

بررسی تکنیک PCR-DGGE برای شناسایی گونه‌های مختلف *Candida*

آیدا حمیدخانی^۱، پریسا محمدی^۲، عزت عسگرانی^۳، مریم یوسفی^۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۲/۰۱

تاریخ تصویب: ۹۵/۱۲/۱۶

چکیده

مخمر *Candida* از جمله شایعترین مخمرهای عفونت زای انسانی می‌باشد و در سال‌های اخیر نرخ عفونت‌های ایجاد شده توسط این مخمر افزایش یافته است. شناسایی زود هنگام *Candida* های بیماری‌زا نقش مهمی را برای انجام اقدامات درمانی و کنترل عفونت‌های بیمارستانی ایفا می‌نماید. روش‌های سنتی شناسایی *Candida* نسبت به روش‌های مولکولی از حساسیت کمتری برخوردار است و به زمان بیشتری نیاز دارند. با توجه به وجود برخی محدودیت‌ها در روش‌های مولکولی مورد استفاده، در این مطالعه امکان استفاده از تکنیک PCR-DGGE برای شناسایی ۵ گونه‌ی *Candida* بیماری‌زا یعنی *C. glabrata*، *C. tropicalis*، *C. parapsilosis*، *C. albicans* و *C. orthopsilosis* ارزیابی شد. بدین منظور ناحیه‌ی ITS2 با استفاده از پرایمرهای GC-ITS3 و ITS4 تکثیر شد و از محصولات به دست آمده در DGGE استفاده شد و نشان داده شد این تکنیک توانایی شناسایی و تفکیک گونه‌های مورد بررسی را دارا می‌باشد

واژه‌های کلیدی: مخمر، *Candida*، PCR-DGGE، ITS2

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران
(نویسنده مسئول: p.mohammadi@alzahra.ac.ir)

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

۴- کارشناس ارشد، آزمایشگاه ملی میکروبیولوژی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

مقدمه

مخمرهای بیماری‌زای انسانی به فراوانی در محیط حضور دارند و برخی از آن‌ها فلور بدن انسان هستند. این مخمرها معمولاً فرصت طلب بوده و در زمانی که شرایط میزبان مساعد باشد سبب ایجاد عفونت‌های حاد و یا مزمن می‌شوند (Cone et al., 2004).

Candida از جمله مخمرهای اصلی ایجاد کننده‌ی عفونت‌های انسانی می‌باشند. در دو دهه‌ی اخیر عفونت‌های بیمارستانی ایجاد شده با گونه‌های مختلف *Candida* تقریباً ده برابر افزایش یافته و نرخ مرگ و میر ناشی از کاندیدیاز تا ۸۰ درصد زیاد شده است (Wenzel, 1995). در حال حاضر *C. albicans* عامل ایجاد ۵۰ الی ۷۰ درصد از عفونت‌ها می‌باشد (Trofa et al., 2008). با این حال در ده سال اخیر عفونت‌زایی گونه‌های غیر از *C. albicans* نیز افزایش یافته است. از میان گونه‌های غیر از *C. albicans*، *C. glabrata*، *C. parapsilosis*، *C. krusei* و *C. tropicalis* عامل ایجاد ۱۷/۱ درصد از عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند (Tan et al., 2008). با توجه به افزایش عفونت‌های ایجاد شده توسط *Candida* و تفاوت در راه کارهای مقابله با گونه‌های مختلف، شناسایی دقیق گونه‌های *Candida* از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (Lopez-Martinez, 2010). شناسایی زود هنگام گونه‌های مختلف *Candida*

