

## **MİKOZLARIN EPİDEMİYOLOJİK ANALİZİNDE MOLEKÜLER YÖNTEMLERİN YERİ VE MLST YÖNTEMİNE ÖZET BİR BAKIŞ**

**Rıza DURMAZ**

**İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya, (rdurmaz@inonu.edu.tr)**

İnvazif fungal infeksiyonlar, özellikle AIDS, kemik iliği ve solit organ aktarımı yapılmış olanlar, prematur yenidoğanlar, cerrahi ve yanık üniteleri ve yoğun bakım birimlerinde yatanlarda önemli oranda morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Özellikle *Candida* türlerine bağlı hastane infeksiyonlarında artış gözlenmektedir. Bu hastalıkların tedavisi ve önleme stratejilerinin geliştirilmesi için epidemiyolojik çalışmalara gereksinim vardır (1).

Moleküler tiplendirme sistemlerinin geliştirilmesiyle infeksiyon hastalıklarının epidemiyolojisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu sistemlerde, aynı tür içindeki izolatların genetik olarak da ilişkili olup olmadıkları araştırılmakta, "izolatlar aynı mı, farklı mı?" sorusuna yanıt aranmaktadır. Böylece izole edilen etken mantarın kaynağı belirlenebilmektedir. Moleküler epidemiyolojik çalışmalarla etkenin çevreden bulaşan ekzojen kaynaklı veya hastanın kendi florasından gelen endojen kaynaklı olup olmadığı ve muhtemel bulaş yolları hakkında fikir edinilebilmektedir. Hastane ve toplum kaynaklı infeksiyonların ayırımı yapılabilmektedir. Epidemik klonların sirkülasyonu ve zaman içindeki prevalansı izlenerek, epidemiyolojik sürveyans ve kontrol yöntemlerinin değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Bir etkene bağlı tekrarlayan infeksiyonların, aynı etkenin dışardan yeniden alınmasıyla mı yoksa latent durumdaki infeksiyonun aktive olmasıyla mı oluştuğu anlaşılabilir. Böylece moleküler tiplendirme sonuçlarından yararlanılarak, uygulanan korunma ve kontrol yöntemleri ve tedavi protokollerinin uygunluğu denetlenebilmektedir (2-6).

### **Moleküler tiplendirmede genel ilkeler**

Mantarların tiplendirmesinde; koloni morfolojisinin incelenmesi, biyokimyasal testler, seroloji, toksin duyarlılığı ve antibiyotiklere direnç görüntülerine dayalı fenotiplendirme yöntemleri denenmiştir. Ancak bu yöntemlerin tekrarlanabilirliklerinin düşük olması, ayırım güçlerinin sınırlı olması ve çoğunlukla yoğun iş yükü gerektirmeleri nedeniyle terk edilmişlerdir (4, 5). Bunlara ilave olarak; *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* ve *Cryptococcus neoformans* gibi bazı mantarlar fenotipik değişiklik gösterebilmekte ve bu durumda fenotiplendirme yöntemleri yetersiz kalabilmektedir (5).

Moleküler tekniklerin gelişmesiyle, suşların genomlarının karşılaştırılabilmesi olanağı doğdu. Ortak genotipik profil oluşturan aynı tür içindeki izolatların, klonal olarak ortak bir atadan geldikleri ve bunların oluşturdukları infeksiyonlar arasında epidemiyolojik ilişkinin olabileceği kabul edilmektedir. Klonal organizmalarda sınırlı veya hiç kromozomal rekombinasyon ve mayoz olmadığı kabul edilmektedir. Böylece kromozom, atasal hücreden yeni soylara bir bütün olarak geçmektedir. Burada gözlenen değişimin ana nedeni, nokta mutasyon veya DNA segmentlerinin insersiyonu ve delesyonları şeklinde olan mutasyonlardır. Bu değişiklikler yeni soylara blok olarak aktarıldığından, uygun genetik göstergelerle (marker) izlenebilir, suşlar arasındaki genetik yakınlık saptanabilir. Fakat eğer mantar eşeyli çoğalma evresinde ise, genetik göstergeler kromozomlar arası değişebilir. Böyle durumlarda, genetik farklılığı gösterebilmek için, fazla sayıda göstergen kullanıldığı daha ayrıntılı çalışmalar gerekebilir (4).

