

Deneyisel Enfeksiyon Oluşturulmuş Tavşanların Kan ve Doku Örneklerinde Bakteriyel ve Fungal DNA'nın Gösterilmesinde PCR'nin Yeterliliği*

Accuracy of PCR for the Detection of Bacterial and Fungal DNA in the Blood and Tissue Samples of Experimentally Infected Rabbits

Ali Adil FOUAD, Ayşe KALKANCI

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma, ilk yazarın yüksek lisans tez çalışması olup, bütçesinin bir kısmı Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (No: 01/2007-60) kapsamında karşılanmıştır.

Geliş Tarihi (Received): 06.03.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 24.06.2012

ÖZET

Kan dolaşımı enfeksiyonlarında etken olan bakteri ve/veya mantarlara ait nükleik asitlerin doğrudan klinik örneklerde gösterilmesi, hızlı tanı, erken ve doğru tedavi ve hasta yönetimi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, sepsis oluşturulmuş deney hayvanlarından alınan örneklerin, genel primerlerin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile taranması, kültür sonuçlarıyla karşılaştırılması ve PCR yönteminin bakteriyemi ile fungemili deneklerin ayırımındaki yeterliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, standart *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus fumigatus* ve *Candida albicans* suşları ile deneyel olarak bakteriyemi (n= 4), fungemi (n= 4) ve polimikrobiyal kan dolaşımı enfeksiyonu (n= 4) oluşturulmuş 12 tavşana ait, farklı zamanlarda (24, 48, 72, 96. saatler) alınan 27 kan ve 36 doku (12 dalak, 12 karaciğer, 12 böbrek) olmak üzere toplam 63 örnek dahil edilmiştir. Kontrol olarak ise enfekte edilmeyen sağlıklı tavşanlar (n= 4), standart bakteri ve mantar suşlarından hazırlanan süspansiyonlar (n= 15), standart bakteri ve mantar suşları eklenmiş insan kanı örnekleri (n= 10) kullanılmıştır. Tüm örneklerde mikroorganizmalara ait DNA'lar gerçek zamanlı PCR ile araştırılmış, eş zamanlı olarak kantitatif kültürleri yapılmıştır. Bakteriyemili deneklerden alınan örneklerle gram-pozitif ve gram-negatif PCR protokollerini, fungemili denek örneklerine ise panfungal PCR, *Aspergillus* ve *Candida* PCR protokolleri uygulanmıştır. Polimikrobiyal enfeksiyon oluşturulan deneklerin örneklerinde ise tüm PCR protokolleri ayrı ayrı çalışılmıştır. Kan örneklerinin 8 (%29.6)'inde kültür pozitifliği saptanmış, 20 (%74)'inde PCR ile mikroorganizmalara ait DNA gösterilmiştir. Ayrıca, 11 dalak, 11 karaciğer ve 10 böbrek olmak üzere 32 (%89) doku ör-

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Ayşe Kalkancı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Beşevler, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 202 4629, **E-posta (E-mail):** kalkanci@gazi.edu.tr

neğinde de PCR pozitifliği tespit edilmiştir. Bakteriemi ve fungeminin tespitinde kültür yönteminin duyarlılığı sırasıyla %30 ve %21.7 iken, PCR yönteminin duyarlılığı sırasıyla %69.2 ve %69.5 olarak bulunmuştur. Uygulanan PCR protokolleri ile, kan kültüründe üreme olmasından 16.5 saat önce pozitif sonuç alındığı izlenmiştir. Koloni süspansiyonlarından yapılan PCR işlemlerinde bütün örnekler pozitif bulunmuş, duyarlılık alt sınırı 30-50 kob/ml arasında hesaplanmıştır. Mikroorganizma eklenmiş kan örneklerinden yapılan PCR işlemlerinde ise alt sınır 50 kob/ml olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, hayvan modelleri için geliştirilen bu yöntemlerin gerçek klinik örneklerle uygulanmasının, kan dolaşımı enfeksiyonlarının erken tanısında yararlı olacağı, ancak verilerin ileri klinik çalışmalarla desteklenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Kan dolaşımı enfeksiyonu; bakteriemi; fungemi; gerçek zamanlı PCR; deneysel enfeksiyon.