برای شروع درمان‌های ضد قارچی و یا سلول درمانی ضروری می‌باشد و به زنده ماندن بیمار کمک شایانی می‌نماید (Schabereiter-Gurtner et al., 2007). در حال حاضر شناسایی گونه‌های مختلف *Candida* در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و پزشکی با روش‌های استاندارد هم‌چون تشکیل لوله‌ی زایا (Murray et al., 1995) و تست‌های بیوشیمیایی انجام می‌شود (Pfaller et al., 1993). روش‌های ذکر شده نیازمند خالص سازی ارگانیسیم‌های هدف و بسیار زمان برند. تست‌های فنوتیپی به دلیل تفاوت‌های موجود در سویه‌های مختلف مخمری و تغییرات زیاد فنوتیپی درون گونه‌ای، روش‌های مطمئنی برای شناسایی گونه‌های مختلف *Candida* نمی‌باشند. مشکل دیگر روش‌های سنتی تشخیص، عدم توانایی رشد بسیاری از اگزوتروف‌ها در محیط کشت‌های مورد نیاز برای انجام تست‌های مختلف می‌باشد (Ahearn et al., 1998).

روش‌های مولکولی نسبت به روش‌های سنتی راه کارهای دقیق‌تری را به منظور شناسایی میکروارگانیسیم‌ها فراهم می‌نمایند و از این روش‌ها به منظور شناسایی و طبقه بندی مخمرها نیز استفاده شده است. برخی از این تکنیک‌ها، *real-time PCR*، *PCR*، کار یو تا پینینگ، پلی مورفیسیم هضم آنزیم محدود کننده (RFLP)، هیبریداسیون فلورسانس در محل

(FISH) و روش تعیین توالی می‌باشند (Dassanayake & Samaranayake) 2003, Moter & Gobel 2000, Trtkova 2006 (& Raclavsky 2006). با استفاده از روش PCR به همراه تکنیک الکتروفورز با ژل دارای شیب دناتوره کننده (DGGE) امکان شناسایی گونه‌های پیش بینی نشده و حداقل وجود دارد. تکنیک DGGE یکی از پرکاربردترین روش‌های غیر وابسته به کشت به منظور مطالعه‌ی ساختار جمعیت‌های میکروبی می‌باشد (Muyzer 1998 & Smalla). در این روش ابتدا با استفاده از PCR محصولاتی از ناحیه‌ی ژن مورد بررسی به دست آمده و سپس از آن‌ها در DGGE استفاده می‌شود. DGGE قادر است بر اساس تفاوت‌های موجود در ترکیب توالی‌های مورد بررسی و اثری که این تفاوت‌ها بر روی رفتارهای ذوب قطعات می‌گذارند، گونه‌های مختلف را شناسایی نماید. بدین صورت که ذوب شدن جزئی قطعات DNA در ژل اکریل امید دارای شیب دناتوره کننده، در طی الکتروفورز موجب توقف حرکت آن‌ها در ژل و تفکیک توالی‌های متفاوت از هم و در پی آن سبب شناسایی گونه‌های مختلف می‌شود (Muyzer et al., 1993).

5.8srRNA و 28srRNA می‌باشند. ژن‌های RNA ریبوزومی توسط فاصله اندازه‌های ITS1 و ITS2 از هم جدا می‌شوند. نواحی ITS دارای نواحی متغیر و حفاظت شده می‌باشند و به همین دلیل به منظور شناسایی ژنتیکی قارچها استفاده می‌شوند (Reiss et al., 1998).

هدف از این مطالعه بررسی امکان استفاده از تکنیک PCR-DGGE با استفاده از ناحیه‌ی ژنی ITS2 به منظور شناسایی گونه‌های مختلف *Candida* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

گونه‌های *Candida* و محیط کشت لیست گونه‌های *Candida* مختلف مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ ذکر شده است. این گونه‌ها در محیط کشت (PDA potato dextrose agar) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA مشابه روش زیانو^۱ و همکاران (Xiano., 2006)، دو لوپ باکتریولوژی (حدود ۲۰ میلی متر مکعب) از کلنی‌های تازه ی ۲۴ ساعته برداشته شد و به تیوپ ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژیکی منتقل گردید. عمل شستشوی سلولی دوبار با استفاده از سانتریفیوژ (Hettich Rotina 380R) در دور ۳۶۸۹۴ × به مدت ۵ دقیقه انجام شد. مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب

