

SİMÜLE KAN ÖRNEKLERİNDE POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE *CANDIDA* DNA'SININ SAPTANMASI*

DETECTION OF *CANDIDA* DNA IN SIMULATED BLOOD SAMPLES BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Sinem ÖZER¹, Mine YÜCESOY¹

ÖZET: İmmün sistemi baskılanmış hastalarda ortaya çıkabilen sistemik kandidozun tanısında kan kültürü altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, olguların yaklaşık yarısında negatif sonuç vermesi, rutin kültür ortamlarında *Candida* üremesinin yavaş olması ve izolasyon için büyük miktarda kan gerektirmesi gibi nedenlerden dolayı, kan kültürlerinin kandidemi tanısında hızlı ve güvenilir olmadığı ifade edilmektedir. Çalışmamızda, simüle kan örneklerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile *Candida* DNA'sının araştırılması planlanmıştır. Bu amaçla, *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.krusei*, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* standart suşları ile *Aspergillus fumigatus*, *C.kefyr*, *C.glabrata*, *C.lusitaniae*, *C.guilliermondii*, *Rhodotorula* sp. klinik izolatları kullanılarak, sağlıklı gönüllülerden EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri ve üreme saptanmayan BACTEC 9240 kan kültürleri ile simüle örnekler hazırlanmıştır. Ayrıca, kan kültür şişelerinde üreme sinyali veren ve katı besiyerlerinde *Candida* türleri üreyen 23 olgunun kan kültür örneği de incelenmiştir. Tüm örneklerin DNA eldesi, eritrosit, lökosit ve mantar hücre duvarı lizis tamponları ile ön işlemi takiben, "MN Nucleospin Tissue Kit" (Macherey-Nagel, Almanya)'in doku örnekleri için önerdiği standart yöntem uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'lar 5S rDNA bölgesine özgül öncüllerin (PCon 1 ve PCon 2) kullanıldığı PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Görüntülerde 105 baz çiftlik ürün varlığı pozitif olarak değerlendirilmiştir. Yöntemimizin simüle örneklerde en düşük saptama sınırı 10^2 - 10^3 cfu/ml *Candida* olarak belirlenmiştir. Çalışmaya alınan tüm *Candida* suşları ile hazırlanan örneklerde 105 baz çift (bc)'lik ürün varlığı gözlenmiştir. *E.coli*, *S.aureus*, *A.fumigatus* ve *Rhodotorula* sp. suşlarından hazırlanan ve negatif olan kan örnekleri ise *Candida* DNA'sı açısından olumsuz bulunmuştur. *Candida* üremesi olan kan kültür örneklerinde de aynı 105 bc'lik ürün varlığı gözlenmiştir. Uygulanan PCR yöntemi yaklaşık yedi saatte tamamlanmakta olup, yöntemin hasta başına maliyeti 8,00 YTL olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, gerek kan gerekse BACTEC kan kültür şişeleri ile hazırlanan simüle örneklerde 5S rDNA genine özgül öncüllerinin kullanıldığı PCR yöntemi ile *Candida* DNA'sının daha kısa sürede saptanabileceği belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Candida*, kandidemi, kan, polimeraz zincir tepkimesi.

ABSTRACT: Although blood culture method is accepted as gold standard in the laboratory diagnosis of invasive candidiasis seen in immunocompromised patients, cultivation of blood is considered as not a reliable and rapid method for the diagnosis

* XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi'nde (12-16 Eylül 2006, Antalya) sunulmuştur.

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir. (mine.yucesoy@deu.edu.tr)

