporlar oluşturmaktadırlar, fakat iki tür de az sporlandığı için bu kriterle tür ayrımı kesin değildir (Kurtzman, 2011)

Biyogüvenlik düzeyi 1 (BSL-1) organizmadır.

2.1.2.2. Biyokimyasal Özellikler

Meyerozyma cinsine ait türler şekerleri fermente ederler. *M. guilliermondii* ve *M. caribbica* arasında standart fermentasyon ve çoğalma testlerinde farklılık görülmemiştir (Kurtzman, 2011). *M. guilliermondii*'ye ait biyokimyasal reaksiyonlar ve çoğalma özellikleri Tablo 2-1'de gösterilmektedir.

Tablo 2-1: *M. guilliermondii*'ye ait biyokimyasal reaksiyonlar ve üreme özellikleri (De Hoog ve ark.'dan, 2001; Kurtzman'dan, 2011)

Fermantasyon					
Glukoz	+	Sükroz	+	Trehaloz	+
Galaktoz	d	Maltoz	-	Rafinoz	+
Laktoz	-				
Üreme (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-İnositol	-
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
Sakarar	-	Jelatin hidrolizi	-	44 °C'de çoğalma	B

d: değişken, b: bilinmiyor

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 (Winn ve ark. 2006).

Debaryomyces hansenii izolatları %0.01 sikloheksimid'e duyarlı görülürken, *P. guilliermondii* ve *P. caribbica* izolatlarının >%90'ı dirençlidir (Vaughan-Martini ve ark. 2005; Lan ve Xu, 2006; Medeiros ve ark. 2007; Desnos-Ollivier ve ark. 2008).

2.1.3. Moleküler İdentifikasyon

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 net olmadığı durumlarda faydalıdır (Richardson ve Warnock, 2012).

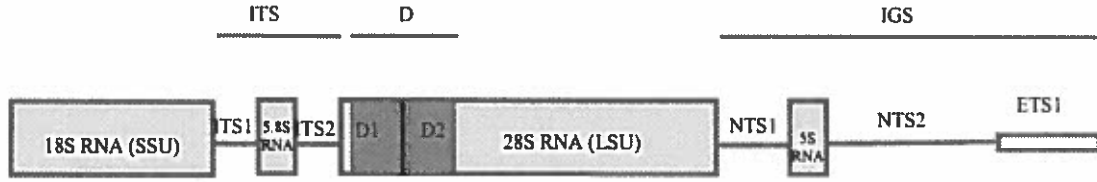
2.1.3.1. Ribosomal RNA Geninin Sekanslanması

Ribozom tüm organizmalarda protein sentezini gerçekleştiren zorunlu hücresel bir organeldir. Korunmuş ribozomal DNA (rDNA) bölgeleri, yakın ilişkili cinsler ve türlerin kendi aralarındaki veya aynı türün izolatları arasındaki akrabalığı belirlemek için yararlı olan hızlı evrimleşen bölgeler içermektedir (Moore ve Frazer, 2002).

Fungal organizmaların kesin identifikasyonu için en sık rDNA gen kompleksi kullanılmaktadır (Bruns ve ark. 1991; Bruns ve ark. 1992). 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 (Liu, 2011).

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.

Meyerozyma (Pichia) guilliermondii rRNA genlerinin fiziksel organizasyonu Şekil 2.1'de gösterilmiştir (Liu, 2011).



Şekil 2.1. *M. guilliermondii* ribozomal RNA genlerinin organizasyonu (Liu, 2011).

ITS bölgeleri 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 ve identifikasyon için oldukça değerli hedeflerdir (Hillis ve Dixon, 1991; Gargas ve DePriest, 1996). Mayalarda 25S rRNA geninin D1 ve D2 değişken bölgeleri sıklıkla hedef olarak kullanılmaktadır (Fell ve ark. 2000). IGS bölgesi, ITS1 ve ITS2 bölgelerine benzemekle birlikte daha fazla genetik değişkenlik içermektedir. Bu durum IGS bölgesini fungal identifikasyon için diğer bir potansiyel hedef yapmaktadır (Vilgalys ve Gonzalez, 1990).

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. Moleküler identifikasyondaki gelişmeler ile bazı türlerin grup veya tür kompleksi olduğu ve birçok gizli tür (cryptic species) varlığı tesbit edilmiştir (Richardson ve Warnock, 2012).

2.1.4. Moleküler Genotiplendirme

Moleküler tiplendirme yöntemleri, suşların klonal ilişkisinin analizinde ve genetik çeşitliliği belirlemede artarak kullanılmaktadır (Clemons ve ark. 1997; Elias ve ark. 1999). Bu amaçlar için farklı moleküler tiplendirme yöntemleri geliştirilmiştir. Tüm genomun RFLP'si (Poikonen ve ark. 2001), PFGE-EK ve tüm genomun *Sfi*I (Kanellopoulou ve ark. 2001), *Sma*I, *Not*I ve *Bss*HII gibi nadir kesen restriksiyon endonükleazlar tarafından kesilmesi ile oluşan DNA fragmentlerinin pulse field jel

elektroforezi (Riederer ve ark. 1998), rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA (RAPD) ile tüm genomun PCR parmak izi analizi (Samaranayake ve ark. 2003), amplifiye fragment uzunluk polimorfizmi (AFLP) (Ball ve ark. 2004), tekrarlayan sekans temelli PCR (rep-PCR) ile tekrarlayan sekansların parmak izi analizi (Redkar ve ark. 1996) ve multi lokus sekans tiplendirme (MLST) ile house-keeping genlerin sekanslanmasını içermektedir (Bougnoux ve ark. 2003). Moleküler tiplendirme yöntemlerinin tekrarlanabilir, ayırıcı, uygulaması kolay, standardizasyona ve kütüphane oluşturmaya uygun olması beklenir (Soll, 2000).

2.1.4.1. 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 ayrılabilmesi fikrini ortaya atmıştır. Bu prensibe dayalı cihazlar geliştirilmiş ve birkaç kilobaz (kb)'dan 10 megabaz (Mb)'a kadar DNA parçalarının ayrılabilmesi 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 (Hacıoğlu Basım ve Basım, 2001).

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 sözkonusu türün genomunda nadir bulunan restriksiyon bölgelerini tanıyan restriksiyon endonükleazlarla kesilmesi ise Pulse Field Jel Elektroforezi-Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi (PFGE-REAG) olarak bilinmektedir. Kesim sonucu oluşan DNA parçaları agaroz jelde büyüklüğe bağlı olarak ayrılır. Bu elektroforezde jel boyunca elektrik alanının yönü periyodik olarak değiştirilir. Ayrılmış DNA fragmentleri band olarak jelde gözlenir ve belli bir paterni şekillendirir (Sabat ve ark. 2013).

Pulse field jel elektroforezi, klinik olarak önemli çeşitli bakteriler için moleküler tiplendirme yöntemleri arasında "altın standart" olarak kabul edilmektedir.

Günümüzde halen 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. Üstelik laboratuvarlar arası karşılaştırma PulseNet veya Harmony gibi çeşitli girişimler tarafından üstlenilmiştir (Sabat ve ark. 2013).

Pulse field jel elektroforezi yönteminin belirgin bir avantajı araştırılan genomun büyük kısmına (>%90) hitap etmesidir. Dolayısıyla genomik DNA içindeki büyük rekombinasyon olayları ve büyük plazmitler (>50 kb) PFGE paterninde değişiklikliğe yol açar. Ancak bu yöntem teknik olarak iddialı, emek yoğun ve zaman alıcıdır. Yaklaşık aynı büyüklükteki bantlar (büyüklükleri %5'den daha az farklı olan DNA parçaları) için yeterli ayırma gücüne sahip olmayabilir. Sonuçların analizi subjektif olma eğilimindedir ve farklı çalışmalara ait verilerin karşılaştırılabilirliği sekans temelli yöntemlerle (Multi Lokus Sekans Tipleme gibi) karşılaştırıldığında sınırlıdır (Sabat ve ark. 2013). Bu protokollerin uygulanması tür veya suş spesifik profillerin elde edilmesine izin vermektedir (Lopez-Ribot ve ark. 2000; Shin ve ark. 2004; Chen ve ark. 2005).

2.1.5 Epidemiyoloji ve Klinik Önem

C. guilliermondii, topraktan, bitkilerden, böceklerden ve deniz suyundan sıklıkla izole edilmesinin yanında insan deri ve mukozal yüzey mikroflorasının bir üyesidir. Bunların yanında fırsatçı insan patojeni olarak, kan dolaşımı enfeksiyonu (fungemi, kandidemi) gibi ciddi enfeksiyonların etkeni olarak da bildirilmiştir (Savini ve ark. 2011).

Candida türleri hastane kaynaklı fungemilerin en sık nedenidir (Beck-Sague ve Jarvis, 1993; Fridkin ve Jarvis 1996). Günümüzde *Candida* türleri hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarının 3. en sık nedeni olarak (Perlroth ve ark. 2007) bu enfeksiyonların %5-9'undan sorumludur (Edmond ve ark. 1999; Wisplinghoff ve ark. 2004; Marra ve ark. 2011). Bir çalışmada tüm hastane kaynaklı kandidal enfeksiyonların %58'ini kan dolaşımı enfeksiyonu, %17'sini steril vücut sıvıları enfeksiyonu ve %16'sını yara enfeksiyonları oluşturmuştur (Pfaller ve ark. 1998).

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* patojen olarak beliren iki tür olarak karşımıza çıkmaktadır (Krcmery ve Barnes, 2002).

Klinik maya izolatları arasında *C. guilliermondii*'nin izolasyon sıklığının yaklaşık %2 olduğu görülmektedir. *C. guilliermondii* kandidemilerin de yaklaşık %2'sinden sorumludur (Cheng ve ark. 2004; Peman ve ark. 2008). Ancak İtalya, Brezilya ve Hindistan gibi belli coğrafik alanlarda bu oran sırasıyla %11.7, %43 ve %85.4 olarak bildirilmiştir (Girmenia ve ark. 2006; Medeiros ve ark. 2007; Shah ve Bhatia, 2012). Ülkemizden bildirilen bir çalışmada bir yılda *C. guilliermondii*'nin kandidemi izolatlarının %16'sını oluşturduğu bildirilmiştir (Çalışkan ve ark. 2013).

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 (Yücel ve Kantarcıoğlu, 2000).

Brezilya'daki bir üniversite hastanesinde *C. guilliermondii* sistemik enfeksiyon bulguları olmaksızın, çoğunlukla pediatri hastaları olmak üzere hastanenin farklı bölümlerindeki hastaların kan örneklerinde, hemşirelerin deri ve tırnakları ile çevresel yüzeylerden izole edilmiştir. İzole edilen 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 (Medeiros ve ark. 2007).