ژن‌های RNA ریبوزومی در ژنوم هاپلوئید تمامی قارچها با آرایش پشت سر هم و تکرار ۵۰ تا ۱۰۰ عدد وجود دارند. این تکرارها شامل ژنهای 18srRNA،

حاصله ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز شامل ۱۰ میلی مولار Tris-HCl، ۱ میلی مولار EDTA ، ۰/۵ میلی مولار NaCl، ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) و حدود ۲۰۰ میکرولیتر گلوله‌ی شیشه‌ای به قطر یک میلی متر اضافه گردید و عمل ورتکس به مدت ۱۵ دقیقه روی آن انجام شد. سپس محلول به مدت ۵ دقیقه در دور $g \times 36894$ سانتریفیوژ شد و مایع رویی به تیوپ جدیدی منتقل و حجم مساوی از ترکیب فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل به آن اضافه شد. پس از سانتریفیوژ مجدد و انتقال فاز رویی به تیوپ جدید، اتانول مطلق سرد با حجمی ۳ برابر مایع رویی به آن افزوده شد و

به مدت ۱ ساعت در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. محلول به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با دور $g \times 44272$ سانتریفیوژ شد و پس از شستشوی رسوب حاصله با اتانول ۷۰ سرد، عمل سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه با دور $g \times 44272$ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گرفت. در نهایت رسوب حاصله در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید و تا موقع استفاده در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد. به منظور اطمینان از کیفیت DNA به دست آمده میزان جذب نوری با استفاده از نانودراپ (Thermo Scientific 2000C) خوانده شد.

جدول ۱: گونه‌های مختلف *Candida* مورد بررسی در این مطالعه

کد گونه	گونه
CCUG ^۲ ۳۲۷۲۳	<i>C. albicans</i>
CCUG ۳۵۲۶۷	<i>C. glabrata</i>
ATCC ۲۲۰۱۹	<i>C. parapsilosis</i>
CCUG ۳۴۲۷۴	<i>C. tropicalis</i>

شرایط PCR

ولتاژ ۷۰ ولت بررسی شد.

شرایط DGGE

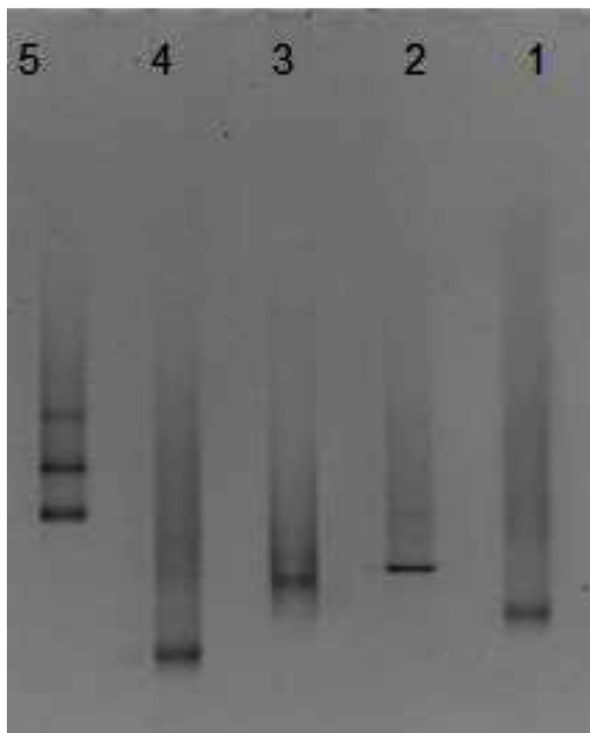
آنالیز DGGE با استفاده از سیستم (Bio-Rad Dcode universal mutation detection system) انجام گرفت. الکتروفورز در ژل اکریل آمید ۸ درصدی شامل شیب دناتوره کننده‌ی اوره و فرم آمید ۳۲/۵ تا ۵۷/۵ درصد انجام شد و ژل با استفاده از بافر 1X TAE در ولتاژ ۵۵ ولت و دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی گراد برای مدت ۱۲ ساعت الکتروفورز گردید. ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲۰ میکرولیتر رنگ بارگذاری 2x مخلوط گردید و در الکتروفورز استفاده شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در بافر 1X TAE رنگ زدایی گردید. در نهایت ژل با استفاده از ژل داگ (Syngene In Genius LHR2) مشاهده و از آن عکس برداری شد.