of candidemia, since it may be negative in approximately half of the patients, slow growth rate of *Candida* in routine culture media and requirement of large amounts of blood for the isolation. The aim of this study was to detect *Candida* DNA in simulated blood samples by using polymerase chain reaction (PCR). Simulated samples were prepared by using blood samples of healthy volunteers. These samples were inoculated into tubes with EDTA and BACTEC 9240 blood culture bottles in which no growth was detected and with standard strains of *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.krusei*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* together with the clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*, *C.kefyr*, *C.glabrata*, *C.lusitaniae*, *C.guilliermondii* and *Rhodotorula* sp. Additionally, blood culture samples of 23 cases whose blood culture bottles signaled as positive and revealed growth of *Candida* in agar plates were examined. DNA extraction of all samples were performed according to the standard procedure proposed by the MN Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Germany) for tissue samples; following the pre-treatment with erythrocyte, leukocyte and fungus cell wall lysis buffers. DNAs were amplified with PCR, using primers specific for the 5S rDNA region (PCon 1 and PCon 2 primers) and PCR products were obtained by electrophoresis in 2% agarose gel. Presence of a 105 base pair (bp) product was considered as positive. The lowest detection limit of PCR has been determined as 10^2 - 10^3 cfu/ml *Candida* for our simulated samples. The presence of a 105 bp band has been observed in samples prepared with all *Candida* strains included in the study. Blood samples spiked with *E.coli*, *S.aureus*, *A.fumigatus* and *Rhodotorula* sp. and negative blood samples has been found negative in terms of *Candida* DNA. The same 105 bp product has been observed for blood culture samples with *Candida* growth. The PCR method applied in this study takes approximately seven hours and the cost was calculated approximately 6,00 US Dollars per patient. As a result, it has been determined that *Candida* DNA can be detected in a shorter time by PCR using specific primers for 5S rDNA gene from simulated samples prepared with either blood or BACTEC blood culture bottles.

Key words: Candida, candidemia, blood, polymerase chain reaction.

GİRİŞ

Son yıllarda sistemik *Candida* enfeksiyonlarının prevalansı, immün sistemi baskılanmış hasta sayısının artması, geniş spektrumlu antibiyotiklerin ve damar içi kateterlerin yaygın kullanımları nedeniyle artmıştır¹. Sistemik kandidoz tanısında altın standart kabul edilen kan kültürünün, olguların sadece %58'inde pozitif olduğu bildirilmektedir². Tanı, rutin olarak kullanılan kültür ortamlarında *Candida*'nın yavaş üremesi nedeni ile gecikmekte ve bu nedenle erken tanı her zaman mümkün olamamaktadır. Kan kültürlerinin *Candida* türleri için güvenilir olmadığı ve inkübasyon için büyük miktarda kan gerektirdiği belirtilmiştir^{3,4}. Ayrıca nötropenik hastalarda, kanda *Candida* türlerinin üremesinin başarısızlığı olağan olarak kabul edilmektedir. Kan kültüründe, kemoterapinin bir sonucu olarak üremenin inhibisyonu veya organizmaların kana aralıklı olarak geçmeleri nedeniyle, kanıtlanmış olgularda bile *Candida* türlerinin saptanması zor olmaktadır^{2,5}. Tanı amacıyla sıklıkla iki veya daha fazla kan kültürü alınmasına rağmen, standart kan kültür yöntemlerinin tanı için iki ile üç gün hatta daha uzun bir süre gerektirdiği belirtilmektedir⁶. İnvaziv *Candida* enfeksiyonları hastanın hayatını ciddi biçimde tehdit eden, uygun tedaviden sonra bile %50-80'lik bir

mortaliteye sahip, çok hızlı tedavi başlanması gereken enfeksiyonlar olması nedeniyle, immün sistemi baskılanmış hastalarda bu enfeksiyonların erken ve doğru tanısı için daha hızlı, özgül ve duyarlı bir yöntemin gerekli olduğu vurgulanmaktadır^{6,7}.

Sistemik *Candida* enfeksiyonları için hızlı ve tanı koydurucu yöntemler arasında antijen ve/veya antikor tespiti ile mantar DNA'sının saptanması yer almaktadır. Özgül antikor ve antijen saptama yöntemleri tanıda kullanılmasına rağmen, duyarlılık ve özgüllüklerinin yetersiz olduğu düşünülmektedir. Kanda *Candida* DNA'sının saptanmasına yönelik olarak geliştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yönteminin kültüre göre daha kısa sürede sonuç verdiği rapor edilmiştir⁸. Bunun yanında tedaviye en erken dönemde başlanması, ölüm oranını, hastanede yatış süresini ve enfeksiyonun getireceği maddi yükü azaltacaktır. Bu çalışmanın amacı, simüle kan örnekleri hazırlanarak PCR yöntemi ile *Candida* DNA'sının araştırılmasıdır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar: Çalışmada, *C.albicans* ATCC 90028, *C.tropicalis* ATCC 1021, *C.parapsilosis* ATCC 90018, *C.krusei* ATCC 6258, *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 kontrol suşları ile bir *Aspergillus fumigatus* klinik izolatu ve kan kültür örneklerinden izole edilen *C.kefyr*, *C.glabrata*, *C.lusitaniae*, *C.guilliermondii* ve *Rhodotorula* sp. suşları kullanıldı.