Bir moleküler tiplleme çalışmasından anlamlı sonuçlar çıkarmadan önce, dikkate alınması gereken çeşitli faktörler vardır. Bunlar; doğru örneklem, uygun yöntem ve göstergelerin seçimi, sonuçların analizi ve dikkatle yorumlanmasıdır.

**Örneklemenin büyüklüğü**, test edilen hipotez üzerine doğrudan etkilidir. Tam rneklem idealdir. Ancak özellikle belirli patojenlerde buna ulaşılması imknsızdır. Bu nedenle, ulaşılabilen örneklemenin derecesi analiz ve yorum aşamalarında dikkate alınmalıdır.

Moleküler tiplleme metodlarının yeterli doğrulukta olabilmeleri için, seğilecek **genetik göster-genin** belirli koşulları karşılaması gerekmektedir. *İlk olarak*; moleküler tipllemede kullanılan gösterge, bulaşmayı izleyebilmek için zaman içinde yavaş değişmeli, fakat aynı zamanda epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşların ayırt edilebilmesi için, spontan olan değişimlere açık olmalıdır. Eğer gösterge çok az değişim gösteriyor ise örnekler arasındaki farklılığı saptamada yetersiz kalacak, hatalı kümeleşmeler olacaktır. Değişim çok hızlı olduğunda ise suşların farklı genotipe ayrılması artar ve gerçek kümeleşmeler saptanamayabilir. *İkinci olarak*; seğilen göstergeler, evrimsel baskı altında olmamalıdır. *cn olarak*; genetik göstergedeki mutasyonun yeni bir versiyonu olmamalı veya çok düşük olasılıkta olmalıdır. *Dördüncü olarak*; gösterge, kendisini analiz edecek modele uygun olmalıdır. *Son olarak*; iki bağımsız izolatta aynı mutasyonun görülme olasılığı oldukça düşük olmalıdır. Homoplaziyi (farklı soya sahip olan kökenlerde ortak karakterlerin gözlenmesi) nlemek için buna gerek vardır (4, 6). Buna ek olarak, tek bir lokusa dayalı tiplleme şemaları rekombinasyona karşı çok duyarlıdır. Aslında aynı olan iki izolattan birinin lokusunda oluşan bir rekombinasyon bunları iki ayrı suş gibi değerlendirmeye neden olabilir. Buna bağlı hatalı gruplaşmayı önleyebilmek için birden fazla lokus veya gösterge seti kullanılmalıdır (7).

Loboratuvarların tiplleme, veri toplama ve analiz için farklı **yöntemleri** seğebilmeleri, elde edilen sonuçların karşılaştırmasını zorlaştırmaktadır. Yöntemlerin standardizasyonu, kalite kontrollerinin kullanımına zen gösterilmesi ve veri analizinin önemsenmesi karşılaştırılabilir sonuçlar alınması açısından gerekli noktalaradır. Genetik ilişkiyi saptamada moleküler tiplleme yöntemlerinin ayırım gücünü artırmak için birçok kıstas önerilmiştir. Uygun bir teknik, çevresel baskılara ve yüksek sıklıktaki genetik reorganizasyonlara dirençli olmalıdır. Buna ek olarak, oluşturulan parmak izi (fingerprints) zaman içinde istikrarlı olmalıdır. Ayrıca metod, homoplaziyeye dirençli olmalıdır. Oluşturulan veriler tekrarlanabilmeli, aynı genetik görüntü veren suşlar, değişik zamanlarda aynı ve farklı laboratuvarlarda hep benzer görüntüyü oluşturmalıdır. Herhangi bir yöntemin laboratuvarlar arası ve laboratuvar içinde tekrarlanabilir olabilmesi deneysel değişkenlerin iyi bilinmesi ve onların kontrol altına alınması ile mümkün olabilmektedir. Mikro-organizmaların üretim ve stoklama koşulları, nükleik asitlerin izolasyon ve saflaştırılması, deneydeki nükleik asit konsantrasyonu, amplifikasyon koşulları, restriksiyon endonükleaz ile kesim, elektroforez koşulları standardize edilmeli ve incelenecek suşların tamamına aynı koşullar uygulanmalıdır. Genotiplleme yöntemi, genetik ilişkiyi derecelendirilme kapasitesine sahip olmalıdır. Suşları farklı, muhtemel ilişkili, yakın ilişkili ve çok yakın ilişkili olarak sınıflandırabilmelidir. Böyle bir yöntemle, suşlar arasındaki benzerlik katsayısı hesaplanabilir, bundan yararlanılarak suşların yakınlık derecelerini gösteren dendrogram oluşturabilir. İdeal olan, bir tiplleme yöntemiyle elde edilen veriler bilgisayar yardımıyla analiz edilebilmeli, geriye dönük analizler ve laboratuvarlar arası karşılaştırmalar için uzun süre saklanabilmelidir. Metodolojik olarak tiplleme yöntemi hızlı, ekonomik, çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarında uygulanabilir olmalıdır. Seğilecek yöntem, aynı türün her suşu için uygulanabilmeli, çok sayıda örneğin incelenmesine elverişli olmalıdır (3, 4, 8).