نتایج

با استفاده از روش استخراج DNA فنل کلروفرم و گلوله‌های شیشه‌ای مقدار زیادی (حدود ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) DNA خالص و قابل تکثیر از گونه‌های مختلف *Candida* به دست آمد. پس از تکثیر DNA، از محصولات PCR (حدود ۲۰ میکرولیتر) در DGGE استفاده شد. به منظور بهینه سازی تفکیک باندهای متعلق به گونه‌های مختلف از یکدیگر و وضوح باندها، شرایط مختلفی

با دستگاه ترموسایکلر (96 PeqSTAR Universal Gradient) انجام شد و قطعات حدود ۳۰۰ جفت بازی در ناحیه‌ی ITS2 با استفاده از پرایمرهای ITS3 و ITS4 تکثیر یافت (White et al., 1990). به منظور جلوگیری از ذوب شدن کامل قطعات DNA در DGGE، قطعه‌ی کوتاهی از GC با توالی 5'CGCCCGCCGCGCGCGGGG3' به انتهای ۵' پرایمر رفت متصل گردید (Muyzer., 1999). مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR به همراه ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار از چهار نوع نوکلئوتید (dNTP)، ۰/۱۶ میلی مولار از هر کدام از پرایمرهای رفت ITS3-GC و برگشت ITS4، ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq polymerase و ۱ میکرولیتر DNA الگو بود. برنامه‌ی اجرا شده در PCR عبارت بود از: دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه به منظور دناتوراسیون اولیه، ۳۵ سیکل شامل دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه. پس از انجام PCR به منظور اطمینان از کیفیت محصولات به دست آمده ۵ میکرولیتر از هر کدام از محصولات بر روی ژل آگارز ۱ درصد با

برای الکتروفورز اعمال گردید و شیب‌های دناتوره کننده‌ی اوره و فرم آمید متفاوتی به کار گرفته شد. در نهایت شرایط شیب ۳۲/۵ تا ۵۷/۵ درصد در ژل ۸ درصد اکریل آمید در ولتاژ ۵۵ ولت و دمای ۵۶ درجه ی سانتی گراد برای مدت ۱۲ ساعت به عنوان بهترین شرایط DGGE انتخاب گردید و مشاهده شد باندهای متعلق به گونه‌های مختلف *Candida* در این شرایط به خوبی از هم تفکیک می‌شوند (شکل ۱).



شکل ۱: شکل الکتروفورز PCR-DGGE گونه‌های مختلف *Candida* در ژل اکریل آمید ۸ درصد. به ترتیب ردیف ۱ تا ۵ نشان دهنده‌ی *C. orthopsilosis*، *C. parapsilosis*، *C. glabrata*، *C. albicans* و *C. tropicalis* می‌باشد.

تفاوت‌های موجود میان گونه‌های مختلف نزدیک به هم در مقایسه با نواحی حفاظت شده‌ی رمزگذار rRNA بیشتر باشد. در نتیجه توالی DNA در ناحیه‌ی ITS معمولاً برای طبقه بندی تاکسونومیکی مناسب تر می‌باشد (Lord et al., 2002). از این رو در این مطالعه از ناحیه‌ی ITS2 به منظور شناسایی گونه‌های مختلف *Candida* توسط DGGE استفاده شد.