Simüle Kan Örnekleri: PCR yönteminin saptama sınırlarını belirlemek amacıyla simüle örnekler hazırlandı. Yukarıda belirtilen suşlarla simüle örnekler hazırlamak için; sağlıklı gönüllülerden EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri ve beş günlük inkübasyon sonunda kan kültüründe üreme saptanmayan BACTEC 9240 (plus+ aerobic/F™, Becton Dickinson, Almanya) kan kültür şişeleri kullanıldı.

PCR ile Pozitiflik Saptama Sınırlarının Belirlenmesi: *C.albicans* ATCC 90028 suşunun McFarland 10 standartına göre (10^8 cfu/ml maya) süspansiyonu hazırlandı⁹. Sağlıklı gönüllülerden EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri ve beş günlük inkübasyon sonunda kan kültüründe üreme saptanmayan BACTEC 9240 kan kültür şişelerinin içeriği ile bu süspansiyonun 10 katlı sulandırımı yapıldı. Koloni sayım tekniği ile her sulandırmadan Sabouraud dekstroz agar (SDA) plaklarına ekilerek, her sulandırım için koloni sayıları belirlendi. Mililitrede 10^7 - 10^1 koloni oluşturan ünite (cfu/ml) maya içeren bu simüle örneklerden ardarda 2 kez DNA eldesi yapıldı ve PCR uygulandı.

PCR Yönteminin Farklı Mikroorganizmalarla Hazırlanan Simüle Kan Örnekleri ile Denenmesi: Maya ve küf suşları SDA'da, bakteri suşları ise kanlı agarda üretildi ve kolonilerden süspansiyonlar hazırlandı. Bu süspansiyonların sağlıklı gönüllülerden EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri ve üreme saptanmayan BACTEC 9240 kan kültürlerinde 10^6 ve 10^8 cfu/ml olacak şekilde sulandırımı yapıldı.

Klinik Örnekler: BACTEC 9240 kan kültür sisteminde pozitif üreme sinyali veren, Gram boyamada maya görülen ve katı besiyerlerinde *Candida* spp. üreyen 23 hastaya ait kan örneği çalışmaya alındı. Rutin tanımlama yöntemleri ile

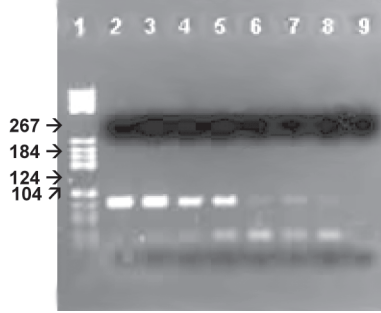
[çimlenme borusu testi, mısır unu tween 80 agardaki morfolojileri, CHROMagar Candida (CHROMagar, Fransa) besiyerindeki görünüşleri ve API 20 C AUX (BioMérieux, Fransa) tanımlama sistemi] üreyen suşların tanımlandığı kan kültür örnekleri PCR yöntemi ile de incelendi. Ayrıca BACTEC 9240 kan kültür sisteminde pozitif üreme sinyali veren ve *S.aureus* ile *E.coli* üreyen 2 hastanın kan örneği de aynı PCR yöntemi ile çalışıldı. Çalışmaya alınan tüm kan örnekleri, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri içinde -80°C'de dondurularak saklandı.

DNA Eldesi ve PCR Yöntemi: Örneklerden DNA eldesi, Loeffler ve arkadaşları⁹ ile van Burik ve arkadaşlarının¹⁰ tanımladığı yöntem ile birlikte Nucleospin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Almanya)'ın doku örnekleri için önerdiği standart yöntemle gerçekleştirildi. Kısaca; 300 ml kan örneğine, 900 ml eritrosit lizis tamponu [10 mM Trizma "base" (pH: 7.6), 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl] eklendi. Yatay çalkalayıcıda oda ısısında 10 dakika inkübe edildikten sonra 8000×g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Çökelti üzerine yeniden 900 ml eritrosit lizis tamponu eklenip, aynı işlem tekrarlandı. Elde edilen çökelti üzerine 1 ml lökosit lizis tamponu [10 mM Trizma "base" (pH: 7.6), 10 mM EDTA (pH: 8.0), 50 mM sodyum klorür, %0.2 sodyum dodesil sülfat (SDS), 200 mg/ml proteinaz K] eklendi ve çökelti ezildi. Örnek 45 dakika 65°C'de kuru ısı bloğunda inkübe edildi, 8000×g'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Maya hücre duvarı, çökelti üzerine 500 ml lizis tamponu [50 mM Tris (pH: 7.6), 1 mM EDTA, %0.2 b-merkaptotanol, 2U/100 ml litikaz] eklenerek parçalandı. Örnek 37°C'de 45 dakika inkübe edildi, 8000×g'de 10 dakika santrifüjlenerek süpernatant atıldı. Bu aşamadan sonra "MN Nucleospin Tissue Kit" in doku örnekleri için önerdiği standart prosedür ön-parçalama basamağından başlanarak, tümü ile uygulandı. Sonuç olarak, DNA eldesi 100 ml hacimde tamamlandı.