ABSTRACT

Direct demonstration of bacterial and/or fungal nucleic acids in the clinical samples of patients with blood stream infections is crucial in terms of rapid diagnosis, early and accurate therapy and patient management. This study was aimed to determine the presence of bacteria and fungi by polymerase chain reaction (PCR) in the clinical samples of experimental sepsis induced animals, to compare the results with culture and to evaluate the efficiency of PCR in the discrimination of bacteremia and fungemia. A total of 12 rabbits experimentally infected with standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* to generate bacteremia (n= 4), fungemia (n= 4) and polymicrobial blood stream infection (n= 4), were included in the study. A total of 63 specimens of which 27 were blood and 36 were tissue (12 spleen, 12 liver, 12 kidney) samples were collected at 24, 48, 72 and 96th hours of infection. Uninfected healthy rabbits (n= 4), colony suspensions of standard bacterial and fungal strains (n= 15) and human blood samples contaminated with standard bacterial and fungal strains (n= 10) were used as controls. Microbial DNAs were searched by using real-time PCR in all the samples, and quantitative cultures were performed simultaneously. Gram-positive and gram-negative PCR protocols were performed for the samples of bacteremic animals, whereas panfungal PCR, *Aspergillus* and *Candida* PCR protocols were performed for the samples of animals with fungemia. All of those PCR protocols were applied separately for the samples of polymicrobial blood stream infection cases. Culture positivity was detected in 8 (29.6%) of the blood samples and bacterial and/or fungal DNAs were demonstrated in 20 (74%) of the blood samples by PCR. Microbial DNAs were also detected in 32 (89%) of 36 tissue samples (11 spleen, 11 liver, 10 kidney). Sensitivity rates of culture method to detect bacteremia and fungemia were 30% and 21.7%, respectively, whereas those rates were 69.2% and 69.5% for PCR, respectively. All PCR protocols gave positive results 16.5 hours before the blood cultures. Amplification of DNA from colony suspensions yielded positive results for all of the samples with a lower detection limit ranged between 30-50 cfu/ml. Detection limit of all PCR applications was 50 cfu/ml for simulated blood samples. It was concluded that the adaptation of the tested PCR method to the clinical samples obtained from patients might help to the early diagnosis of blood stream infections. However, further clinical studies are necessary to support the results of this study.

Key words: Blood stream infection; bacteremia; fungemia; real time PCR; experimental infection.

GİRİŞ

Kan dolaşımı enfeksiyonlarının tanısında altın standart yöntem, otomatik kan kültür sistemlerinin kullanılması, üreme saptanan şişelerden Gram boyama yapılması, alt kültür (pasaj) alınması ve üreyen kolonilerin fenotipik olarak tanımlanmasıdır¹. Üreyen mikro-

organizmanın antimikrobiyallere duyarlılığının incelenmesi bütün süreci tamamlayan son basamaktır. Bütün sürecin en büyük kısıtlayıcı özelliği bir ile beş iş günü gerektirmesidir. Bu nedenle kültürün yer aldığı işlemler iyi bir altın standart yöntem olamamaktadır¹. Geleneksel kültür 6-48 saat arasında zaman gerektirmekte ve bakteri kaynaklı sepsislerde %30, mantar kaynaklı sepsislerde ise %50 oranında negatif sonuç alınabilmektedir². Bu nedenlerle klinikte çalışan hekimler sıklıkla ampirik tedavi başlanması yönünde kritik kararlara zorlanmaktadır^{2,3}.

Bakteriyemi veya fungeminin hızlı tanısı mikrobiyoloji laboratuvarının en önemli görevlerinden biridir^{2,4}. Hızlı mikrobiyolojik tanıda en önemli yöntem olarak tanımlanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) hasta dokularında var olan mikrobiyal DNA'yı göstermektedir³. Hastanın tedavi almasıyla mikroorganizmanın canlılığını yitirmesi DNA'nın gösterilmesini engellemez. Kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni olan bakteri veya mantarlara ait nükleik asitlerin doğrudan klinik örneklerde gösterilmesi, erken tanı ve tedavinin düzenlenmesini sağlayacaktır. Bu yaklaşım, gereksiz ilaç kullanılmasını engelleyecek, tedavinin süresini azaltacak, hastanede kalış süresini kısaltacak ve direnç gelişmesini engelleyecektir⁴. Sepsisli hastada hızlı moleküler yöntemlerin klasik tanı yöntemleriyle birlikte kullanılması, uygun ve yeterli tedaviye en hızlı şekilde başlanmasını sağlayacaktır⁵.