Hindistan'dan bildirilen bir çalışmada, neonatal yoğun bakım ünitesinde 22 haftalık süreçte alınan kan kültürlerinin 41 (%85.4)'inden *C. guilliermondii* izole edilmiştir. Kan kültürlerinde *C. guilliermondii* üreyen hastalarda fungemi belirtileri gözlenmemiş ve bütün hastalar antifungal tedavi almaksızın 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 (Shah ve Bhatia, 2012).

Amerika Birleşik Devletlerinden bildirilen bir çalışmada, 25 hastanın kan ve tırnak örneklerinden oluşan 36 klinik örneğinde *M. guilliermondii* üremiş; klinik bulguları fungemi ile ilişkili olmayan hastaların, mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan anaerobik jar kaynaklı bir yalancı salgına dahil oldukları tespit edilmiştir (Kirby ve ark. 2017).

C. guilliermondii'nin neden olduğu başka hastane kaynaklı salgınlar da bildirilmiştir. İtalya'da iki haftalık 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 (Masala ve ark. 2003).

C. guilliermondii'nin nadiren kutanöz ve subkutanöz enfeksiyonlara (De Hoog ve ark. 2001), dissemine kandidiyazise (Dick ve ark. 1985), dento-alveolar apseye (McManners ve Samaranayake, 1990), aplastik anemili bir hastada perikarditis ilişkili dissemine enfeksiyona (Vazquez ve ark. 1995) ve kristalin keratopatiye neden olduğu bildirilmiştir (Ainbinder ve ark. 1998).

C. guilliermondii'nin etken olduğu osteomyelit vakasında, enfeksiyon flukonazol tedavisine yanıt vermemiş ve parmak ampute edilmiştir. İzolat, flukonazol ve itrakonazol dirençli bulunmuştur (Tietz ve ark. 1999). *C. guilliermondii*,

onikomikoz enfeksiyonlarından en sıklıkla izole edilen maya türlerindedir; onikomikoz etkenlerinin %2.3'ünü oluşturmaktadır (Ghannoum ve Abu-Elteen, 1990).

C. guilliermondii, gingivitis ve periodontitis görülen bağışık yetmezliği olmayan bireylerin subgingival biyofilm örneklerinden en sık izole edilen maya türleri arasında yer almaktadır (Jewtuchowicz ve ark. 2007). Dejeneratif osteoartrit tanısı konan bir hastada travmatik prosedür ve predispozon faktör olmaksızın diz ekleminin primer *C. guilliermondii* enfeksiyonu rapor edilmiştir (Lee ve ark. 2012).

Sistemik fungal enfeksiyonların bağışık yetmezlikli hastalarda sıklıkla ölümcül olduğu bilinmektedir. *C. guilliermondii*'nin mortalitesi %0-45 aralığında bildirilmekle birlikte *C.albicans*'a kıyasla düşük mortaliteli bir etken olarak tanımlanmaktadır (Krcmery ve ark. 1999; Chen ve ark. 2013; Marcos-Zambrano ve ark. 2017; Tseng ve ark. 2018).

2.1.6. Antifungal Duyarlılık

Suşların çoğu pan-azol duyarlılığı göstermektedir. Ancak azollere çapraz direnç bildirilmiştir. Flukonazol ve itrakonazol dirençli bir izolat, flukonazol, itrakonazol ve vorikonazol dirençli bir izolat, vorikonazol ve posakonazol dirençli üç izolat bildirilmiştir. Bu maya türü polyen toleran olarak ifade edilmesine rağmen birçok *C. guilliermondii* suşu amfoterisin B duyarlılığı göstermektedir. *C.guilliermondii*, *C. parapsilosis* ile birlikte ekinokandinlere en az duyarlı maya olarak etiketlenmiştir. Özellikle kaspofungin, anidulafungin ve mikafungin için MİK değerleri *C. guilliermondii* ve *C. parapsilosis* için diğer *Candida* türlerinden 2-100 kat daha yüksek olarak bilinmektedir. Ancak ekinokandinler *C. guilliermondii*'ye karşı nadiren test edilmiştir. *C. guilliermondii*'nin 5-flusitozin duyarlılığı ile ilgili olarak, izolatların çoğunun duyarlı olduğunu belirten az sayıda çalışma bulunmaktadır (Savini ve ark. 2011; Marcos-Zambrano ve ark. 2017; Tseng ve ark. 2018).

2.1.7. Virülans Özellikleri

Mantarlar, konağın hücre zarlarında işlev bozukluğuna sebep olarak dokuda ilerlemelerine yani invazyona yardımcı olan enzimler oluşturmaktadırlar (Schaller ve ark. 2005). *Candida* cinsinin hidrolitik enzimleri arasında en iyi tanımlanmış olan

salgı aspartik proteaz (Sap) enzimidir (Monod ve Borg-von, 2002). Sap enzimi *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* gibi en patojen *Candida* türleri tarafından salgılanmaktadır. Klinikle ilişkili diğer *Candida* türleri, hücre dışı proteaz üretmiyor gibi görünmektedir. Bu durum *Candida* türlerinin virülans sıralamasına yansımaktadır (Schaller ve ark. 2005). *C. guilliermondii*'nin SAP gen ailesine sahip olduğu bilinmesine rağmen (Monod ve ark. 1994) *C. guilliermondii* izolatlarında Sap aktivitesi çalışmaları, az sayıda izolat ile yapılmış birkaç çalışmadan ibarettir. Bu çalışmalar ile türe ait izolatlarda enzim aktivitesi saptanamamış ya da düşük düzeyde saptanmıştır (Dostal ve ark. 2003; Bramono ve ark. 2006).

2.1.8. Biyoteknolojik Uygulamalar

C. guilliermondii, RF üretimi için model organizmadır. Riboflavin (RF, B₂ vitamini) kullanım çeşitliliği ile önemli bir biyoteknolojik üründür (Abbas ve Sibirny, 2011).

C. guilliermondii ksiloz'un ksilitol'e biyolojik dönüşümü için en etkili organizmalardan biridir. Ksilitol özellikle şekerlerde, sakız ve diş macununda tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Zou ve ark. 2010).

C. guilliermondii endüstriyel olarak önemli enzimlerin umut vaat eden üreticisi konumundadır. İnülinaz'ın en aktif üreticileridir (Wang ve ark. 2012). İnülinaz, inülin'i fruktoz şurubuna, sonrasında ise biyoetanol ve inülo-oligosakkaritlere dönüştürülebilmektedir (Vijayaraghavan ve ark. 2009). *C. guilliermondii* amilaz üretmektedir. Belli koşullar altında atıklardan etanol sentezleyebilmektedir (Acourene ve Ammouche, 2012). *C. guilliermondii* ve *S. cerevisiae*'nin protoplast füzyonu ile elde edilen hibrid, ksiloz ve selobiyoz'u etanole fermante edebilir (Wang ve ark. 1992). *C. guilliermondii*'nin bazı doğal izolatları ramnosidaz enziminin zengin bir kaynağıdır. Bu enzim ramnoz üretiminde ve şarap yapımı sırasında üzüm işlemede kullanılmaktadır (Rodriguez ve ark. 2010). *C. guilliermondii* izolatları tarafından nitrilaz (Dias ve ark. 2000) ve fitaz (Hellstrom ve ark. 2010) gibi endüstriyel olarak önemli başka enzimlerin de üretildiği rapor edilmektedir.

C. 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 (Sundh ve Melin, 2011). *C. guilliermondii*'nin besin yarıışı yolu ile patojenik mantarları kontrol ettiği düşünülmektedir (Petersson ve Schnürer, 1995). *C. guilliermondii* bazı bitkilerde (domates ve yenidoğyada) bitki savunma enzimlerinde aktivasyon ile hastalık direncine neden olmaktadır (Liu ve ark. 2010).

Tek karbon ve enerji kaynağı olarak alkan'larda çoğalabilen oldukça nadir bir maya türüdür. Bu nedenle hidrokarbon kirleticilerin parçalanması için kullanılabilir (Zinjarde ve Pant, 2002). Biyoyakıt (Schirmer-Michel ve ark, 2008) ve aroma (Wah ve ark, 2013) üretimi açısından potansiyel kabul edilmektedir.

Çeşitli maya türleri için klinik önem, biyoteknolojik uygulama, biyolojik kontrol potansiyeli, genom sekansı ve moleküler araç bilgilerinin karşılaştırılması Tablo 2-2'de görölmektedir.

Tablo2-2. Çeşitli CTG klad türleri için klinik önem, biyoteknolojik uygulama, biyolojik kontrol potansiyeli, genom sekansı ve moleküler araç bilgileri (Papon ve ark.'dan, 2013)

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 lusitaniae</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>

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. 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 *M. guilliermondii* izolatı arasından seçilen 12 klinik izolat kullanılmıştır.

M. guilliermondii çalışma grubu izolatlarının izolasyon tarihi, örnek tipi ve servis bilgileri Tablo 3-1'de gösterilmektedir.

Tablo 3-1: *M. guilliermondii* çalışma grubu 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

Çalışmaya dahil edilen referans suşların adları ve farklı suş koleksiyonlarındaki kodları Tablo 3-2'de belirtilmiştir.

Tablo 3-2: 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
<i>Pichia guilliermondii</i>	CBS 2030	ATCC 46036	NRRL Y-2075	JCM 1539

3.1.2. Araç ve Gereçler

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na ait; etüv (nüve FN120, Türkiye), sınıf II biyogüvenlik kabini (ESCO Class II BSC Airstream AC2-4E8, Türkiye), -20 °C derin dondurucu (ARÇELİK, Türkiye) ve -80 °C derin dondurucu (Wisd WUF-500, Kore), +4 °C buzdolabı (BEKO, Türkiye), pastör fırını (Wiseven WON-500, Kore), otoklav (ALP CL-32L, Japonya), otomatik pipetler (Gilson, Fransa), çalkalamalı su banyosu (GFL 1083, Almanya), pH metre (Hanna HI 2211, Romanya), manyetik karıştırıcı (Wisd MSH-20A, Kore), vorteks (Wisd VM-10, Kore), orbital karıştırıcı (GFL 3005, Almanya), santrifüj (Sigma 1-14, Almanya), hassas terazi (Shimadzu, AUX220, Japonya), mikrodalga fırın (Samsung ME711K, Malezya), CHEF DR III pulse field jel elektroforezi sistemi (BioRad, ABD), ChemiDoc™ XRS+ with Image lab™ Software (BioRad, ABD), UV transillüminatör (Wisd WUV-1.20, Kore), distile su cihazı (nüve ND12, Türkiye), deiyonize su cihazı (Evoqua, Almanya), bunzen beki 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, pipet ucu (10 µL, 100 µL, 1000 µL), bistüri ucu (no:21), otoklav bandı ve alimünyum folyo sarf malzemeleri kullanıldı.

