

TARTU ÜLIKOOL
Arstiteaduskond
Mikrobioloogia Instituut

Katrin Eimra

**Laste intensiivravi osakondades levivate *Candida*
liikide feno- ja genotüübiline struktuur**

Magistritöö biomeditsiini erialal

Juhendaja: Prof. Irja Lutsar

TARTU 2007

Sisukord

1.	Kirjanduse ülevaade	4
1.1.	Perekond <i>Candida</i> üldiseloomustus	4
1.2.	<i>Candida</i> liikide identifitseerimiseks kasutatavad söötmed ja meetodid.....	5
1.2.1.	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i> (Oxoid, LTD) agar.....	5
1.2.2.	<i>CHROMagar Candida</i> (tootja Becton, Dickinson and Company, USA) agar....	6
1.2.3.	<i>Corn Meal Agar + Polysorbate/Tween 80</i> sööde.....	8
1.2.4.	API testid (tootja BioMerieux sa, Prantsusmaa)	8
1.3.	<i>Candida spp.</i> genoom <i>C. albicans</i> näitel	9
1.4.	Epidemioloogiline genotüpiseerimine ja varieeruvus.....	13
1.4.1.	Genoomse DNA restriksiooni endonukleasse analüüsi restriksiooni ensüümi valik.....	15
1.4.2.	Mikroevolutsioon.....	18
1.5.	<i>Candida</i> tähtsus infektsiooni tekitajana	18
2.	Töö eesmärgid	20
3.	Materjal ja meetodika.....	21
3.1.	Isoleeritud tüved ja nende säilitamine.....	21
3.2.	Liikide identifitseerimine	21
3.2.1.	Liikide määramine <i>CHROMagar Candida</i> ja <i>Corn Meal Agar + Polysorbate/Tween 80</i> (tootja Becton, Dickinson and Company, USA) söötmetega ..	21
3.2.2.	Identifitseerimine <i>API Candida</i> (tootja BioMerieux sa, Prantsusmaa) testiga ..	22
3.3.	PFGE meetodika väljatöötamine	23
3.3.1.	Karütüpiseerimine.....	23
3.3.2.	Restriksioonifragmentide analüüs PFGE-ga	24
3.3.3.	Markeri valik	25
3.3.4.	Mikroevolutsioonilised muutused	25
4.	Tulemused ja diskussioon	26
4.1.	Patsiendid ja nendelt isoleeritud tüved	26
4.2.	Liikide identifitseerimine	26
4.2.1.	Liikide määramine <i>CHROMagar Candida</i> ja <i>Corn Meal Agar</i> söötmetega	26
4.2.2.	Liikide määramine API (tootja BioMerieux sa, Prantsusmaa) testidega ja <i>Corn Meal Agar</i> agariga	29
4.2.3.	Liigilise samastamise erinevused	30
4.3.	PFGE meetodika väljatöötamine.....	33
4.3.1.	Karütüpiseerimine.....	33
4.3.2.	Restriksioonifragmentide analüüs PFGE-ga	33
4.3.3.	Markeri valik	34
4.4.	Eesti lasteintensiivravi osakondade <i>Candida</i> liigisisene genotüpiseerimine	35
4.4.1.	Karütüpiseerimine.....	35
4.4.2.	Restriksiooni analüüs ensüümiga BssHII	36
4.4.3.	Mikroevolutsioonilised muutused	40
5.	Järeldused.....	44
6.	Kokkuvõte.....	45
7.	Summary	47
	Kasutatud kirjandus.....	49
	Lisad	56

Sissejuhatus

Pärmseened perekonnast *Candida* kuuluvad hõimkonda kottseened (*Ascomycota*), seltsi pärmkottseenelaadsed (*Saccharomycetales*) ja sugukonda pärmkottseenelised (*Saccharomycetaceae*). Perekonna *Candida* liigid on inimese seedekulgla, suguteede ja eritusedelundkonna sagedased koloniseerijad, kuuludes inimese naha ja limaskestade mikrofloorat moodustavate liikide hulka. Tervetest inimestest on perekonna *Candida* pärmseentega koloniseeritud 3-37% (Voss *et al.*, 1997).

Candida perekonna pärmseened on oportunistlikud patogeenid, mis põhjustavad põhiliselt infektsioone nõrgestatud immuunsüsteemiga isikutel. Enamik neist on päritolult endogeensed, saades alguse inimese enda mikrofloorast. Kõige sagedamini põhjustab inimesel infektsioone liik *Candida albicans*, talle järgnevad *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* ja *C. krusei*. *C. albicans* põhjustab peamiselt tupepõletikku, soori, söögitoru põletikku, enteriiti, põiepõletikku ning liigesepõletikku. *C. tropicalis* põhjustab lisaks kandidemiaale sageli ka süsteemset kandidoosi. *C. glabrata* põhjustab tihti kuseteede ja neerude infektsioone.

Perekonna *Candida* liigid on üheks olulisemaks patogeeniks hospitaalinfektsioonide põhjustajatena, kuuludes Ameerika Ühendriikides nelja tähtsaima haiglanakkusi põhjustava patogeeni hulka (Voss *et al.*, 1997). Haiglanakkus tekib patsiendi haiglas viibimise ajal ning haigustekitaja levib invasiivsete ravivõtete kasutamisel, otsesel ülekandel kätega teistelt patsientidelt või põetavalt personalilt, kui ei jälgita steriilsuse ja hügieeni nõudeid.

Haiglanakkuste puhangute kindlakstegemiseks ja päritolu selgitamiseks on kasutusel patogeensete seente genotüüpiseerimine. Käesoleva töö eesmärgiks on kindlaks teha aastatel 1999 kuni 2006 Tartu ja Tallinna lastehaigla intensiivravi osakonnast isoleeritud *Candida* perekonna isolaatide geno- ja fenotüübiline struktuur, töötada välja ühtne pulssvälja geelelektroforeesi (PFGE) meetodika erinevate *Candida* liikide genotüüpiseerimiseks ja kasutades genotüübilist samastamist selgitada välja, kas laste intensiivravi osakondades on esinenud tüvede nosokomiaalset levikut ja tüvede mikroevolutsioonilisi muutusi.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Perekond *Candida* üldisloomustus

Pärmseened perekonnast *Candida* kuulvad hõimkonda kottseened (*Ascomycota*), seltsi pärmkottseenelaadsed (*Saccharomycetales*) ja sugukonda pärmkottseenelised (*Saccharomycetaceae*). Selle heterogeense perekonna moodustavad ligikaudu 200 liiki, mis ei ole suguluses. Liikide taksonoomilised seosed selles perekonnas pole täpselt teada. Perekond *Candida* on määratletud kui aseksuaalsed seened, millel puudub vähemalt üks järgnevatest omadustest:

1. äädikhappe tootmine;
2. visuaalselt märgatav punane, roosa või oranž pigment;
3. artrokoniidid ja ballistokoniidid;
4. unipolaarne või bipolaarne pungumine;
5. sümoodulal moodustuvad blastokoniidid;
6. varrel moodustuvad pungad;
7. nõelakujuline terminaalne koniid ehk lülieos;
8. enteroplastiline basipetaalne pungumine, mis esineb koos limaste kolooniatega ja võimega kasvada tingimustes, kus insitool on ainukeseks süsiniku allikaks (Murray *et al.*, 2003).

Candida liigid omavad mitmeid virulentsusfaktoreid, mis võivad edendada nende parasitismi. Näiteks on *C. albicansi* virulentsusfaktoriteks kiire kasv asustataval veresoonekonna koel, proteaaside tootmine, pinna integriinistaoliste molekulide tootmine adhesiooniks ekstratsellulaarse maatriksi valkudele, komplemendi valke siduv retseptor, fenotüübi muutmine ning pinna variatsioon ja hüdrofoobsus (Murray *et al.*, 2003). *Candida* liikide eristamiseks on vajalik süsiniku assimilatsiooni ja fermentatsiooni omaduste teadmine; nende omavaheliseks eristamiseks kasutatavad kasvutingimused ja biokeemilised testid on näidatud Tabel 1.

Tabel 1. Kõige sagedamini kliinilisest materjalist isoleeritud *Candida* liikide biokeemilised ja kultuurilised omadused. Sümbolid: + kasv suurem kui negatiivsel kontrollil; - negatiivne reaktsioon; * reaktsioon võib anda vastupidise tulemuse; +b *C. albicans* produtseerib enamasti ühe, kuid mitte kunagi rohkem kui kaks terminaalset klamüdospoori, aga *C. dubliniensis* toodab terminaalset klamüdospoore paari, kolmiku või klastrite kaupa (Murray *et al.*, 2003).

Liigid	Kasv 37 °C juures	Kilejas membraan söötmes	Pseudo- või pärisühüüfid	Klamüdospoorid	Germ Tube	Assimilatsioon:													Fermentatsioon:							
						Glükoos	Maltoos	Sahharoos	Laktoos	Galaktoos	Melibioos	Tsellobioos	Inositol	Ksilütoos	Rafinoos	Trehhaloos	Dultsitol	Glükoos	Maltoos	Sahharoos	Laktoos	Galaktoos	Trehhaloos	Ureaas	Askospoorid	
						<i>C. albicans</i>	+	-	+	+b	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	F	F	-
<i>C. catenulata</i>	+*	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	F*	F	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	+	-	+	+b	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	F	F	-	-	F	F	-	-	-
<i>C. famata</i>	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	W	-	W	-	-	-	W	-	.*
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	F	-	-	.*
<i>C. guilliermondii</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	F	-	F	-	F*	F	-	-	.*
<i>C. kefyr</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	F	-	F	F*	F	-	-	-	.*
<i>C. krusei</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	+	.*
<i>C. lambica</i>	+*	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	.*
<i>C. lipolytica</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	.*
<i>C. lusitaniae</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	F	-	F	-	F	F	-	-	.*
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. pintolopesii</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	-	-	-	-	-
<i>C. rugosa</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+	ng	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	F	F	F	-	F*	F*	-	-	-
<i>C. zeylanoides</i>	-	.*	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1.2. *Candida* liikide identifitseerimiseks kasutavad söötmed ja meetodid

1.2.1. Sabouraud Dextrose Agar (Oxoid, LTD) agar

Sabouraud Dextrose Agar agar on üldkasutatav sööde, mis soodustab enamike patogeensete seente kasvu. See ei ole differentsiaalsööde ja erinevate patogeensete seente liigid pole sellel eristatavad (Odds *et al.*, 1994). *Sabouraud Dextrose Agar* söötmele lisatakse tavaliselt bakterite kasvu pärssimiseks antibiootikumi, näiteks klooramfenikooli (söötmete koostis on ära toodud Lisade osas tabelis 1). Seene kolooniate kuju, mikroskoopilised ja füsioloogilised omadused varieeruvad sõltuvalt peptooni tüübist, mida on kasutatud söötme valmistamiseks (Odds *et al.*, 1991). Näiteks *C. albicans* kolooniad on 24 tunni möödudes söötmel kortsus või korallilised, kuid 48 tunni möödumisel muutuvad siledaks ning värvuselt varieeruvad valgest kuni kreemika või pruunikasvalgeni (Murray *et al.*, 2003).

1.2.2. CHROMagar Candida (tootja Becton, Dickinson and Company, USA) agar

CHROMagar Candida on diferentsiaalsööde (võimaldab enamlevinud patogeensete seente liikide määramist ja segakultuuride leidmist ning ei vähenda isolaatide elujõulisust edasikülvamisel), mis sobib hästi kliinilistes laborites *C. albicans*, *C. tropicalis* ja *C. krusei* identifitseerimiseks. (Lisad: Tabel 1). Söötme head spetsiifilisust tõestas Odds *et al.* 1994. aastal näidates, et kõik isolaadid kasvasid samaaegselt nii *Sabouraud Dextrose Agar* agaril kui ka *CHROMagar Candida* söötmel (Odds *et al.*, 1994; Pfaller *et al.*, 1996).



Pilt 1. *CHROMagar Candida* agar, kus rohelised pesad on *C. albicans*, sinised pesad *C. tropicalis* ja roosad *C. krusei* liigid.

Liikide eristamine *CHROMagar Candida* agaril põhineb liigi spetsiifilistel reaktsioonidel nende ensüümide ja kromogeense substraadi vahel, mille tulemusel on võimalik eristada liike värvuse ja morfoloogia alusel (Odds *et al.*, 1994). Näiteks toodab *C. albicans* β -*N*-atsetüülgalaktoosaminidaasi, mis võimaldab kromogeense või florigeense heksoaminidaasi substraadi lisamist otse söötmesse ja *C. albicans* liigi identifitseerimist primaarsel isoleerimisel (Beighton *et al.*, 1995). Isolaadi külvamisel *CHROMagar Candida* söötmele saadakse erinevate liikide puhul tulemuseks erinevat värvi kolooniad (Pilt 1; Tabel 2). Värvuse määramisel arvestatakse ainult domineerivat, pesa keskel olevat värvi.

Tabel 2. *Candida* liikide identifitseerimine *CHROMagar Candida* (CaC) söötmega (Koehler *et al.*, 1999).

Liik	Koloonia iseloomustus CaC
<i>C. albicans</i>	Õunarohelised kolooniad; liigile iseloomulik välimus
<i>C. glabrata</i>	Suured läikivad kolooniad, mille värvus varieerub heleroosast purpurpunaseni
<i>C. tropicalis</i>	Tuhmsinised kolooniad, mis võivad harva olla ka roosad; Moodustavad purpurpunase halo, mis on difundeerinud ümbritsevasse söötmesse
<i>C. krusei</i>	Suured, lamedad, mati pealispinnaga ja laialivalguvad heleroosad pesad; liigile iseloomulik välimus
<i>C. parapsilosis</i>	Kolooniad värvuselt valgest kuni heleroosani; varieeruv välimus
<i>C. guilliermondii</i>	Väikesed, värvuselt roosad kuni purpurpunased kolooniad; varieeruv välimus
<i>C. dubliniensis</i>	Tumerohelised kolooniad

Houang *et al.* (1997) poolt läbiviidud uuringus identifitseeriti erinevaid *Candida* liike 38 kogenud laborandi poolt kasutades *CHROMagar Candida* agarit. *C. albicans* liigi samastamise täpsuseks saadi 100% ning *C. krusei* ja *C. tropicalis* täpsuseks 90% (Houang *et al.*, 1997). Odds (1994) ja Ainscough *et al.* (1998) leidsid, et söötme spetsiifilisus ja tundlikkus rohelse värvi moodustamiseks *C. albicans* liigi puhul on 100%, sinakashalli värvi moodustamiseks *C. tropicalis* puhul on >99% ja kahvatu roosa värvi moodustamiseks koos laialivalguva ja mati pealispinnaga *C. krusei* puhul on 99%. Kuid uuring näitas ka, et pärast 48 tunnist inkubeerimist ei olnud *C. tropicalis* isolaadid unikaalset värvi vastavalt sellele liigile. Sinakashalli värvi moodustasid ka *Pichia spp.* Lisaks moodustas *C. krusei* liigile iseloomuliku värvi ka kliiniliselt üliharva esinev *C. norvegensis* (Odds *et al.*, 1994). Kuigi mitmed autorid on kasutanud *CHROMagar*-it ka *C. glabrata* identifitseerimiseks, pole see siiski selleks otstarbeks soovitatav. Nii varieerus Hougan (1997) poolt läbiviidud uuringus *C. glabrata* kolooniade värvus valgest või kollasest kuni roosade ja pruunide toonideni. Kõige rohkem oli läikivaid, roosakaslillasi kolooniad, millel oli põhivärvist heledam serv. Seega eelnevatest uuringutest järeldub, et *C. glabrata* identifitseerimine *CHROMagar Candida* söötmega on komplitseeritud (Koehler *et al.*, 1999; Odds *et al.*, 1994).

1.2.3. Corn Meal Agar + Polysorbate/Tween 80 sööde

Corn Meal Agar (tootja Becton, Dickinson and Company, USA) on sööde (koostis - Lisad: Tabel 1), mida kasutatakse pärmide (*Ascomycetes: Saccharomyces, Candida; Basidiomycetes: Trichosporon, Geotrichum*) liikide samastamiseks erineva morfoloogia alusel (Murray *et al.*, 2003). *Polysorbate/Tween 80* on spetsiaalselt toodetud, et näidata *C. albicans* liigi klamüdosporide moodustumist (Murray *et al.*, 2003). Liikide määramisel tuvastatakse klamüdosporide, hüüfide, pseudohüüfide, blastosporide ja liigispetsiifilise raku kuju olemasolu (Tabel 3).

Tabel 3. *Candida* liikide identifitseerimine *Corn Meal Agar* agariga, kuhu oli lisatud reagenti *Polysorbate/Tween 80* (CMA+T) (Koehler *et al.*, 1999).

Liik	Morfoloogilised tunnused CMA+T
<i>C. albicans</i>	Esinevad klamüdosporid, mõne tüve puhul võib nende moodustamiseks aega kuluda rohkem kui 2 päeva; rohkelt pseudohüüfe; mõned tõelised hüüfid; piki pseudohüüfe on blastosporide klastrid; liigile iseloomulik välimus
<i>C. glabrata</i>	Ei moodusta pseudohüüfe ega hüüfe; rakud on ligikaudu 2,5 x 4 µm; liigile iseloomulik välimus
<i>C. tropicalis</i>	Rohkelt pseudohüüfe, mis hargnevad keskelt blastokoniidide klastritena
<i>C. krusei</i>	Ulatuslik hargnev pseudomütseel, millel on puud meenutavad piklike rakkude ahelad; piki pseudohüüfe asetsevad blastosporide ja klastrite ahelad; liigile iseloomulik välimus
<i>C. parapsilosis</i>	Piki hargnevate piklike rakkude ahelaid on blastosporide klastrid; juhuslikud suured rakud; varieeruv välimus
<i>C. guilliermondii</i>	Blastosporide klastritega pseudohüüfid; varieeruv välimus
<i>C. dubliniensis</i>	Esineb rohkelt klamüdospoore, rohkelt pseudohüüfe, mõned tõelised hüüfid, piki pseudohüüfe on blastosporide klastrid

1.2.4. API testid (tootja BioMerieux sa, Prantsusmaa)

Kolm peamist BioMerieux sa. poolt toodetavat testi, mis võimaldavad *Candida* liikide määramist on *API Candida*, *API 20C AUX* ja *ID 32 C*:

- 1) *API Candida* koosneb 12 biokeemilisest reaktsioonist, millega on võimalik identifitseerida 14 enamlevinud pärmide, neist 9 liiki kuuluvad perekonda *Candida*. Tulemused on interpreteeritavad 18-24 tunni möödudes.
- 2) *API 20C AUX* koosneb 20-st assimilatsioonitestist, millega on võimalik identifitseerida 44 taksonit (40 liiki), millest 22 taksonit (20 liiki) kuulub perekonda *Candida*. Tulemused loetakse 48-72 tunni möödudes.
- 3) *ID 32 C* koosneb 32-st assimilatsioonitestist, millega on võimalik identifitseerida 62 taksonit (61 liiki), millest 37 taksonit (36 liiki) kuulub

perekonda *Candida*. Tulemused on interpreteeritavad 24-48 tunni möödudes (Lisad: Tabel 2).