Moleküler tipllemeden elde edilen **sonuçlarının doğru değerlendirilebilmesi** için, klasik epidemiyolojik bilgiler ve klinik verilerle birlikte ele alınması gerekmektedir. Ne kadar benzerlik epidemiyolojik veya klonal ilişkiliyi doğrulamaktadır? Bu durumu değerlendirebilmek

için; kullanılan sistemin ayırım gücü, incelenen organizmanın genomik değişkenliği ve araştırma periyodunun bilinmesine gereksinim vardır. Moleküler alt-tipleme sonuçlarının yorumlanmasında dikkat edilmesi gereken en önemli faktör; epidemiyolojik, çevresel ve laboratuvar bulgularının birbiriyle ne derece örtüştüğüdür. Laboratuvar bulguları, tek başına, bir enfeksiyonun kaynağını doğrulama veya reddetmede yetersizdir. Aynı suşun iki kişiyi farklı yollardan infekte etmesi her zaman mümkün olabileceği gibi, farklı profile sahip izolatların ortak bir kaynağa sahip olmaları da olasıdır (3, 6).

### **Moleküler tipleme yöntemleri**

Mantarların epidemiyolojisinde çeşitli moleküler tipleme yöntemleri denenmektedir. Bunlardan fazlaca kullanılanların prensip, avantaj ve dezavantajları konusunda bilgi verilecektir.

**"Restriction fragment length polymorphism" (RFLP)/Restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş kromozomal DNA'nın pulsed-field jel elektroforezle (PFGE) ayrıştırılması:** Uygun bir restriksiyon endonükleaz (RE) enzimiyle DNA kesilmekte, oluşan parçalar agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılmaktadır. Her bir suşa ait farklı büyüklük ve sayıdaki DNA parçaları, o suş için tipleme profilini oluşturmaktadır. Restriksiyon endonükleaz enziminin kesim noktasında oluşan mutasyonlar, suşlar arasındaki farklılıktan sorumlu olmaktadır. Buradaki en önemli dezavantaj, çoğu tipleme yönteminde olduğu gibi, bantların aynı büyüklükte olması, suşların mutlaka aynı olduğu anlamına gelmeyebilir. Bu problemi elimine etmek için "sequence-confirmed amplify region analysis" (SCAR) önerilmektedir. Bu yöntemde; ayırıcı bantlar polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle çoğaltılmakta ve takiben dizi analizi yapılmaktadır (4).

Pulsed-field jel elektroforez yönteminde; agaroz içine gömülü haldeki hücrelerden yapısal bütünlüyü bozulmadan izole edilen kromozomun, RE enzimi ile kesilmesinden sonra oluşan DNA parçalarının, akım oryantasyonu periyodik bir şekilde değiştirilen elektrik akımı (pulsed-field gel electrophoresis) yardımıyla ayrıştırılması amaçlanmaktadır. Pulsed-field jel elektroforez yönteminde, RE enzimle kesilmiş kromozomal DNA'dan oluşan, 10-800 kb arasında uzunluğa sahip parçalar, etkin bir şekilde göç ettirilmekte ve bunun neticesinde yaklaşık 5-20 kadar, farklı büyüklükte DNA bant profili ortaya çıkmaktadır (9).

Restriction fragment length polymorphism hızlı, basit ve ucuz bir yöntemdir. Fakat birçok metodolojik sıkıntılar bulunmaktadır. Fungal genomun kompleks olmasından dolayı çok sayıda bant oluşmaktadır. Bu durum bantların ayrışmasını zorlaştırmaktadır. Bundan dolayı orta derecede ilişkili izolatlar arasındaki klonal ilişkiyi test etmede sıkıntılar vardır. Restriksiyon endonükleaz enzimlerinin seçimi önemli parametrelerden biridir. *SfiI* ve *BssHII* restriksiyon enzimlerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda; *C. albicans* ve *C. tropicalis* suşlarının ayırımında *BssHII* enzime dayalı analizin daha yüksek ayırım gücünde olduğu gösterilmiştir (10-12).