Elde edilen DNA'lar, Holmes ve arkadaşları¹¹ tarafından önerilen ve 5S rDNA bölgesinden seçilmiş PCon 1 (5'- AGT TTC GCG TAT GGT CTC CC -3') ve PCon 2 (5'- GTT GCG GCC ATA TCT AGC AG -3') öncüllerinin kullanıldığı PCR yöntemi ile çoğaltıldı. PCR; 5 µl 10X buffer, 5 µl 25 mM'lık MgCl₂, 1'er µl 10 pmol'lük PCon 1 ve PCon 2 öncülleri, 1 µl 10mM'lık dNTP karışımı, 0.5 µl 5U/µl'lik Taq polimeraz enzimi, 26.5 µl steril distile su ve 10 µl kalıp DNA'dan oluşan toplam 50 µl'lik hacimde gerçekleştirildi. Amplifikasyon; ön denatürasyon 94°C'de 3 dakika ve takiben 30 siklus 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 60°C'de 45 saniye bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama ve 72°C'de 5 dakika son uzama olacak şekilde "Techne Flexigene Thermal Cycler"da gerçekleştirildi. PCR ürünleri %5 etidyum bromür içeren %2'lik agaroz jelde 1X Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu içerisinde 120V elektrik akımında yürütüldü ve jeller UV altında incelendi. Elde edilen ürünlerin molekül ağırlıkları "pBR322 DNA/Bsu RI [HaeIII] DNA ladder (MBI Fermentas)" ile karşılaştırıldı.

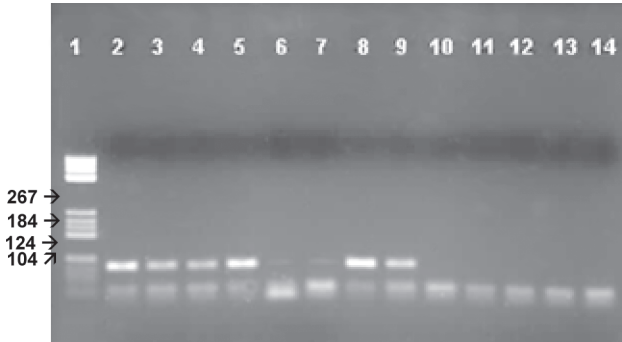
BULGULAR

C. albicans ATCC 90028 suşunun 10 katlı seri sulandırımalar şeklinde hazırlanan simüle örneklerinde iki kez tekrarlanan PCR'in en düşük saptama sınırı sağlıklı gönüllülerden alınan kan örneklerinde 10², üreme saptanmayan BACTEC 9240 kan kültürlerinde ise 10³ cfu/ml *Candida* olarak belirlenmiştir. PCR sonrası elde edilen görüntü Şekil 1'de izlenmektedir.



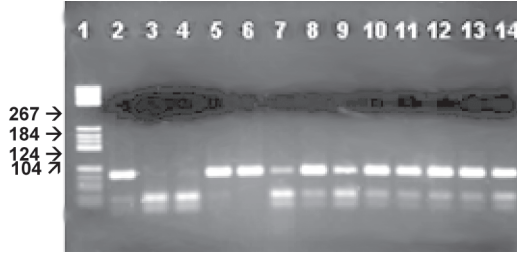
Şekil 1. Sağlıklı gönüllülerden alınan kan örnekleri ile hazırlanan simüle örneklerin PCR sonrası elde edilen agaroz jel görüntüsü (Hat 1: Moleküler ağırlık standartı; Hat 2: 10^7 ; Hat 3: 10^6 ; Hat 4: 10^5 ; Hat 5: 10^4 ; Hat 6: 10^3 ; Hat 7: 10^2 ; Hat 8: 10^1 cfu/ml *C. albicans* ATCC 90028; Hat 9: Negatif kontrol).