بحث

شناسایی مولکولی گونه‌های مختلف قارچی معمولاً با استفاده از نواحی ITS صورت می‌پذیرد. ناحیه‌ی غیر رمزگذار ITS که شامل ITS1، 5.8S rDNA و ITS2 می‌باشد، به دلیل وجود تعداد تکرارهای زیاد در ژنوم قارچ‌ها، هدف مناسبی برای PCR است. این ناحیه دارای سرعت تکامل بالایی می‌باشد و سبب می‌شود

که در برخی از گونه‌های قارچی مطالعه شده با DGGE چندین باند در ژل برای یک میکروارگانیزم خاص ایجاد شد. پرایمرهای NL1 و LS2 بخش زیادی از دومین ناحیه D1 (26S rRNA) (Cocolin et al., 2003) و پرایمرهای ITS3 و ITS4 ناحیه‌ی ITS2 و بخشی از 5.8S rRNA از ژن RNA ریبوزومی را تکثیر می‌دهند (White et al., 1990) و از آن جایی که ITS2 دارای تکرارهای زیادی می‌باشد، گمان می‌رود باندهای اضافی حاصله از تکثیر با استفاده از پرایمرهای ITS3 و ITS4 برای گونه‌ی *C. tropicalis* به دلیل وجود تنوع ژنتیکی در کپی‌های مختلف ناحیه‌ی بررسی شده در ناحیه‌ی ITS2 باشد (Schoch et al., 2012).

به دلیل شیوع بالا و گسترش روز افزون عفونت‌های ایجاد شده توسط گونه‌های مختلف *Candida* (Lopez-Martinez, 2010) تکنیک DDGE می‌تواند نقش به‌سزایی را در شناسایی عوامل عفونت زای کاندیدیایی ایفا نماید. تکنیک DGGE روشی سریع، قابل اعتماد، تکرار پذیر و مقرون به صرفه برای شناسایی میکروارگانیزم‌ها بوده (Muyzer, 1990) و با استفاده از این تکنیک می‌توان گونه‌های غیر قابل انتظار و با فراوانی پایین را در محیط مورد بررسی شناسایی نمود (Weerasekera et al., 2013). از این رو ارزیابی امکان استفاده از DGGE به منظور شناسایی

با توجه به شکل ۱ مشاهده می‌شود بهینه‌سازی شرایط DGGE سبب شد تا قطعات تکثیر شده‌ی ناحیه‌ی ITS2 از ۵ گونه‌ی مختلف میزان حرکت متفاوتی را در ژل DGGE از خود نشان دهند. به طوری که *C. albicans* و *C. tropicalis* به ترتیب در کمترین و بیشترین غلظت از ماده‌ی دنا توره کننده در ژل متوقف شده و سایر گونه‌ها در فاصله‌ی میانی آن‌ها قرار گرفتند. در مطالعه‌ی ای که توسط ویراسکرا^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۳ روی گونه‌های مختلف *Candida* بزاق صورت گرفت (Weerasekera et al., 2013)، نشان داده شد امکان شناسایی گونه‌های مختلف *Candida* با استفاده از پرایمرهای NL1 و LS2 توسط DGGE وجود دارد و هر یک از گونه‌های *Candida* یک باند خاص در جایگاه خاصی از ژل را به خود اختصاص می‌دهند. در مطالعه‌ی حاضر با وجود این که برای هر کدام از گونه‌های *C. albicans*، *C. orthopsilosis*، *C. glabrata* و *C. parapsilosis* یک باند در ژل به دست آمد، اما گونه‌ی *C. tropicalis* 4 باند ایجاد نمود. در مطالعه‌ی ای که توسط میکایلسن^۲ و همکاران بر روی کلنی‌های قارچ‌های کاغذ انجام شده بود نیز نتایج مشابهی برای محصولات PCR حاصل شده با پرایمرهای ITS3 و ITS4 مشاهده شد (Michaelsen., 2006). به طوری