Kõik kliiniliselt olulised *Candida* liigid nagu *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. famata* ja *C. guilliermondii* on tootja spetsifikatsiooni kohaselt identifitseeritavad nii *API Candida*, *API 20C AUX* kui ka *ID32 C* testidega. Koehler (1999) võrdles *API 20 C AUX* ja *API 32C* teste ja leidis, et API testid polnud võimelised identifitseerima *C. dubliniensis* ja *P. wickerhamii* liike kuna andmebaasis need puudusid. Mõlemad API testid määrasid valesti ka ühe viiekümnest *germ tube* positiivse *C. albicans* isolaadist ja identifitseerisid selle kui *C. parapsilosis*. Kõigi testide puuduseks oli ka asjaolu, et nii *C. krusei* kui ka *C. guilliermondii* samastati väga madala usaldatavuse määraga.

1.3. *Candida* spp. genoom *C. albicans* näitel

Candida albicans on diploidse genoomiga anamorf ehk seen, mille suguline tsükkel pole teada. Seen tagab järglaste geneetilise mitmekesisuse genoomi ümberkorraldamisega, mille põhilisteks allikateks on deletsioonid ja mutatsioonid s.h. nii punktmutatsioonid kui ka DNA fragmentide insertsioonid (Gil-Lamagnere *et al.*, 2003). Kuni 1999. aastani, mil Hull ja Johnson näitasid MTL (ingl. k. *mating type-like*) lookuse olemasolu (Hull *et al.*, 1999), arvati, et *C. albicans* on asekuaalne seen.

Haploidse *Candida* DNA suurus koos mitokondriaalse DNA-ga on 14-18 Mbp (Scherer *et al.*, 1990). Liigil *C. albicans* on varieeruv karüotüüp ja kromosoomid sisaldavad keskmiselt korduva DNA järjestusi, mida nimetatakse MRS (ingl. k. *Major Repeat Sequence*). MRS koosneb alakordustest HOK, RPS ja RB2. Nendest RPS on tandeemselt korduv ja teda leidub kõigis kromosoomides välja arvatud kolmandas. RPS sisaldab mitmeid SfiI restriksioonikohti, mis on üksteisest 0,2 Kbp kuni 1,1 Kbp kaugusel. HOK ja RB2 esinevad üks kord iga MRS-i kohta. Kolmandas kromosoomis puudub peale RPS järjestuse ka HOK järjestus. On näidatud, et muutustes, mis viivad liigi *C. albicans* karüotüübi mitmekesisusele, mängib peamist rolli MRS. Korrelatsioon karüotüübi ja fenotüübi mitmekesisuse vahel tõestati alles 1998. aastal kui, Janbon *et al.* leidsid seotuse 5 kromosoomi ühe homoloogi kaotuse või osalise deletsiooni ja sorboosi assimilatsiooni vahel (Janbon *et al.*, 1998).

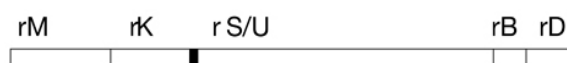
C. albicans genoomis puuduvad ulatuslikult liitelised (ingl. k. *spliced*) geenid ja

suhteliselt vähestel esineb introneid. Keskmise polümorfismi sagedus on üks 237 aluspaari kohta, mis on tunduvalt kõrgem võrreldes inimesega. *C. albicans* ulatusliku alleelilise erinevuse tähtsus on siiani teadmata, kuid see võib põhjustada geneetilise varieeruvuse suurenemist ja aidata kaasa ravimresistentsuse evolutsioonile. Genoomi polümorfismid on jaotatud sarnaselt inimese genoomile ebahütlaselt üle genoomi. Kolmanda ja seitsmenda kromosoomi madal üldine polümorfismi tase on tingitud väga suurest üksteise lähedal asetsevatest homosügootsetest regioonidest. *Candida* perekonna seentel puuduvad erinevalt teistest patogeenidest antigeneetilise variatsiooniga seotud suured geeniperekonnad. Neil on ainult patogeensusega seotud suured geeniperekonnad, mis koosnevad ALS (ingl. k. *agglutinin-like sequence*), raua transpordi, sekreteeritava aspartülproteinaasi ja lipaasi geenidest (Jones *et al.*, 2004).

Väikeste kromosoomide ulatuslik varieeruvus näitab, et liigil puudub standardne karüotüüp. Karüotüübi varieerumise molekulaarsed mehhanismid on veel selgitamisel. Erinevaid *C. albicans* isolaate võrreldes on leitud, et põhiline karüotüüpide erinevus seisneb R kromosoomi erinevas suuruses. Leidub ka mitmeid tüvesid, mis erinevad genoomi poolest põhiosa moodustavatest tüvedest, millel on kaheksa kromosoomi paari (Scherer *et al.*, 1990). *C. albicans* kromosoomid alates suuremast on (<http://alces.med.umn.edu/Candida.html>; 04. juuli 2007):

Kromosoom R

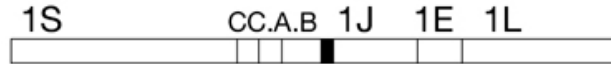
R on liigi *Candida albicans* suurim kromosoom, mille minimaalseks suuruseks on 2 287 713 bp ja see koosneb ühest rDNA koopiasist ning neljast ensüümi SfiI fragmendist: M,+K, U, B ja D (Joonis 1). Fragment U sisaldab ribosomaalse DNA tsistroni klastrit, mille tsistronite hulk võib ulatuda 110 koopiani ühe diploidse raku kohta. Kromosoomil R on üks MRS, mis asub K ja U fragmendi vahel. Tsentromeer paikneb rDNA-st 140 Kbp vasakul ja üksik RB2 asetseb järgmised 35 Kbp tsentromeerist. Selle kromosoomi kaks homoloogi ei ole alati ühe suurusega ja seega võib kromosoom asetseda pulssvälja geelelektroforeesi (PFGE) geelil kahes kohas. Enamasti on suurim bänd üks kromosoom R homoloogidest.



Joonis 1. Liigi *C. albicans* R kromosoomi SfiI restriksiooni kaart, kus peenikesed jooned on SfiI restriksiooni saidid ja jäme joon MRS-i asukoht.

Kromosoom 1

Esimene kromosoom, mille pikkuseks 3 190 737 bp koosneb seitsmest ensüümi SfiI fragmendist (S, C2, A, B, J, E ja L) ning sisaldab B ja J fragmentide vahel ühte MRS-i (Joonis 2). MRS-ist 100-120 Kbp vasakul paikneb tsentromeer.



Joonis 2. Liigi *C. albicans* esimese kromosoomi SfiI restriktsooni kaart, kus peenikesed jooned on SfiI restriktsooni saidid ja jäme joon MRS-i asukoht.

Kromosoom 2

Teise kromosoomi suuruseks on 2 231 231 bp ja see koosneb kahest SfiI fragmendist (U ja A), mis on eraldatud MRS lookusega (Joonis 3). MRS-ist 210 Kbp vasakul paikneb tsentromeer.



Joonis 3. Liigi *C. albicans* teise kromosoomi SfiI restriktsooni kaart. Jäme joon tähistab MRS-i asukohta ja katab SfiI restriktsooni saidi peenikest joont.

Kromosoom 3

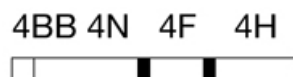
Kolmas kromosoom on 1 798 341 bp pikk ja koosneb kahest SfiI fragmendist: P ja O (Joonis 4). See on ainuke *C. albicans* kromosoom, millel puudub täielik MRS-i koopia, kuna puudub RB2, mis on üks MRS komponentidest. Erinevalt teistest kromosoomidest on kolmas kromosoom väga homosügootne.



Joonis 4. *C. albicans* kolmanda kromosoomi SfiI restriktsooni kaart, kus peenike joon on SfiI restriktsooni sait.

Kromosoom 4

Neljas kromosoom koosneb neljast SfiI fragmendist: BB, N, F2 ja H ja on 1 622 837 bp pikk (Joonis 5). Üks MRS paikneb N ja F2 ja teine F2 ja H fragmendi vahel. Tsentromeer asub 100 Kbp kaugusel N/F2 MRSist. SfiI sait 4BB ja 4N vahel võib mõnedel tüvedel puududa.



Joonis 5. *C. albicans* neljanda kromosoomi SfiI restriktiooni kaart, kus peenikesed jooned on SfiI restriktiooni saidid ja jäme joon MRS-i asukoht.

Kromosoom 5

Liigi *C. albicans* väga heterosügootne viies kromosoom on 1 190 506 bp suur ja koosneb kahest SfiI restriktiooni saidist (M ja I) (Joonis 6). Fragmente eraldab üksteisest üksik MRS, millest 350 Kbp vasakul paikneb üksik RB2. MRS-ist 250 Kbp vasakul paikneb aga tsentromeer. SfiI restriktiooni sait on tegelikult saitide klaster ning I ja M fragmentide vahel võib olla märkimisväärne kogus DNA-d.



Joonis 6. Liigi *C. albicans* viienda kromosoomi SfiI restriktiooni kaart, kus jäme joon MRS-i asukoht.

Kromosoom 6

Kromosoom 6 on suurusega 1 032 875 bp ja koosneb kahest SfiI fragmendist (O ja C), mis on eraldatud üksiku MRS-iga (Joonis 7). Tsentromeer paikneb 6C telomeerist 50 Kbp vasakul.



Joonis 7. Liigi *C. albicans* kuuenda kromosoomi SfiI restriktiooni kaart, kus jäme joon MRS-i asukoht.

Kromosoom 7

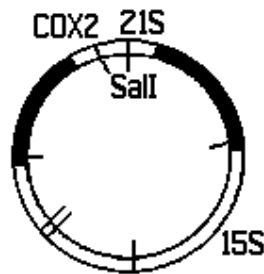
Kromosoom 7 on kaheksast kromosoomist väikseim ja sisaldab nelja SfiI fragmenti (C, A, F ja G) ja kahte MRS järjestust (Joonis 8). Kromosoomi kogupikkuseks on 949 626 bp ja korduvjärjestused 7A – 7F ja 7F – 7G SfiI frgmentide vahel on orienteeritud ümberpööratult. Mõnedel tüvedel puudub kromosoomis SfiI sait C ja A vahel ning toodetakse hoopis fragment D.



Joonis 8. Liigi *C. albicans* seitsmenda kromosoomi SfiI restriktiooni kaart, kus peenikesed jooned on SfiI restriktiooni saidid ja jäme joon MRS-i asukoht.

Mitokondriaalne genoom

Liigi *C. albicans* mitokondriaalne DNA on ringikujuline ja selle ligikaudne suurus on 40 Kbp. Sarnaselt liikidele *Saccharomyces cerevisiae* ja *C. glabrata*, on ka liigil *C. albicans* tsütokroomi oksüdaasi geenil kaks alampiirkonda (COX1 ja COX2) ning maturaasi geen Clark-Welker *et al.*, 1983 (Joonis 9).



Joonis 9. Liigi *Candida albicans* mitokondriaalse DNA ehitus (Sal I restriktsoonisaidid asuvad 15S ja 21S alaühiku ja COX2 juures).

1.4. Epidemioloogiline genotüüpiseerimine ja varieeruvus

Candida infektsioonide epidemioloogia jälgimiseks ja kontrolli põhialuseks on sobiva tüpiseerimismeetodi olemasolu. Isolaatide tüpiseerimise eesmärgiks on tõestada erinevate isolaatide geneetilist sarnasust, mis on väga oluline epidemioloogilistes uuringutes, eriti aga hospitaalinfektsioonide leviku jälgimisel. Just võitluses viimastega on geneetilise tüpiseerimise meetodid tänapäeval laialdaselt kasutusel (Bingen *et al.*, 1993). Nende hulka kuulub mitu geneetikal põhinevat meetodit, näiteks DNA restriktiooni fragmentide pikkuse polümorfism, PCR-põhinevad meetodid, PFGE (ingl. k. *pulse-field gel electrophoresis*) isoensüümide profiilid ja *Southern blot* hübridisatsioon koos korduvate DNA proovidega. Hetkel pole neist siiski ükski epidemioloogiliste uuringute kuldseks standardiks (Rho *et al.*, 2004). Lupetti võrdles REA (ingl. k. *restriction enzyme analyses*) ja PFGE meetodeid ning leidis, et REA-ga oli eristatav 17 *C. albicans* tüve tüüpi ja PFGE-ga 23 tüve. Järeldati, et PFGE meetod annab unikaalseid kromosomaalsete fragmentide mustreid, mida saab kasutada kliiniliste isolaatide eristamiseks (Lupetti *et al.*, 2001). Chen *et al.* (2005) võrdles erinevaid meetodeid, et teha kindlaks, milline molekulaarne tüpiseerimise meetod sobib liigi *C. albicans* geneetilise suguluse uurimiseks. Kõige parem tulemus saadi PFGE kasutamisel koos BssHII ensüümiga, mille abil eristati 40 genotüüpi, sellele järgnesid PFGE koos ensüümiga SfiI (35 genotüüpi), rep-PCR (32 genotüüpi) ja

PFGE karütütüpeerimine (19 genotüüpi) (Chen *et al.*, 2005).

Karütütüpeerimist ehk seente kromosoomide separeerimist geelil kasutakse seenhaiguste puhangute uuringutes. Kromosoomide suuruse varieerumist erinevatel seene tüvedel saab uurida kasutades PFGE-d. Seda on võimalik kasutada geneetiliselt sarnaste *Candida* isolaatide eristamiseks üksteisest. Näiteks ei teatud kuni viimase ajani, kas muutused raskekujulise immuunpuudulikkusega patsientidel liigi *C. albicans* isolaatide karütütübis tulenevad karütütübi ümberkorraldusest või nakatumisest uue organismiga. Gottfredsson *et al.* (1998) analüüsisid perioodiliselt *C. albicans* isolaate ühel ja samal patsiendil kasutades karütütüpeerimist ja näitasid, et nakatumine toimus alati uue tüvega (Gottfredsson *et al.*, 1998). On näidatud, et karütütüpeerimine on kliiniliselt oluliste *Candida* isolaatide nagu näiteks *C. glabrata* eristamisel parem meetod kui REA kuna bändide lahutusvõime on suurem. Seentel aga, millel on vähe kromosoomi (näiteks *C. albicans*, millel on 7-8 kromosoomi ja *Cryptococcus neoformans*, millel on 7-13 kromosoomi) on karütütüpeerimine probleemne, kuna kromosoomide väike arv vähendab meetodi efektiivsust (Gottfredsson *et al.*, 1998).

Genoomse DNA restriksioonianalüüs pulssvälja geelelektroforeesiga on genoomi makrorestriksiooni fragmentide analüüs, mis võimaldab lihtsustatud kromosomaalsete restriksioonifragmentide mustri tekitamist. DNA-d lõikavat ensüümi kasutatakse suurte DNA fragmentide lahutamiseks, mis eraldatakse spetsiaalsete elektroforeetiliste protseduuridega. Elektrivälja tekitamiseks kasutab PFGE elektroode, mis paiknevad kuusnurga kujuliselt (120° C nurga all). DNA fragmendid liiguvad geelil otsejoones, ilma kõrvalekaldeta. Meetod võimaldab eraldada fragmente suuruses 200 Kbp kuni 12 Mbp. DNA analüüsil PFGE meetodiga on kolm põhilist kasutuseesmärki: (1) kromosoomi füüsilise kaardi tegemine kasutades genee proovidena; (2) varem kloonimata lookusesse inserteeritud transposoonide kaardistamine; (3) epidemioloogiliste uuringute teostamine (Persing *et al.*, 1993).

PFGE analüüsiks ei sobi traditsioonilised DNA eraldamise meetodid, mis põhjustavad DNA lagunemise, kuna vajalik on tervikliku DNA-ahela olemasolu. DNA isoleerimise protseduur hõlmab seene paigutamist agaroshammastesse (ingl. k. *plug*), rakkude lüüsimist ensüümide ja detergentidega ning teiste koostisosade eemaldamist pesemisega (Persing *et al.*, 1993). PFGE meetodit on kasutatud mitmete *Candida* liikide genotüpeerimiseks ja liigisiseste erinevuste leidmiseks, kuid siiani ei ole leitud PFGE protokollide parameetreid, mis sobiksid mitmele erinevale liigile. Näitkes uuris Jang (2005) *C. tropicalis* puhangut, kus kasutati restriksiooniks ensüümi BssHII ja pulsi kestvuseks oli

6V/cm pinge juures valitud 5 ja 50 sekundit, kestvuseks 20 tundi ja puhvri temperatuuriks 14° C. Dib *et al.* (1996) kasutasid aga *C. rugosa* puhangu uurimisel ensüümi SfiI ja pulsi kestvuseks oli valitud 185V pinge juures 1 ja 38 sekundit, kestvuseks 17 tundi ja puhvri temperatuuriks 14° C. *C. albicans* analüüsimisel valiti pingeiks 180V, pulsi kestvuseks 6 ja 50 sekundit, kestvuseks 36 tundi ja toimumistemperatuuriks 14° C. Selle meetodi peamiseks puuduseks loetakse küll organismide/liikide omavahelise võrdlemise puudulikkust, kuid liigisisese varieeruvuse uurimisel pole see oluline. Teiseks puuduseks loetakse, et meetod vajab erinevuste eristamise kriteeriume. Kuna geneetilise varieeruvuse uurimisel on eesmärgiks otsida isolaatide vahelisi erinevusi võib seda pidada pigem eeliseks. Kolmandaks puuduseks loetakse, et tulemused pole laborite vahel võrreldavad. Kui kõik uurimusrühmad kasutaks ühtset PFGE meetodikat, oleks ka laborite vahelised tulemused võrreldavad. PFGE peamiseks eeliseks on suurte fragmentide eraldamise võime, mis on *Candida* seente puhul vajalik, kuna nende genoom on bakterite omast tunduvalt suurem. Teiseks eeliseks on meetodi võime uurida kogu genoomi korraga, mis näiteks PCR puhul pole võimalik. Väga suureks eeliseks on võimalus muuta PFGE toimumise parameetrid. See muudab teostamise küll keerukamaks, kuid annab samas suure eelise varieeruvuse uurimisel (Gottfredsson *et al.*, 1998).