Genel primerlerin kullanıldığı bütün bakteriler veya mantarlar için ortak gen bölgelerinin hedeflendiği, tarama amaçlı moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin esası, genomda korunmuş gen bölgelerinin çoğaltılmasına dayanmaktadır. Bakterilerin 16S, mantarların 18S ribozomal DNA gen bölgesi bu amaçla kullanılmakta ve amplifikasyon sonrasında çoğaltılan bölge (amplikon) tanımlanarak mikroorganizma isimlendirilmektedir⁵. Zor ve geç üreyen bakterilerin tanısında PCR yönteminin kullanılması yaygın bir yaklaşımdır; ancak standart bir ticari yöntemin bulunmaması nedeniyle invazif mantar enfeksiyonlarının tanısında PCR yöntemi rutin olarak kullanılamamaktadır⁶. Moleküler yöntemlerin deneysel modellerde kullanılmasıyla elde edilecek bilgiler klinik durumlarda yararlı olabilir ve insan enfeksiyonlarının daha iyi irdelenmesi için gereklidir. Genel primerler kullanılarak yapılan PCR ile sepsisli hastada etkenin bakteri veya mantar olarak ayrılması, erken dönemde uygun antimikrobiyal tedavinin başlamasına yardım edecek ve mortaliteyi azaltarak, bakım giderlerini düşürecektir. Bu çalışmada, sepsis oluşturulmuş deney hayvanlarından alınan örneklerin genel primerlerin kullanıldığı PCR ile taranması, klasik kültür sonuçları ile karşılaştırılması ve PCR yönteminin bakteriyemi ile fungemili deneklerin ayırımındaki yeterliliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda, sepsis oluşturulan tavşanlardan elde edilen kan ve doku örneklerinde bakteri veya mantar DNA'ları gerçek zamanlı PCR yöntemiyle araştırıldı. Mikroorganizma olarak; *A.fumigatus* ATCC 204305, *C.albicans* ATCC 10231, *S.aureus* ATCC 6538 ve *E.coli* ATCC 10536 referans suşları kullanıldı. Mantarlar Sabouraud-Dekstroz agar (SDA) plaklarında 37°C'de 24 veya 72 saat, bakteriler ise kanlı agar plaklarında 48 saat inkübe edilerek üretildi. Çalışmada, mantarlar için ortak (panfungal) PCR, *Aspergillus* PCR ve

Candida PCR; bakteriler için gram-pozitif PCR ve gram-negatif PCR olmak üzere beş farklı reaksiyon yürütüldü.

Deneysel Enfeksiyon Modeli

Çalışma, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınarak gerçekleştirildi ve deneyler etik ilkelere uygun şekilde yapıldı. Bu amaçla Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Merkezi bünyesinde yetiştirilmiş 16 adet "New Zealand" ırkı tavşan kullanıldı. Tavşanlar her kafeste bir veya iki denek olacak şekilde, ortam ısısı 20-25°C olan bir üretim ünitesinde beslendi; 12 saatlik karanlık ve aydınlık uygulaması yapıldı. Deneklerin su ve besine serbestçe ulaşmaları sağlandı.

Tavşanlar aşağıda belirtildiği şekilde dört gruba ayrıldı:

1. Sağlıklı kontrol grubu (n= 4): Denekler enfekte edilmedi.
2. Fungemi (F) grubu (n= 4): İki denek 10^6 konidya/ml *Aspergillus*, 2 denek 10^6 maya/ml *Candida* ile enfekte edildi.
3. Bakteriyemi (B) grubu (n= 4): İki denek 10^8 bakteri/ml *E.coli* ve 2 denek 10^8 bakteri/ml *S.aureus* ile enfekte edildi.
4. Polimikrobiyal kan dolaşımı enfeksiyonu (PE) grubu (n= 4): Tüm denekler bakteri ve mantar karışımıyla enfekte edildi.