**Hibridizasyonlu RFLP:** RFLP ile elde edilen DNA bantları, Southern blot yöntemiyle naylon membrana aktarılmakta, sonra etkene özel problarla hibridizasyon yapılmaktadır. Problar kromozomal DNA'yı hedef alarak düzenlendiklerinden, mitokondriyal DNA veya rDNA'dan kaynaklanan bantlar elimine edilebilmektedir. Ayrıca sınırlı sayıda bantların hibridizasyonu hedeflenerek, bant sayısının fazlalığından kaynaklanan yetersiz ayırım problemlerinin önüne geçilebilmektedir. Bu amaçla kullanılabilen farklı problar bulunmaktadır. Tek gen problar (single-gene probes), alelik polimorfizme bağlı olarak izolatlar arasında ayırım sağlayabilmektedir. Ancak, bunlar izolatlar arasında yalnızca bir veya iki bant farklılığına dayalı ayırım yapmaktadırlar. Bu durum bazen genetik ilişkiyi saptama ve suşları ayırmada yeterli olmamaktadır. Ayırım gücünü artırmak için kromozomdaki tekrarlayan DNA parçalarına bağlana-

bilen problardan yararlanılmaktadır. Filogenetik analizler için kullanılacak olan ideal prob, suşlar arasındaki genetik ilişkinin derecesini (ilişkisiz, muhtemel ilişkili, yakın ilişkili..) saptamaya uygun olmalıdır. Bu amaç için kompleks problemler, başarılı bir biçimde kullanılmaktadır (4).

Bu yöntemin en önemli avantajı, uygun bir prob seçilmesi halinde ayırım gücü oldukça yüksektir. Fakat *Aspergillus fumigatus*'ta olduğu gibi, haploid organizmalarda bir alelin (bir band) varlığı ve yokluğu gösterilebilirken; *C. albicans* gibi diploid organizmalarda homozigot (her iki alelin bulunması) genotiplerin, heterozigot (alellerden yalnızca birisi bulunmaktadır) genotiplerden ayırımı yapmak olanaksızdır. *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dublinensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* ve *A. flavus* gibi mantarların tiplendirmesinde kullanılan problemler bulunmaktadır (4).

**Polimeraz zincir reaksiyonu temelli tiplendirme yöntemleri:** Bu yöntemler; 6-20 bazlık PZR primerlerinin bağlandığı bölgelerdeki değişimleri hedef almaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu primerlerinin bağlandığı bölgelerdeki, özellikle 3'-uçtaki, baz değişimleri primerin bağlanmasını ve amplifikasyonu engeller. İlave olarak, bu yöntemler genomdaki insersiyon ve delesyonları saptayabilirler. "Random amplified polymorphic" DNA (RAPD) veya "arbitrarily primed PCR" (AP-PCR) yöntemleri, yaklaşık 10 baz uzunlukta, rastgele seçilmiş bir primer kullanılmaktadır. Tek primer, izolatlar arasında oldukça fazla sayıda bant profili oluşturmakla birlikte, çoğu durumda izolatlar arasındaki ayırımı sağlayabilecek 1-3 tane yoğun bant oluşmaktadır. Bu yöntemler ucuz, hızlı ve basit yöntemlerdir. Uygulamaları kolay ve çoğunlukla RFLP ile elde edilen ilişkisiz izolatlar arasındaki farklılığı doğru olarak tanımlayabilmektedirler. Bu yöntemler; *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *C. neoformans*, *Malassezia* türleri ve *Fusarium solanii* gibi pek çok mantarın tiplendirilmesinde kullanılmaktadır (4).

Polimeraz zincir reaksiyonu temelli yöntemlerin en önemli dezavantajları, laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliklerinin düşük olmasıdır. Bunu önlemek için DNA konsantrasyonu, primer, nükleotit, enzim ve diğer tüm malzemeler açısından yöntem standardize edilmeli, çalışmaların tamamı aynı amplifikasyon koşullarında yapılmalıdır.