C. albicans ATCC 90028, *C. tropicalis* ATCC 1021, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. krusei* ATCC 6258, *C. guilliermondii* ve *C. kefir* suşlarından hazırlanan simüle örnekler için 5S rDNA bölgesine ait 105 bp'lik ürün varlığını gösteren bandın iyi, *C. glabrata* ve *C. lusitanae* suşları için çok zayıf olduğu gözlenmiştir (Şekil 2). Bu nedenle *C. glabrata* ve *C. lusitanae* suşlarının 10^8 cfu/ml maya olacak şekilde yeni simüle örnekleri hazırlanmış ve PCR uygulanmıştır. Ancak yine de bu bölgeye ait bantın zayıf olduğu izlenmiştir. *E. coli* ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923, *A. fumigatus* ve *Rhodotorula* sp. suşlarından hazırlanan örnekler ise *Candida* DNA'sı açısından negatif bulunmuştur. Ayrıca mikroorganizma eklenmemiş kan örneği de PCR'da negatif olarak değerlendirilmiştir. Bu suşların PCR ürünleri ile elde edilen jel görüntüsü Şekil 2'de görülmektedir.

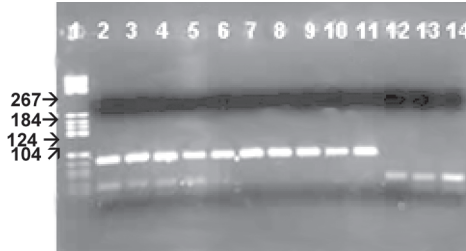


Şekil 2. Üreme saptanmamış kan kültürlerinde farklı mikroorganizmalarla hazırlanan simüle örneklerin agaroz jel görüntüsü (Hat 1: Moleküler standart; Hat 2: *C. albicans* ATCC 90028; Hat 3: *C. krusei* ATCC 6258; Hat 4: *C. tropicalis* ATCC 1021; Hat 5: *C. parapsilosis* ATCC 90018; Hat 6: *C. glabrata*; Hat 7: *C. lusitanae*; Hat 8: *C. guilliermondii*; Hat 9: *C. kefir*; Hat 10: *Rhodotorula* sp.; Hat 11: *A. fumigatus*; Hat 12: *E. coli* ATCC 35218; Hat 13: *S. aureus* ATCC 25923; Hat 14: Üreme saptanmamış, mikroorganizma eklenmemiş kan kültür örneği).

Çalışmaya alınan klinik kan kültür örneklerinden izole edilen suşların 14'ü *C.albicans*, 6'sı *C.parapsilosis*, 2'si *C.glabrata* ve biri *C.tropicalis* olarak tanımlanmıştır. Bu 23 kan kültür örneğine uygulanan PCR sonucunda, tüm örneklerde 5S rDNA bölgesine ait 105 bp'lik ürün varlığı gözlenmiştir. *S.aureus* ve *E.coli* üremiş kan kültür örnekleri ise negatif bulunmuştur (Şekil 3).



Şekil 3a: Klinik kan kültür örneklerinin PCR sonuçlarına ilişkin agaroz jel görüntüsü - I
(Hat 1: Moleküler standart; Hat 2: *C.albicans**; Hat 3: *C.glabrata*; Hat 4: *C.albicans*; Hat 5: *C.parapsilosis*; Hat 6: *C.parapsilosis*; Hat 7: *C.glabrata*; Hat 8: *C.albicans*; Hat 9: *C.albicans*; Hat 10: *C.parapsilosis**; Hat 11: *C.parapsilosis**; Hat 12: *C.albicans*; Hat 13: *C.parapsilosis**; Hat 14: *C.albicans*), [*işareti olanlar direk bakıda maya hücresinin görüldüğü, diğerleri ise *Candida* üremesinin saptandığı kan kültür örnekleridir].



Şekil 3b: Klinik kan kültür örneklerinin PCR sonuçlarına ilişkin agaroz jel görüntüsü - II
(Hat 1: Moleküler standart; Hat 2: *C.albicans*; Hat 3: *C.parapsilosis**, Hat 4: *C.albicans*; Hat 5: *C.albicans*; Hat 6: *C.albicans*; Hat 7: *C.albicans*; Hat 8: *C.albicans*; Hat 9: *C.albicans*; Hat 10: *C.albicans*; Hat 11: *C.tropicalis*; Hat 12: *E.coli*; Hat 13: *S.aureus*, Hat 14: Negatif kontrol), [*işareti olanlar direk bakıda maya hücresinin görüldüğü, diğerleri ise *Candida* üremesinin saptandığı kan kültür örnekleridir].