Bakteri ve mantar karışımları kulak veninden enjeksiyonla verildi. Denekler 96 saat takip edildi; 24, 48, 72 ve 96. saatlerde kulak veninden kan örneği alındı. Deney 96. saatte sonlandırıldı; denekler anestezi altında feda edildi ve kan, dalak, böbrek, karaciğer örnekleri toplandı⁷.

Örneklerden DNA İzolasyonu

Kan örnekleri için, eritrosit parçalama tamponu [10 mM Tris (pH 7.6), 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl] ve ardından lökosit parçalama tamponu [10 mM Tris (pH 7.6), 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, %0.2 SDS, proteinaz K 100 mg/ml] kullanıldı. Örnekler önce 65°C'de 2 saat, sonra proteinaz K aktivitesini durdurmak için 95°C'de 10 dakika bekletildi ve 10.000x g'de santrifüj edildi. Elde edilen DNA fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) yöntemi (FKI) ile saflaştırıldı. DNA içeren üst sıvı önce 150 µl FKI, sonra 200 µl KI (24:1) içinde santrifüj edildi. DNA'nın çöktürülmesi için 200 µl etil alkol içinde 10.000x g'de 30 dakika çevrildi. Kuru DNA 30 µl Tris ve EDTA (TE) içinde süspanse edildi. Elde edilen tüm DNA'lar spektrofotometrede (NanoDrop, Thermo Scientific, ABD) ölçüldü ve -20°C'de saklandı⁸.

Karaciğer, böbrek ve dalak örneklerinden DNA elde edilmesi için doku örneklerinin 0.1-0.5 g'lık parçası 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve eritrosit parçalama basamağı kan örneklerindeki gibi uygulandı. Bundan sonraki basamaklarda "High Pure Viral Nucleic Acid Kit" (Roche, Almanya) kullanıldı. Üst sıvı 200 µl bağlama tamponu içine konuldu; 50 µl proteinaz K içinde 72°C'de 10 dakika bekletildi. Örnek filtre üzerine aktarıldı, 8000x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra toplama tüpü uzaklaştırıldı, filtre yeni bir tüpe aktarıldı. İnhibitörlerin uzaklaştırılması ve yıkama basamaklarından sonra DNA'lı

filtre içeriği 50 µl TE içeren tüpe süzdürüldü ve -20°C'de saklandı. Doku örneklerindeki DNA miktarları da kan örneklerinde olduğu gibi ölçüldü⁹.

Gerçek Zamanlı PCR

Bu yöntem, panfungal, *Aspergillus*, *Candida*, gram-pozitif ve gram-negatif mikroorganizmalar için olmak üzere beş farklı şekilde uygulandı. Panfungal PCR işlemi SYBR Green kullanılarak erime eğrisi analiziyle, diğerleri "TaqMan" hidroliz probu kullanılarak "absolute quantification" analiziyle gerçekleştirildi. Bütün PCR işlemleri LightCycler® 2.0 cihazında (Roche, Almanya) yapıldı. Her örnek birbirinden bağımsız olarak dört kez çalışıldı. PCR işleminde hedef bölge olarak mantarlarda 5.8S rDNA, bakterilerde 16S rRNA bölgeleri belirlendi. Bu bölgelere yönelik en az üç primer prob seti denendi ve en özgül sonucu veren kombinasyon seçildi. Problar 5' uçlarından 5-karboksifloresan (FAM) ve 3' uçlarından N,N,N,N-tetrametil-6-karboksirodamin (TAMRA) ile işaretlendi. Bakteriler için ortak 5'-CAA CGC GAA GAA CCT TAC C-3' ve 5'-ACG TCA TCC CCA CCT TCC-3' primer çifti ile, gram-pozitif prob olarak 5'-FAM-ACG ACA ACC ATG CAC CAC CTG-TAMRA-3' ve gram-negatif prob olarak 5'-FAM-ACG ACA GCC ATG CAG CAC CT-TAMRA-3' seçildi¹⁰. Panfungal primer çifti ITS1 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' ve ITS4 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3' kullanıldı. *Aspergillus* primerleri olarak 5'-CTG TCC GAG CGT CAT TG-3' ve 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT-3', *Aspergillus* probu olarak 5'-FAM-AGC CGA CAC CCA ACT TTA TTT-TAMRA-3' seçildi. *Candida* primerleri olarak 5'-CCT GTT TGA GCG TCR TTT-3' ve 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT-3', *Candida* probu olarak 5'-FAM-CAT TGC TTG CGG CGG TA-TAMRA-3' seçildi¹¹. Panfungal PCR işlemi 10 µl'lik karışım içinde 2.5 µl DNA, 5 µl SYBR Green karışım tamponu içinde her bir primerden 100 pmol içerecek şekilde hazırlandı. Amplifikasyon işlemi; 95°C'de 7 dakika denatürasyonu takip eden 45 döngüden (95°C'de 15 saniye, sıcaklık değişimi 20°C/saniye; 55°C'de 20 saniye, sıcaklık değişimi 20°C/saniye; uzama 72°C'de 10 saniye, sıcaklık değişimi 20°C/saniye) oluştu. Erime eğrisi analizi 55-90°C arasında (sıcaklık değişimi 0.2°C/saniye) basamaklı olarak gerçekleştirildi. TaqMan sistemi kullanılan panfungal PCR dışındaki diğer gerçek zamanlı PCR işlemleri 10 µl'lik karışım içinde 2.5 µl DNA, 5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), her bir primerden 500 nM ve probdan 250 nM içerecek şekilde hazırlandı. Amplifikasyon işlemi 95°C'de 10 dakika denatürasyonu takip eden 50 döngüden (95°C'de 10 saniye, 60°C'de 40 saniye) oluştu. Değerlendirme "absolute quantification" analiziyle yapıldı.