1.4.1. Genoomse DNA restriktiooni endonukleasse analüüsi restriktiooni ensüümi valik

Restriktiooniks valitakse ensüüm, mis tekitab vähesel hulgal pikki restriktiooni fragmente. Sobivad ensüümid tunnevad ära spetsiifilisi 8-(NotI, SfiI) või 6-aluselisi järjestusi (SmaI, ApaI, BssHII); nende valik sõltub DNA G+C sisaldusest. Agaroshambad, mis sisaldavad restrikteeritud DNA-d on sobivad PFGE teostamiseks (Persing *et al.*, 1993). Decré *et al.* (1998) analüüsisid oma uuringus erinevaid restriktiooniensüüme (XbaI, SpeI ja NotI) ja leidis, et ainult XbaI ja SpeI moodustasid PFGE mustri, mida oli lihtne analüüsida. Kui restriktiooniensüümid lõikavad liiga tihedalt, pole võimalik fragmente eristada ja PFGE ei anna tulemusi. Õige restriktiooniensüümi valik sõltub küll liigiomase DNA järjestuse G+C sisaldusest, kuid tuleb arvestada ka asjaoluga, et ensüümid, mis tunnevad 8-aluselisi järjestusi lõikavad ebaühtlasemalt, kui ensüümid, mis tunnevad 6-aluselisi saite (Persing *et al.*, 1993). Viimase kolme aasta jooksul on kõige enam kasutatavateks ensüümideks SfiI ja BssHII. Näiteks nii Shin *et al.* (2005), kui ka Rho *et al.* (2004) on oma uurimustes kasutanud

paraleelselt mõlemat ensüümi (Rho *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2005).

1.4.1.1. Restriksiooniensüüm SfiI

5'-G G C C N N N N[^]N G G C C-3'
3'-C C G G N[^]N N N N C C G G-5'

Joonis 10. Restriksiooniensüümi SfiI äratundmissait koos lõikamiskohaga (^).

Restriksiooniensüüm SfiI on ensüüm, mida on laialt kasutatud nii bakterite, kui ka pärmide kromosoomide lõikamiseks (Joonis 10). Chibana (1994) poolt läbiviidud uuringus näidati, et *Candida* SfiI saidid on kõrgelt konserveerunud erinevate kromosoomide RPS järjestustes, mida leidub kõigis kromosoomides välja arvatud kolmandas (Chibana *et al.*, 1994). On näidatud ka, et RPS on tandeemselt korduv järjestus SfiI fragmentide vahel viiendas ja seitsmendas kromosoomis (Chindamporn *et al.*, 1995; Chindamporn *et al.*, 1998). Kanellopoulou *et al.* (2001) on näidanud, et see ensüüm on sobiv *C.albicans*-i ideentifitseerimiseks, kuid nii Shin *et al.* (2005) kui ka Rho *et al.* (2004) uuringud on tõestanud, et ensüüm BssHII on veel efektiivsem.

1.4.1.2. Restriksiooniensüüm BssHII

5' -G[^]C G C G C- 3'
3' -C G C G C[^]G- 5'

Joonis 11. Restriksiooniensüümi BssHII äratundmissait koos lõikamiskohaga (^).

Ensüüm tunneb ära spetsiifilise 6 aluselise järjestuse (Joonis 11). Rho (2004) ja Jang (2005) kasutasid BssHII-te *C. tropicalis* kandideemia epidemioloogiliseks analüüsimiseks (Rho *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2005). Shin *et al.* (2005) uurisid aga verest isoleeritud *C. albicans* isolaatide molekulaarset epidemioloogiat ja leidis, et kõige suurem eristamiseefektiivsus on ensüümiga BssHII (0,962), sellele järgneb SfiI (0,953) ja karütüpiseerimine (0,835) (Shin *et al.*, 2005).

1.4.1.3. PFGE muster ja selle interpreteerimine

Haiguspuhangu käigus võivad PFGE mustrit muuta mitmed geneetilised sündmused, nagu näiteks DNA punktmutsatsioonid, insertioonid või deletsioonid. Kõige sagedasemad muutused toimuvad R kromosoomi pikkuses, mis sisaldab ribosomaalse DNA tsistroni. Arvatavasti on selle põhjuseks mitmete rDNA koopiade vahel toimuv rekombinatsioon. Üks spontaanse mutatsiooniga tüvi võib pidevalt toota tohutul hulgal muudetud karüotüüpe, mille tulemusena tekib palju erinevaid fenotüüpe (Rustchenko-Bulgac *et al.*, 1991). Iga vähemalt 10 eristatava fragmendiga tüve PFGE muster liigitatakse ühte neljast kategooriast (Tabel 4):

Tabel 4. PFGE fragmentide mustri geneetiliste muutuste võimalused (Tenover *et al.*, 1995).

Geneetiline muutus	PFGE mustri erinevus võrreldes puhangu tüvede mustriga
Punktmutsatsiooni tulemusel tekib uus restriktsoonisait	Ühest fragmendist tekib kaks väiksemat fragmenti - kolmefragmendiline erinevus.
Punktmutsatsiooni tulemusel kaob restriktsooni sait	Kaks väiksemat fragmenti kaovad ja tekib üks uus suur fragment - kolmefragmendiline erinevus.
DNA insertioon olemasolevasse restriktsooni saiti, kusjuures uus DNA ei sisalda restriktsooni saiti	Fragmentide arv on sama, kuid üks väike fragment kaob ja üks uus suur fragment tekib kahefragmendiline erinevus, mida nimetatakse ka fragmendi nihkeks.
Fragmendi sisene DNA deletsioon ilma restriktsooni saidi kadumiseta	Suure fragmendi kadumine ja väiksema fragmendi tekkimine - kahefragmendiline erinevus.

Kuna PFGE-ga eristamiseks peavad molekulide suurused erineva vähemalt 10 Kbp, võib järeldada, et suured DNA regioonid esinevad ühes ja puuduvad teises homoloogis. *Candida* tüvede eristamine PFGE abil on võimalik tänu *Candida* ulatusliku DNA polümorfismi tõttu (Scherer *et al.*, 1990). Isolaatide suguluse määramiseks kasutatakse Tenover *et al.* poolt välja töötatud tulemuste tõlgendamist (Tabel 5):

Tabel 5. PFGE mustri tulemuste tõlgendamine. Isolaadid on kindlasti suguluses kui neil on kolm või vähem PFGE fragmendi erinevust. Kui esineb neli kuni kuus DNA fragmendi erinevust on tüved tõenäoliselt suguluses. Isolaadid ei ole omavahel seotud kui võrdlemisel esineb üle seitsme erineva fragmendi (Tenover *et al.*, 1995).

	Geneetiliste erinevuste arv võrreldes puhangut põhjustava tüvega	Enamlevinud fragmentide erinevuste arv võrreldes puhangut põhjustava tüvega	Epidemioloogiline hindamine
Eristamatud	0	0	Tüvi on puhangu osa
Lähedalt seotud	1	2-3	Tüvi on tõenäoliselt puhangu osa
Tõenäoliselt seotud	2	4-6	Tüvi võib olla puhangu osa
Erinevad	≥ 3	≥ 7	Tüvi ei ole puhangu osa

1.4.2. Mikroevolutsioon

Mikroevolutsiooniks nimetatakse 1-3 fragmendilisi restriktiooni mustri muutusi ühe tüve piires ja seda on täheldatud kuni kolmandikul *C. albicans* kandideemiaga patsientidest (Marco *et al.*, 1999; Shin, *et al.*, 2004). Mikroevolutsiooni põhjusteks võivad olla nii kolonisatsiooni/infektsiooni kestvus, kuid ka tüvede geneetiline stabiilsus peremeesorganismis (Shin *et al.*, 2004). See on korduvaid RPS elemente hõlmava genoomse ümberpaiknemise tulemus. Nii Tanaka *et al.* (1997), Struelens *et al.* (1998) kui ka Reiss *et al.* (1998) kasutasid PFGE-d *Candida* liikide mikroevolutsiooniliste muutuste uurimiseks. Ka Shin näitas, et PFGE restriktiooniensüümiga BssHII on efektiivsem mikroevolutsioonide uurimiseks, kui Ca3 DNA *fingerprinting* (Shin *et al.*, 2004).

1.5. *Candida* tähtsus infektsiooni tekitajana

Kandideemia suremusmäär nii laste kui ka täiskasvanute seas võib varieeruda 20 – 50%-ni (Levy *et al.*, 1998). Süsteemne kandidaas tekib 1,6 - 4,5%-il madala sünnikaaluga (≤ 1500 g) imikutest (Rowen *et al.*, 1999). Kui Stamos (1995) uuringus oli lastel enamlevinud liigiks *C. albicans*, siis Levy *et al.* (1998) leidsid, et lastel esines kõige rohkem *C. parapsilosis* isolaate (Stamos *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 1998). Benjamin *et al.* (2006) uuris neonataalset kandidaasi väga madala sünnikaaluga lastel (< 1000 g) ja leidis, et 7%-il (4579-st 320-l) imikutest tekkis kandidaas, nendest 96%-il (307-l) isoleeriti verest *Candida*. Kõige enam põhjustas kandideemiat *C. albicans*, millele järgnesid *C.*

parapsilosis ja *C. tropicalis* (Benjamin *et al.* 2006). Ka Sandven *et al.* (2006) uuris kandideemiat Norras aastatel 1991 kuni 2003, kuid kumbki ei uurinud kandideemia molekuraaset epidemioloogiat. Eestis on uuritud *Candida* levikut ja protsentuaalset jaotumust [Sepp *et al.* (2003) järgi oli Tartu lastehaigla intensiivravi osakonnas *Candida* osakaal 15% ja Tallinna lastehaigla intensiivravi osakonnas 2%], kuid liigilist jaotumust ja molekulaarset epidemioloogiat pole siiani uuritud ei täiskasvanutel, ega lastel.

Tänaeni on vähesed uurinud *Candida* mikroevolutsioonilisi muutusi (Marco *et al.*, 1999; Shin, *et al.*, 2004) ning senised andmed on ebapiisavad ja pole teada missuguses ulatuses esineb mikroevolutsioonilisi muutusi infektsiooni või kolonisatsiooni vältel.

Mitmed uurimisgrupid (Voss *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2004; Rho *et al.*, 2004 jt.) on analüüsinud *Candida* molekulaarset ja epidemioloogilist jaotumust ning isolaatide omavahelisi seoseid PFGE abil, kuid enamasti on iga *Candida* liigi jaoks välja töötatud eraldi meetodika ja parameetrid. Kuna PFGE kõige suuremaks puudseks on laborite vaheline ühildamatus, annaks ühtne meetodika, mis sobiks mitmete *Candida* liikide uurimiseks, võimaluse vähendada laborite töömahtu, kuna poleks vaja iga liigi puhul töötada välja eraldi parameetrid. PFGE jaoks pole siiani kinnitatud universaalset meetodika, kuid selle olemasolul oleks võimalik ka tulemuste laborite vaheline võrdlus ja ühildatavus.

2. Töö eesmärgid

Töö üldine eesmärk oli kirjeldada Eesti lastehaiglate intensiivravi osakondades levivaid *Candida* liike ja töötada välja sobiv meetodika nende molekulaarseks uurimiseks.

Spetsiifilised eesmärgid:

- 1) Kirjeldada 22. aprillist 1999 kuni 24. aprillini 2003 Tartu Ülikool Kliinikumi Anestesioloogia- ja intensiivravi kliiniku lasteintensiivravi osakonnas (LIRO) ning 1. märtsist 28. novembrini 2005 LIROs ja Tallinna Lastehaigla intensiivravi osakonnas viibinud haigetelt kliinilistel näidustustel isoleeritud *Candida* tüvede feno- ja genotüübilist struktuuri;
- 2) Töötada välja ühtne PFGE (ingl. k. *Pulsed field gel electrophoresis*) meetodi protkoll, mis sobib erinevate *Candida* liikide molekulaarseks võrdlemiseks;
- 3) Kasutades genotüübilist samastamist selgitada välja, kas lasteintensiivravi osakondades on esinenud *Candida* tüvede nosokomiaalset levikut;
- 4) Leida, kas erinevatel aegadel ja erinevatest keha piirkondadest isoleeritud sama patsiendi isolalaatidel on toimunud mikroevolutsioonilisi muutusi.

3. Materjal ja meetoodika

3.1. *Isoleeritud tüved ja nende säilitamine*

Uurimustöö materjaliks kasutati Tartu ja Tallinna lastehaigla intensiivravi osakonna 56-lt patsiendilt kliinistel näidustustel võetud materjalist isoleeritud 83 *Candida* isolaati. Materjal trahheast või haavast võeti tampooniga transportsöötmesse, peritoneaal-dialüsaadi lahus ja uriin koguti steriilsesse katsutisse ning veri ja pleuraõõne vedelik Bactec süsteemi pudelitesse. Tüved isoleeriti ja identifitseeriti esmalt kas SA Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabori (TÜKÜ) või SA Põhja-Eesti Regionaalhaigla (PERH) kliinilise mikrobioloogia laboris.

Pärast analüüsimist säilitati isolaadid 4° C juures (TÜKÜs steriilses vees ja PERHis krüoviliaalides). Järgnevad uuringud säilitatud materjalist toimusid Tartu Ülikooli Mikrobioloogia Instituudis (TÜMI), kus isolaate kasvatati 30° C juures 48 tundi, korrates seda protsessi kaks korda; isolaadid säilitati edasisteks uuringuteks Skim Milk Powder (tootja Oxoid Ltd, Inglismaa) söötme pulbrist tehtud 10% lahuses -20° C juures.

3.2. *Liikide identifitseerimine*

Kliinilise materjali esmaskülvid ja seeneliikide määramine toimus TÜKÜ-s ja PERH-is. Kuna tegemist oli alates 1999. aastast kogutud materjaliga, isoleeriti ja identifitseeriti kõik tüved TÜMI laboris käesoleva uuringu alguses uuesti.

3.2.1. Liikide määramine CHROMagar Candida ja Corn Meal Agar +

Polysorbate/Tween 80 (tootja Becton, Dickinson and Company, USA) söötmetega

Esmalt külvati säilitatud isolaadid *Sabouraud Dextrose Agar* (tootja Oxoid Ltd, Inglismaa) agarile ja inkubeeriti 48 tundi 30° C juures. Nimetatud protseduuri korrati kaks korda. Seejärel külvati isolaadid *CHROMagar Candida* agarile ja inkubeeriti 48 tundi 37° C juures. Kõik rohelised pesad külvati järgnevalt *Corn Meal Agar* (tootja Becton, Dickinson and Company, USA) agarile, millele oli *C. albicans* ja *C. dubliniensis* liikide eristamiseks lisatud reagenti *Polysorbate/Tween 80* (tootja Becton, Dickinson and Company, USA) (CMA+T). Isolaadid külvati trellide kujuliselt agarile, kaeti katteklaasiga

ja inkubeeriti vähemalt 48 tundi 25° C juures. Seejärel eristati *C. dubliniensis* liigid *C. albicans*'ist mikroskoobi abil klamüdospooride hulga alusel (*C. dubliniensis*-el on neid tunduvalt rohkem kui *C. albicans*-il) (Tabel 6). Isolaatidele, mis roheliseks ei värvunud teostati *API Candida* (tootja BioMerieux sa, Prantsusmaa) test.

Tabel 6. *Candida* liikide identifitseerimine *CHROMagar Candida* (CaC) söötme ja *Corn Meal Agar* agariga, kuhu oli lisatud reagenti *Polysorbate/Tween 80* (CMA+T) (Koehler *et al.*, 1999).

Liik	Koloonia iseloomustus CaC	Morfoloogilised tunnused CMA+T	Samastamine Cac ja CMA+T-ga
<i>C. albicans</i>	Õunarohelised kolooniad; liigile iseloomulik välimus	Esinevad klamüdospoorid, mõne tüve puhul võib nende moodustamiseks aega kuluda rohkem kui 2 päeva; rohkelt pseudohüüfe; mõned päris hüüfid; piki pseudohüüfe on blastospooride klastreid; liigile iseloomulik välimus	Mõlema söötmega on võimalik liigi täpne identifitseerimine
<i>C. glabrata</i>	Suured läikivad kolooniad, mille värvus varieerub heleroosast purpurpunaseni	Ei moodusta pseudohüüfe ja hüüfe; rakud on ligikaudu 2,5 x 4 µm; liigile iseloomulik välimus	Täpne identifitseerimine morfoloogiliste tunnuste alusel
<i>C. tropicalis</i>	Tuhmsinised kolooniad, mis võivad harva olla ka roosad; Moodustavad purpurpunase halo, mis on difundeerunud ümbritsevasse söötmesse	Rohkelt pseudohüüfe, mis hargnevad keskelt blastokoniidide klastritena	Täpne identifitseerimine CaC söötmega
<i>C. krusei</i>	Suured, lamedad, mati pealispinnaga ja laialivalguvad heleroosad pesad; liigile iseloomulik välimus	Ulatuslik hargnev pseudomütseel, millel on piklike rakkude ahelad meenutades puud; blastospooride ja klastrite ahelad piki pseudohüüfe; liigile iseloomulik välimus	Mõlema söötmega on võimalik liigi täpne identifitseerimine
<i>C. parapsilosis</i>	Kolooniad on värvuselt valged kuni heleroosad; varieeruv välimus	Piki hargnevate piklike rakkude ahelaid on blastospooride klastrid; juhuslikud suured rakud; varieeruv välimus	Pole alati võimalik identifitseerida
<i>C. guilliermondii</i>	Väikesed, värvuselt roosad kuni purpurpunased kolooniad; varieeruv välimus	Blastospooride klastritega pseudohüüfid; varieeruv välimus	Pole alati võimalik identifitseerida
<i>C. dubliniensis</i>	Tumerohelised kolooniad	Esineb rohkelt klamüdospoore, rohkelt pseudohüüfe, mõned päris hüüfid, piki pseudohüüfe on blastospooride klastrid	Mõlema söötmega on võimalik liigi täpne identifitseerimine

3.2.2. Identifitseerimine *API Candida* (tootja BioMerieux sa, Prantsusmaa) testiga

Isolaadid külvati *Sabouraud Dextrose Agar* agarile ja inkubeeriti 48 tundi 30° C juures. Niiske atmosfääri tekitamiseks pandi igasse API testi inkubatsiooni karpi 5 ml destilleeritud vett. Järgnevalt valmistati 0,85% NaCl lahusesse seene suspensioon tihedusega 3 McF ja pipeteeriti kambritesse. Anaeroobse keskkonna tekitamiseks lisati glükoosi, galaktoosi, sahharoosi, trehhaloosi, rafinoosi ja urea kambritele immersiooniõli. Tulemusi loeti 18-24 tunni möödudes.