3.1.3. Kimyasallar

Yeast Extract (Merck, Almanya), Bacteriological peptone (Sigma, Fransa), Glycerol (C₃H₈O₃) (A.D.R Advanced Diagnostic&Research, Türkiye), Bacteriological agar (Sigma, Almanya), Tris (C₄H₁₁NO₃) (Sigma, ABD), Boric acid (H₃BO₃) (Sigma, Almanya), EDTA disodium salt dihydrate (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O) (Sigma, ABD), Hydrochloric acid (HCl) (Sigma, Avusturya), D(+)-Glucose monohydrate (C₆H₁₂O₆.H₂O) (Merck, İspanya), D-Sorbitol (C₆H₁₄O₆) (Merck, ABD), Sodium chloride (NaCl) (Merck, Danimarka), Sodium hydroxide (NaOH) (Merck, Almanya), tri-Sodium citrate dihydrate (C₆H₅Na₃O₇.2H₂O) (Merck, Almanya), Calcium chloride

(CaCl₂.2H₂O) (Merck, Almanya), N-Lauroylsarcosine sodium salt (C₁₅H₂₈NO₃Na) (Sigma, İngiltere), Adenine hemisulfate salt (Sigma, ABD), 2-Mercaptoethanol (C₂H₆OS) (Sigma, Almanya), Pulse Field Certified™ Agarose (Bio-Rad, ABD), Certified™ Megabase Agarose (Bio-Rad, ABD), Etidyum bromür (Sigma, ABD), Lyticase from *Arthrobacter luteus* (Sigma, ABD), Proteinaz K from High Pure PCR Template Preparation Kit (Sigma, ABD), Ribonuclease A from bovine pancreas (Sigma, ABD), *Sfi*I (Thermo scientific, Litvanya), *Pac*I (Biolabs, İngiltere), *Not*I (Promega, ABD), 0.225-2.2 Mb *S. cerevisiae* DNA marker (BioRad, ABD), 50-800 kb Lambda ladders (Biyolabs, İngiltere), LiChrosolv® LC-MS Grade Kromotografi için Su (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.4. Solüsyonlar

3.1.4.1. Pulse Field Jel Elektrofrezisi Solüsyonları

Açıkça belirtilmedikçe, bütün çözeltiler ve besiyerler 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır ve oda sıcaklığında saklanılmıştır.

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. Otoklavlandıktan 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 çözüldü.

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

Litikaz Solüsyonu (0.665 mg/ml): 13.3 mg litikaz (3770 Ünite/mg) 20 ml ajirojen enjeksiyonluk suda çözüldü ve cryoviallere bölünerek -20 °C'de saklandı.

RNaz A (10 mg/ml) Solüsyonu: Toz haldeki 10 mg RNaz, 1 mL ajirojen enjeksiyonluk suda çözüldü ve cryoviallere 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.

Proteinaz K Solüsyonu (100 mg/ml): Toz halindeki 100 mg proteinaz K, 1 mL proteinaz K çözme solüsyonunda çözüldü ve cryoviallere 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 çözüldü. 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 çözüldü. HCl ile pH:8.3'e ayarlandı. Hacim deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı.

0.5X TBE: 150 mL 10X TBE ölçüldü 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 çözüldü.

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

3.2. Yöntem

3.2.1. Pulse Field Jel Elektroforezi Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi Optimizasyonu

Candida guilliermondii CBS 566 ve *Pichia guilliermondii* CBS 2030 referans suşlarının ve klinik 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 gerçekleştirilmiştir (Maringele ve Lydall, 2006).

3.2.1.1. 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.

3.2.1.2. 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, 65 °C su banyosunda bekletildi.

3.2.1.3. Litikaz Solüsyonu Hazırlanması

15 plug için,

- 150 µl SCE çözeltisi
- 150 µl Litikaz
- 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.

3.2.1.4. 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.

3.2.1.5 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.

3.2.1.6. EDTA-Tris-β Merkaptotanol 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. Bir plug bulunan her falkona 0.5 mL EDTA-Tris-β Merkaptotanol (ETB) solüsyonu eklendi. EDTA-Tris-β Merkaptotanol 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.

3.2.1.7. 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

karışımı hazırlandı. Proteinaz solüsyonu kullanmadan hemen önce hazırlandı. Bir 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.

3.2.1.8. Genomik DNA'nın Retriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilmesi

Her plug steril petri içinde steril bistüri ile 4 eşit eşit parçaya bölündü. Her plug'un ¼'lük parçası (2.5 mm) 1.5 mL'lik steril eppendorfa kondu. Her restriksiyon enzimi için Tablo 3-3'de belirtilen reaksiyon karışımı hazırlandı ve plug dilimi bu karışımın içine daldırıldı. Karışım Tablo 3-4'de belirtilen sıcaklıktaki su banyosunda inkübe edildi.

Pulse field jel elektroforezi-genomik DNA'nın restriksiyon enzim kesimi için kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3-3' de gösterilmektedir.

Tablo 3-3: 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>NotI</i>	1 μL (10 U)	2	20	177	200
<i>PacI</i>	1 μL (10 U)	-/2	20	179/177	200
<i>SfiI</i>	2 μL (20 U)	2	20	176	200

Pulse field jel elektroforezi-genomik DNA'nın restriksiyon enzim kesimi için kullanılan enzimlere ait bilgiler Tablo 3-4' de gösterilmektedir.

Tablo 3-4: 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>NorI</i>	GC/GGCCGC CGCCGG/CG	10 U/μl	Buffer D	37	Promega
<i>PacI</i>	TTAAT/TAA AAT/TAATT	10 U/μl	CutSmart Buffer	37	New England Biolabs
<i>SfiI</i>	GGCCNNNN/NGGCC CCGGN/NNNNCCGG	10 U/μl	Buffer G	50	Thermo Scientific

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.

3.2.1.9. Megabaz Agaroz (%1.0) Jel Hazırlanması

Enzim kesim ürünlerini yürütmek için 1 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.

3.2.1.10. 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

Genomik DNA'nın enzim kesim ürünleri için PFGE koşulları:

Başlangıç switch süresi	5 sn
Son switch süresi	20 sn
Elektroforez süresi	24 sa
Açı	120°
Voltaj	4.5V/cm

3.2.1.11. Boyama ve Görüntüleme

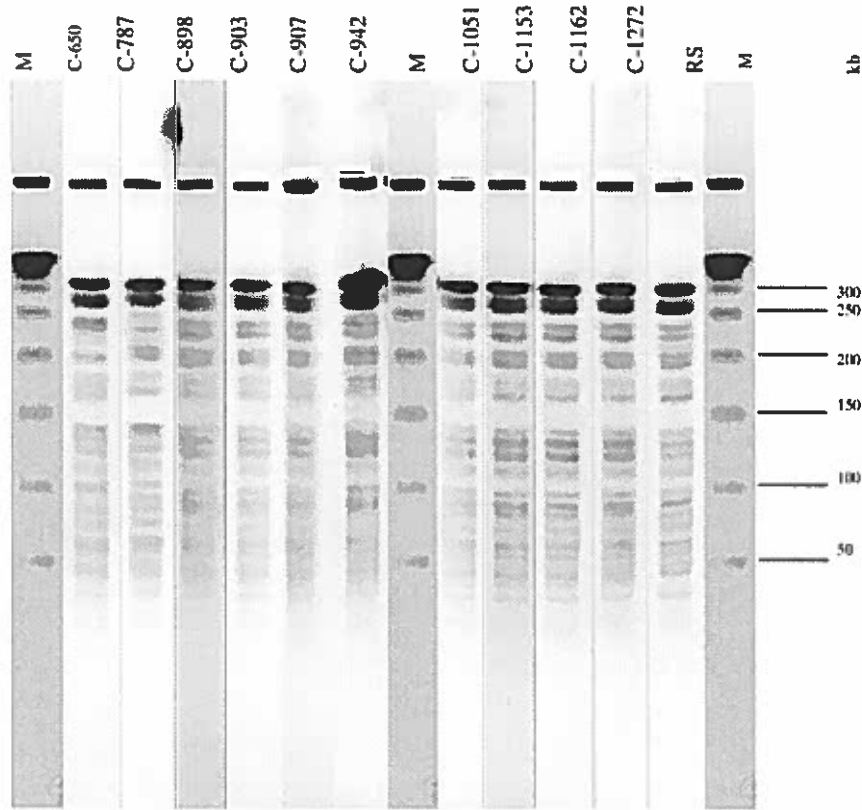
Elektroforez sonrası jel, 0.5 µg/mL son konsantrasyonda EtBr solüsyonu içine yerleştirildi ve 45 rpm çalkalamada 30 dk inkübe edildi. EtBr solüsyonundan alındıktan sonra deiyonize su ile 45 rpm çalkalamada 1 saat süre ile jelden boya uzaklaştırıldı. ChemiDoc™ XRS+ with Image lab™ Software Version 6.0.1 (BioRad, ABD) ile görüntüledi ve SCN dosyası olarak kaydedildi.

4. BULGULAR

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

4.1.1. Genomik DNA'nın *Sfi*I Restriksiyon Enzimi Analizi

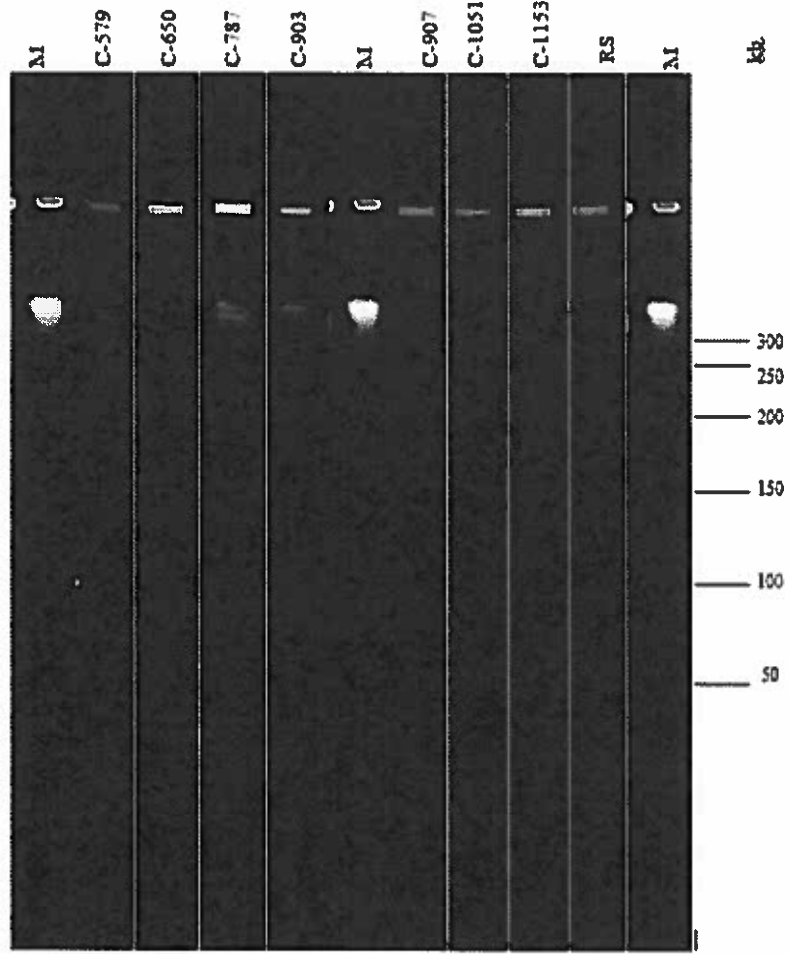
M. guilliermondii çalışma suşlarının *Sfi*I enzimi ile kesilmesi ile oluşan bant profilleri Şekil 4.1'de görülmektedir.