Kan Dolaşımı Enfeksiyonunun Doğrulanması ve Koloni Örneklerinden PCR

Tavşanlardan alınan bütün kan örnekleri pediatrik kan kültür şişelerinde (BacT/ALERT®3D system, bioMerieux, Fransa) inkübe edildi. Üreme olan şişelerden SDA ve kanlı agar plaklarına pasaj yapıldı.

Mikroorganizmalar, klasik mikrobiyolojik yöntemler kullanılarak tanımlandı. Tavşanlara uygulanan bakteriyemi veya fungeminin şiddetini göstermek için deneklerin kan örneklerinden kantitatif kültür yapıldı.

PCR işleminin duyarlılığını belirlemek üzere bakteri ve mantar kolonileri serum fizyolojik içinde süspansiyon edildi. Bu karışımlardan DNA izolasyonu yapıldı ve bütün PCR basamakları uygulandı. Bu karışımlar deneyin pozitif kontrolü olarak kullanıldı. Toplam 15 koloni karışımı (üçü *E.coli*, üçü *S.aureus*, üçü *Aspergillus*, üçü *Candida* ve üçü tüm mikroorganizmalar) hazırlandı. Mikroorganizma karışımları seri olarak sulandırıldı ve 10^8 ile 10^1 arasında hücre/ml içeren bir pozitif kontrol seti oluşturuldu. Her bir konsantrasyondan 100 µl besiyerine ekilerek oluşan koloniler sayıldı. Oluşturulan setin bütün konsantrasyonlarına PCR işlemleri uygulandı.

Bakteri ve Mantar Eklenmiş Kan Örnekleri

PCR işleminin duyarlılığını belirlemek üzere ayrıca sağlıklı kişilerden alınmış 5 ml kan örneği içine 10^6 maya/ml veya 10^8 bakteri/ml mikroorganizma içerecek şekilde *S.aureus* ATCC 6538, *E.coli* ATCC 10536, *A.fumigatus* ATCC 204305 ve *C.albicans* ATCC 10231 süspansiyonu eklendi. Toplam 10 adet kan örneğinin ikisi *E.coli*, ikisi *S.aureus*, ikisi *Aspergillus*, ikisi *Candida* ve ikisi de bütün mikroorganizmaları içerecek şekilde hazırlandı. Kan örnekleri de koloni örneklerinde olduğu gibi seri olarak sulandırıldı ve bir pozitif kontrol seti oluşturuldu. Her bir konsantrasyondan kültür yapılarak üreyen koloni miktarı belirlendi.