3.3. PFGE meetoodika väljatöötamine

PFGE meetoodika väljatöötamisel lähtuti *Genepath Group 4 Reagent Kit*-ist (tootja Bio-Rad Laboratories, Prantsusmaa), mis on tootja spetsifikatsiooni kohaselt ettenähtud *Candida* isolaatide karüotüüpiseerimiseks. Teostati järgnevad protseduurid:

- Esmalt kasvatati isolaadid *Sabouraud Dextrose* söötmel vastavalt eelpoolkirjeldatule. Seejärel isoleeriti üks pesa, mida inkubeeriti 10 ml rikastussöötmes (*Thioglycollate medium USP*; tootja Oxoid Ltd, Inglismaa) 30° C juures 48 tundi.
- Rakkude pesemiseks valmistati suspensioonid, mille tiheduseks 620 nm juures oli $1,52 \pm 0,2$ Abs. Seejärel tsentrifugeeriti 1 ml suspensiooni 2 minuti jooksul kiirusel 12000 rpm ja eraldati supernatant.
- Agarooshammaste valmistamiseks suspenseeriti sade 150 µl rakususpensiooni puhvris ja tasakaalustati inkubeerides seda 50° C juures kuni 15 minutit. Järgnevalt lisati 6 µl lütikaasi ja 50-kraadist agarooshamba geeli ning pipeteeriti lahus agarooshammaste vormidesse.
- Peale agarooshammaste tahenemist teostati rakkude lüüs 500 µl lüüspuhvris 20 µl lütikaasiga. 1-tunnise lüüsi järgselt pesti agarooshambad ühekordses pesupuhvris ja teostati 16 kuni 20-tunnine lüüs 20 µl proteinaas K-ga 500 µl proteinaas K puhvris.
- Järgnevalt nimetatud lahus eemaldati, lisati 1ml pesupuhvrit ja pesti õrnalt loksuvas asendis 1 tunni jooksul. Pesemist korrati kolm korda.

3.3.1. Karüotüüpiseerimine

Esiteks teostati *Gene Path* süsteemis (tootja Bio-Rad Laboratories, Prantsusmaa) kromosomaalne elektroforees *C. guilliermondii* isolaatidega 0,5 kordses TBE puhvris. Seejärel värviti geel etiidumbromiidi lahuses (20 µl/ 400 ml) ja pildistati UV valguses. Karüotüüpiseerimist korrati kaks korda, kuid karüotüüpiseerimismustri korduval väga kiirel hajumisel ühe minuti jooksul teostati edaspidine meetoodika väljatöötamine CHEF-DR II (tootja Bio-Rad Laboratories, Prantsusmaa) süsteemiga, mis võimaldas parameetreid vabalt valida. Karüotüüpiseerimisprotokolli väljatöötamine teostati *C. parapsilosis* isolaatidega sarnaselt Barchiesi-le (2000) ja selleks kasutati kahte järgnevat protokoll, mida kumbagi korrati kaks korda:

1. Shin *et al.* (2005) poolt kasutatud PFGE protokoll, kus 0,5-kordses TBE puhvris oli

valitud pingeks 4V/cm, temperatuuriks 14° C ja pulsi kestvuseks oli 90 ja 325 sekundit 48 tunni jooksul.

2. Barchiesi *et al.* (2000) poolt kasutatud PFGE protokoll, kus 0,5-kordses TBE puhvril oli pingeks valitud 2V/cm, temperatuuriks 14° C ja pulsi kestvuseks oli 60 ja 300 sekundit 66 tunni jooksul.

Geel värviti etiidiumbromiidi lahuses (20 µl/ 400 ml) ja pildistati UV valguses.

3.3.2. Restriktsioonifragmentide analüüs PFGE-ga

Restriktsiooniga PFGE meetodika väljatöötamisel kasutati *C. albicans* liigi isolaate. Ensüümiga SfiI (Fermentas International Inc, Kanada) teostati restriktsioon 50° C juures 16 tunni jooksul ja tootja spetsifikatsiooni kohaselt polnud proovide eelnev asetamine jääle vajalik. Aluseks võeti Kanellopoulou (2001) poolt kasutatud protokoll, kus *Candida* isolaate genotüpiseerimisel 0,5-kordses TBE puhvril parameetritega 6V/cm 13° C juures ja pulsi kestvuseks oli 40 ja 90 sekundit 18,5 tunni jooksul. Ensüümi kontsentratsiooniks valiti 5 U/µl. Restriktsioonifragmentide visualiseerimiseks värviti geel etiidiumbromiidi lahuses (20 µl/ 400 ml) ja pildistati UV valguses. Kuna fragmendid polnud ka kordusanalüüsil nähtavad, kahekordistati ensüümi kontsentratsiooni (10 U/µl) ja korrati PFGE-d samadel parameetritel. Restriktsioonifragmentide visualiseerimisel ei olnud ka nüüd fragmentide asukohad eristatavad, seega otsustati edasisteks uuringutes kasutada sarnaselt Rho *et al.* (2004), Jang *et al.* (2005) ja Shin *et al.* (2005) uuringutele ensüümi BssHII.

Restriktsioon ensüümiga BssHII (Paul – tootja Fermentas International Inc, Kanada) teostati 37° C juures 16 tunni jooksul; vastavalt tootja spetsifikatsioonile polnud proovide eelnev jääle asetamine vajalik. DNA eeltöötlemiseks kasutati Bio-Rad Laboratories (Prantsusmaa) meetodikat ja kiti. Seetõttu lähtuti ka restriktsiooni meetodika väljatöötamisel selle firma protokollist, kus 0,5-kordses TBE puhvril oli 14° C juures pingeks 6V/cm ja pulsi kestvuseks 60 ja 120 sekundit 24 tunni jooksul. Ensüümi kontsentratsiooniks võeti 5 U/µl. Geel visualiseeriti etiidiumbromiidi lahuses (20 µl/ 400 ml) ja pildistati UV valguses. Kuna restriktsioonifragmentide visualiseerimine ei olnud ka korduval analüüsimisel piisavalt efektiivne, valiti uueks lähteprotokolliks Shin *et al.* (2005) poolt kasutatud parameetrid, kus 14° C juures oli pingeks 4V/cm ja pulsi kestvuseks 5 ja 50 sekundit 20 tunni jooksul. Ensüümi hulgaks võeti 5 U/µl. Geel visualiseeriti ja pildistati sarnaselt eelpoolkirjeldatule. Selle meetodiga paranes restriktsioonifragmentide

visualiseerimine, kuid ikkagi polnud kõik fragmendid üksteisest eristatavad, mistõttu edasiseks arendamiseks kasutati järgmisi võtteid:

1. PFGE puhvri temperatuuri alandamine ühe kraadi kaupa (e.g. 13° C, 12° C, 11° C). Iga temperatuuri juures teostati PFGE kaks korda.
2. Enne restriksiooni ensüümi lisamist ja kohe peale restriksiooni lõppu proovide asetamine jääle.
3. Geeli visualiseerimiseks kasutatava etiidiumbromiidi lahuses (20 µl/ 400 ml) värvimisaja pikendamine 5 minuti kaupa (20 ja 25 minutit).

Väljatöötatud meetodika sobivus erinevatele *Candida* liikidele teostati isolaatide kartiotüpiseerimise ja liigisisese genotüpiseerimise käigus.

3.3.3. Marker valik

Bio-Rad Laboratories (Prantsusmaa) spetsifikatsioon soovitab *Candida* PFGE puhul kasutada molekulaarseks markeriks *Saccharomyces cerevisiae* *Chef DNA Size Marker* (0,2-2,2 Mb) (tootja Bio-Rad Laboratories, Prantsusmaa) markerit. Alternatiivsena võiks kasutada Lambda Ladder Standard (48,5 – 582 Kbp) markerit (tootja Bio-Rad Laboratories, Prantsusmaa). Kuna sõltumata parameetritest pole visualiseerimisjärgselt *S. cerevisiae* markeri lugemine vastavalt tootja spetsifikatsioonile võimalik, kasutati Lambda Ladder Standard markerit.

3.3.4. Mikroevolutsioonilised muutused

Esmalt valiti välja patsiendid, kellel uurimusperioodil oli isoleeritud erinevatel aegadel või erinevatest keha piirkondadest isolaate. Kui patsiendil oli isoleeritud kaks kuni neil isolaati valiti analüüsamiseks ajaliselt esimene ja viimane, kui 5 isolaati, valiti aga uurimusse ajaliselt esimene, keskmine ja viimane. Teiseks teostati väljatöötatud meetodikat kasutades restriksioonifragmentide PFGE.

4. Tulemused ja diskussioon

4.1. Patsiendid ja nendelt isoleeritud tüved

Tartu ja Tallinna Lastehaigla Intensiivravi Osakonna 52-lt patsiendilt isoleeriti 83 *Candida* isolaati; neist 8 Tallinnast perioodil august 2005 kuni mai 2006 ja 75 Tartust perioodil 30. juuni 1999 kuni 28. november 2005. Vere isolaadid moodustasid 14,5%, trahhea isolaadid 68,7% ja teistest allikatest (uriin, kurk, kanüül) 16,8% kõigist isoleeritud proovidest (Tabel 7). Ka eelnevates uuringutes on kasutatud erinevatest kehapiirkondadest isoleeritud *Candida* tüvesid. Nii moodustasid Kanellopoulou *et al.* (2001) uuringus (Kreeka) 46% isolaatidest trahheast, 40% uriinist, 8% verest ja 6% muudest allikatest isoleeritud tüved ja Rowen *et al.* (1999) uuringus (Texas) 57% vere, 20% uriini ja 23% muudest allikatest (trahhea, nahk jt.) isoleeritud tüved.

Tabel 7. Tartu ja Tallinna lastehaigla intensiivravi osakonnast isoleeritud *Candida* isolaatide jaotumus analüüsi võtmiskoha järgi.

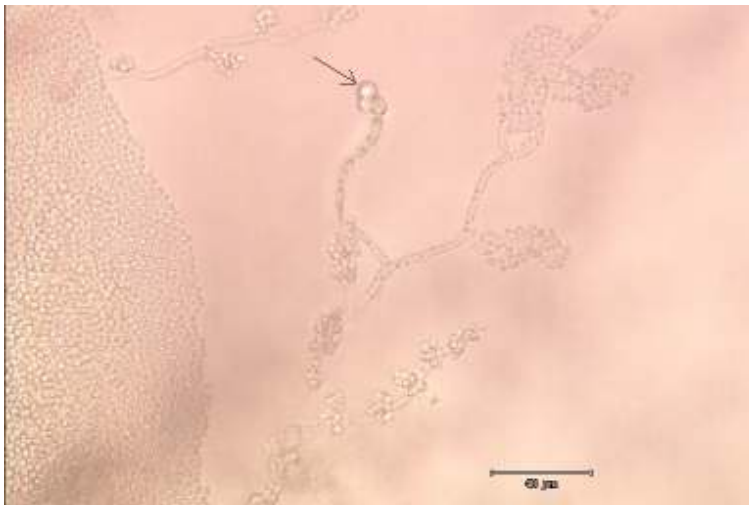
	Tartu	Tallinn
Patsiente	45	7
Analüüsi võtmise koht:	75	8
veri	11	1
trahhea	52	5
muu	12	2

4.2. Liikide identifitseerimine

4.2.1. Liikide määramine *CHROMagar Candida* ja *Corn Meal Agar* söötmetega

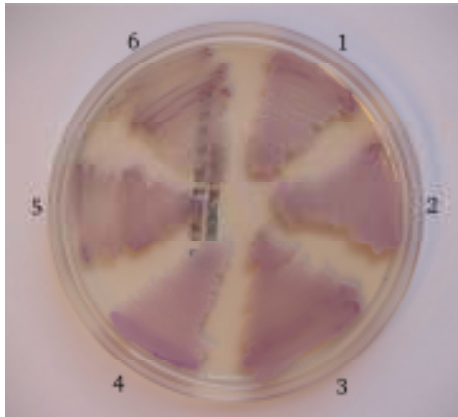
Esmalt isoleeriti tüved TÜ Kliinikumi Ühendlabori ja Põhja-Eesti Regionaalhaigla mikrobioloogia laborites, kus 83-st isolaadist 38,6% (32 isolaati) moodustas *C. albicans*, 24,1% (20 isolaati) *C. parapsilosis*, 13,3% (11 isolaati) *C. glabrata*, 7,2% (6 isolaati) *C. guilliermondii* ja 16,8% (14 isolaati) teised liigid. Me otsisime oma uuringus vereagarilt (ingl. k. *Blood Agar Base No2*, tootja Oxoid Ltd, Inglismaa, millele on lisatud 7% steriilset verd) või *Sabouraud Dextrose Agar* (tootja Oxoid Ltd, Inglismaa) agarilt tõenäolisi *Candida spp.* isolaate 24 kuni 48 tunni möödumisel. Seejärel külvasime need edasi *CHROMagar Candida* agarile. Kõik rohelisteks muutunud isolaatide pesad samastasime kui *C. albicans*, kõik siniseks muutunud isolaatide pesad kui *C. tropicalis* ja kõik

heleroodsad isolaadid, mis olid valge äärega, lamedad ja kuiva pealispinnaga kui *C. krusei*. Nii Odds *et al.* (1994) kui ka Koehler *et al.* (1999) on leidnud, et ainult *C. albicans* liiki saab eristada värvi järgi *CHROMagar Candida* agariga. Samas aga leidis Hospenthal uurimisgrupp (2006), et *C. albicans* ja *C. dubliniensis* on *CHROMagar Candida* agariga üksteisest eristatavad ainult korduval analüüsil, külvates liigid kõrvuti ühele söötmele. Järelikult ei saa *C. albicans*-i samastada ainult *CHROMagar Candida* söötmega ja liigilist kuuluvust tuleks kontrollida *Corn Meal Agar* agariga kuhu on lisatud regenti *Polysorbate/Tween 80* (morfoloogia test).



Pilt 2. *C. albicans*, mis moodustab *Corn Meal Agar* agaril klamüdospoore.

Meie uuringus moodustasid 24 isolaati 83-st 48 tunni möödumisel *CHROMagar Candida* agaril roheline värvuse. TÜKÜ ja PERH laborites samastati *CHROMagar Candida* agaril roheline värvuse järgi 32 isolaati 83-st (kaheksast isolaadist viis osutusid edasisel samastamisel *C. guilliermondii* ja kolm *C. parapsilosis* isolaatideks). Kuna mitmetes eelnevates uuringutes on leitud, et 24-tunnine inkubatsioon ei ole piisav (Odds *et al.*, 1994; Paritpokee *et al.*, 2005), siis meie poolt läbi viidud tüvede kontrollimisel hindasime kasvu ainult 48 tunni järel. *C. albicans* liigile iseloomulikke klamüdospoore moodustasid *Corn Meal Agar* agaril kõik 24 isolaati (Pilt 2) ja määrasime need liigiks *C. albicans*. Koehler *et al.* (1999) uuring näitab, et niisugune kahe meetodi kombinatsioon *C. albicans* samastamiseks on täpne ja usaldusväärne (Koehler *et al.*, 1999), mis lubab eeldada, et meie uurimuse tulemused on tõesed.



Pilt 3. *CHROMagar Candida*: kõik isolaadid on TÜ Kliinikumi Ühendlaboris samastatud kui *C. glabrata* liigid. Meie uurimuses kasutatud *API Candida* ja morfoloogia põhjal osutusid 1, 2, 3, 5 ja 6 *C. guilliermondii* ja ainult 4 *C. glabrata* isolaadiks. Kõik isolaadid on *CHROMagar Candida* agaril identset värvi.

CHROMagar Candida agariga tuvastasime *C. tropicalis* liigile omast sinakashalli värvust kolmel isolaadil ja *C. krusei* liigile iseloomulikku valge äärega, lameda ning kuiva pealispinnaga isolaate ühel korral (Tabel 8). Odds *et al.* (1994) uuring näitab, et pärast 48 tundi inkubeerimist võivad sinakashalli värvi olla lisaks *C. tropicalis* liigile ka *Pichia spp.* tüved ja *C. krusei* liigile iseloomuliku värvi olla ka kliiniliselt üliharva esinev *C. norvegensis*. Sellele tuginedes samastasime esialgu liigid kui *C. tropicalis* ja *C. krusei*, kuid isolaatide liigilise kuuluvuse kontrollisime *API Candida* testiga.

Tabel 8. *Candida* liikide erinevate värvuste moodustumine *CHROMagar Candida* agaril.

Liigid	roheline (n=24)	heleroosa (n=21)	kreemikasvalge (n=9)	helelilla (n=23)	kreemikasvalge, krobeline pinnaga (n=2)	valkjasroosa, kuiv ja lame (n=1)	sinine (n=3)
<i>C. albicans</i> (n=24)	24						
<i>C. parapsilosis</i> (n=25)		13	9	1	2		
<i>C. tropicalis</i> (n=3)							3
<i>C. guilliermondii</i> (n=25)		5		20			
<i>C. glabrata</i> (n=3)		1		2			
<i>C. lusitanae</i> (n=2)		2					
<i>C. krusei</i> (n=1)						1	

Teisi, erinevatele liikidele sarnaseid värvusi määrasime 55-l korral (Tabel 8). Meie uurimuses moodustasid *C. glabrata* isolaadid sarnaselt *C. guilliermondii* isolaatidele *CHROMagar Candida* agaril heleroosasid ja helelillasid pesi (Pilt 3). Pfaller *et al.* (1996) ja Hospenthal *et al.* (2006) järgi on *CHROMagar Candida* agarit võimalik kasutada *C.*

glabrata samastamiseks, kuid kõik teised uurimused (Houang *et al.*, 1997; Koehler *et al.*, 1999; Odds *et al.*, 1994; Odds *et al.*, 2000; Powell *et al.*, 1998) on tõestanud, et see pole võimalik. Sama ütleb ka tootja spetsifikatsioon. Seega näitavad meie andmed, et kuigi mitmed kliinilised laborid samastavad selle söötmeaga *C. glabrata* liiki, ei pruugi see alati õigeid tulemusi anda.