**Elektroforetik karyotiplendirme (EK):** Seksüel ve aseksüel fungus türlerinin çoğu, kromozomun kırılması ve düzelmesi veya yeniden organize olmasından kaynaklanan "chromosomal-length polymorphism" (CLP) sergilemektedirler. Benzer görünüm azollere direnç gelişme aşamalarında da gözlemlenmektedir. Bu beklenmedik olaylara yol açan dizilimler, çoğunlukla aktarılabilen elementlerdir ve nadir olarak da tekrarlayan dizilimlerdir. Bu dizilimler, ektopik rekombinasyon (homolog olmayan kromozomlar arasında rekombinasyon) için substrat işlevi görürler. Örnek olarak; rRNA genlerini içeren sıralı tekrarlar (tandem repeat) bütün funguslarda değişik uzunluktadır ve bazı olgularda CLP'nin doğrudan nedeni olarak gösterilmektedirler. "Chromosomal-length polymorphism" elektroforetik karyotiplendirme (EK) ile görüntülenebilmektedir. Elektroforetik karyotiplendirme yönteminde; farklı yönlerden uygulanan elektrik akımıyla, herhangi bir enzimle kesime uğratılmamış olan fungal kromozomun jel içinde yürütülmesi gerçekleştirilmektedir (4).

Elektroforetik karyotiplendirme ile "sequence specific" PZR ve genomik DNA'nın RE enzimi ile kesimini takiben yapılan PFGE'den alınan sonuçlar arasındaki uyum çalışmalara göre farklı bulunmuştur. İdrar yolu infeksiyonu olan hastalardan üretilen *C. tropicalis* suşlarının moleküler tiplendirmesinde; EK'nin yetersiz olduğu, en uygun yöntem olarak *Bss*HII ile kesilmiş kromozomal DNA'nın, PFGE ile ayrıştırılmasının olduğu gösterilmiştir (10). Bir başka çalışmada, *C. albicans* izolatlarındaki mikrodeğişimleri saptamada EK'nin yetersiz olduğu, *Bss*HII ve *Sfi*I enzimleriyle kesilmiş DNA'nın PFGE ile ayrıştırılmasında farklı profil oluşturan suşların, EK ile aynı oldukları gözlemlenmiştir (11). Kore'deki bir üniversite hastanesinde beş yıl

süre ile 38 hastanın kanından izole edilen 54 *C. albicans* suşu EK ile 14, *SfiI* kullanılan PFGE ile 29, *BssHII* kullanılan PFGE ile 31 farklı profile ayrılmıştır (12). Üç ayrı laboratuvarında yapılan tiplendirme sonuçlarına göre; EK tiplendirme yönteminin *C. albicans*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ve *C. glabrata* suşlarının tiplendirilmesinde, *BssHII* ve *SfiI* enzimleriyle kesimi takiben yapılan PFGE'den daha iyi olduğu gösterilmiştir (5). Bu çalışmada; ayrıca, yöntemlerin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliklerinin *Candida* türlerine göre değişim gösterebildiği saptanmıştır. Elektroforetik karyotiplendirme yönteminin *Cryptococcus neoformans* izolatlarının tiplendirilmesinde yararlı olduğu (11), fakat *Malassezia* türlerinin epidemiyolojik incelenmesinde uygun olamayacağı belirtilmiştir (13).

**"Single-nucleotide polymorphism" (SNPs):** SNP; özgü bir lokasyonda meydana gelmiş olan tek baz değişimleridir. Bu değişimleri gösterebilmek için "confirmation-based polymorphism scanning/Single-strand confirmation polymorphism analysis" (SSCP), "heteroduplex mobility analysis", "DNA microarray genotyping" gibi yöntemler bulunmaktadır. DNA microarray; birçok değişikliği aynı anda gözlemeye olanak veren hibridizasyon temelli bir tiplendirme yöntemidir. Binlerce oligonükleotit, bir düzen içinde silikon bir yüzeye bağlanarak, yüksek yoğunlukta microarray veya DNA chip'leri oluşturulmaktadır. Floresans veren maddelerle işaretli nükleotitler kullanılarak PZR ile çoğaltılan hedef DNA örnekleri, silikon üzerine bağlanmış olan problemlerle hibridizasyona tabi tutulmaktadır. Yüzeyde bulunan her bir oligonükleotit prob, kendisine özgü dizilimlerle tam hibridizasyon oluşturduklarında, hatalı hibridizasyon olmuş olanlara kıyasla daha güçlü sinyal oluşmaktadır. Oluşan sinyallerin kantitasyonu yapılabilmektedir. Bu yöntemle tek baz değişimleri yanında, delesyonlar ve insersiyonlar da saptanabilmektedir (4).