BULGULAR

Çalışmamızda enfekte edilen tavşanlarda 12 saat sonra hareket azlığı başlamış ve B grubundaki bütün denekler 48 saat içinde kaybedilmiştir. F grubunda bir tavşan, PE grubunda üç tavşan 72 saat içinde kaybedilmiştir. Buna göre B grubunda mortalite hızının 48 saat içinde %100, F grubunda 72 saat içinde %25, PE grubunda ise 72 saat içinde %75 olduğu görülmüştür.

Kan ve Doku Örneklerinin Kültür Sonuçları

Tavşanları enfekte etmek için kullanılan bakteri ve mantar kolonilerinin aynısı feda edilen deneklerin kan ve doku kültürlerinden izole edilmiştir. Kan örneklerinde ortalama bakteri yükü 10^4 koloni oluşturan birim (kob)/ml iken, mantar yükü 10^2 kob/ml olarak hesaplanmıştır. Deneklerin karaciğer, dalak ve böbrek örneklerinde saptanan bakteri yükü sırasıyla 10^3 , 10^3 ve 10^2 kob/ml, mantar yükü ise sırasıyla 10^2 , 10^2 ve 10^1 kob/ml olarak belirlenmiştir. Bazı tavşanların kan örneklerinin kültüründe üreme olmamıştır (Tablo I). Kan kültüründe yalancı negatiflik özellikle F ve PE oluşturulan gruplarda görülmüştür. Kontrol grubundaki deneklerin hiçbirisinin kan ve doku örneğinde bakteri veya mantar üremesi olmamıştır.

Kan ve Doku Örneklerinin PCR Sonuçları

Deneyin ilk 24 saatinde tavşanlardan alınan kan örnekleri değerlendirildiğinde; B grubunda *E.coli* verilen iki denekte gram-negatif bakteri DNA'sı, *S.aureus* verilen iki denekte ise gram-pozitif bakteri DNA'sı pozitif bulunmuştur. F grubundan bir denneğin kan örneğinde *Aspergillus* DNA, bir denneğin kan örneğinde *Candida* DNA pozitif olarak saptanmıştır. PE grubundaki bir denneğin kan örneğinde gram-negatif, gram-pozitif, *Aspergillus*, *Candida* ve panfungal PCR sonuçları pozitif bulunmuştur. PCR ile eş zamanlı yapılan kültür sonuçları Tablo I'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışma Gruplarının Kültür ve PCR Sonuçları

		24. saat		48. saat		72. saat		96. saat	
		Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif
Bakteriyemi (B) grubu (n= 4)	Kan kültürü	3	1						
	Kan PCR	4	-						
	Dalak PCR	3	1	4*					
	Karaciğer PCR	3	1	4*					
	Böbrek PCR	2	2	4*					
Canlı denek sayısı		4		0		0		0	
Fungemi (F) grubu (n= 4)	Kan kültürü	1	3	1	3	1	2	1	2
	Kan PCR	2	2	3	1	3	-	3	-
	Dalak PCR							3**	
	Karaciğer PCR							3**	
	Böbrek PCR							3**	
Canlı denek sayısı		4		4		3		3	
Polimikrobiyal kan dolaşımı enfeksiyonu (PE) grubu (n= 4)	Kan kültürü	-	4	1	2	-	1	-	1
	Kan PCR	1	3	2	1	1	-	1	-
	Dalak PCR							1**	
	Karaciğer PCR							1**	
	Böbrek PCR							1**	
Canlı denek sayısı		4		3		1		1	
Sağlıklı kontrol (K) grubu (n= 4)	Kan kültürü	-	4	-	4	-	4	-	4
	Kan PCR	-	4	-	4	-	4	-	4
	Dalak PCR								4
	Karaciğer PCR								4
	Böbrek PCR								4
Canlı denek sayısı		4		4		4		4	

* Bakteriyemi grubunun 48. saat doku PCR çalışmaları ölü deneklerden alınan örnekler ile yapılmıştır.

** Fungemi ve PE gruplarındaki deneklerin doku PCR sonuçları, deneyin tamamlanıp deneklerin feda edildiği 96. saate aittir.

