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 Candidaهای بیماری زا 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. albicans، C. orthopsilosis، C. tropicalis، C. glabrata و C. parapsilosis 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

واژه های کلیدی: مخمر، ITS2، PCR-DGGE، Candida

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران
*۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران
(نویسنده مسئول: p.mohammadi@alzahra.ac.ir)
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران
٤- کارشناس ارشد، آزمایشگاه ملی 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 عفونت ها می‌باشد (Trofa et al., 2008). با این حال در ده سال اخیر عفونت زایی گونه‌های غیر از *C. albicans* نیز افزایش یافته است. از میان گونه‌های غیر از *C. albicans*، *C. parapsilosis*، *C. glabrata*، *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-Martınez, 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 استانداردی همچون تشکیل لوله‌ی زایا (Murray et al., 1995) و تست‌های بیوشیمیایی انجام می‌شود (Pfaller et al., 1993). روش‌های ذکر شده نیازمند خالص سازی ارگانیسم‌های هدف و بسیار زمان بر ند. 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 میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌نمایند و از این روش‌ها به منظور شناسایی و طبقه بندی مخمرها نیز استفاده شده است. برخی از این تکنیک‌ها، PCR، real-time PCR، کاریوتایپینگ، پلی‌مورفیسم هضم آنزیم محدود کننده (RFLP)، هیبریداسیون فلورسانس در محل

(FISH) و روش تعیین توالی می‌باشند (Dassanayake & Samaranayake 2003, Moter& Gobel 2000, Trtkova & 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 & Smalla 1998). 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 جزیی قطعات DNA در ژل اکریل آمید 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).

ژن های 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، 5.8srRNA و 28srRNA میباشند. ژن های RNA ریبوزومی توسط فاصله اندازهای 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 ۲٤ ساعت کشت داده شدند.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA مشابه روش زیانو[1] و همکاران (Xiano, 2006)، دو لوپ باکتریولوژی (حدود ۲۰ میلی متر مکعب) از کلنی‌های تازه ی ۲٤ ساعته برداشته شد و به تیوپ ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیکی منتقل گردید. عمل شستشوی سلولی دوبار با استفاده از سانتریفیوژ (Hettich Rotina 380R) در دور g × ۳٦۸۹٤ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب

۱.Xiano

حاصله ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز شامل ۱۰ میلی مولار Tris-HCl، 1 میلی مولار EDTA ، ۰/۵ میلی مولار NaCl، ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۵:۲٤:۱) و حدود ۲۰۰ میکرولیتر گلوله‌ی شیشه ای 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 × ۳٦۸۹٤ 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 *3* 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 ٤ درجه‌ی سانتی گراد با دور g × ٤٤۲۷۲ سانتریفیوژ شد و پس از شستشوی رسوب حاصله با اتانول ۷۰ سرد، عمل سانتریفیوژ به مدت *2* دقیقه با دور g × ٤٤۲۷۲ در دمای ٤ درجه‌ی سانتی گراد انجام گرفت. در نهایت رسوب حاصله در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید و تا موقع استفاده در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی گراد نگه‌داری شد. به منظور اطمینان از کیفیت DNA به دست آمده میزان جذب نوری با استفاده از نانودراپ (Thermo Scientific 2000C) خوانده شد.

جدول۱: گونه‌های مختلف *Candida* مورد بررسی در این مطالعه

گونه	کد گونه
C. albicans	CCUG[۲] ۳۲۷۲۳
C. glabrata	CCUG ۳۵۲۶۷
C. parapsilosis	ATCC ۲۲۰۱۹
C. tropicalis	CCUG ۳۴۲۷۴

2. Culture Collection, University of Gothenburg

شرایط PCR

PCR 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 CGCCCGCCGCGCGCGGCGGG'5 GGCGGGG3' به انتهای ۵′ پرایمر رفت متصل گردید (Muyzer, 1990). 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 ٤٥ 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 هرکدام از محصولات بر روی ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۷۰ ولت بررسی شد.