Uyguladığımız PCR yöntemi DNA eldesi için harcanan süre de hesaba katıldığında yaklaşık 7 saat sürmektedir. PCR için kullanılan malzemeler dikkate alındığında, yöntem için belirlediğimiz yaklaşık maliyet 8,00 YTL'dir.

TARTIŞMA

Son yıllarda kandidemi olgularının tanısında, kültüre göre daha hızlı ve daha duyarlı olması gibi nedenlerden dolayı PCR yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Pratikte PCR için önerilen en yaygın örnek tam kan olup, genellikle heparin veya EDTA gibi uygun bir antikoagülan içeren tüpe inoküle edilmekte ve DNA

eldesi öncesinde eritrosit ve lökositler parçalanmaktadır. Kanın ticari kan kültür şişelerinde 3 saatten fazla inkübe edilmesi durumunda PCR yapılabileceği, bu inkübasyonun muhtemelen kandaki potansiyel PCR inhibitörlerinin etkilerini azaltacağı ve mantarın doğal amplifikasyonunu sağlayacağı bildirilmektedir¹². Çalışmamızda da BACTEC 9240 kan kültür sisteminde inkübasyon sırasında pozitif üreme sinyali veren hasta kan örnekleri ile yapılan PCR sonuçları *Candida* türleri açısından olumlu bulunmuştur.

Fredricks ve Relman¹³ kan ve kan kültür örneklerinde bulunan “hem” bileşikleri, heparin ve EDTA’nın PCR için inhibitör olduğunu belirtmiştir. Bunun yanında DNA saflaştırılmasında kullanılan fenol, kloroform, etanol, sodyum polianetol sülfonat (SPS), triton X-100 ve sodyum klorür gibi kimyasal kalıntıların da PCR için inhibitör olabileceği bildirilmiştir^{14,15}. Çalışmamızda kan kültür örnekleri ile yaptığımız PCR deneylerinde duyarlılığın (10^3 cfu/ml), EDTA’lı kan örneklerine (10^2 cfu/ml) göre daha düşük saptanmasının, kan kültürlerinde bulunan ve PCR için inhibitör olduğu bildirilen¹³ SPS’a bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Kandan *Candida* DNA’sının araştırılması için gerçekleştirilen PCR uygulamalarında, ITS 1-2, 18S, 5.8S, 5S rDNA, lanosterol-14-a-demetilaz (L1A1), mitokondriyal DNA, aktin, kitin sentaz, salgısal aspartik proteinaz, ısı şok protein 90 genleri gibi bir çok bölgeye özgül öncüller kullanılmıştır¹². Araştırmamızda gerek korunmuş ve tekrarlayan bölge olması, gerekse çoklu kopya gen hedeflerinden oluşması sonucu daha duyarlı olabileceği düşünülerek 5S rDNA bölgesinden öncüller seçilmiştir. Çalışmamızda uygulanan PCR yöntemi, *Candida* türleri ile hazırlanan tüm simüle örneklerde pozitif sonuç vermiştir. Yöntem çok sayıda *Candida* türünü kapsaması açısından da avantajlı gibi gözükmektedir. *Aspergillus*, *Rhodotorula* gibi mantar türleri ve *E.coli*, *S.aureus* gibi bakteri türleri ile hazırlanan simüle örneklerden negatif sonuç alınması, yöntemin bu mikroorganizmalar ile yalancı pozitif sonuç vermeyeceğini göstermektedir. Yöntemin BACTEC 9240 kan kültür örneklerine uygulanabilmiş olması, kan alma sorunu olabilecek kandidemi olgularına uygulama kolaylığı yaratabilecektir. BACTEC 9240 kan kültür sisteminde üreme sinyali veren ve kültüründe *Candida* üremesi saptanan az sayıda kan kültür örneği çalışılabilirdiğinden, çalışmamızda yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü değerlendirilememiştir. Ancak 23 kan kültür örneğinin hepsinde PCR ile 105 bç’lik ürünün saptanması, yöntemin altın standart kabul edilen kan kültürü ile %100 uyumlu olduğunu göstermektedir.

Kalkancı ve arkadaşları⁸ nötropenik hastalardan alınan kan örneklerinde 5S rDNA bölgesinden seçilen PCon 1 ve PCon 2 öncüllerinin kullanıldığı PCR yöntemi ile 32 hastanın dördünde (%12.5) pozitif sonuç elde etmişlerdir. PCR ile pozitif olan bu dört hastanın sadece birinde BACTEC otomatize kan kültür sistemi ile yapılan kan kültürlerinde pozitif sonuç elde edilmiştir. Ardışık dört örneği PCR ile pozitif bulunan tek olgunun üç kan kültüründen PCR ile eş zamanlı birisinde *Candida* sp. izole edilmiştir. Çalışmacılar bu yöntemin kandidemi tanısı için duyarlılığı yüksek, hızlı sonuç verebilen, tedavi takibinde kullanılabilen bir yöntem olarak özellikle nötropenik hastalarda kullanılabileceğini ifade etmişlerdir⁸.