**Baz dizi analizi:** İki suşu kıyaslamamanın en uygun olan yolu, bunların DNA dizilimlerini karşılaştırmaktır. Birçok araştırmacıya göre, iki suşun tamamen aynı olduğuna yalnızca bu yöntemle karar verilebilir. Ancak bu yöntemin uygulaması ve sonuçlarının yorumlanmasında sıkıntılar vardır. Dizi analizi; daha çok PZR veya RFLP ile elde edilmiş olan homolojiyi doğrulamak ve ayrıca mikro-organizmalarda iyi korunmuş olan belirli sayıdaki "housekeeping" gendeki değişimi analiz etmek için uygulanmaktadır.

**"Multilocus sequence typing" (MLST):** MLST perensip olarak, multilokus enzim elektroforez (MLEE) sistemine benzemektedir. Farklı olarak, bunda, temel metabolik fonksiyonu kodlayan "housekeeping" genlerdeki değişiklik araştırılmaktadır. Yöntemde; "housekeeping" genlerin arasında kalan bölgelerin PZR ile çoğaltılması yapılmakta, oluşan PZR ürünlerinin dizi analizi çıkarılmaktadır. Her bir lokus için, her farklı dizilim farklı bir alel numarası ile gösterilmekte ve böylece suşa ait bir alelik profil tanımlanmaktadır (7, 14). Her bir alelik profil, dizi tipi (diploid sequence type=DST) olarak belirtilmektedir. Belirlenen alelik profiller, MLST veri bankasındaki (<http://www.mlst.net>) bilinen alellerle karşılaştırılarak, saptanan alel profilinin diğer ülkelerdeki yaygınlık derecesi konusunda bilgi edinmek mümkün olabilmektedir. "Multilocus sequence typing"deki lokusların her birinde çok sayıda alel bulunmakta ve bunların sayısı MLEE'dekinden daha fazladır. Böylece MLST'de kullanılan altı-yedi lokusla, MLEE'dekine benzer oranda ayırım gücü elde edilebilmektedir. "Multilocus sequence typing" sonuçlarının elektronik ortama aktarılabilmesi, kolayca saklanabilmesi ve tiplendirilen herhangi bir suşun sonucunu daha önceden var olanlarla kıyaslama olanağının bulunması, bu yöntemin MLEE'e üstünlükleridir (1, 15). "Multilocus sequence typing", hızlı ve uygulaması kolaydır. Bu tekniğin en önemli avantajlarından birisi, genomun tamamının dizi analizinin yapılmasına gerek duyulmamasıdır. Laboratuvarlar arası tekrarlanabilir sonuçlar alınabilme olasılığı oldukça yüksektir. Diğer PZR tekniklerinde olduğu gibi MLST, elde izolatin olmadığı durumlarda, doğrudan klinik örnekler üzerinden uygulanabilmektedir. Bu yöntem mantarların tiplendirmesinde kullanılan EK, AP-PZR, SNPs ve hibridizasyon yöntemlerinden daha avantajlıdır. "Multilocus sequence typing" yöntemiyle mantarların türlerini tanımlamak mümkün olabilmekte, türler içindeki suşların

ayrıntılı analizleri yapılabilen (mantar-çevre, mantar-konak normal florası, mantar-hastalık ilişkisi gibi), salgının olası kaynak ve bulaş yolları aydınlatılabilmekte, belirli mantar tiplerinin toplumlardaki yaygınlık derecesi konusunda bilgi edinilebilmektedir (15, 16).

*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus flavus*, *Coccidioides immitis* ve *Fusarium oxysporum* kompleksinin tiplendirilmesinde MLST'nin kullanıldığını gösteren çalışmalar vardır (5,16). <http://www.mlst.net> adresinde *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* ve *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* için hazırlanmış ayrıntılı MLST bilgilerine ulaşmak mümkün olabilmektedir (16). Bu yöntemin, ilişkili *C. albicans* suşlarındaki minör değişimleri bile yakalayabilecek yüksek ayırım gücüne (%99.7) sahip, istikrarlı bir tiplendirme yöntemi olduğu ortaya konulmuştur (14). Tayvan'daki 12 hastaneden izole edilmiş olan *C. albicans* izolatlarının genetik profillerini analiz etmek için kullanılan MLST yönteminde; bu yöntemin epidemiyolojik olarak ilişkili olan suşların ayırımında PFGE'den daha yüksek ayırım gücüne sahip olduğu gösterilmiştir (17). Bu çalışmada; ayrıca, aynı hastadan farklı zamanlarda izole edilen *C. albicans* suşlarındaki mikro değişimlerin izlenmesinde de MLST'nin uygunluğu vurgulanmıştır.