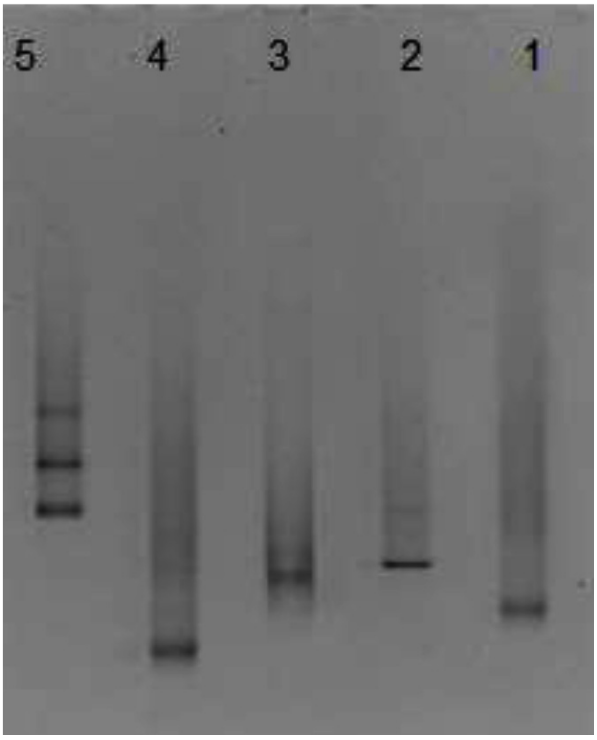
شرایط DGGE

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 ٥٦ 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 داک (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

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).



شکل۱: شکل الکتروفورز PCR-DGGE گونه‌های مختلف *Candida* در ژل اکریل آمید ۸ درصد. به ترتیب ردیف ۱ تا ۵ نشان دهنده‌ی *C. albicans*، *C. glabrata*، *C. parapsilosis*، *C. orthopsilosis* و *C. tropicalis* می‌باشد.

بحث

شناسایی مولکولی گونه‌های مختلف قارچی معمولاً با استفاده از نواحی ITS صورت می‌پذیرد. ناحیه‌ی غیر رمز گذار 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 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.

با توجه به شکل ۱ مشاهده می‌شود بهینه سازی 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.tropicalis* و *C.albicans* به ترتیب در کمترین و بیشترین غلظت از ماده‌ی دناتوره کننده در ژل متوقف شده و سایر گونه‌ها در فاصله ی میانی آن‌ها قرار گرفتند. در مطالعه ای که توسط ویراسکرا[1] 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 *4 C. tropicalis* باند ایجاد نمود. در مطالعه ای که توسط میکایلسن[2] 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 et al., 2006). به طوری که در برخی از گونه‌های قارچی مطالعه شده با DGGE چندین باند در ژل برای یک میکروارگانیسم خاص ایجاد شد. پرایمرهای NL1 و LS2 بخش زیادی از دومین D1 ناحیه‌ی (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-Martınez, 2010) تکنیک DDGE می‌تواند نقش به سزایی را در شناسایی عوامل عفونت زای کاندیدایی ایفا نماید. تکنیک DGGE روشی سریع، قابل اعتماد، تکرار پذیر و مقرون به صرفه برای شناسایی میکروارگانیسم‌ها بوده (Muyzer, 1999) 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

1.Weerasekera
2.Michaelsen

سایر گونه های بیماری زای *Candida* با نواحی ژنی مختلف می‌تواند نقش مؤثری در افزایش کاربردهای تشخیصی این روش ایفا نماید.

نتیجه گیری

در این مطالعه امکان استفاده از تکنیک DGGE به منظور شناسایی ۵ گونه‌ی مختلف بیماری زای *Candida* مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که با استفاده از این تکنیک امکان تفکیک و شناسایی گونه‌های مختلف بیماری‌زای *Candida* با استفاده از قطعات DNA تکثیر یافته از ناحیه‌ی ITS2 وجود دارد و الگوی خاصی از باندها حاصل می‌شود که می‌توان از آن در تشخیص گونه‌های مسبب عفونت‌های کاندیدایی بهره برد.

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., Samaranayake, L.P. (2003) Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting: the basics. Methods Molecular Biology 226: 117-22.

Lopez-Martınez, 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., Yolken, 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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America109(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.