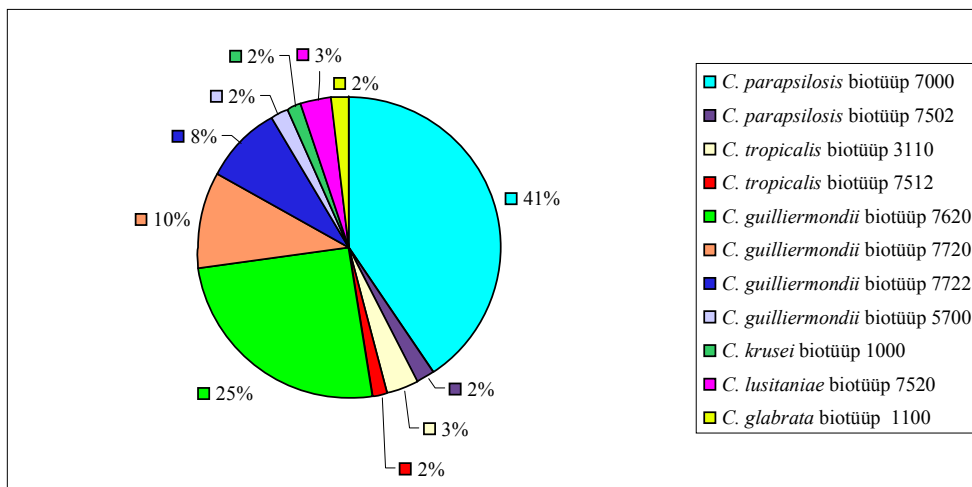
4.2.2. Liikide määramine API (tootja BioMerieux sa, Prantsusmaa) testidega ja *Corn Meal Agar* agariga

TÜKÜ-s samastati kuni 2001. aastani *Candida* isolaadid API 20 C AUX testiga ja alates 2001 aastast ID 32 C testiga. PERH-is kasutati samastamiseks API *Candida* testi. Meie valisime oma uurimuses *Candida* liikide samastamiseks API *Candida* testi, kuna see hõlmab kõiki kliiniliselt olulisi *Candida* liike. Testiga samastasime kõik isolaadid, mis ei andnud CHROMagar *Candida* agaril rohelist värvust ja ei tekitanud *Corn Meal Agar* agaril *C. albicans* liigile iseloomulikke klamüdospoore ning seega kuulusid mitte-*albicans Candida* liikide hulka (Pilt 2). Eelnevates uuringutes on kasutatud liikide samastamiseks kõiki kolme *Candida* liikide samastamiseks loodud teste - API *Candida*, API 20 C AUX, ID 32 C (Comert *et al.*, 2006; Fleck *et al.*, 2007; Ariyawardana *et al.*, 2007; Rozkiewicz *et al.*, 2006) ning need on olnud sarnase tulemuslikkusega.

API *Candida* testiga määrasime 59 mitte-*albicans* isolaadi liigilise kuuluvuse, millest samastasime 27 kui *C. guilliermondii*, 25 *C. parapsilosis*, 3 *C. tropicalis*, 2 *C. lusitaniae* 1 *C. glabrata* ja 1 *C. krusei*. (Joonis 12). Kuna TÜKÜ labori ja meie poolt teostatud *C. glabrata* liigilisel samastamisel oli erinevus väga suur (11 vs. 1), kontrollisime seda morfoloogia testiga *Corn Meal Agar* agaril. Seitse isolaati, mis TÜKÜ-s samastati kui *C. glabrata* andsid API *Candida* testiga tulemuseks *C. guilliermondii*. Morfoloogia testi tulemusel osutusid neist viis *C. guilliermondii* liigiks ja 2 *C. glabrata* liigiks. Järelikult ei saa API *Candida* testi kasutada *C. glabrata* ja *C. guilliermondii* liikide eristamiseks nagu tootja spetsifikatsiooni väidab. Nii Koehler *et al.* (1999) kui ka meie uurimuses selgus, et *C. glabrata* ja *C. guilliermondii* on *Corn Meal Agar* agariga väga hästi eristatavad. Seega tuleks nende liikide samastamisel API *Candida* testiga kontrollida tulemust *Corn Meal Agar* agariga.

Kõik *C. lusitaniae* ja *C. famata* isolaadid samastas API *Candida* kui *C. guilliermondii*. Samas on tootja spetsifikatsiooni kohaselt need liigid API *Candida* testiga

samastatavad ja ka Comert *et al.* (2006) uuringus ei esinenud kõrvalekaldeid tootja spetsifikatsioonist. Meie uurimus näitab, et *C. lusitaniae* ja *C. famata* liikide TÜKÜ ja meiepoolsed erinevused on tõenäoliselt tingitud API *Candida* testi madalast spetsiifilisusest nende liikide suhtes.



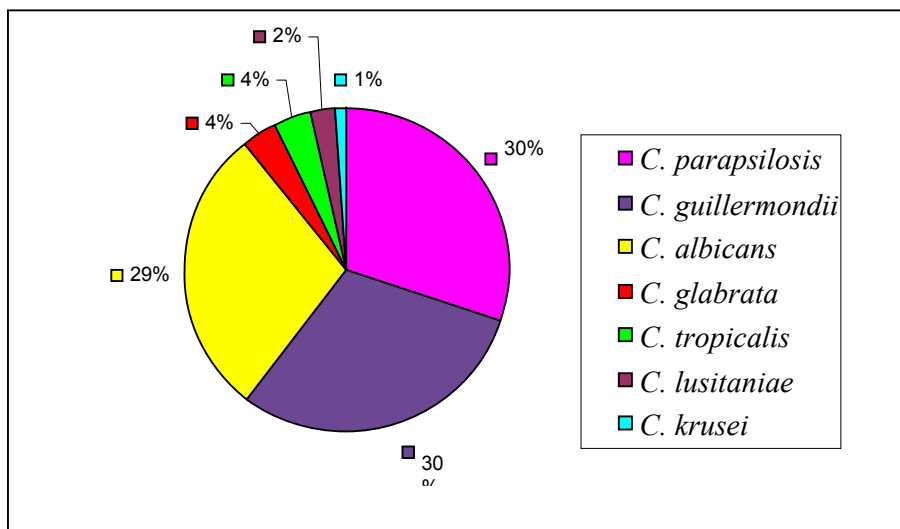
Joonis 12. API *Candida* testiga määratud mitte-*albicans Candida* biotüüpide esinemissagedus (%).

4.2.3. Liigilise samastamise erinevused

Tallinna lastehaigla intensiivravi osakonnast isoleerisime augustist 2005 kuni maini 2006 kaheksa isolaati, millest kuus olid *C. albicans* isolaadid, üks *C. tropicalis* ja üks *C. krusei* isolaat. Liikide übermääramisel oli sarnasus 100%. Kuigi isolaatide arv oli väike, võib järeldada, et sarnasus on tingitud nii sama API testi kasutamisest, kui ka ainult enamlevinud liikide esinemisest.

75 isolaati olid isoleeritud Tartu lastehaigla intensiivravi osakonnast ja samastatud TÜ Kliinikumi Ühendlaboris: 26 *C. albicans*, 20 *C. parapsilosis*, 11 *C. glabrata*, 6 *C. guilliermondii*, 4 *Candida sp.*, 3 *C. famata*, 2 *C. lusitaniae*, 2 *C. pelliculosa* ja 1 *C. tropicalis* liik. Nende übermääramisel TÜ Mikrobioloogia Instituudis oli enamlevinud liikideks 25 isolaadiga *C. parapsilosis* ja *C. guilliermondii* ning neile järgnes 24 isolaadiga *C. albicans*. Liike *C. glabrata* ja *C. tropicalis* samastasime kolmel korral, *C. lusitaniae* kahel ning *C. krusei* ühel korral. (Joonis 13; Lisad: Tabel 3). *Candida parapsilosis*-e sagedat esinemist on sarnaselt meie uuringule leitud ka teistes vastsündinute intensiivravi osakondades läbiviidud uuringutes. Näiteks Cliff *et al.* (2005) poolt Leedsi Üldhaigla neonataalses osakonnas läbiviidud retrospektiivses uuringus moodustas *C. albicans* 64,2%,

C. glabrata 17,0% ja *C. parapsilosis* 15,1%. Sarnast jaotuvust on näidanud ka Roloides *et al.* (2004) Kreekas läbiviidud epidemioloogilises uuringus. Meie uuringus leitud *C. guilliermondii* kõrge osakaal on küll erandlik, kuid enne molekulaarset analüüsi ei määratletud seda saastuseks ega hospitaalinfektsiooniks. Seega esineb võrreldes teistega meie uuringus nii sarnasusi kui ka erinevusi liikide samastamisel.



Joonis 13. Lõplik liigiline jaotus TÜ Mikrobioloogia Instituudi laboris pärast samastamist

Invasiivsete ehk vere isolaatide samastamisel esines kliiniliste laborite ja meie poolt määratud liikide vahel 92%-line sarnasus. Erines ainult üks isolaat, mis oli isoleeritud Tartu lastehaigla intensiivravi osakonnast 2000. aasta oktoobris. Traheea aspiraadist isoleeritud tüvedel oli isolaatide jagunemine väga erinev (Tabel 9). *C. guilliermondii*, mis moodustas 33,8% kõigist mitteinvasiivsetest isolaatidest, on küll laialt levinud keskkonnas, kuid tema tähtsus infektsioonitekitajana on siiani ebaselge. Praeguseks on avaldatud ainult üks uurimus, kus *C. guilliermondii* isolaatide osakaal ületas 5,5%. Nimelt kirjeldas Medeiros *et al.* *C. guilliermondii* pseudopuhangut (puhang, kus patsientidelt võetud verest isoleeriti *C. guilliermondii* vaatamata sellele, et neil puudusid kliinilised sümptomid ja polnud tehtud ühtegi invasiivset protseduuri, ega olnud ühtegi muud võimalust *Candida* infektsiooni saamiseks). Proovide laboratoorset saastumist on täheldatud ka Deresinski *et al.* (1995) poolt, kus saastumise allikaks oli Hancks`i balanseeritud soolalahus. Brasiilia Ülikoolihaigla pediaatria osakonnas, kus täheldati puudulik vere võtmise tehnika, oli liigi osakaaluks 43% (Medeiros *et al.*, 2007). Sõltumata päritolust (kontaminatsioon või hospitaalinfektsioon) on meie töös leitud *C. guilliermondii* kõrge (30%-line) osakaal oluline leid, mille uurimine on kindlasti vajalik selle liigi edasisel isoleerimisel Tartu

lastehaigla intensiivravi osakonnast. Kuna meie töös on proovid pärit alates aastast 1999, ei olnud proovide võtmise ajal ette näha võimalikku puhangut ja seetõttu ei võetud ka proove keskkonnast, mis võiks saastumist kinnitada või ümber lükata. Võib järeldada, et meie töös tulevad erinevuste võimalike põhjustena arvesse (1) võimalik segakultuuride esinemine; (2) kultuuride saastumine, kas enne säilitamist või säilitamise ajal; (3) piisavalt täpse samastamise protokollide puudumine aastatel 1999 - 2001; (4) ebaspetsiifilisema, vähem süsiniku allikaid sisaldava testi *Candida API* kasutamine meie poolt.

Tabel 9. Traheea ja vere isolaatide liigiline erinevus kliinilise ja TÜMI-s (TÜ Mikrobioloogia Instituudis) määratud isolaatidel.

	Kliinilises laboris määratud		TÜMIs ümbermääratud	
	veri	trahhea aspiraats	veri	trahhea aspiraats
<i>C. albicans</i>	6	21	5	16
<i>C. parapsilosis</i>	5	8	5	12
<i>C. guilliermondii</i>	0	6	1	22
<i>C. tropicalis</i>	1	1	1	2
<i>Candida. spp.</i>	0	4	0	0
<i>C. glabrata</i>	0	10	0	2
<i>C. pelliculosa</i>	0	1	0	0
<i>C. lusitaniae</i>	0	2	0	2
<i>C. famata???</i>	0	3	0	0
<i>C. krusei</i>	0	1	0	1

4.3. PFGE metoodika väljatöötamine

Siiani puudub ühtne metoodika erinevate liikide molekulaarseks uurimiseks. Iga liigi uurimiseks töötatakse iga uurimisgrupi poolt välja oma PFGE metoodika (Jang, *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2005; Kanellopoulou *et al.*, 2001). Kui uuring hõlmab erinevaid liike, on iga liigi jaoks spetsiifilise metoodika väljatöötamine väga töömahukas. Seega oli meie uurimuse üheks eesmärgiks leida ühtne *Candida* PFGE genotüüpiseerimise metoodika.

4.3.1. Karütüüpiseerimine

Kokku kasutasime karütüüpiseerimismetoodika väljatöötamisel 14 *C. parapsilosis*, 14 *C. albicans* ja 14 *C. guilliermondii* isolaati. Kõige parema karütüüpiseerimise tulemuse saime kui töötlesime materjali eelnevalt DNA *Genepath Group 4 Reagent Kit*-iga (tootja Bio-Rad Laboratories, Prantsusmaa). Seejärel teostasime pulssvälja geelelektroforeesi (PFGE) 0,5-kordses TBE puhvril, kus oli pinge 4V/cm, pulsi kestvus 90 ja 325 sekundit, temperatuur 14° C ja PFGE kestvus 48 tundi. Seejärel värvisime geeli etiidiumbromiidi lahuses (20 µl/ 400 ml) ja visualiseerisime UV valguses. Tulemuse usaldatavuse tõstmiseks kordasime kõikide isolaatide karütüüpiseerimist kaks korda. Uurimuse tulemusena leidsime, et Shin *et al.* (2005) poolt *C. albicans* karütüüpiseerimiseks kasutatud metoodika PFGE parameetrid sobivad hästi ka teiste *Candida* liikide karütüüpiseerimiseks. Kuna leidsime, et 7-8 fragmendiline karütüüp ei võimalda tüvede genotüübilist eristamist, ei jätkanud me metoodika modifitseerimist.

4.3.2. Restriktsioonifragmentide analüüs PFGE-ga

Esmalt kasutasime metoodika väljatöötamiseks restriksiooniensüümi SfiI. Nii Doebbelin *et al.* (1993) kui ka Kanellopoulou *et al.* (2001) on uurinud selle ensüümiga *Candida* subpopulatsioone. SfiI-ga ei saanud me rahuldavat tulemust, kuna fragmentide asukohad ei olnud üksteisest eristatavad. Meie uurimus kinnitas Shin *et al.* (2005) tulemust, kus SfiI polnud piisavalt spetsiifiline *Candida* molekulaarseks uurimiseks.

Seejärel testisime restriksioonifragmentide analüüsiks PFGE-ga ensüümi BssHII. Kõige efektiivsemaks osutusid järgmised parameetrid: pinge 4V/cm, temperatuur 14° C ja pulsi kestvus 5 ja 50 sekundit ja PFGE kestvus 20 tundi. Sarnaseid parameetreid on

kasutatud ka eelnevates uuringutes *C. albicans*-i PFGE läbiviimisel (Shin *et al.*, 2005). Oluliseks osutus ka proovide asetamine jääle enne restriksiooni ensüümi lisamist ja kohe peale restriksiooni lõppu. Viimane parandas oluliselt *Candida* isolaatide DNA fragmentide nähtavaks tegemist ja üksteisest eristamist. Lisaks näitas uurimus, et PFGE puhvri temperatuuri alandamine ei muuda visualiseerimistulemusi. Ensüümi kontsentratsiooniks sobib tootja spetsifikatsioonis soovitatud 5 U/ μ l ja ensüümi hulga suurendamine ei paranda tulemust. Geeli värvimiseks sobib standartne etiidiumbromiidi lahus (20 μ l/ 400ml vees 15 minuti jooksul) ja värvimisaja pikendamine pigem halvendas tulemust, kuna suurendas taustamüra. Visualiseerimiseks kasutasime UV valgust. Tabel 10 on ära toodud tulemuste parandamiseks valitud modifikatsioonide tulemused. Kõikide uuritud liikide puhul on tulemuste usaldusväärsuse suurendamiseks vajalik proovide kahekordne analüüs.

Tabel 10. Algemeetodiks valitud Shin *et al.* (2005) protokollide modifikatsioonide tulemused.

Algemeetodi modifikatsioon	Parandas tulemust	Tulemus jäi samaks	Halvendas tulemust
Proovide asetamine jääle enne restriksiooni	+	-	-
Proovide asetamine jääle peale restriksiooni	+	-	-
Toimumistemperatuuri alandamine 13 °C-ni	-	+	-
Toimumistemperatuuri alandamine 12 °C-ni	-	+	-
Ensüümi kontsentratsiooni kahekordistamine	-	+	-
Värvimisaja pikendamine	-	-	+

4.3.3. Markeri valik

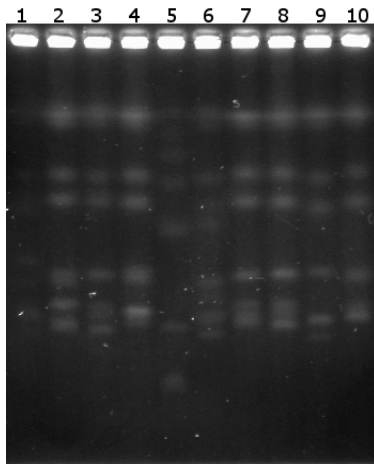
Bio-Rad Laboratories (Prantsusmaa) spetsifikatsioon soovib *Candida* PFGE puhul kasutada molekulaarseks markeriks *Saccharomyces cerevisiae* Chef DNA Size Marker (0,2-2,2 Mb) (tootja Bio-Rad Laboratories, Prantsusmaa) markerit. Vaatamata erinevate parameetrite kasutamisele ei õnnestunud meil *Saccharomyces cerevisiae* markerit visualiseerimisjärgselt lugeda. Alternatiivina kasutasime uurimuses *Lamda Ladder Standard* markerit (tootja Bio-Rad Laboratories, Prantsusmaa), mis on loodud markeriks bakterite analüüsimisel PFGE meetodiga. Selle markeri fragmendid olid hästi nähtavad ja loetavad, mistõttu valitigi markeriks viimane. Kui *Saccharomyces cerevisiae*-t on ka eelnevates *Candida* uurimustes tihti kasutatud (Jang *et al.*, 2005; Shin *et al.*, 2004, Rho *et al.*, 2004), siis meile teada olevalt ei ole *Lamda Ladder Standard* markerit *Candida* liikide puhul üldse kasutatud. Võib järeldada, et viimane võib osutada *Candida* uurimisel efektiivsemaks markeriks kui *Saccharomyces cerevisiae* Chef DNA Size Marker, kuid see nõuab edasisi uuringuid.

4.4. Eesti lasteintensiivravi osakondade *Candida* liigisisene genotüüpiseerimine

Molekulaarseks tüüpiseerimiseks valisime järgmised haigetelt kõige sagedamini isoleeritavad liigid: *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* ja *C. albicans*. Nendest liikidest pole ainult *C. guilliermondii* liigi puhangulist, epidemioloogilist, ega retrospektiivset uuringut siiani avaldatud.