Şekil 4.1. Çalışma suşlarının pulsed field jel elektroforezi-genomik DNA'nın *Sfi*I enzimi ile kesimi sonucu oluşan bant profilleri. (RS. *Meyerozyma guilliermondii* CBS 2030 M. 50-800 kb Lambda ladder DNA büyüklük marker'ı)

4.1.2. Genomik DNA'nın *NotI* Restriksiyon Enzimi Analizi

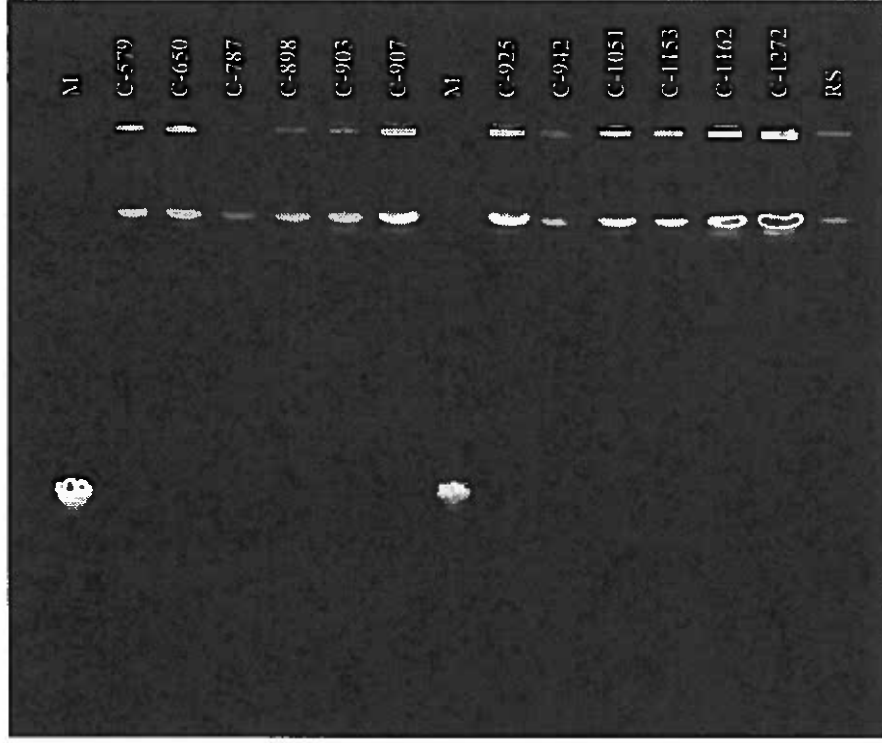
M. guilliermondii çalışma suşlarının *NotI* enzimi ile kesilmesi ile oluşan bant profilleri Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.2: Çalışma suşlarının pulsed field jel elektroforezi-genomik DNA'nın *NotI* enzimi ile kesimi sonucu oluşan bant profilleri. (RS. *Meyerozyma guilliermondii* CBS 2030 M. 50-800 kb Lambda ladder DNA büyüklük marker'ı)

4.1.3. Genomik DNA'nın *PacI* Restriksiyon Enzimi Analizi

M. guilliermondii çalışma suşlarının *PacI* enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen jel görünümü Şekil 4.3'de görülmektedir.



Şekil 4 3. Çalışma suşlarının pulsed field jel elektroforezi-genomik DNA'nın *PacI* enzimi ile kesilmesiyle oluşan jel görünümü (RS. *Meyerozyma guilliermondii* CBS 2030 M. 50-800 kb Lambda ladder DNA büyüklük marker'ı)

5. TARTIŞMA

M. guilliermondii, doğal ortamlardan sıklıkla izole edilmesinin yanında insan deri ve mukozal yüzey mikroflorasında da bulunmaktadır. İnsan fırsatçı patojeni olarak fungemi gibi ciddi enfeksiyonların da etkenidir (Savini ve ark. 2011). *M. guilliermondii*, düşük doğal virülansa sahip bir türdür, ancak insan hastalıklarına neden olabilmesi ve çoklu ilaç direnci gösterebilmesi nedeniyle önemlidir (Pfaller ve ark. 2006; Savini ve ark. 2010; Savini ve ark. 2011; Diba ve ark. 2012; Lee ve ark. 2012). Çoğunlukla kanser hastalarında enfeksiyon oluşturmakla (Krcmery ve ark. 1999; Krcmery ve Barnes, 2002; Girmenia ve ark. 2006) birlikte pediatri hastalarında da kandidemi etkeni olarak dikkat çekmektedir. Sporadik kandidemi vakaları yanında türün neden olduğu hastane kaynaklı salgınlar da bildirilmiştir (Yagupsky ve ark. 1991; Peman ve ark. 2008; Shah ve Bhatia, 2012).

M. guilliermondii'nin klinik maya izolatları arasındaki izolasyon sıklığı yaklaşık %2'dir. Farklı çalışmalarda bu patojenin neden olduğu fungemiler ise bütün kandidemilerin %1-11.7'sinden sorumludur. Bu sonuçlarla *M. guilliermondii*, tüm kandidemilerin küçük bir yüzdesinden sorumlu, nadir patojen olarak tanımlanmıştır (Abi-Said ve ark. 1997; Diba ve ark. 2012). Ancak fungemiler yüksek mortaliteye sahip enfeksiyonlar olmaları ile önemlidirler (Beck-Sague ve Jarvis, 1993; Posqualotto ve ark. 2006; Chen ve ark. 2013).

C. albicans fungemilerden en sık izole edilen fungal patojen olarak bildirilmektedir. *C. albicans*'ı *C. parapsilosis* ve *C. tropicalis* türleri takip etmektedir (Edmond ve ark. 1999; Wisplinghoff ve ark. 2004; Perltroth ve ark. 2007; Marra ve ark. 2011). Cebeci Güler ve ark.larının (2017) çalışmasında *M. guilliermondii*, kandidemilerden 2006-2008 yıllarında en sık izole edilen 4. tür, 2010 yılında en sık izole edilen 3. tür, 2009 ve 2011-2012 yıllarında ise en sık izole edilen tür olmuştur. 2006-2012 yılları arasındaki 7 yıllık süreç değerlendirildiğinde *C. albicans*'ı (%29.2) takiben kandidemilerden 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 (Cebeci Güler, 2014). Cebeci Güler ve ark.larının verileri "salgın"

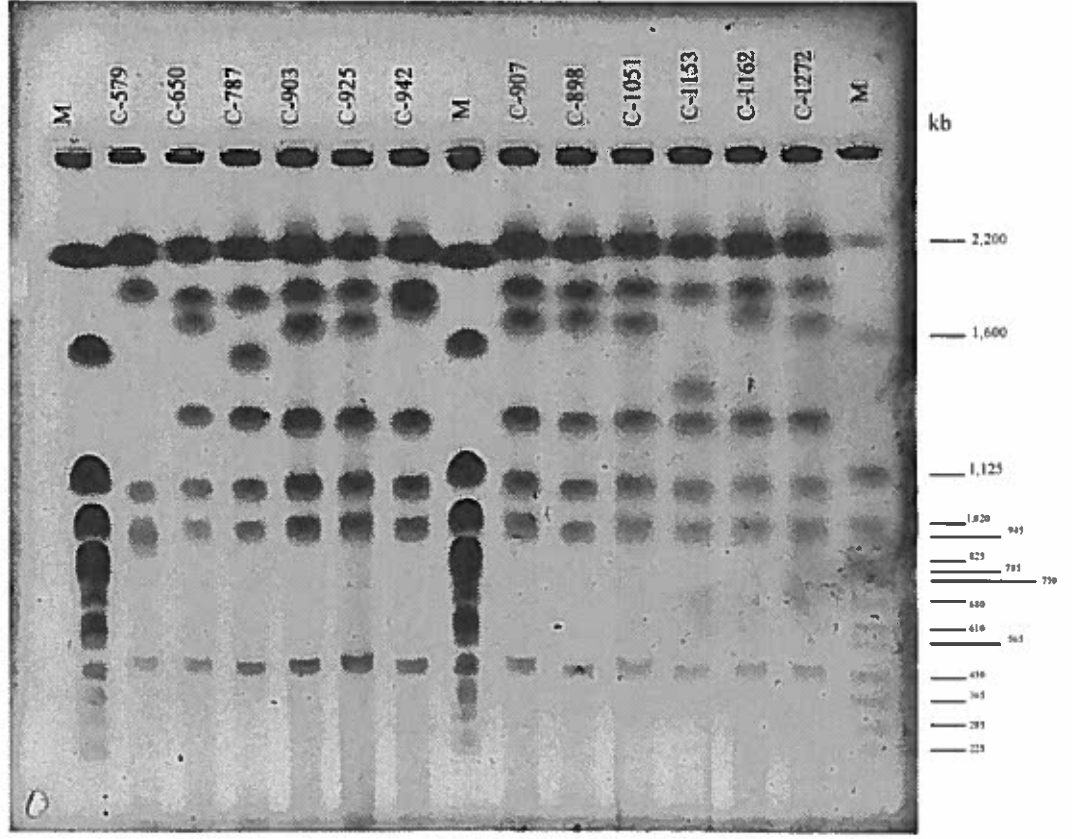
varlığına işaret etmektedir. *M. guilliermondii*'nin fungemilerden en sık izole edilen tür ya da türlerden olması literatür genelinde çok az rastlanan bir durumdur (Medeiros ve ark. 2007; Shah ve Bhatia, 2012).