Deneyin 48. saatinde B grubunda canlı denek kalmadığı için ölü denek dokularından DNA izolasyonu yapılmış ve bu örneklerde enjeksiyon yapılan bakteriye göre gram-negatif veya gram-pozitif PCR pozitif bulunmuştur. B grubundaki deneklerde ölü katılığı geliştiği ve kan pıhtılaştığı için alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu başarısız olmuş ve bu örnekler PCR uygulanmamıştır. F grubundaki dört deneğin kan örneklerinde ise, enjeksiyon yapılan mantara göre bir *Aspergillus* ve iki *Candida* PCR pozitif bulunmuştur. *Aspergillus* verilen bir denekte PCR negatif sonuç vermiştir. PE grubunda canlı kalan üç deneğin ikisinin kan örneğinde gram-negatif, gram-pozitif, *Aspergillus*, *Candida* ve pan-

fungal PCR sonuçları pozitif olarak tespit edilmiştir. PCR ile eş zamanlı yapılan kan kültür sonuçları Tablo 1'de sunulmuştur.

Deneyin 72. saatinde F grubunda sağ kalan üç tavşandan alınan kan örneklerinde, enjeksiyon yapılan mantara göre bir *Aspergillus* ve iki *Candida* PCR pozitif bulunmuş; PE grubunda sağ kalan tek tavşanın kan örneğinde ise fungal ve bakteriyel PCR sonuçları pozitif olarak tespit edilmiştir. Deneyin 96. saatinde F grubunda üç, PE grubunda bir denek sağ kalmış; bu deneklerin feda edilmesinden sonra alınan kan örneklerinde, 72. saatteki örneklerden elde edilen sonuçlarla uyumlu PCR sonuçları alınmıştır. F grubunda üç deneğe ait karaciğer, dalak ve böbrek doku örneklerinde enjeksiyon yapılan mantara göre *Aspergillus* veya *Candida* PCR pozitif bulunmuş; PE grubunda kalan tek deneğin doku örneklerinde de fungal ve bakteriyel PCR yöntemleri pozitif sonuç vermiştir.

Sağlıklı kontrol grubundaki dört deneğin 24, 48, 72 ve 96. saat kan örnekleri ile 96. saat doku örneklerinin hiçbirinde bakteriyel veya fungal PCR pozitifliği bulunmamıştır.

PCR Yöntemlerinin Duyarlılığı

Uygulanan beş farklı PCR işleminin duyarlılığını belirlemek için hem koloni süspansiyonları hem de mikroorganizma eklenmiş kan örnekleri çalışılmıştır. Koloni örneklerinden yapılan gram-negatif, gram-pozitif, *Aspergillus*, *Candida* ve panfungal PCR yöntemlerinin duyarlılık alt sınırları sırasıyla 30, 40, 50, 50 ve 40 kob/ml olarak bulunmuştur. Mikroorganizma eklenmiş kan örneklerinden yapılan gram-negatif, gram-pozitif, *Aspergillus*, *Candida* ve panfungal PCR yöntemlerinin duyarlılık alt sınırları ise sırasıyla 50, 50, 50, 50 ve 100 kob/ml olarak belirlenmiştir. Bakteri kolonisinden yapılan süspansiyonlarda fungal DNA, mantar kolonisinden yapılan süspansiyonlarda bakteri DNA'sı elde edilmemiş, yani çapraz pozitiflik bulunmamıştır.

Kan kültüründe üreme olmasından 16.5 saat önce kanda mikrobiyal DNA PCR ile gösterilmiştir. Duyarlılık ve özgüllük hesaplaması için kontrol grubuna ait kan ve doku örnekleri negatif kontrol olarak kabul edilerek dışarıda bırakılmıştır. Bakteriyemi, fungemi ve ikisi birlikte bulunan deneklere ait bakteri veya mantar DNA'ları, pozitif olması beklenen 27 kan ve 36 doku (12 dalak, 12 karaciğer, 12 böbrek) örneği olmak üzere toplam 63 örnek PCR ile çalışılmıştır. Kan kültürü yapılan 27 örneğin sadece sekizinde mikroorganizma üremiş; buna göre kan kültürünün duyarlılığı %29.6 olarak hesaplanmıştır. Bakteriyemili deneklerin kan kültüründe bakteri izole edilme yüzdesi %30 iken, fungemili deneklerde bu oran %21.7 olarak tespit edilmiştir. Kandan yapılan PCR işleminde, 27 kan örneğinin 20'sinde pozitiflik saptanmış ve duyarlılık %74 olarak hesaplanmıştır. Bakteriyemili ve fungemili denekler için kandan PCR testi yapılmasının duyarlılığı ayrı ayrı hesaplandığında, bakteriyemi için %69.2, fungemi için %69.5 olarak saptanmıştır. Doku örnekleri dikkate alındığında PCR yönteminin duyarlılığı; karaciğer ve dalak örnekleri için %91.6 (11/12), böbrek örnekleri için ise %83.3 (10/12) oranında izlenmiştir.