4.4.1. Karüotüüpiseerimine

Me karüotüüpiseerisime kõigi eelpool mainitud kolme enamlevinud liigi isolaadid. Liigisiseste karüotüübifragmentide analüüsil leidsime, et kõikidel liikidel esines sarnase paigutusega ainult 6-8 fragmenti, mis oli vähem kui on vajalik tüvede eristamiseks (Pilt 4; Lisad: Pilt 1 ja 2). Eelnevalt on Lupetti *et al.* (2002) ja Gottfredsson *et al.* (1998) kasutanud karüotüüpiseerimist kandidemia puhangu epidemioloogiliseks uurimiseks. Kuid Tenover *et al.* (1995) poolt läbiviidud uuringus on näidatud, et tüvesid on võimalik eristada kui visualiseerimisel esineb vähemalt 10 fragmenti. *Candida* liikide epidemioloogiline uurimine ei osutunud karüotüüpiseerimist kasutades võimalikuks kuna (1) fragmentide arv oli liiga väike (2) fragmentid olid liiga sarnased ja halvasti loetavad. Meie andmed toetavad Chen *et al.* (2005) uurimust, kes näitas ka karüotüüpiseerimise sobimatust *Candida* liikide genotüübilise struktuuri iseloomustamisel.



Pilt 4. *C. albicans* karütütüpeerimine: 1 – 10 on Tartu Lastehaigla Intensiivravi Osakonna patsientidelt isoleeritud *C. albicans* karütütübid, kus 7 ja 8 on erinevalt teistest isolaatidest isoleeritud samalt

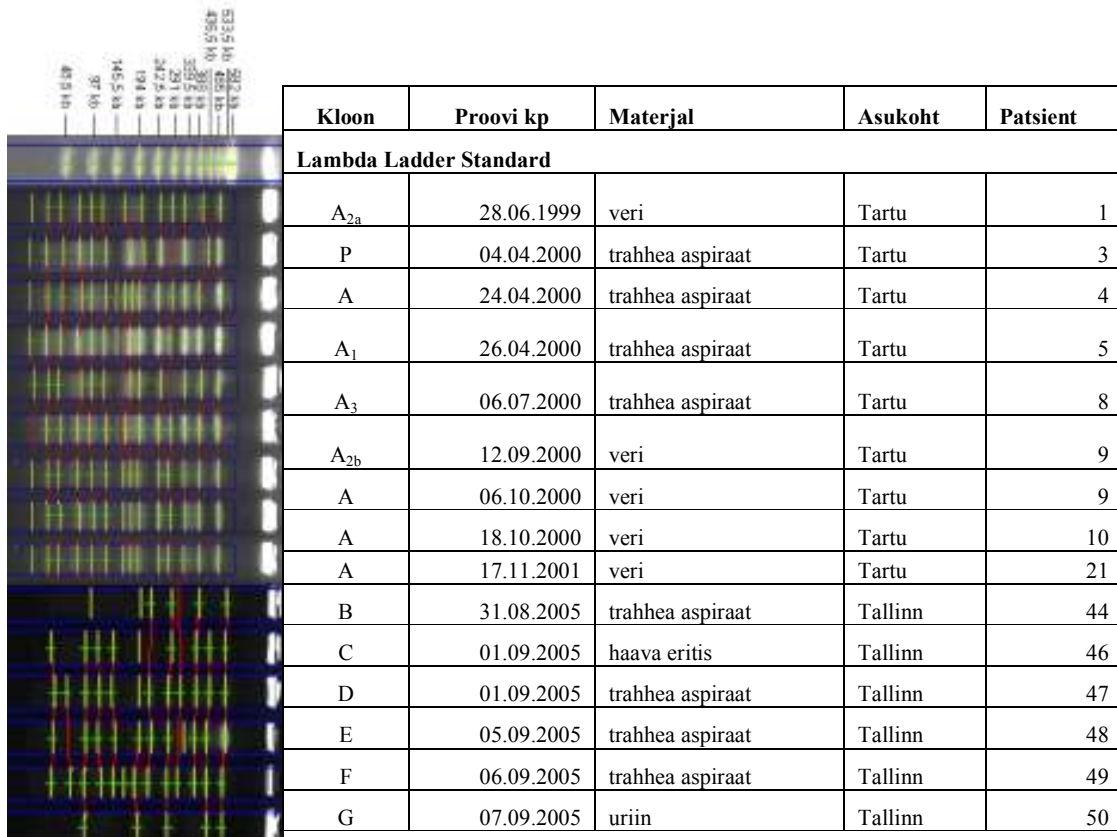
4.4.2. Restriksiooni analüüs ensüümiga BssHII

4.4.2.1. *C. albicans* restriksioonimustrite analüüs

C. albicans isolaatide restriksiooni analüüsi teostasime 8-l Tartu ja 6-l Tallinna lastehaigla intensiivravi osakonna patsiendi isolaadil (Joonis 14). Kaheksast Tartu isolaadist osutusid sarnaseks seitse, millest võib järeldada, et aastatel 1999 kuni 2001 toimus peamiselt ühe tüve levik. Vähem kui 3-bändilised erinevused isolaatide vahel viitavad kõige tõenäolisemalt asjaolule, et selle aja jooksul on need tüved läbi teinud mitmeid mikroevolutsioonilisi muutusi. Kuna kloon A esines esmakordselt 24. aprillil 2000. aastal ja seejärel alles 06. oktoobril 2000. aastal on tõenäoline, et see kloon on nimetatud osakonnas pidevalt olemas olnud. Patsiendil nr. 9 esines ligikaudu kuuajalise vahega nii kloon A2b kui ka A. Kas tegemist on kahe erineva klooni kandlusega või, on toimunud klooni A2b mikroevolutsiooniline muutus klooniks A, pole võimalik kindlaks teha, kuna selleks oleks vajalik rohkem kui kahe isolaadi olemasolu (Joonis 14). Shin *et al.* (2005) uuris 38 patsiendilt isoleeritud 54 isolaati. Nendest 22 restriksiooni muster oli $\geq 95\%$ ulatuses identne, mis tõestas nende epidemioloogilist sugulust. Kuna meie uuringus olid 1/2 isolaatidest 100%-liselt identsed ja 3/8 isolaatidest erinesid vähem kui 3 fragmenti on tõenäoline, et kõik uuritud isolaadid olid epidemioloogiliselt seotud.

Augustist septembrini 2005. a, Tallinna lastehaigla intensiivravi osakonna patsientidelt isoleeritud kõigi kuue isolaadi restriksioonifragmentide mustrid erinesid

üksteisest rohkem, kui kolme bändi võrra. Järgides Tenover *et al.* (1995) soovitusi võib järeldada, et nimetatud *Candida* tüved ei olnud omavahel suguluses ning nende kõige tõenäolisemaks allikaks võib olla patsientide emade mikrofloora.



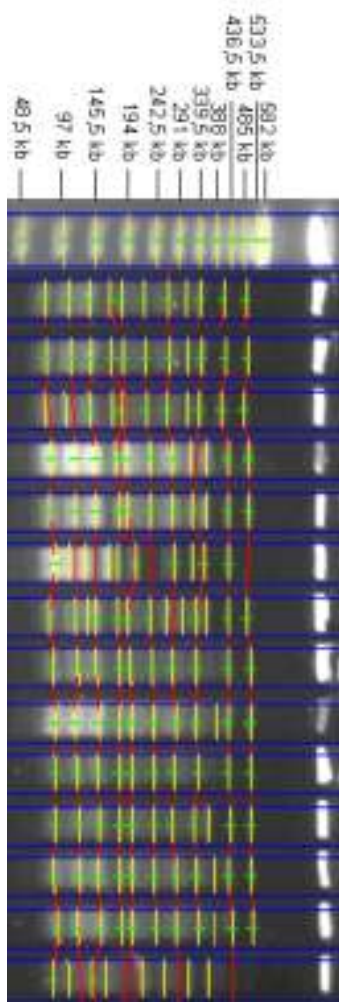
Joonis 14. Tartu ja Tallinna lastehaigla intensiivravi osakonnast isoleeritud *C. albicans* isolaatide genotüübiline jaotumus, kus A, P, B, C, D, E, F ja G on erinevad tüved. Kloon A₁ näitab, et isolaat erineb tüves A ühe restriksioonifragmendi poolest. A_{2a} ja A_{2b} kloon erinevad mõlemad kloonis A kahe restriksioonifragmendi poolest, kuid neil puuduvad erinevad fragmendid.

4.4.2.2. *C. parapsilosis* restriksioonimustrite analüüs

Liigi *C. parapsilosis* restriksioonianalüüsi teostasime 14-le Tartu lastehaigla intensiivravi osakonna patsiendi isolaadile, mis olid eraldatud ajavahemikus juuni 2000 a. kuni november 2005 a. Sarnane restriksiooni muster leiti 12 isolaadil. Kuna aastatel 2002 kuni 2004 ei isoleeritud ühtegi *C. parapsilosis* isolaati ja 2005. aastal eraldatud isolaatide restriksioonimustrid sarnanevad 2000/2001 aasta isolaatidele, viitab see püsiva infektsioonikolde olemasolule (Joonis 15). Tüvi J on küll 2005. aastal teinud läbi mitmeid mikroevolutsioonilisi muutusi, kuid need pole kas püsima jäänud või on nakkus saadud kolmandatest allikatest. Neofytos *et al.* (2006) uuris *C. parapsilosis* fungeemiat

vähahaigetel ja leidis, et sama tüvega nakatusid 8 kuu vältel kolm patsienti. Ka meie tööst võib järeldada, et patogeensed isolaadid võivad haiglateskkonnas säilida muutumatuna väga kaua.

Huvitav on ka märkida, et patsiendil 52, kellelt oli kuuajalise vahega kogutud *C. parapsilosis* isolaadid nii trahheast kui ka verest, isoleeriti kaks erinevat tüve. See tõestab ka üldtuntud fakti, et intensiivravi osakonnas viibimise ajal võib esineda nakatumisi mitmete tüvedega.

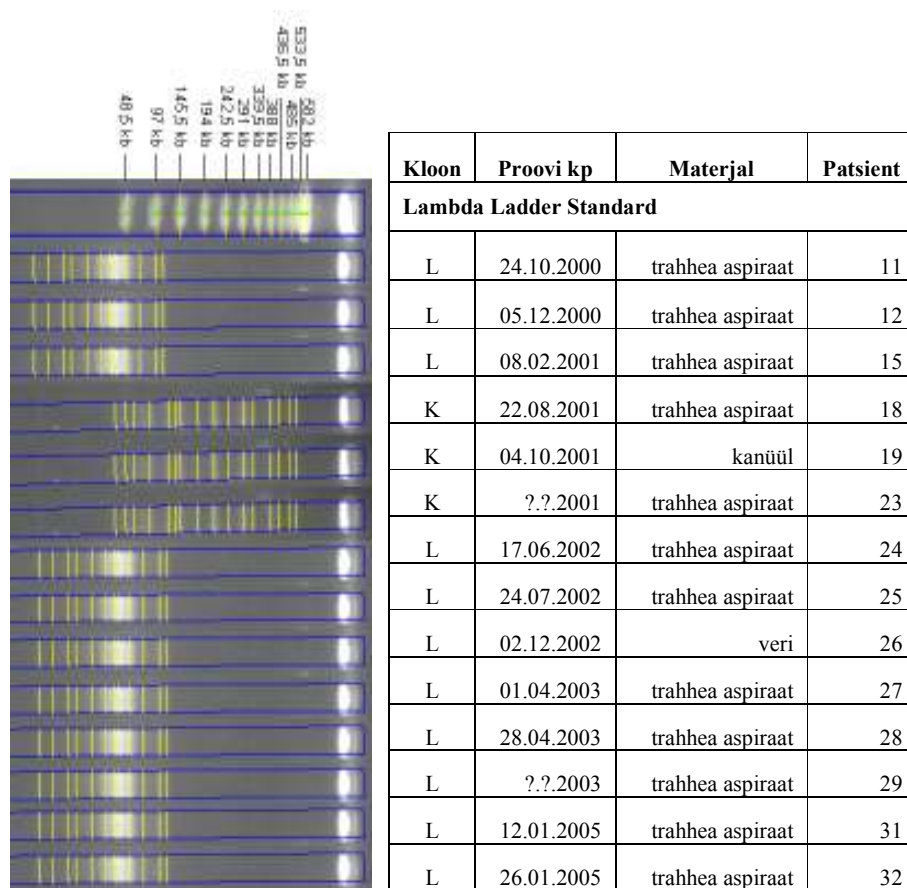


Kloon	Proovi kp	Materjal	Patsient
Lambda Ladder Standard			
J	01.05.2000	PD lahus	6
J	13.12.2000	trahhea aspiraats	13
J	19.06.2001	trahhea aspiraats	17
J	21.11.2001	trahhea aspiraats	22
J	26.11.2001	veri	4
H	04.02.2005	pleura	33
J ₂	03.05.2005	eritis	35
J ₁	11.05.2005	trahhea aspiraats	36
J	19.07.2005	trahhea aspiraats	37
J ₁	20.08.2005	trahhea aspiraats	41
J	09.09.2005	veri	43
J	30.09.2005	trahhea aspiraats	45
J	20.10.2005	trahhea aspiraats	52
I	26.11.2005	veri	52

Joonis 15. Tartu lastehaigla intensiivravi osakonnast isoleeritud *C. parapsilosis* isolaatide genotüübiline jaotumus, kus J, H ja I on erinevad tüved. J₁ kloonid erinevad kloonist J ühe restriktsoonifragmendi poolest ja on omavahel identsed. J₂ kloon erineb kloonist J kahe restriktsoonifragmendi poolest. PD peritoneaaldialüüsi lahus.

4.4.2.3. *C. guilliermondii* restriksioonimustrite analüüs

Uurisime 14 patsiendilt isoleeritud 14 *C. guilliermondii* isolaati. Leidsime, et Tartu lastehaigla intensiivravi osakonnas on uuringuperioodil esinenud kaks *C. guilliermondii* tüve (K ja L). Tüvi K esines lühiajalisel perioodil kolmel patsiendil 2001. aastal. Kuna edaspidi pole sellist tüve enam leitud, võib järeldada, et tüve K püsivat kollet intensiivravi osakonnas ei kujunenud. Tüve L on aga korduvalt isoleeritud alates 24. novembrist 2000. aastal kuni 26. jaanuarini 2005. aastal. Mitmeaastane esinemine näitab, et ka *C. guilliermondii* liigi tüvel L esineb sarnaselt *C. albicans* liigi tüvele A ja *C. parapsilosis* liigi tüvele J Tartu lastehaigla intensiivravi osakonnas püsiv kolle (Joonis 16). Erinevalt *C. albicansi*-st on valdav enamus *C. guilliermondii* tüvedest isoleeritud trahhea aspiraadist viidates selle *Candida* liigi vähesele invasiivsusele. Viimast on näidanud ka eelnevad uuringud, kus *C. guilliermondii* on olnud väga harv vereringe infektsioonide tekitaja (Shin *et al.*, 2004). Samas ei saa me välistada eksogeenset kontaminatsiooni, mille võimalikkust näitab ka restriksioonimustrite suur sarnasus.

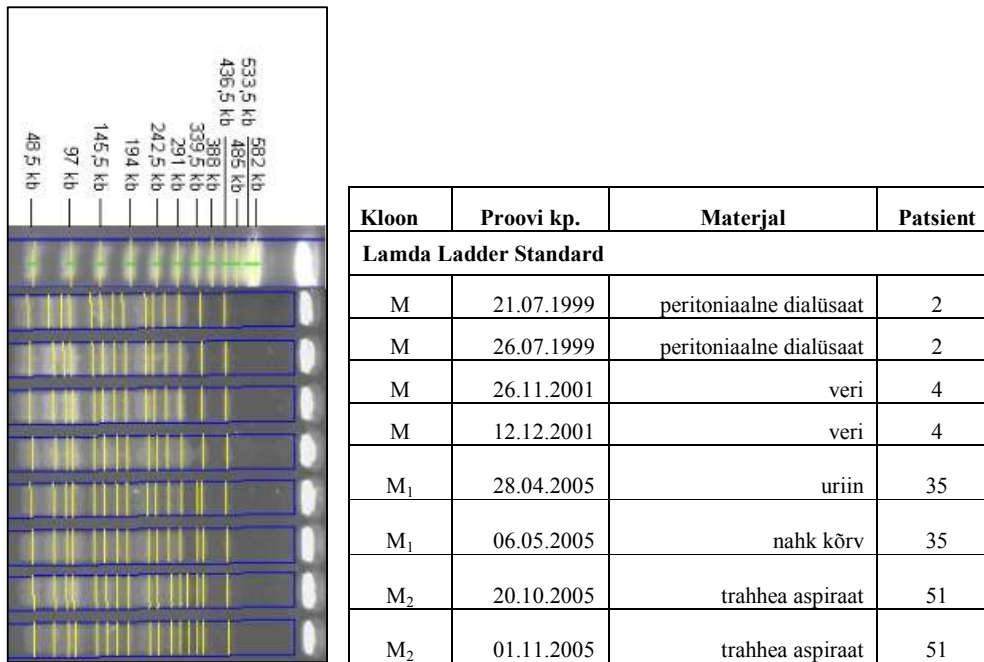


Joonis 16. Tartu lastehaigla intensiivravi osakonnast isoleeritud *C. guilliermondii* isolaatide genotüübiline jaotumus, kus K ja L on erinevad tüved.

4.4.3. Mikroevolutsioonilised muutused

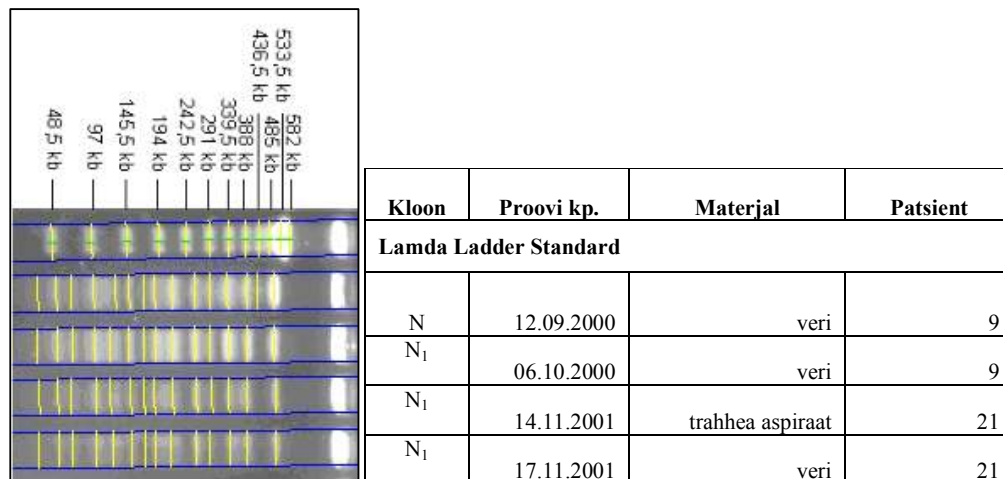
Mikroevolutsiooniliste muutuste uurimiseks sobivatele nõudmistele (patsiendid, kellelt oli uurimisperioodil isoleeritud erinevatel aegadel või erinevatest keha piirkondadest vähemalt kaks isolaati) vastas seitsme patsiendi 15 isolaati, mis kõik pärinesid Tartu lastehaigla intensiivravi osakonnast. Nende hulka kuulusid nelja patsiendi *C. parapsilosis* isolaadid (kogutud 21. 07 1999 kuni 01.11. 2005. a.), kahe patsiendi *C. albicans* isolaadid (kogutud 12.09.2000 kuni 17.11.2001 a.) ja ühe patsiendi *C. guilliermondii* isolaadid (kogutud 08.02.2001 kuni 14.06.2002 a.). Varasemalt on uuritud vaid ühe *Candida* liigi mikroevolutsioonilisi muutusi (Shin *et al.*, 2004). Meie poolt välja töötatud meetodika (ühtsed parameetrid kõigi *Candida* liikide uurimiseks) võimaldas meil uurida kolme enamlevinud *Candida* liiki.