Holmes ve arkadaşları¹¹, simüle kan örneklerinde bizim kullandığımız öncüller (PCon 1 ve PCon 2) ile birlikte *C.albicans* NTS genine özgü PSpA1 ve PSpA2 öncüllerini ortak bir PCR karışımında kullanmışlar ve *C.tropicalis*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.kefir* ve *C.glabrata* içeren tüm kan örneklerinde 105 bç, ancak *C.albicans* ile hazırlanan kan örneğinde biri 5S rDNA genine özgü 105 bç'lik, diğeri hem 5S hem de NTS dizisini içeren 1,015 bç'lik olmak üzere iki PCR ürünü elde etmişlerdir. 5S rDNA genine özgül aynı öncüller kullanılarak 105 bç'lik ürünün elde edildiği çalışmamızda, uyguladığımız PCR yönteminin *Candida* türleri ile hazırlanmış simüle örneklerde olumlu, diğer mikroorganizmalar ile hazırlananlarda ise olumsuz olduğu belirlenmiş olup, bulgularımız Holmes ve arkadaşlarının¹¹ elde ettiği sonuçlar ile benzer doğrultudadır.

Aspartik proteinaz genine özgül primerlerin kullanıldığı PCR yöntemi ile yapılan bir araştırmada, kanda 1-4 cfu/ml maya saptanabilmiş; klinik örneklerde yöntemin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %98 olarak bildirilmiştir¹⁶. Bir diğer çalışmada ise fungal patojenlerin tanısı için ITS2 bölgesini hedefleyen PCR-REA yöntemi geliştirilmiş ve yöntemin uygulanabilirliği kanserli ve nötropenik çocuklarda araştırılmıştır. Duyarlılık, simüle örneklerde üç *C.albicans*/ml olarak belirlenmiş, çalışmacılar bu yöntemin klinik örneklerde fungal patojenlerin hızlı ve duyarlı tanısını sağladığı sonucuna varmışlardır¹⁷.

Klinik kan örneklerinde TaqMan prensibi temelinde *C.albicans* rDNA geninin kantitasyonu için hızlı ve tekrarlanabilir bir PCR yöntemi geliştirilmiştir. Biri *C.albicans*'a özgül, diğeri ise *Candida* cinsine özgül iki "probe"un kullanıldığı bu gerçek zamanlı (real-time) PCR testinin en düşük saptama sınırı *C.albicans* için beş cfu/ml olarak belirlenmiş, duyarlılığının %100, özgüllüğünün ise %97 olduğu bildirilmiştir. Bu testin klinik kan örneklerinde *C.albicans*'ın tanımlanması ve kantitasyonu için iyi bir alternatif olduğu düşünülmektedir¹⁸.

Üreme saptanmamış kan kültürleri kullanılarak yapılan deneylerde, *C.glabrata*'nın çok zayıf bant verdiği görülmüş, ancak üreme saptanan kan kültür örneklerinden *C.glabrata* üreyenlerin en azından birinde daha iyi bant elde edilebilmiştir. Bunun nedeni olarak, üreme saptanan kan kültür örneklerinin içerdiği *Candida* miktarının (fungal yük) hazırlanan simüle örneklerle göre daha fazla olduğu ($>10^6$ - 10^8 cfu/ml) düşünülmektedir.

Çalışmamızda *C.glabrata* ve *C.lusitaniae* ile hazırlanan örnekler için çok zayıf bantlar elde edilmiştir. Bunun nedenini araştırmak amacıyla gen bankasında standart *C.glabrata* ve *C.lusitaniae*'nin 5S rDNA bölgesinin dizileri araştırılmış (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/oldblast/Blast.cgi>), *C.lusitaniae*'ye ait dizi bulunamazken *C.glabrata*'nın (DQ15516) bu bölgeye ait dizisi indirilerek, kullandığımız öncül dizileri ile hizalanarak karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda ise herhangi bir uyumsuzluk ya da farklılık izlenmemiştir. Belirtilen her iki *Candida* türünün de hücre yapısı açısından bakıldığında küçük olması dikkat çekicidir.