M. guilliermondii, çok sayıda sinonim (Cebeci Güler, 2014) ile nomenklatürü ve taksonomisi oldukça kafa karıştırıcı bir türdür. Bu mantar türü literatür genelinde sıklıkla *C. guilliermondii* (telemorf *P. guilliermondii*) olarak adlandırılmıştır. Ancak 2010 yılında Kurtzman ve Suzuki'nin çalışmaları ile *Meyerozyma* cinsine dahil edilmiş, telemorf tür adı *M. guilliermondii* olarak değiştirilmiştir. Bu nedenle günümüzde genellikle *M. guilliermondii* olarak ifade edilmektedir (Kurtzman ve Suzuki, 2010). *C. guilliermondii* olarak sınıflandırılan suşlar ve telemorfu *P. guilliermondii*, özellikle *C. fermentati* (telemorf *Pichia caribbica*) ve *C. carpophila* sinonimlerinin dahil olduğu, fenotipik olarak ayrılamayan, genetik olarak heterojen bir kompleks olarak düşünülmektedir (Bai, 1996; San Millan ve ark. 1997). Ayrıca bu tür, *C. famata* (telemorf *Debaryomyces hansenii*) türü ile de mevcut fenotipik identifikasyon metodları ile net olarak ayrılamamaktadır. *M. guilliermondii*'nin taksonomik yerleşiminin ve identifikasyonunun tam sağlanabilmesi için farklı moleküler yöntemler tanımlanmıştır (Vaughan-Martini ve ark. 2005; Desnos-Ollivier ve ark. 2008; Nguyen ve ark. 2009; Romi ve ark. 2014). İnternal transcribed spacer (ITS), D1/D2 ve intergenic spacer (IGS) ribozomal gen bölgelerinin DNA sekansı, 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 çalışılmıştır (Desnos-Ollivier ve ark. 2008; Lockhart ve ark. 2009; Yamamura ve ark. 2009; Savini ve ark. 2010; Cornet ve ark. 2011; Romi ve ark. 2014)

Klinik örneklerden *M. guilliermondii* izolatlarının izolasyonu, biyokimyasal identifikasyonu ve saklanması işlemleri KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hasta Hizmetleri Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Maya kolonilerinin tür düzeyinde identifikasyonu, karbohidrat asimilasyonu temelli ticari identifikasyon kiti, API 20 C AUX (bio - Merieux, Fransa) ile gerçekleştirilmiştir. *M. guilliermondii* olarak identifiye edilen izolatlar %20 gliserollü YEPD saklama besiyerine konularak -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır. Suşların

moleküler identifikasyonu rDNA tüm ITS Gen Bölgesinin Sekanslanması ve rDNA tüm IGS gen bölgesi PCR ürünlerinin *AluI* Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi ile doğrulanmıştı (Cebeci Güler ve ark. 2017).

Cebeci Güler'in doktora tez çalışmasında (2014), PFGE-EK çalışması sonucu Şekil 5.1'de belirtilen jel görünümü elde edildi. Dokuz hastanın 12 izolatında 5 farklı karyotip (A, B, C, D ve E) elde edildi. Klinik izolatların 8 tanesinde (C-650, C-903, C-925, C-907, C-898, C-1051, C-1162, C-1272) aynı karyotip (B) gözlemlendi. Diğer 4 izolatta (C-579, C-787, C-942, C-1153) birbirlerinden ve diğer tüm izolatlardan farklı karyotipler gözlemlendi. C-650, C-903, C-925, C-907, C-898, C-1051, C-1162, C-1272, C-787, C-787, C-1153 nolu izolatlarda 7 kromozom bandı gözlemlenirken C-579 ve C-942 nolu izolatlarda 6 kromozom bandı gözlemlendi. Çalışmada *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 (Cebeci Güler, 2014). Yüksek lisans tez çalışmamızda da, bu suşlar ile EK aşaması gerçekleştirildi ve bu çalışma ile aynı sonuçlar elde edildikten sonra REAG aşamasına geçildi.



Şekil 5.1. *Meyeromyza guilliermondii* izolatlarının PFGE-EK bant profillerinin görünümü M. 0.225-2.2 Mb *Saccharomyces cerevisiae* kromozomal DNA marker (Cebeci Güler, 2014).

Cebeci Güler'in doktora tez çalışmasında (2014), farklı her bant profili bir karyotipi temsil edecek şekilde yorumlanmıştı. Sekiz izolatta 5 farklı karyotipin belirlenmesi ve salgın dönemlerine ait olmayan C-579 ve C-787 nolu izolatların diğer izolatlardan farklı karyotipe sahip olması; karyotiplemenin, *M. guilliermondii* türüne ait epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların klonal ilişkisinin araştırılması için kullanılabileceğini düşündürmüştü. İlginç şekilde, 2007 yılında izole edilen ve salgın dönemlerine ait olmayan C-650 izolatu ise salgın izolatlarıyla aynı karyotipe sahipti (Cebeci Güler, 2014).

Çalışmamızda, *SfiI* ile yapılan kesimlerde 12 çalışma suşunun 10'unda çıplak gözle değerlendirilebilen bant profili elde edildi (Şekil 4.1). *NotI* ile yapılan kesimde ise 12 çalışma suşunun 7'sinde çıplak gözle değerlendirilebilen bant profili elde edildi (Şekil 4.2). *PacI* ile yapılan kesimlerde ise suşların hiçbirinden gözle

değerlendirilebilen bant profili elde edilemedi (Şekil 4.3). *PacI* ile kesim reaksiyonunda, enzim miktarının veya reaksiyon için uygulanan sürenin yetersiz olabileceği düşünüldü. Finansal yetersizliklerden dolayı *PacI* ile kesimler tekrarlanamadı. Çalışma sonuçlarımıza göre, çalışma suşlarımızdan 6'sının (C-650, C-787, C-903, C-907, C-1051 ve C-1153) karyotipleme, *SfiI* ve *NotI* bant profilleri karşılaştırıldı. Suşların 6'sında da, *SfiI* ile kesim reaksiyonu sonucunda, moleküler büyüklük marker'ı aralığına dağılmış ve daha net ayırt edilebilen bantlar izlenmiştir. *SfiI* ve *NotI* bant profilleri, karyotipleme bant profilleriyle karşılaştırıldığında; aynı karyotipe sahip C-650, C-903, C-907 ve C-1051 suşlarında, her iki enzimle de kesim sonucu oluşan bant profilleri incelendiğinde C-650 suşunun diğer üç suştan farklı bant profiline sahip olduğu bulundu (C-650 salgın döneminde izole edilmemişti) ve REAG protokolünün karyotiplemeden daha ayırt edici olduğu sonucuna varıldı. Farklı karyotiplere sahip C-787 ve C-1153 suşlarının REAG-*SfiI* ve REAG-*NotI* bant profilleri de diğer suşlardan farklı bulundu. REAG-*SfiI*, epidemiyolojik olarak ilişkili *M. guilliermondii* suşlarının klonal ilişkisini belirlemede kullanılabilir.

Bai 1996'da referans suşlarla yaptığı çalışmada, karyotipleme ve DNA baz içeriğini kullanarak *C. guilliermondii* suşları arasında *C. fermentati* türünü tanımlamıştır (Bai, 1996). Bai ve ark.'ları 2000'deki çalışmalarında, *C. guilliermondii* kompleks'de yer alan taksonlar arasındaki taksanomik ilişkiyi elektroforetik karyotipleri karşılaştırarak çalışmışlardır (Bai ve ark. 2000). Vaughan Martini ve ark.'ları 2005'deki çalışmalarında karyotiplemeyi *P. guilliermondii* klad'daki yeni türlerin tanımlanmasında DNA sekans karşılaştırmaları ile beraber kullanmışlardır (Vaughan-Martini ve ark. 2005). Literatürde bu türe ait çok az elektroforetik karyotipleme çalışması bulunmaktadır.

Pulse field jel elektroforezi-Genomik DNA'nın restriksiyon enzim analizi için türe uygun restriksiyon enzimini belirlemeye çalışan tek çalışmayı Chou ve ark.'ları (2007), *C. tropicalis* için yapmışlardır. *C. tropicalis* izolatlarının PFGE-REAG 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 dikkate alınarak karar verilmiştir. *C. tropicalis*, *S. cerevisiae* 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 (Chou ve ark. 2007). *BssHII*, maya PFGE çalışmalarında en sık kullanılan restriksiyon enzimidir (Branchini ve ark. 1994; Voss ve ark. 1998; Silva ve ark. 2001; Lin ve ark. 2007)

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 (Dijkshoorn ve ark. 2001). Ayrıca, hedef DNA üzerinde kısmen az sayıda bölgeden kesen ve büyük DNA fragmentleri veren enzimlerin kullanılması önerilmektedir. Çok sayıda küçük fragment (10 kb'dan daha düşük) oluşturan enzimlerin bu amaçla kullanılması mümkün olmamaktadır. Altı bp'dan daha büyük sekansa sahip restriksiyon enzimleri, büyük fragmentler oluşturdukları için potansiyel olarak daha faydalıdır. Ticari olarak mevcut 8 bp tanıma bölgesi olan 9 restriksiyon enzimi bulunmaktadır. Bunlardan *NotI*, *SfiI*, *SrfI*, *AscI*, *PacI* ve *SwaI* GC içeriği yaklaşık %35-55 olan genomlarda nadir kesen enzimler olarak bilinmektedir (Hacıoğlu Basım ve Basım, 2001).

Cebeci Güler'in doktora tez çalışmasında (2014), 6 bp tanıma bölgesi *BsaI*, *BssHII*, *HindIII*, *NaeI*, *NheI*, *SmaI*, *SphI*, *XbaI*; 7 bp tanıma bölgesi *SapI*; 8 bp tanıma bölgesi *NotI*, *PacI* ve *SfiI* restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılmıştı. *C. guilliermondii* %GC içeriği (%43.8, %44.4) (Butler ve ark. 2009; Kurtzman, 2011), *C. tropicalis*'in %GC içeriğinden (%33.1) (Butler ve ark. 2009) 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 (Average Fragment Size Generated By Endonuclease Cleavage) örneklem usulüyle seçilmişti (Cebeci Güler, 2014).

Cebeci Güler'in doktora tez çalışmasında, *SfiI*, *NotI* ve *PacI* restriksiyon ürünleri, moleküler büyüklük marker'ı aralığına dağılmış ve daha net ayırt edilebilen bantlar şeklindeydi. Bu nedenle *NotI*, *PacI*, *SfiI* restriksiyon enzimleri *M. guilliermondii* suşlarının PFGE-REAG için daha uygun enzim adayları olarak değerlendirilmişti. Ancak bu 3 enzim yalnızca referans suşlarda (*C.guilliermondii* CBS 566 ve *P. guilliermondii* CBS 2030) çalışılmıştı (Cebeci Güler, 2014). Bu nedenle çalışmamızda, klinik *M. guilliermondii* suşlarının PFGE-REAG için bu üç enzim kullanıldı. *NotI* ve *PacI* 8 bp tanıma bölgesi enzimlerdir. *NotI* tanıma bölgesi yalnızca GC, *PacI* tanıma bölgesi ise yalnızca AT nükleotidlerini bulundurmaktadır. *SfiI* ise GC yanında 5N (herhangi bir nükleotitten ard arda 5 tane) bulundurmaktadır. 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 varılabilir. Literatür genelinde farklı maya türlerinin PFGE-REAG çalışması için *SfiI* (Dib ve ark. 1996; Pfaller ve ark. 1998; Chen ve ark. 2005; Heo ve ark. 2011; Abdeljelil ve ark. 2012) ve *NotI* enzimlerine rastlanmaktadır (Lee ve ark. 2007). *PacI* ise henüz bu amaçla kullanılmamıştır. *NotI*, *PacI*, *SfiI*, *SrfI*, *AscI*, ve *SwaI* GC içeriği yaklaşık %35-55 olan genomlarda nadir kesen enzimler olarak bilinmektedir (Hacıoğlu Basım ve Basım, 2001). Cebeci Güler'in doktora tez çalışması (2014) sonuçları da bunu destekler niteliktedir. Çalışmamızda bütçe kısıtlılıkları nedeniyle, Cebeci Güler'in doktora tez çalışması (2014) sonuçları dikkate alınarak yukarıdaki 6 enzimden *NotI*, *PacI* ve *SfiI* çalışılmıştır.