1. Weerasekera

2. Michaelsen

سایر گونه‌های بیماری‌زای *Candida* با مختلف بیماری‌زای *Candida* مورد نواحی ژنی مختلف می‌تواند نقش مؤثری در افزایش کاربردهای تشخیصی این روش ایفا نماید.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه امکان استفاده از تکنیک DGGE به منظور شناسایی ۵ گونه‌ی تکثیر یافته از ناحیه‌ی ITS2 وجود دارد و الگوی خاصی از باندها حاصل می‌شود

منابع

- Ahearn, D.G. (1998) Yeasts pathogenic for humans. Pp. 9–14. In: C. P. Kurtzman and J. W. Fell (eds), *The yeasts, a taxonomic study*, 4th ed. Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands
- Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A. (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 189(1): 81–87.
- Cone, L.A., Byrd, R.G., Potts, B.E., Wuesthoff, M. (2004) Diagnosis and treatment of *Candida* vertebral osteomyelitis: clinical experience with a short course therapy of amphotericin B lipid complex. *Surgical Neurology* 62(3): 234-7.
- Dassanayake, R.S., Samaranyake, L.P. (2003) Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting: the basics. *Methods Molecular Biology* 226: 117-22.
- Lopez-Martinez, R. (2010) Candidosis, a new challenge. *Clinics in Dermatology* 28(2):178-84.
- Moter, A., Gobel, U.B. (2000) Fluorescence in situ Hybridization (FISH) of microorganisms for direct visualization. *Journal of Microbiological Methods* 41(2):85-112.
- Lord, N.S., Kaplan, C.W., Shank, P., Kitts, C.L., Elrod, S.L. (2002) Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. *FEMS Microbiology Ecology* 42(3): 327-37.
- Michaelsen, A., Pinzari, F., Ripka, K., Lubitz, W., Pilar, G. (2006) Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58(3): 133-141.
- Murray, P.R., Baron, E, Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (1995) *Manual of clinical microbiology*, 6th ed., ASM Press. 436pp, Washington DC.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reac-

- tion-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59(3): 695–70.
- Muyzer, G., Smalla, K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73(1): 127-41.
- Muyzer, G. (1999) DGGE/TGGE, a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion* 2(3): 317-22.
- Pfaller, M.A., Preston, T., Bale-M., Koontz, F.P., Body, B.A. (1993) Comparison of the Quantum II, API Yeast Ident, and AutoMicrobic systems. *Journal of Clinical Microbiology* 26(10): 2054-8.
- Reiss, E., Tanaka K, Bruker, G., Chazalet, V., Coleman, D., Debeaupuis, J.P., Hanazawa, R., Latge, J.P., Lortholary, J., Makimura, K., Morrison, C.J., Murayama, S.Y., Naoe, S., Paris, S., Sarfati, J., Shibuya, K., Sullivan, D., Uchida, K., Yamaguchi, H. (1998) Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections. *Medical Mycology* 36(57):-249–57.
- Schabereiter-Gurtner, C., Selitsch, B., Rotter, M.L., Hirschl, A.M., Willinger, B. (2007) Development of novel realtime PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 45(3): 906–914.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S. (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(16): 6241-6.
- Tan, T.Y., Tan, A.L., Tee, N.W. (2008) A retrospective analysis of antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates from Singapore hospitals. *Annals of the Academy of Medicine Singapore* 37(10): 835-40.
- Trofa, D., Gacser, A., Nosanchuk, J.D. (2008) *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 21(4): 606-25.
- Trtkova, J., Raclavsky, V. (2006) Molecular-genetic approaches to identification and typing of pathogenic *Candida* yeasts. *Biomedical Papers* is an official journal of the Palacký University, Faculty of Medicine and Dentistry, Olomouc, Czech Republic 150(1): 51-61
- Weerasekera, M.M., Sissons, C.H., Wong, L., Anderson, S., Holmes, A.R. (2013) Use of denaturing gradient gel electrophoresis for the identification of mixed oral yeasts in human saliva. *Journal of Medical Microbiology* 62(2): 319-330.
- Wenzel, R.P. (1995) Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clinical Infectious Diseases* 20(6): 1531-4.