Çalışmamızda uyguladığımız yöntem yaklaşık yedi saatte tamamlanmakta olup, bu süre üreme sinyali alındıktan sonra kan kültüründen yapılan pasajlarda *Candida* üremesi için gereken 24-48 saate göre kısa kalmaktadır. Bu durum,

yöntemin kandidemi olgularına erken tanı olanağı sağlayabileceği düşünülerek bir avantaj olarak kabul edilebilir. Uyguladığımız PCR yönteminin hasta başına maliyeti ise 8,00 YTL şeklinde belirlenmiş olup, bu ücret hastaya uygulanacak yanlış ya da gereksiz antifungal tedavi ve hastane masrafları göz önüne alındığında çok düşük kalmaktadır. Araştırmamızda PCR yöntemi sadece simüle örneklerle ve üreme olan kan kültür örneklerine uygulanmış olup, yöntem bu şekli ile invaziv kandidozun rutin tanısında kullanılması açısından önerilememektedir. Yöntemin invaziv kandidoz ön tanılı kan örneklerinin de dahil edildiği daha büyük çalışmalarda kullanılarak tekrar değerlendirilmesi uygun olacaktır. Sonuç olarak, gerek kan gerekse BACTEC kan kültür şişeleri ile hazırlanan simüle örneklerde 5S rDNA genine özgü PCon 1 ve PCon 2 öncüllerinin kullanıldığı PCR yöntemi ile daha kısa sürede *Candida* DNA'sının saptanabileceği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Beck-Sargue CM, Jarvis WR. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. J Infect Dis 1993; 167:1247-51.
2. Berenguer J, Buick M, Stock F, Pizza PA, Walsh TJ. Lysis-centrifugation blood cultures in detection of tissue-proven invasive candidiasis; disseminated versus single organ infection. Diagn Microbiol Infect Dis 1993; 17:103-9.
3. Talluri G, Mangone C, Freyle J, Shirazian D, Lehman H, Wise GJ. Polymerase chain reaction used to detect candidemia in patients with candiduria. Urology 1998; 51: 501-5.
4. Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS, Khan ZU. Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. J Clin Microbiol 2002; 40: 2483-9.
5. Brawner DL, Anderson GL, Yuen KY. Serotype prevalence of *Candida albicans* from blood culture isolates. J Clin Microbiol 1992; 30: 149-53.
6. Wahyuningsih R, Freisleben HJ, Sonntag HG, Schnitzler P. Simple and rapid detection of *Candida albicans* in serum by PCR for diagnosis of invasive candidiasis. J Clin Microbiol 2000; 38: 3016-21.
7. Pittet D, Li N, Woolson RF, Wenzel RP. Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: a 6-year validated, population-based model. Clin Infect Dis 1997; 24: 1068-78.
8. Kalkancı A, Kuştur S, Güneş İ, Otlu B. Nötropenik hastalarda invazif *Candida* enfeksiyonunun polimeraz zincir reaksiyonu ile tanısı. Enfeksiyon Derg 2003; 17: 171-4.
9. Loeffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. J Clin Microbiol 1997; 35: 3311-2.
10. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. J Clin Microbiol 1998; 36: 1169-75.
11. Holmes AR, Cannon RD, Shepherd MG, Jenkinson HF. Detection of *Candida albicans* and other yeasts in blood by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32: 228-31.
12. Chen SC, Halliday CL, Meyer W. A review of nucleic acid-based diagnostic tests for systemic mycoses with an emphasis on polymerase chain reaction-based assays. Med Mycol 2002; 40: 333-57.
13. Fredricks DN, Relman DA. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanethanesulfonate. J Clin Microbiol 1998; 36: 2810-6.

14. Kulski J, Khinsoe C, Pryce T, Christiansen K. Use of a multiplex PCR to detect and identify *Mycobacterium avium* and *M.intracellulare* in blood culture fluids of AIDS patients. J Clin Microbiol 1995; 33: 668-74.
15. Kreader CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. Appl Environ Microbiol 1996; 62: 1102-6.
16. Flahaut M, Sanglard D, Monod M, Bile J, Roissier M. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples by DNA amplification of common regions from *C.albicans*-secreted aspartic proteinase genes. J Clin Microbiol 1998; 36: 395-401.
17. Dendis M, Horvath R, Michalek J, et al. PCR-RFLP detection and species identification of fungal pathogens in patients with febrile neutropenia. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 1191-202.
18. Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, et al. Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. J Clin Microbiol 2003; 41: 3293-8.