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 analizi ile çalışmışlardır. Çalışma bu yöntemlerin epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlarda ayırım gücünü belirlemek için uygulanmıştır. Bu tiplendirme yöntemlerinden hiçbirinin ve kombinasyonlarının *C. guilliermondii* referans suşları arasında ayırım sağlayamadığı ifade edilmiştir. Bu çalışma ile 4 *C. guilliermondii* referans suşunda tek bant farklılığı içeren yalnızca 2 farklı bant paterni belirlenmiştir (Voss ve ark. 1998). Çalışmada kromozom sayısı belirtilmemesi, 7 tür için aynı enzim ve elektroforez koşullarının kullanılması, üstelik hiç jel görüntüsü verilmemesi çalışma sonuçlarına temkinli yaklaşmayı gerektirmektedir.

Chen ve ark.'ları (2005), 53 *C. albicans* klinik izolatınının genetik ilişkisini değerlendirmek için PFGE-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 (Chen ve ark. 2005). Heo ve ark.'ları (2011), klinik 50 *C. albicans* izolatının genetik ilişkisini PFGE-EK ve *Bss*HII (REAG-B) ve *Sfi*I (REAG-S) ile çalışmışlardır. Bu yöntemler arasında REAG-B, ayırım gücü en yüksek yöntem olarak belirlenmiştir (Heo ve ark. 2011). Abdeljelil ve ark.'ları (2012), neonatal yoğun bakım biriminde kandidiyazis salgınının araştırırken, 6 hastanın 18 *C. albicans* izolatını ve aynı üniteye çalışan onikomikozisli 2 sağlık çalışanından izole edilen birer izolatı, PFGE-EK ve REAG-S (*Sfi*I) ile genotiplendirmişlerdir. PFGE-*Sfi*I, epidemiyolojik olarak ilişkili izolatların ayırımında daha etkili bulunmuştur (Abdeljelil ve ark. 2012). Bu çalışmaların sonucu, maya türlerinin klonal ilişkisinin belirlenmesinde, EK yanında REAG'ın çalışılmasının önemine işaret etmektedir.

Abdeljelil ve ark.'ları (2011), 89 *C. albicans* klinik ve sürveyans izolatının moleküler tiplendirmesini EK ve RAPD analizi ile gerçekleştirmişlerdir. EK'nin düşük ayırım gücüne sahip olduğu bildirilmiştir (Abdeljelil ve ark. 2011). EK, bu çalışmada tiplendirme sonuçlarına katkı sağlamak için tamamlayıcı teknik olarak kullanılmıştır. Çünkü *C. albicans* suşlarında ayırımı iyileştirmek ve doğru sonuçlar elde etmek için en az iki farklı moleküler tekniğin birlikte kullanılması tavsiye edilmektedir (Pfaller, 1995). Çalışmamız, epidemiyolojik olarak ilişkili *M. guilliermondii* klinik suşlarının klonal ilişkisini, hem EK ve hem de REAG yöntemleri ile çalışması ile önemlidir.

Jank ve ark.'ları (2005) çalışmalarında, cerrahi yoğun bakım birimindeki *C. tropicalis* kandidiüri salgınını PFGE-*Bss*HII ile araştırmışlar; 19 hastanın 22 *C. tropicalis* izolatı ile 6 çevresel izolat aynı PFGE-REAG paternine sahip bulunmuştur. Epidemiyolojik olarak ilişkisiz 22 izolatta ise farklı bant paternleri belirlenmiştir. REAG-*Bss*HII yönteminin *C. tropicalis* suşlarını ayırmada faydalı olduğu ifade edilmiştir (Jang ve ark. 2005). Ancak çalışmada *S. cerevisiae* kromozomal DNA'sı moleküler ağırlık marker'ı olarak kullanılmış ve jel görüntüleri gözle

değerlendirilmiştir. Üstelik Chou ve ark.'ları (2007), *C. tropicalis*'in PFGE-REAG için uygun restriksiyon enzimini belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarında, *BssHII* enzimini de faydalı bildirmekle birlikte; *NaeI* en çok PFGE tipi ile en yüksek ayırım gücüne sahip enzim olarak belirlenmiştir (Chou ve ark. 2007). Dolayısıyla literatürde aynı tür için farklı restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı görülmekte; bu durum PFGE-REAG sonuçlarının karşılaştırılabilir olmasına engel olmaktadır. Bu nedenle PFGE protokollerinde türe özgü uygun restriksiyon enzimini belirlemeye yönelik çalışmalar, standardizasyona katkı sağlaması açısından önem taşımaktadır.

Dib ve ark.'ları (1996), 18 *C. rugosa* izolatında tiplendirme sistemi olarak PFGE EK ve PFGE-*SfiI* kullanmışlardır. Salgın izolatı olmayan izolatlarda farklı karyotip paternleri görülmüştür. Salgın izolatlarının RFLP-*SfiI* uygulaması, EK ile aynı sonucu verirken; salgın izolatı olmayanlarda EK, PFGE-REAG paterni ile ayrılamayan bazı izolatları ayırmıştır. PFGE-EK, *C. rugosa* suşları arasındaki ayrımı sağlamak için en yararlı moleküler tiplendirme yöntemi olarak belirtilmiştir (Dib ve ark. 1996). EK ve REAG yöntemlerinin ayırım gücüne dair, literatür genelinde zıt sonuçlar bildirilmiştir. Üstelik bu çalışma ile uygun moleküler tiplendirme yönteminin çalışılan suşların profiline göre de (epidemiolojik olarak ilişkili veya ilişkisiz) değişebildiği ifade edilmiştir.

Kirby ve ark.'ları (2017), yalancı bir salgına ait olan hasta ve çevre izolatlarına 3 restriksiyon enzimini aynı çalışma içinde kullanarak pulse field jel elektroforezi uygulamışlar ve hasta izolatları ile anaerobik jar izolatlarında aynı bant paternini gözlemişlerdir. Ancak, kliniği gerçek enfeksiyon ile uyumlu olan bir hastanın *BssHII*, *NotI* ve *SfiI* ile kesilmiş kan kültürü izolatında, yalancı salgın izolatları ile karşılaştırıldığında en az bir bant farklılığı gösteren farklı bir bant paterni gözlemişlerdir (Kirby ve ark. 2017). Çalışmada, bu 3 enzimin aynı izolatta oluşturdukları bant paterni farklılıkları "en az bir bant farklılığı" şeklinde ifade edilmiş; ayırt edicilikleri karşılaştırılmamıştır.

Literatür çalışmaları gözden geçirildiğinde, PFGE-EK yönteminin tür ayrımı amacıyla taksonomide hem de suşlar arasındaki klonal ilişkiyi çalışmak amacıyla moleküler epidemiyolojide kullanıldığı görülmektedir. 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 (Cendejas-Bueno ve ark. 2010) düşünüldüğünden funguslarda "salgın" kavramına az rastlanmasından ve bu yöntemin uygulama zorluğundan kaynaklanıyor olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

REAG-*SfiI*, epidemiyolojik olarak ilişkili *M. guilliermondii* suşlarının klonal ilişkisini belirlemede kullanılabilecek bir Pulse Field Jel Elektroforezi (PFGE) yöntemidir. Bu çalışmayla, epidemiyolojik olarak ilişkili *M. guilliermondii* klinik izolatlarının klonal ilişkisinin değerlendirilmesine yardımcı olacak REAG metodu için uygun enzimin belirlenmesine katkı sağlanmıştır. Ayrıca Elektroforetik Karyotipleme (EK) ve Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzim Analizi (REAG) yöntemlerinin klonal ayırım gücü karşılaştırılmış ve REAG metodunun ayırım gücünün daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

PacI ile yapılan kesimlerde ise suşların hiçbirinden gözle değerlendirilebilen bant profili elde edilemedi. *PacI* ile kesim reaksiyonunda, enzim miktarı ve/veya reaksiyon süresi artırılarak çalışmanın tekrarlanması önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

Abbas, C.A. ve Sibirny, A.A. (2011). Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **75**(2), 321-360.

Abdeljelil, J.B., Saghrouni, F., Emira, N., Valentin-Gomez, E., Chatti, N., Boukadida, J., Said, M.B., 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.

Abdeljelil, J.B., Saghrouni, F., Khammari, I., Gheith, S., Fathallah, A., Said, M.B., 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.

Abi-Said, D., Anaissie, E., Uzun, O., Raad, I., Pinzcowski, H., Vartivarian, S. (1997). The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida spp.* *Clinical Infectious Diseases*, **24**(6), 1122-1128.

Acourene, S. ve 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**(5), 759-766.

Ainbinder, D.J., Parmley, V.C., Mader, T.H., Nelson, M.L. (1998). Infectious crystalline keratopathy caused by *Candida guilliermondii*. *American Journal of Ophthalmology*, **125**(5), 723-725.

(Average Fragment Size Generated By Endonuclease Cleavage) (İnternette), <https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/average-fragment-size-generated-by-endonuclease-cleavage>. (Erişim Tarihi 05.03.2019).

Bai, F.Y. (1996). Separation of *Candida fermentati* com. nov. from *Candida guilliermondii* by DNA base composition and electrophoretic karyotyping. *Systematic and Applied Microbiology*, **19**(2), 178-181.

Bai, F.Y., Liang, H.Y., Jia, J.H. (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.

Ball, L.M., Bes, M.A., Theelen, B., Boekhout, T., Egeler, R.M., Kuijper, E.J. (2004). Significance of amplified fragment length polymorphism in identification and epidemiological examination of *Candida spp* colonization in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**(4), 1673-1679.

Beck-Sague, C.M. ve Jarvis, W.R. (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**(5), 1247-1251.

Bougnoux, M.E., Tavanti, A., Bouchier, C., Gow, N.A., Magnier, A., Davidson, A.D., Maiden, M.C., D'Enfert, C., Odds, F.C. (2003). Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**(11), 5265-5266.

Bramono, K., Yamazaki, M., Tsuboi, R., Ogawa, H. (2006). Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida spp.* *Japanese Journal of Infectious Diseases*, **59**(2), 73-76.

Branchini, M.L., Pfaller, M.A., Rhine-Chalberg, J., Frempong, T., Isenberg, H.D. (1994). Genotypic variation and slime production among blood and catheter isolates of *Candida parapsilosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**(2), 452-456.