C. parapsilosis uurimisel leidsime, et teise ja neljanda patsiendi isolaadid olid identsed. Kuid 35. patsiendi 28. aprilli 2005. aasta isolaadil oli toimunud tüve mikroevolutsiooniline muutus, oli lisandunud 339,5 Kbp fragment (kloon M₁) (Joonis 17). See mikroevolutsiooniline muutus esines nii uriinist kui ka kõrvast isoleeritud tüvedel. Teine mikroevolutsiooniline muutus toimus 51. patsiendil, kui M₁ kloonile lisandus veel üks fragment. Seega on kuue aasta jooksul Tartu lastehaigla intensiivravi osakonnas tekitanud *C. parapsilosis* infektsioone üks tüvi, mis on selle aja vältel läbi teinud kaks mikroevolutsioonilist muutust.



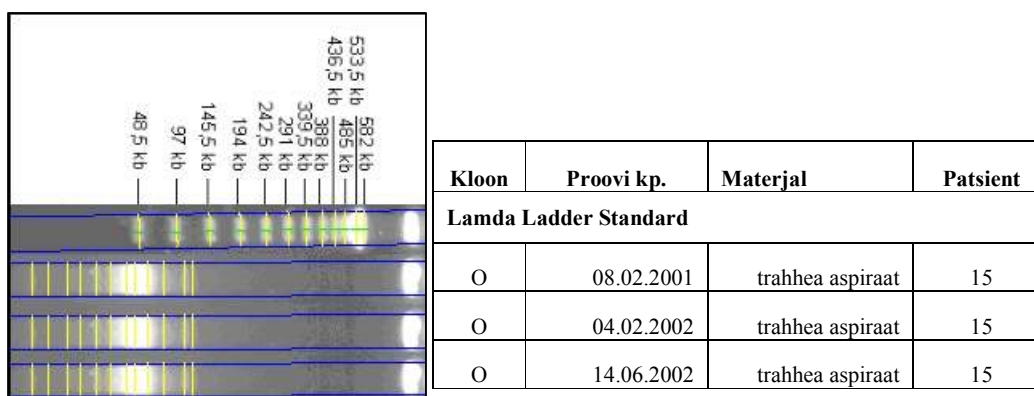
Joonis 17. *C. parapsilosis* isolaatide mikroevolutsioonilised muutused.

C. albicans-i vere isolaatide uurimisel täheldasime ühel patsiendil mikroevolutsioonilise muutuse. Patsiendil nr. 9 esinev kloon N oli 24 päeval jooksul (ajavahemikul 12. 09. 2000 kuni 06.10. 2000) kaotanud ühe fragmendi (Joonis 18). Võiks eeldada, et *Candida* tüvede mikroevolutsioon võib toimuda nii kateetritel tekkivates mikrofilmides, veres, limaskestadel kui ka meditsiinitöötajate kätel või haigla keskkonnas. Shin *et al.* (2004) uuris mikroevolutsiooni teket PFGE meetodil, kasutades selleks kateetriga seotud kandidemia diagnoosiga patsientidelt isoleeritud tüvesid ja leidis, et mikroevolutsioonilisi muutusi esineb küll vereringe kateetritelt isoleeritud tüvedel, kuid need puuduvad vereringest või uriinist kogutud isolaatidel (Shin *et al.*, 2004). Meie uuring aga tõestas, et mikroevolutsioonilised muutused võivad toimuda nii vereringest kui ka trahheast isoleeritud isolaatidel.



Joonis 18. *C. albicans* isolaatide mikroevolutsioonilised muutused.

Vaid ühel patsiendil (nr. 15), kellel oli *C. guilliermondii* kolonisatsioon, oli isoleeritud enam kui 5 isolaati, millest analüüsisime kolme; kõik restriktsoonimustrid olid identsed ning mikroevolutsioonilisi muutusi ei täheldatud (Joonis 19). Kuna *C. guilliermondii* isolaate on vähe uuritud, ei saa meie uurimuse põhjal öelda, kas mikroevolutsioonilised muutused pole uuritavatel isolaatidel toimunud, kas sellele liigile on selliste muutuste puudumine iseloomulik või pole meie poolt väljatöötatud meetodika piisavalt tundlik *C. guilliermondii* mikroevolutsiooni uurimiseks. Samas ei saa välistada ka võimalust, et tegemist oli välise kontaminatsiooniga.



Joonis 19. *C. guilliermondii* isolaatide mikroevolutsioonilised muutused.

Kui bakteriaalne mikroevolutsioon on vastutav erinevate virulentsus- ja resistentsus-mehhanismide eest (Shin *et al.*, 2004), siis *Candida* korral esinevate mikroevolutsioonide tähtsus on siiani ebaselge. Pole teada, kas meie uuringus toimus *C. parapsilosis* mikroevolutsioon patsiendist väljaspool, kuna uuringusse polnud hõlmatud keskkonna isolaate. Kas *C. albicans* liigil toimunud mikroevolutsiooniline on patsiendisiseselt liigispetsiifiline või juhuslik pole teada, kuna uuritav isolaatide hulk oli väike ja ühefragmendilisi muutusi oli uuringus liiga vähe.

5. Järeldused

1. Tartu ja Tallinna lastehaigla intensiivravi osakondades on enamlevinud liikideks *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* ja *C. albicans*. Kui Tallinnas esines kõigil isolaatidel oma unikaalne genotüüp, siis Tartus leiti üks *C. albicans* tüvi, kolm *C. parapsilosis* tüve ja kaks *C. guilliermondii* tüve, millest igaüks esines mitmel patsiendil.
2. Molekulaarsel genotüüpiseerimisel saadi parim tulemus kui restriksioon teostati ensüümiga BssHIII ning restriksioonifragmentide pulssvälja geelelektroforeesiga (PFGE) kasutati järgmisi parameetrid: pinge 4V/cm, temperatuur 14° C ja pulsi kestvus 5 - 50 sekundit ning PFGE kestvus 20 tundi. Visuaalse tulemuse parandamiseks osutus vajalikuks meetodi modifitseerimine asetades proovid enne ensüümi lisamist ja kohe peale restriksiooni lõppu jääle.
3. Uuringu tulemusel järelitati, et Tartu lastehaigla intensiivravi osakonnas on esinenud püsiv infektsioonikolle, kuid see ei tõesta nosokomiaalset levikut.
4. Leiti, et Tartu lastehaigla intensiivravi osakonnast isoleeritud *C. albicans* ja *C. parapsilosis* tüvedel on toimunud nii samade kui ka erinevate kehapiirkondade isolaatidel mikroevolutsioonilisi muutusi ja oletati, et need võivad olla seotud tüvede patogeensuse ja levikuga.

6. Kokkuvõte

Antud töös uuriti retrospektiivselt Tartu ja Tallinna lastehaigla intensiivravi osakonna 52-lt patsiendilt isoleeritud 83 *Candida* isolaati, mille hulgas oli nii invasiivseid kui mitteinvasiivseid tüvesid. Eesmärkideks oli kirjeldada nende tüvede fenotüübilist struktuuri, töötada välja ühtne pulssvälja geelelektroforeesi (PFGE) meetodika, mis sobiks erinevate *Candida* liikide molekulaarseks võrdlemiseks, uurida *Candida* liigisiseste genotüüpide levikut ja nendes toimuvaid mikroevolutsioonilisi muutusi ning teha kindlaks, kas lasteintensiivravi osakondades on esinenud *Candida* tüvede nosokomiaalset levikut.

Töö käigus leiti, et kõigist tüvedest moodustas fenotüübi alusel *C. guilliermondii* 30%, *C. parapsilosis* 30% ja *C. albicans* 29%; sealhulgas invasiivsete tüvede seas prevalveerisid *C. albicans* ja *C. parapsilosis* moodustades mõlemad 42% isolaatidest. Fenotüübilise samastamise käigus leiti, et *C. albicans* määramisel tuleb lisaks *CHROMagar Candida* agarile kasutada ka *Corn Meal Agar* agarit ning *API Candida* kasutamine pole vähemlevinud liikide puhul otstarbekas kuna vastupidiselt tootja spetsifikatsioonile ei suuda test samastada *C. lusitaniae* ja *C. famata* liike.

Genoomse DNA PFGE osutus heaks meetodiks *Candida* isolaatide liigisiseks uurimiseks. Antud uuringus töötati välja ühtne PFGE metoodika kolme *Candida* liigi (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*) analüüsimiseks. Järeldati, et DNA eeltötluseks sobib hästi *Genepath Group 4 Reagent Kit* (tootja Bio-Rad Laboratories, Prantsusmaa) ja sobivaimaks restriksiooni ensüümiks on BssHIII. Optimaalseimateks PFGE parameetriteks osutusid Shin *et al.* (2005) poolt *C. krusei* PFGE teostamiseks kasutatud parameetrid: pinge 4V/cm, temperatuur 14° C, pulsi kestvus 5 - 50 sekundit ja kestvus 20 tundi. Metoodika modifitseerimise käigus leiti, et parimaks restriksioonifragmentide visuaalseks eristamiseks on vajalik proovide eelnev ja järgnev jääle panek.

Genotüübilise struktuuri uurimisel leiti, et uuritaval ajaperioodil esines Tartus ühe *C. albicans* tüve levik, kuid Tallinnas erinesid kõik *C. albicans* isolaadid üksteisest rohkem kui kolme restriksioonifragmenti võrra. *C. parapsilosis* liigi puhul leiti 12 isolaadil sarnane restriksioonimuster. Seega võib oletada, et Tallinnas pärinesid tüved kõige tõenäolisemalt ema mikrofloorast ja Tartus intensiivravi osakonnast. Kuna aastatel 2002 kuni 2004 ei isoleeritud ühtegi *C. parapsilosis* isolaati ja 2005. aastal eraldatud isolaatide restriksioonimustrid sarnanevad 2000/2001 aasta isolaatidele, viitas see püsiva kolde

olemasolule Tartu lastehaigla intensiivravi osakonnas. *C. guilliermondii* puhul leiti tüvi L, mis oli esinenud alates 24. novembrist 2000. aastal kuni 26. jaanuarini 2005. aastal. Tüve mitmeaastane esinemine näitas, et ka *C. guilliermondii* liigi tüvel L esineb sarnaselt *C. albicans* liigi tüvele A ja *C. parapsilosis* liigi tüvele J lastehaigla intensiivravi osakonnas püsiv kolle. Siiski ei võimaldanud antud uuring välistada analüüside kontaminatsiooni säilitamise käigus.

Mikroevolutsioonilisi muutusi uurides leiti üks patsiendi siseselt toimunud *C. albicans* tüve fragmendi kadumine vere isolaadi korral. *C. parapsilosis* puhul leiti mikroevolutsiooniliste muutuste kaskaad, kus ajaliselt kahel järjestikkusel korral oli järgmisena nakatunud patsiendil toimunud ühe fragmendi lisandumine restriksioonimustrisse. Võiks eeldada, et kui patsiendil on üks ja sama liik esinenud aasta ja neli kuud, siis on üpris tõenäoline, et on toimunud tüvesisene mikroevolutsiooniline muutus genoomis. Meie uuringus olid kõik *C. guilliermondii* isolaatide restriksioonimustrid identsed ja mikroevolutsioonilisi muutusi ei esinenud. Kuna *C. guilliermondii* isolaate on vähe uuritud, ei osata ka öelda, kas mikroevolutsiooniliste muutuste vähesus on iseloomulik sellele liigile või pole väljatöötatud meetodika sobilik *C. guilliermondii* mikroevolutsiooni uurimiseks. Siiski ei anna ka meie uuring vastust nimetatud probleemile kuna pikaajase kogutud tüvede retrospektiivsel analüüsil ei saa välistada isolaatide kontaminatsiooni. Seega vajaks see probleem edasisi uuringuid tüvedega, mille säilitusperiood on lühem ja kontaminatsioonioht väiksem.

Kokkuvõtteks võib öelda, et Tartu ja Tallinna lastehaigla intensiivravi osakondades on enamlevinud liikideks *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* ja *C. albicans*. Leiti, et ühe meetodikaga ja parameetritega on võimalik uurida mitme *Candida* liigi liigisisest varieeruvust. Tuvastati, et kõikidel Tartu lastehaigla intensiivravi osakonnast isoleeritud liikidel esineb püsiv infektsioonikolle osakonnas. Mikroevolutsioonilisi muutusi leiti ainult *C. parapsilosis* ja *C. albicans* liikide tüvedel, kuid nende roll *Candida* patogeensusele ja nosokomiaalsele levikule vajab veel edaspidiseid täiendavaid uuringuid.

7. Summary

Phenotypical and Genotypical structure of *Candida* species in the paediatric intensive care units

In the current study a total of 83 invasive and non-invasive *Candida* isolates collected from 52 patients in the paediatric intensive care units (PICU) of Tartu University Clinics and Tallinn's Children Hospital were retrospectively evaluated. The purpose of the study was to (1) describe phenotypical and genotypical structure of these isolates; (2) to develop an uniform methodology of pulsed field gel electrophoresis (PFGE) that enables to analyse various *Candida* species; (3) to characterise microevolutionary changes and spread of different genotypes over the period of 5 years and (4) to find out whether a nosocomial spread of *Candida* species in the PICU's has occurred.

The samples were collected on clinical indications and *Candida spp.* were isolated and identified by culturing them on *Sabouraud Dextrose Agar*, *CHROMagar Candida*, *Corn Meal Agar + Polysorbate/Tween 80* and API tests. The most commonly identified *Candida* species among invasive strains were *C. guilliermondii* (30%), *C. parapsilosis* (30%) and *C. albicans* (29%) whereas two latter types (both with the frequency of 42%) prevailed among non-invasive strains. We found that the *CHROMagar Candida* was not sufficient in identifying all *Candida spp.*; especially of *C. albicans* for which the *Corn Meal Agar* had to be included. In contrast to manufacturers specification *API Candida* did not allow to determine *C. lusitaniae* and *C. famata* species.

The modified PFGE of restricted genomic DNA was used for genotyping of *Candida spp.* In all previous studies for each *Candida* species different PFGE conditions were used. In this study, however, we managed to develop a unified methodology for PFGE analysis for three different *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*). The following conditions suited the best: DNA was preprocessed with the Genepath Group 4 Reagent Kit (Bio-Rad Laboratories, France) and restricted with the enzyme BssHIII. Most optimal parameters for all species were those described by Shin *et al.* (2005) for *C. krusei* - pressure 4V/cm, temperature 14° C, pulse 5-50 seconds and duration of 20 hours. In addition for the best visual band separation all probes had to be placed onto ice before and after the restriction.

All *Candida* species that were spreading in the PICU in Tartu in 1999-2005 had similar pattern on PFGE suggesting that there was a common environmental source in this

unit. In Tallinn, however, all isolates were different indicating that the *Candida* species most likely originated from the birth canal. A total of twelve isolates of *C. parapsilosis* with similar restriction patterns in the PICU in Tartu were found. The fact that *C. parapsilosis* restriction patterns in 2000/2001 and in 2005 were similar and that there were no isolates in 2002 to 2004 suggests that there was a permanent source in the ICU in children's hospital of Tartu. In addition, the single PFGE pattern of *C. guillierimondii* was seen from 24th of November 2000 until 26th of January 2005. The existence of a single clone over several years may indicate to a persistent source, however, an external contamination during the storage cannot be excluded.

During the study minor changes (loss of a fragment) in restriction fragments among *Candida albicans* strains were observed; these were considered as microevolutionary changes. In *C. parapsilosis* strains, however, several changes occurred; in two consecutive patients infected with *C. parapsilosis* the addition of a fragment was observed. One patient had one and the same *C. guillierimondii* strain almost one and half year. We assumed that there should be some microevolutionary changes in the genome of this strain. But all the isolates had the same pattern and we did not find any fragment changes. Since all PFGE patterns of *C. guillierimondii* were very similar one may speculate that these strains were result of a contamination and not a real infection.

In conclusion *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. guillierimondii* were the most common species in the paediatric intensive care units in Tartu and Tallinn's children Hospital. In the PICU in Tartu vast majority of subjects were infected with similar *Candida* strains suggesting that a permanent external source existed over the years. In Tallinn, however, all strains were clonally different and most likely originated from the birth canal. Several microevolutionary changes were observed in *C. albicans* and *C. parapsilosis* strains. Their role in the pathogenesis of the disease or in the development of nosocomial infections, however, remains to be clarified in further studies.

Kasutatud kirjandus

Ainscough S, Kibbler CC. An Evaluation of the Cost-Effectiveness of Using CHROMagar for Yeasts Identification in a Routine Microbiology Laboratory. *Journal of Medical Microbiology* 1998; 47: 623-628.

Ariyawardana A, Panagoda GJ, Fernando HN, Ellepola AN, Tilakaratne WM, Samaranyake LP. Oral Submucous Fibrosis and Oral Yeast Carriage - a Case Control Study in Sri Lankan Patients. *Mycoses* 2007; 50: 116-20.

Barchiesi F, Falconi Di Francesco L, Arzeni D, Caselli F, Simonetti O, Cellini A, Giacometti A, Offidani AM, Scalise G. Electrophoretic Karyotyping and Antifungal Susceptibility Patterns of *Candida parapsilosis* Clinical Isolates Causing Deep and Superficial Fungal Infections. *Mycopathology* 2000; 149: 117-121.

Bighton D, Ludford R, Clark DT, Brailsford SR, Pankhurst CL, Tinsley GF, Fiske J, Lewis D, Daly B, Khalifa, Marren V, Lynch E. Use of CHROMagar Candida Medium for Isolation of Yeast from Dental Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33: 3025-3027.