**Sonuç olarak**, moleküler tiplendirmede kullanılan yöntemlerin her birinin avantajları yanında dezavantajları da bulunmaktadır. İdeal bir tiplendirme yöntemi bulunmadığına göre, herhangi bir tiplendirme yöntemiyle küme oluşturan suşlarda; yöntemin etkinlik derecesi, bağımsız bir tiplendirme yöntemiyle doğrulanmalıdır. Bu durum, özellikle küçük değişimler (minievolution) veya suşaltı değişim (substrain shuffling) gösteren belirli mayaların epidemiyolojik incelemelerinde önemlidir. Moleküler tiplendirme sonuçlarından doğru bir yorum çıkarılabilmesi için, klasik epidemiyolojik verilerin toplanmış olması vazgeçilmez bir zorunluluktur. Epidemiyolojik veriler olmadan yapılan tiplendirme çalışmaları boşa harcanmış zaman ve masraftan başka bir şey değildir.

## Kaynaklar

1. Andrei A, Zervos MJ. The application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Arch Pathol Lab Med.* 2006; 130:662-668.
2. Pfaller MA, Herwaldt LA. The clinical microbiology laboratory and infection control: Emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. *CID* 1997; 25: 858-870.
3. Durmaz R. Moleküler epidemiyoloji neden gerekli, başlarken nelere dikkat edilmelidir? 3. *Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (28 Haziran-1 Temmuz 2004, Ankara) Program ve Bildiri Özet Kitabı*'nda. 2004: 52-59.
4. Gil-Lamaignere C, Roilides E, Hacker J, Müller F-MC. Molecular typing for fungi-a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9:172-185.
5. Espinel-Ingroff A, Vazquez JA, Boikov D, Pfaller MA. Evaluation of DNA-based typing procedures for strain categorization of *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 33:231-239.
6. Barrett TJ, Ribot E, Swamathan B. Molecular subtyping for epidemiology: Issues in comparability of patterns and interpretation of data. *In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang Y-W, Unger ER, Relman DA, White TJ, eds. Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice.* Washington, DC: ASM Press, 2004: 259-266.
7. Hanage WP, Feil EJ, Brüeggemann AB, Spratt BG. Multilocus sequence typing: Strain characterization, population biology, and patterns of evolutionary descent. *In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang Y-W, Unger ER, Relman DA, White TJ, eds. Molecular Microbiology. Diagnostic Principles and Practice.* Washington, DC: ASM Press, 2004: 235-243.
8. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microorganisms. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1661-1669.
9. Durmaz B, Durmaz R. Pulsed field gel electrophoresis. Durmaz R, ed. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*'de. Adana: Nobel Tıp Kitapevleri, 2001:161-168.
10. Rho J, Shin JH, Song JW, et al. Molecular investigation of two consecutive nosocomial clusters of *Candida tropicalis* candiduria using pulsed-field gel electrophoresis. *J Microbiol.* 2004; 42:80-86.

11. Shin JH, Park MR, Song JW, et al. Microevolution of *Candida albicans* strains during catheter-related candidemia. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4025-4031.
12. Shin JH, Og YG, Cho D, et al. Molecular epidemiological analysis of bloodstream isolates of *Candida albicans* from a university hospital over a five-year period. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:546-554.
13. Almeida AM, Matsumoto MT, Baeza LC, et al. Laboratory Group on Cryptococcosis. Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical sequential isolates of *Cryptococcus neoformans* from Sao Paulo State, Brazil. *FEMS Yeast Res*. 2007;7:152-164.
14. Bounoux M-E, Morand S, d'Enfert C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1290-1297.
15. Taylor JW, Fisher MC. Fungal multylocus sequence typing-it's not just for bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6:351-356.
16. David M. Aanensen DM, Spratt BG. The multilocus sequence typing network: mlst.net *Nucl Acids Res* 2005; 33:772-733.
17. Chen K-W, Chen Y-C, Lo H-J, et al. Multilocus sequence typing for analyses of clonality of *Candida albicans* strains in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2172-2178.