Bruns, T.D., White, T.J., Taylor, J.W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annual Review Ecology Systematics*, **22**, 525-564.

Bruns, T.D., Vilgalys, R., Barns, S.M., Gonzalez, D., Hibbett, D.S., Lane, D.J., Simon, L., Stickel, S., Szaro, T.M., Weisburg, W.G., Sogin, M.L. (1992). Evolutionary relationships within the fungi: Analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **1**(3), 231-241.

Butler, G. Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA, Rheinbay E, Grabherr M, Forche A, Reedy JL, Agrafioti I, Arnaud MB, Bates S, Brown AJ, Brunke S, Costanzo MC, Fitzpatrick DA, de Groot PW, Harris D, Hoyer LL, Hube B, Klis FM, Kodira C, Lennard N, Logue ME, Martin R, Neiman AM, Nikolaou E, Quail MA, Quinn J, Santos MC, Schmitzberger FF, Sherlock G, Shah P, Silverstein KA, Skrzypek MS, Soll D, Staggs R, Stansfield I, Stumpf MP, Sudbery PE, Srikantha T, Zeng Q, Berman J, Berriman M, Heitman J, Gow NA, Lorenz MC, Birren BW, Kellis M, Cuomo CA. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, **459**(7247), 657-662.

Cebeci Güler, N., (2014). *Kan kültürlerinden izole edilmiş Candida guilliermondii* suşlarının genotipik ve virülans özelliklerinin araştırılması. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Trabzon.

Cebeci Güler, N., Tosun, I., Aydın, F. (2017). The identification of *Meyerozyma guilliermondii* from blood cultures and surveillance samples in a university hospital in Northeast Turkey: A ten-year survey. *J Mycol Med*, **27**(4), 506-513.

Cendejas-Bueno, E., Gomez-Lopez, A., Mellado, E., Rodriguez-Tudela, J.L., 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.

Chen, K.W., Lin, Y.H., 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), 249-258.

Chen, C.Y., Huang, S.Y., Tang, J.L., Tsay, W., Yao, M., Ko, B.S., Chou, W.C., Tien, H.F., Hsueh, P.R. (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**(11), 2632-2635.

Cheng, M.F., Yu, K.W., Tang, R.B., Fan, Y.H., Yang, Y.L., Hsieh, K.S., Ho, M., Lo, H.J. (2004). Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia from 1996 to 1999. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **48**(1), 33-37.

Chou, H.H., Chiou, C.S., Chen, K.W., Li, S.Y. (2007). Suitable restriction enzymes for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Candida tropicalis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **57**(4), 451-454.

Clemons, K.V., Feroze, F., Holmberg, K., Stevens, D.A. (1997). Comparative analysis of genetic variability among *Candida albicans* isolates from different geographic locales by three genotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**(6), 1332-1336.

Cornet, M., Sendid, B., Fradin, C., Gaillardin, C., Poulain, D., Nguyen, H.V. (2011). Molecular identification of closely related *Candida spp.* using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. *The Journal of Molecular Diagnostics*, **13**(1), 12-21.

Çalışkan, E., Dede, A., Biten Güven, G. (2013). Kan kültürlerinde saptanan *Candida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *ANKEM Dergisi*, **27**(1), 25-30.

De Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J., Figueras, M.J. (2001). Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain, 2000. *Int. Microbiol*, **4**, 51-52.

Desnos-Ollivier, M., Ragon, M., Robert, V., Raoux, D., Gantier, J.C., 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.

Dias, J.C., Rezende, R.P., Rosa, C.A., Lachance, M.A., Linardi, V.R. (2000). Enzymatic degradation of nitriles by a *Candida guilliermondii* UFMG-Y65. *Canadian Journal of Microbiology*, **46**(6), 525-531.

Dib, J.C., Dube, M., Kelly, C., Rinaldi, M.G., Patterson, J.E. (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.

Diba, K., Namaki, A., Ayatollahi, H., Hanifian, H. (2012). Rapid identification of drug resistant *Candida* species causing recurrent vulvovaginal candidiasis. *Medical Mycology Journal*, **53(3)**, 193-198.

Dick, J.D., Rosengard, B.R., Merz, W.G., Stuart, R.K., Hutchins, G.M., Saral, R. (1985). Fatal disseminated candidiasis due to amphotericin B-resistant *Candida guilliermondii*. *Annals of Internal Medicine*, **102**, 67-68.

Dijkshoorn, L., Towner, K.J., Struelens, M. (2001). *New approaches for the generation and analysis of microbial typing data*. First edition. Elsevier Science.

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.

Edmond, M.B., Wallace, S.E., McClish, D.K., Pfaller, M.A., Jones, R.N., Wenzel, R.P. (1999). Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clinical Infectious Diseases*, **29(2)**, 239-244.

Elias Costa, M.R., Carnovale, S., Relloso, M.S. (1999). Oropharyngeal candidosis in AIDS patients: an epidemiological study using restriction analysis of *Candida albicans* total genomic DNA. *Mycoses*, **42**, 41-46.

Fell, J.W., 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(3)**, 1351-1371.

Fridkin, S.K. ve Jarvis, W.R. (1996). Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, **9(4)**, 499-511.

Gargas, A. ve DePriest, P.T. (1996). A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing SSU rDNA. *Mycologia*, **88(5)**, 745-748.

Ghannoum, M.A. ve Abu-Elteen, K.H. (1990). Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses*, **33(6)**, 265-282.

Girmeria, 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.

Hacıoğlu Basım, E. ve Basım, H. (2001). Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) technique and its use in molecular biology. *Turkish Journal of Biology*, **25**, 405-418.

Hellstrom, A.M., Vazques-Juarez, R., Svanberg, U., Andlid, T.A. (2010). Biodiversity and phytase capacity of yeasts isolated from *Tanzanian togwa*. *International Journal of Food Microbiology*, **136(3)**, 352-358.

Heo, S.M., Robert, S., Sung, R.S., Scannapieco, F.A., Haase, E.M. (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.

Hillis, D.M. ve Dixon, M.T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, **66(4)**, 411-453.

Jang, S.J., Han, H.L., Lee, S.H., Ryu, S.Y., Chaulagain, B.P., Moon, Y.L., Kim, D.H., Jeong, O.Y., Shin, J.H., Moon, D.S., Park, Y.J. (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(5)**, 263-267.

Jewtuchowicz, V.M., Brusca, M.I., Mujica, M.T., Gliosca, L.A., Finkelievich, J.L., Lovannitti, C.A., Rosa, A.C. (2007). Subgingival distribution of yeast and their antifungal susceptibility in immunocompetent subjects with and without dental devices. *Acta Odontologica Latinoamericana*, **20(1)**, 17-22.

Kanellopoulou, M., Stamos, G., Petinnelli, I., Savala, M., Tzimogianni, A., Legakis, N.J., 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(2)**, 179-183.

Kirby, J.E., Branch-Elliman, W., LaSalvia, M.T., Longhi, L., MacKechnie, M., Urman, G., Baldini, L.M., Muriel, F.R., Sullivan, B., Yassa, D.S., Gold, H.S., Wagner, T.K., Diekema, D.J., Wright, S.B. (2017). Investigation of a *Candida guilliermondii* pseudo-outbreak reveals a novel source of laboratory contamination. *J Clin Microbiol*, **55(4)**, 1080–1089.

Krcmery, V., Grausova, S., Mraz, M., Pichnova, E., Jurga, L. (1999). *Candida guilliermondii* fungemia in cancer patients: Report of three cases. *Japan Society of Chemotherapy*, **5**, 58-59.

Krcmery, V. ve Barnes, A.J. (2002). Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection*, **50(4)**, 243-260.

Kurtzman, C.P. (1992). DNA relatedness among phylogenetically similar species of *Pichia*. *Mycologia*, **84(1)**, 72-76.

Kurtzman, C.P. ve Suzuki, M. (2010). Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Milleromyza*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*, *Mycoscience*, **51(1)**, 2-14.

- Kurtzman, C.P. (2011). *The yeasts: A taxonomic study*. 5th ed. Elsevier.
- Lan, L. ve Xu, J. (2006). Multiple gene genealogical analyses suggest divergence and recent clonal dispersal in the opportunistic human pathogen *Candida guilliermondii*. *Microbiology*, **152**, 1539-1549.
- Lee, J.S., Shin, J.H., Kim, M.N., Jung, S.I., Park, K.H., Cho, D., Kee, S.J., Shin, M.G., Suh, S.P., Ryang, D.W. (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.
- Lee, G.W., Kim, T.H., Son, J.H. (2012). Primary *Candida guilliermondii* infection of the knee in a patient without predisposing factors. *Case Reports in Medicine*, **2012**, 375682.
- Lin, C.Y., Chen, Y.C., Lo, H.J., Chen, K.W., Li, S.Y. (2007). Assessment of *Candida glabrata* strain relatedness by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**(8), 2452-2459.
- Liu, F.J., Tu, K., Shao, X.F., Zhao, Y., Tu, S.C., Su, J., Hou, Y.P., Zou, X.R. (2010). Effect of hot air treatment in combination with *Pichia guilliermondii* on postharvest anthracnose rot of loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **58**(1), 65-71.
- Liu, D. (2011). *Molecular detection of human fungal pathogens*. CRC Press Taylor & Francis Group.
- Lockhart, S.R., Messer, S.A., Pfaller, M.A., Diekema, D.J. (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.
- Lopez-Ribot, J.L., Kaufman-McAtee, R., Kirkpatrick, W.R., 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 Micologia*, **17**(2), 49-54.
- Marcos-Zambrano, L.J., Puig-Asensio, M., Pérez-García, F., Escribano, P., Sánchez-Carrillo, C., Zaragoza, O., Padilla, B., Cuenca-Estrella, M., Almirante, B., Martín-Gómez, M.T., Muñoz, P., Bouza, E., Guinea, J. (2017). *Candida guilliermondii* complex is characterized by high antifungal resistance but low mortality in 22 cases of candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*, **61**(7).
- Maringele, L. ve Lydall, D. (2006). *Methods in molecular biology-Yeast protocol methods in cell and molecular biology*. 2nd ed. Totawa-NJ: Humana Press Inc.
- Marra, A.R., Camargo, L.F.A., Pignatari, A.C.C., Sukiennik, T., Behar, P.R.P., Medeiros, E.A.S., Ribeiro, J., Girao, E., Correa, L., Guerra, C., Brites, C., Pereira,

C.A.P., Carneiro, I., Reis, M., de Souza, M.A., Tranches, i R., Barata, C.U., Edmond, M.B., 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.

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.

McManners, J. ve Samaranayake, L.P. (1990). Suppurative oral candidosis: Review of the literature and report of a case. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **19(5)**, 257-259.

Medeiros, E.A.S., Lott, T.J., Colombo, A.L., Godoy, P., Coutinho, A.P., Braga, M.S., Nucci, M., Brandt, M.E. (2007). Evidence for a pseudo-outbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in a university hospital in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, **45(3)**, 942-947.