Benjamin DK, Stoll BJ, Fanaroff AA, McDonald SA, Oh W, Higgins RD, Duara S, Poole K, Laptook A, Goldberg R and on behalf of the National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. Neonatal Candidiasis Among Extremely Low Birth Weight Infants: Risk Factors, Mortality Rates, and Neurodevelopmental Outcomes at 18 to 22 Months. *Paediatrics* 2006; 117: 84-92.

Bingen EH, Desjardins P, Arlet G, Bourgeois F, Mariani-Kurkdjian P, Lambert-Zechovsky NY, Denamur E, Philippon A, Elion J. Molecular Epidemiology of Plasmid Spread Among Extended Broad-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a paediatric hospital. *Journal of Clinical Microbiology* 1993; 31: 179-184.

Chen K-W, Lo H-J, Lin Y-H, Li S-Y. Comparison of Four Molecular Typing Methods to Assess Genetic Relatedness of *Candida albicans* Clinical Isolates in Taiwan. *Journal of Medical Microbiology* 2005; 54: 249-258.

Chibana H, Iwaguchi S, Homma M, Chindamporn A, Nakagawa Y, Tanaka K. Diversity of Tandemly Repetitive Sequences Due to Short Periodic Repetition in the Chromosomes of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* 1994; 176: 3851-3858.

Chindamporn A, Nakagawa Y, Homma M, Chibana H, Doi M, Tanaka K. Analysis of the Chromosomal Localization of the Repetitive Sequences (RPSs) in *Candida albicans*. *Microbiology* 1995; 141:469-476.

Chindamporn A, Nakagawa Y, Mizuguchi I, Chibana H, Doi M, Tanaka K. The Repetitive Sequences, RPSs, in the Chromosomes of *Candida albicans*, are Sandwiched by Two Novel Stretches HOK and RB2, Common to Each Chromosome. *Microbiology* 1998; 144: 849-857.

Clark-Welker GD, Sriprakash KS. Analysis of a Five Gene Cluster and Unique Orientation of Large Genic Sequence in *Torulopsis glabrata* Mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 1983; 19: 342-345.

Cliff PR, Sandoe JAT, Heritage J, Barton RC. Retrospective Survey of Candidemia in Hospitalized Patients and Molecular Investigation of a Suspected Outbreak. *Journal of Medical Microbiology* 2005; 54: 391-394.

Comert F, Kulah C, Aktas E, Eroglu O, Ozlu N. Identification of *Candida* Species from Patients in Intensive Care Unit and *in vitro* Susceptibility to Fluconazole for a 3-year Period. *Mycoses* 2007; 50: 52-57.

Decré D, Gachot B, Lucet JC, Arlet G, Bergogne-Berezin E, Regnier B. Clinical and Bacteriologic Epidemiology of Extended-spectrum β -lactamase-producing Strains of *Klebsiella pneumoniae* in a Medical Intensive Care Unit. *Clinical Infectious Diseases* 1998; 27: 834-844.

Deresinski SC, Clemons KV, Kemper CA, Roesch K, Walton B, Stevens DA. Genotypic Analysis of Pseudoepidemic Due to Contamination of Hanks' Balanced Salt Solution With *Candida parapsilosis*. *Journal Of Clinical Microbiology* 1995; 33: 2224-2226.

Dib JC, Dube M, Kelly C, Rinaldi MG, Patterson JE. Evaluation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis as a Typing System for *Candida rugosa*: Comparison of Karyotype and Restriction Fragment Length Polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 34: 1494-1496.

Doebbeling BN, Lehmann PF, Hollis RJ, Wu LC, Widmer AF, Voss A, Pfaller MA. Comparison of pulse-field Gel Electrophoresis with Isonzyme Profiles as a Typing System for *Candida tropicalis*. *Clinical Infectious Diseases* 1993; 16: 377-383.

Fleck R, Dietz A, Hof H. In vitro Susceptibility of *Candida* Species to Five Antifungal Agents in a German University Hospital Assessed by the Reference Broth Microdilution Method and Etest. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 59: 767-771.

Gil-Lamaignere C, Roloides E, Hacker J, Müller F-MC. Molecular Typing for Fungi – a Critical Review of the Possibilities and Limitations of Currently and Future Methods. *Clinical Microbiological Infections* 2003; 9: 172-185.

Gottfredsson M, Cox GM, Prefect JR. Molecular Methods for Epidemiological and

Diagnostic Studies of Fungal Infections. Pathology 1998; 30: 405-418.

Hospenthal DR, Murray CK, Green JA, Dooley DP. Persistence of Pigment Production by Yeast Isolates Grown on CHROMagar Candida Medium. Journal of Clinical Microbiology 2002; 40: 4768-4770.

Houang ETS, Chu KC, Koehler AFB, Cheng AFB. Use of CHROMagar Candida for Genital Specimens in the Diagnostic Laboratory. Journal of Clinical Pathology 1997; 50: 563-565.

<http://alces.med.umn.edu/Candida.html>; 04. juuli 2007.

Hull CM, Johnson AD. Identification of a Mating Type-like Locus in the Asexual Pathogenic Yeast *Candida albicans*. Science 1999; 285: 1271-1275.

Janbon G, Sherman F, Rustchenko E. Monosomy of a Specific Chromosome Determines L-sorbose Utilization: A Novel Regulatory Mechanism in *Candida albicans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 1998; 95: 5150-5155.

Jang S-J, Han H-L, Lee S-H, Ryu S-Y, Chaulagain BP, Moon Y-L, Kim D-H, Jeong O-Y, Shin J-H, Moon D-S, Park Y-J. PFGE-Based Epidemiological Study of an Outbreak of *Candida tropicalis* Candiduria: The Importance of Medical Waste as a Reservoir as a Reservoir of Nosocomial Infection. Japanese Journal of Infectious Diseases 2005; 58: 263-267.

Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, Newport G, Thorstenson YR, Agabian N, Magee PT, Davis RW, Scherer. The Diploid Genome Sequence of *Candida albicans*. Proceedings of the National Academy of Sciences 2004; 101: 7329-7334.

Kanellopoulou M, Stamos G, Petinnelli I, Savala M, Tzimogianni A, Legakis NJ, Foustouk M, Parafragas E, Velegraki A. Subtyping and Antifungal Susceptibilities of *Candida spp.* in the Intensive Care Unit of a Greek General Hospital. International Journal of Antimicrobial Agents 2001; 18: 179-183.

Koehler AP, Chu K, Houang ETS, Cheng AFB. Simple, Reliable, and Cost-Effective Yeast Identification Scheme for the Clinical Laboratory. Journal of Clinical Microbiology 1999; 37: 422-426.

Levy I, Rubin LG, Vasishtha, Tucci V, Sood SK. Emergence of *Candida parapsilosis* as the Predominant Species Causing Candidemia in Children. Clinical Infectious Diseases 1998; 26: 1086-1088.

Lupetti A, Tavanti A, Davini P, Ghelardi E, Corsini V, Merusi I, Boldrini A, Campa M, Senesi S. Horizontal Transmission of *Candida parapsilosis* Candidemia in a Neonatal

Intensive Care Unit. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 2363-2369.

Marco F, Lockhart SR, Pfaller MA, Pujol C, Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Edwards JE, Jarvis W, Saiman L, Paterson JE, Rinaldi MG, Wenzel RP, the Nemis study group, Soll DR. Elucidating the Origins of Nosocomial Infections with *Candida albicans* by DNA Fingerprinting with the Complex Probe Ca3 1999; 37: 2817-2828.

Medeiros EA, Lott TJ, Colombo AL, Godoy P, Coutinho AP, Braga MS, Nucci M, Brandt ME. Evidence for a Pseudo-outbreak of *Candida guilliermondii* Fungemia in a University Hospital in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45: 942-947.

Murray PR, Baron EL, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yölkén RH. *Manual of Clinical Microbiology* 2003; 2: 1653-1704.

Nedret Koc A, Kocagöz, Erdem F, Gündüz Z. Outbreak of Nosocomial Fungemia Caused by *Candida glabrata*. *Mycoses* 2002; 45: 470-475.

Neofytos D, Pfaller MA, Diekema DJ, Horn D. A Case of Recurrent Episodes of *Candida parapsilosis* Fungemia. *Mycopathologia* 2006; 162: 295-298.

Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a New Differential Isolation Medium for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida* Species. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32: 1923-1929.

Odds FC. Sabouraud(s) Agar. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 1991; 29: 355-359.

Paritpokee S, Hall G, Procop G. Rapid Identification of Yeast Isolates using BD BBL CHROMagar Candida. As presented at the 105th General Meeting of the American Society for Microbiology 2005.

Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Application*. Washington, Mayo Foundation Rochester 1993; 35-38, 563-572.

Pfaller MA, Houston A, Coffmann. Application of CHROMagar Candida for Rapid screening of Clinical Specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology* 1996; 34: 58-61.

Powell HL, Sand CA, Rennie RP. Evaluation of CHROMagar Candida for Presumptive Identification of Clinically Important *Candida* species. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 1998; 32: 201-204.

Reiss E, Tanaka K, Bruker G, Chazalet V, Coleman D, Debeaupuis JP, Hanazawa R, Latgé JP, Lortholary J, Makimura K, Morrison CJ, Murayama SY, Naoe S, Paris S, Sarfati J, Shibuya K, Sullivan D, Uchida K, Yamaguchi H. *Molecular Diagnosis and*

- Epidemiology of Fungal Infections. *Medical Mycology* 1998; 36: 249-57.
- Rho J**, Shin JH, Song JW, Park M-R, Kee SJ, Jang SJ, Park YK, Suh SP, Ryang DW. Molecular Investigation of Two Consecutive Nosocomial Clusters of *Candida tropicalis* Candiduria Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *The Journal of Microbiology* 2004; 42: 80-86.
- Roilides E**, Farmaki E, Evdoridon J, Dotis J, Hatzioannidis, Tšivitanidou M, Bibashi E, Filioti I, Sofianou D, Gil-Lamaignere C, Mueller F-M, Kremenopoulos G. Neonatal Candidiasis: Analysis of Epidemiology, Drug Susceptibility, and Molecular Typing of Causative Isolates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2004; 23: 745-750.
- Rozkiewicz D**, Daniluk T, Zaremba ML, Cylwik-Rokicka D, Stokowska W, Pawińska M, Dabrowska E, Marczuk-Kolada G, Waszkiel D. Oral *Candida albicans* carriage in healthy preschool and school children. *Advances in medical sciences* 2006; 51: 187-90.
- Rowen JL**, Tate JM, Nordoff N, Passarell L, McGinnis MR. *Candida* Isolates from Neonates: Frequency of Misidentification and Reduced Fluconazole Susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 3735-3737.
- Rustchenko-Bulgac EP**. Variations of *Candida albicans* Electrophoretic Karyotypes. *Journal of Bacteriology* 1991; 173: 6586-6596.
- Sandven P**, Bevanger L, Digranes A, Haukland HH, Mannsåker T, Gaustad P and the Norwegian Yeast Study Group. Candidemia in Norway (1991 to 2003): Results from a Nationwide Study. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44: 1977–1981.
- Scherer S**, Magee PT “ Genetics of *Candida albicans*”. *Microbiological Reviews* 1990; 54: 226-241.
- Sepp E**, Kõljalg S, Naaber P, Truusalu K, Štšepetova L, Metsvaht T, Sau L, Jürna M, Mägi H, Allik M, Mikelsaar M. *Staphylococcus epidermidis* ja *Klebsiella pneumoniae* – võimalikud hospitaalinfektsioonide tekitajad Eesti lasteintensiivravi osakondades. *Eesti Arst* 2003; 82: 239–248.
- Shin JH**, Og YG, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Molecular Epidemiological Analysis of Bloodstream Isolates of *Candida albicans* from a University Hospital over a Five-Year Period. *The Journal of Microbiology* 2005; 43: 546-554.
- Shin JH**, Park M-R, Song JW, Shin DH, Jung S, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. Microevolution of *Candida albicans* during Catheter-Related Candidemia. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42: 4025-4031.
- Stamos JK**, Rowley AH. Candidemia in a Paediatric Population. *Clinical Infectious*

Diseases 1995; 20: 571-575.

Struelens MJ, De Gheldre Y, Deplano A Comparative and Library Epidemiological Typing Systems: Outbreak Investigations Versus Surveillance Systems. *Infection Control and Hospital Epidemiology: the Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 1998; 19: 565-569.

Tanaka K. Strain-relatedness Among Different Populations of the Pathogenic Yeast *Candida albicans* Analyzed by DNA-based Typing Methods. *Nagoya Journal of Medical Science* 1997; 60: 1-14.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Michkelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33: 2233-2239.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research* 1990; 18: 6531-6535.

Voss A. Epidemiology of Systemic *Candida* Infections. PhD dissertatsioon, Vrije Ülikool, Amsterdam, 1997.

Käesolev töö on rahastatud:

1. SF0182726s06 - HIV infektsioon Eestis: viiruse ja peremeesorganismi interaktsioonid molekulaarsel ja kliinisel tasandil.
2. ETF6984 - Vastsündinu varase sepsise empiirilise antibakteriaalse ravi optimeerimine.

Lisad

Tabel 1. Uurimuses kasutatud söötmete koostisosade protsentuaalne jaotuvus 11 kohta.

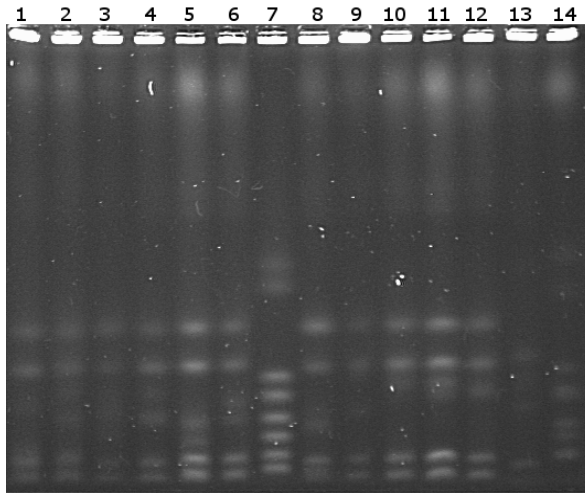
Koostisosad	Sööde		
	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>	<i>CHROMagar Candida</i>	<i>Corn Meal Agar + Polysorbate/Tween 80</i>
Pepton	1%	1%	-
Glükoos	4%	2%	-
Agar	1,5-2%	1,50%	1,50%
Klooramfenikool	-	0,50%	-
Kromogeenne segu	-	0,20%	-
Maisijahu	-	-	15-20%
Polysorbate/Tween 80	-	-	0,10%

Tabel 2. BioMerieux sa. (Prantsusmaa) poolt toodetud *Candida* seente samastamiseks mõeldud testide liigiline võrdlus.

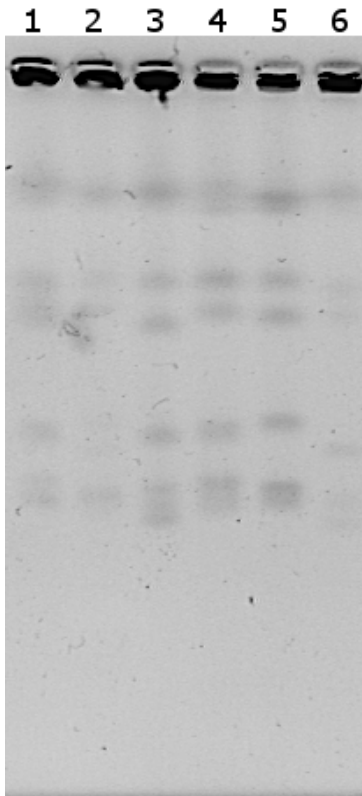
	API Candida	API 20 C AUX	ID 32 C
<i>C. albicans</i>	+	+	+
<i>C. boidinii</i>		+	+
<i>C. catenulata</i>			+
<i>C. ciferrii</i>		+	+
<i>C. colliculosa</i>		+	+
<i>C. curvata</i>			+
<i>C. dattila</i>			+
<i>C. dubliniensis</i>		+	+
<i>C. famata</i>	+	+	+
<i>C. glabrata</i>	+	+	+
<i>C. globosa</i>			+
<i>C. guilliermondii</i>	+	+	+
<i>C. hellenica</i>			+
<i>C. holmii</i>			+
<i>C. inconspicua/novergensis</i>			+
<i>C. intermedia</i>			+
<i>C. kefyr</i>	+	+	+
<i>C. krusei</i>	+	+	+
<i>C. lambica</i>			+
<i>C. lipolytica</i>			+
<i>C. lusitaniae</i>	+	+	+
<i>C. magnoliae</i>		+	+
<i>C. melibiosica</i>			+
<i>C. membranaefaciens</i>			+
<i>C. norvegensis</i>		+	
<i>C. norvegica</i>			+
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+
<i>C. pelliculosa</i>		+	+
<i>C. pulcherrima</i>			+
<i>C. rugosa</i>		+	+
<i>C. sake</i>			+
<i>C. silvicola</i>			+
<i>C. sphaerica</i>		+	+
<i>C. tropicalis</i>	+	+	+
<i>C. utilis</i>		+	+
<i>C. valida</i>			+
<i>C. zeylanoides</i>		+	+

Tabel 3. Kliinilise labori poolt ja tõbermääratud liigilise samastamise erinevused.

Eelnevalt identifitseeritud tüved	Antud uuringus identifitseeritud tüved							
	<i>C. albicans</i> (n = 24)	<i>C. guilliermondii</i> (n = 25)	<i>C. parapsilosis</i> (n = 25)	<i>C. glabrata</i> (n = 3)	<i>C. tropicalis</i> (n = 3)	<i>C. lusitaniae</i> (n = 2)	<i>C. krusei</i> (n = 1)	
<i>C. albicans</i> (n = 32)	24	5	3					
<i>C. parapsilosis</i> (n = 20)			20					
<i>C. glabrata</i> (n = 11)		6	1	3		1		
<i>C. guilliermondii</i> (n = 6)		6						
<i>C. spp.</i> (n = 4)		1	1		1	1		
<i>C. famata</i> ?? (n = 3)		3						
<i>C. lusitaniae</i> (n = 2)		2						
<i>C. pelliculosa</i> (n = 2)		2						
<i>C. tropicalis</i> (n = 2)					2			
<i>C. krusei</i> (n = 1)							1	



Pilt 1. *C. parapsilosis* karüotüpeerimine: 1 – 13 on Tartu Lastehaigla Intensiivravi Osakonna erinevatelt patsientidelt isoleeritud *C. parapsilosis* karüotüübid, 14 on kontrolliks kasutataud *C. albicans* ATCC 28366.



Pilt 2. Tallinna Lastehaigla Intensiivravi Osakonnast erinevatelt patsientidelt 1 - 6 isoleeritud *C. albicans* karüotüübid.