Monod, M., Togni, G., Hube, B., Sanglard, D. (1994). Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Molecular Microbiology*, **13(2)**, 357-368.

Monod, M. ve Borg-von, Z.M. (2002). Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. *Biological Chemistry*, **383(7-8)**, 1087-1093.

Moore, D. ve Frazer, L.N. (2002). *Essential Fungal Genetics*. Secaucus, NJ: Springer.

Nguyen, H.V., 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(4)**, 641-662.

Papon, N., Savini, V., Lanoue, A., Simkin, A.J., Creche, J., Giglioli-Guivarc'h, N., Clastre, M., Courdavault, V., Sibirny, A.A. (2013). *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. *Current Genetics*, **59(3)**, 73-90.

Peman, J., Bosch, M., Canton, E., Viudes, A., Jarque, I., Gomez-Garcia, M., Garcia-Martinez, J.M., 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(1)**, 109-112.

Perloth, J., Choi, B., Spellberg, B. (2007). Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology*, **45(4)**, 321-346.

Petersson, S. ve 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**(3), 1027-1032.

Pfaller, M.A. (1995). Epidemiology of fungal infections: the promise of molecular typing. *Clinical Infectious Disease*, **20**(6), 1535-1539.

Pfaller, M.A., Messer, S.A., Houston, A., Rangel-Frausto, M.S., Wiblin, T., Blumberg, H.M., Edwards, J.E., Jarvis, W., Martin, M.A., Neu, H.C., Saiman, L., Patterson, J.E., Dibb, J.C., Roldan, C.M., Rinaldi, M.G., Wenzel, R.P. (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**(1), 289-296.

Pfaller, M.A., Diekema, D.J., Mendez, M., Kibbler, C., Erzsebet, P., Chang, S.C., Gibbs, D.L., Newell, V.A., 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.

Poikonen, E., Vuopio-Varkila, J., Kaukoranta-Tolvanen, S.S., 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**(2), 140-144.

Posqualotto, A.C., Antunes, A.G.V., Seveo, L.C. (2006). *Candida guilliermondii* as the aetiology of candidosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, **48**(3), 123-127.

Redkar, R.J., Dube, M.P., McCleskey, F.K., Rinaldi, M.G., Del Vecchio, V.G. (1996). DNA fingerprinting of *Candida rugosa* via repetitive sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**(7), 1677-1681.

Richardson, M.D. ve Warnock, D.W. (2012). *Fungal infection: Diagnosis and management*. 4th ed. Somerset, NJ: Wiley-Blackwell.

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**(9-10), 397-402.

Rodriguez, M.E., Lopes, C.A., Valles, S., Caballero, A.C. (2010). Characterization of alpha-rhamnosidase activity from a Patagonian *Pichia guilliermondii* wine strain. *Journal of Applied Microbiology*, **109**(6), 2206-2213.

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.

Sabat, A.J., Budimir, A., Nashev, D., Sa-Leao, R., van Dijl, J.M., Laurent, F., Grundmann, H., Friedrich, A.W., 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.

Samaranayake, Y.H., Samaranayake, L.P., Dassanayake, R.S., Yau, J.Y., Tsang, W.K., Cheung, B.P., Yeung, K.W. (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.

San Millan, R.M., Wu, L.C., Salkin, I.F., Lehmann, P.F. (1997). Clinical isolates of *Candida guilliermondii* include *Candida fermentati*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47(2)**, 385-393.

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.

Savini, V., Catavittello, C., Onofrillo, D., Masciarelli, G., Astolfi, D., Balbinot, A., Febbo, F., D'Amario, C., 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.

Schaller, M., Borelli, C., Korting, C.H., Hube, B. (2005). Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*, **48(6)**, 365-377.

Schirmer-Michel, A.C., Flores, S.H., Hertz, P.F., Matos, G.S., Ayub, M.A. (2008). Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. *Bioresource Technology*, **99(8)**, 2898-2904.

Shah, P. ve Bhatia, P. (2012). Pseudooutbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in neonatal intensive care unit. *International Journal of Scientific Research*, **1(5)**, 112-113.

Shin, J.H., Park, M.R., Song, J.W., Shin, D., Jung, S.I., Cho, D., Kee, S.J., Shin, M.G., Suh, S.P., Ryang, D.W. (2004). Microevolution of *Candia albicans* strain during catheter-related candidemia. *Journal of Clinical Microbiology*, **42(9)**, 4025-4031.

Silva, C.L.P., Santos, R.M.R., Parasitarias, D.D.I., Colombo, A.L. (2001). Cluster of *Candida parapsilosis* primary bloodstream infection in a neonatal intensive care unit the Brazilian. *Journal of Infectious Diseases*, **5(1)**, 32-36.

Soll, D.R. (2000). The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clinical Microbiology Reviews*, **13(2)**, 332-370.

Sundh, I. ve Melin, P. (2011). Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **99**(1), 113-119.

Tietz, H.J., Czaika, V., Sterry, W. (1999). Case report. Osteomyelitis caused by high resistant *Candida guilliermondii*. *Mycoses*, **42**(9-10), 577-580.

Tseng, T.Y., Chen, T.C., Ho, C.M., Lin, P.C., Chou, C.H., Tsai, C.T., Wang, J.H., Chi, C.Y., Ho, M.W. (2018). Clinical features, antifungal susceptibility, and outcome of *Candida guilliermondii* fungemia: An experience in a tertiary hospital in mid-Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, **51**(4), 552-558.

Vaughan-Martini, A., Kurtzman, C.P., Meyer, S.A., O'Neill, E.B. (2005). Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascospore state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* comb. nov. *FEMS Yeast Research*, **5**(4-5), 463-469.

Vazquez, J.A., Lundstrom, T., Dembry, L., Chandrasekar, P., Boikov, D., Parri, M.B., Zervos, M.J. (1995). Invasive *Candida guilliermondii* infection: in vitro susceptibility studies and molecular analysis. *Bone Marrow Transplant*, **16**(6), 849-853.

Vijayaraghavan, K., Yamini, D., Ambika, V., Sowdamini, N.S. (2009). Trends in inulinase production-a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, **29**(1), 67-77.

Vilgalys, R. ve Gonzalez, D. (1990). Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. *Current Genetics*, **18**(3), 277-280.

Voss, A., Pfaller, M.A., Hollis, R.J., Melchers, W.J.G., Meis, W.F.J.G. (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.

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.

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**(4), 214-218.

Yücel, A. ve Kantarcioğlu, A.S. (2000). *Candida*'ların patojenlik belirtgenleri, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, **30**(3), 176-180.

Zinjarde, S.S. ve Pant A.A. (2002). Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. *Marine Pollution Bulletin*, **44**(2), 118-121.

Zou, Y.Z., Qi, K., Chen, X., Miao, X.L., Zhong, J.J. (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**(2), 149-152.

Wah, T.T., 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**(3), 282-289.

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**(1), 51-56.

Wang, G.Y., Chi, Z., Song, B., Wang, Z.P., Chi, Z.M. (2012). High level lipid production by a novel inulinase-producing yeast *Pichia guilliermondii* Pcla22. *Bioresource Technology*, **124**, 77-82.

Wickerham, L.J. ve Burton, K.A. (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.

Wickerham, L.J. (1966). Validation of the species *Pichia guilliermondii*. *Journal of Bacteriology*, **92**(4), 1269.

Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G. (2006). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia.

Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., Edmond, M.B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*, **39**(3), 309-317.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Saliha KESTİ
Doğum Yeri/Tarihi: Giresun/1992
Yabancı Dili : İngilizce
E-mail : saliha-kesti@hotmail.com
İletişim Bilgileri : 0 530 186 28 88

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Bölüm/ Program	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Yıl
Y. Lisans	Tıbbi Mikrobiyoloji Tezli Ortak Yüksek Lisans Programı	Giresun Üniversitesi ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi	2019
Lisans	Biyoloji Bölümü	Giresun Üniversitesi	2014
Lise	Fen Bilimleri Bölümü	Espiye Ç.P.L./Giresun	2010

YAYINLAR

1. Karaman, Ü., Kaçmaz, G., Kesti, S., Akdemir, C., Direkel, Ş., Kolören, Z. (2018). Parazitlerin Kist, Yumurtalarının, Modifiye Çinko Sülfat Yüzdürme Yöntemi İle Değerlendirilmesinde Bozulma Sürelerinin Belirlenmesi. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 7(1), 13-17.

Sözlü Sunumlar

1. Karaman, Ü., Kaçmaz, G., Kesti, S., Akdemir, C., Direkel, Ş., Kolören, Z. (2017). Parazitlerin kist ve yumurtalarının, çinko sülfat yüzdürme yöntemi ile değerlendirilmesinde bozulma sürelerinin belirlenmesi. 2. *Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi*. Manisa. TÜRKİYE.

2. Kaçmaz, G., Karaman, Ü., Kesti, S., Akdemir, C., Direkel, Ş., Kolören, Z. (2017). Toprak örneklerinde parazit tanısının çinko sülfat yüzdürme ve formol eter çöktürme yöntemleri ile karşılaştırılması. 2. *Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi*. Manisa. TÜRKİYE.

3. Karaman, Ü., Kaya, Y., Kaçmaz, G., Kesti, S. (2018). Parazitlerin Kist ve Yumurtalarının Tanısında, Doymuş Tuzlu Su ve Çinko Sülfat Yüzdürme Yönteminin Karşılaştırılması. 3. *Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi*. Manisa. TÜRKİYE

Kongre Bildirileri

1. Direkel, Ş., Cebeci Güler, N., Emecen, Ö., Kesti, S. (2016). Evaluation of the donor questionnaire forms in Giresun Prof. Dr. A. İlhan Ozdemir Government Hospital, Blood Bank in two year period. *XII. AATM Congress-IX. BBTST Congress Book*. Antalya. TÜRKİYE.

2. Karaman, Ü., Kaçmaz, G., Kesti, S., Akdemir, C., Direkel, Ş., Kolören, Z. (2017). Parazitlerin kist ve yumurtalarının, çinko sülfat yüzdürme yöntemi ile değerlendirilmesinde bozulma sürelerinin belirlenmesi. 2. *Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi Bildiri Kitabı*. Manisa. TÜRKİYE.

3. Kaçmaz, G., Karaman, Ü., Kesti, S., Akdemir, C., Direkel, Ş., Kolören, Z. (2017). Toprak örneklerinde parazit tanısının çinko sülfat yüzdürme ve formol eter çöktürme yöntemleri ile karşılaştırılması. 2. *Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi Bildiri Kitabı*. Manisa. TÜRKİYE

4. Karaman, Ü., Kaya, Y., Kaçmaz, G., Kesti, S. (2018). Parazitlerin Kist ve Yumurtalarının Tanısında, Doymuş Tuzlu Su ve Çinko Sülfat Yüzdürme Yönteminin Karşılaştırılması. 3. *Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi Bildiri Kitabı*. Manisa. TÜRKİYE