TARTIŞMA

Kan dolaşımı enfeksiyonları (KDE)'nda hızlı tanının yapılabilmesi için, etken mikroorganizma kan veya doku örneklerinde gösterilebilmelidir. Moleküler tanı, hasta kanında

enfeksiyon etkenine ait DNA'nın gösterilmesi ve tanımlanması süreçlerini içerir. KDE'nin tanısında altın standart kan kültürü yöntemidir; ancak kantitatif sonuç verilemediği, yavaş ve zaman alıcı olduğu bilinmektedir. Kan kültürünün kısıtlayıcı özellikleri arasında; (a) etkenin izolasyonu ve tanımlanması için en az iki gün gerekmesi; (b) mantarlar gibi yavaş ve güç üreyen mikroorganizmaların kan kültüründe tanımlanmasının zor olması; (c) antimikrobiyal tedavi başlanması ile kan kültürünün duyarlılığının belirgin olarak azalması ve (d) çok etkenli enfeksiyonların kültür yöntemiyle nadiren doğrulanması yer alır⁵. Üstelik bakteri veya mantar etkenlerinin ancak yarısı kan kültüründe izole edilebilmektedir¹². Bu nedenlerden dolayı moleküler ve/veya kültür dışı diğer yöntemler, tek başlarına olmasa da, gün geçtikçe daha çok tercih edilir duruma gelmektedir¹²⁻¹⁷. Çalışmamızda deneysel olarak bakteriyemi ve fungemi oluşturulan tavşanlardan alınan ve pozitif olması beklenen 27 kan örneğinin sekizinde kültür, 20'sinde PCR pozitifliği saptanmış ve duyarlılık oranları genel olarak sırasıyla %29.6 ve %74 olarak hesaplanmıştır. Bu oranlar, bakteriyemi ve fungeminin tespitinde kültür için sırasıyla %30 ve %21.7 iken, PCR için sırasıyla %69.2 ve %69.5 olarak belirlenmiştir. Doku örneklerinde ise PCR'nin duyarlılığı daha yüksek (32/36; %89) saptanmıştır.

Çok etkenli KDE, özellikle bağışıklık sistemi bozulmuş konaklarda görülmekte ve tek etkenli enfeksiyonlarından iki kat daha fazla mortalite ile seyretmektedir¹⁵⁻¹⁸. Çalışmamızda, bakteriyemi oluşturulan deney hayvanlarının tamamı ilk 48 saat içinde; fungemi oluşturulan deneklerin ise 1 (%25)'i ilk 72 saat içinde kaybedilmiştir. Polimikrobiyal enfeksiyon grubunda ise 72. saatte mortalite hızı (%75) bakteriyemiden az, ancak fungemiden yüksek olarak saptanmıştır. Bu veriler, New Zealand ırkı tavşanların bakteriyemiye daha duyarlı olduğunu düşündürmüştür; ancak tavşanlardaki mortalitenin insanlardan farklı olacağı açıktır. Çok etkenli KDE, tedavi için birden fazla geniş spektrumlu antimikrobiyal kullanılmasını gerektirdiğinden klinisyen için de ayrıcalıklı bir tablodur. Üstelik antibiyotik kullanımı sırasında enfeksiyon etkenlerinin doğru tanısında bazı sorunlar olabilir¹⁹. Son yıllarda moleküler testlerin, konvansiyonel yöntemlerin başarısız olduğu koşullarda uygulanabileceği ve büyük ya da küçük bütün laboratuvarlar için düzenlenebileceği ifade edilmektedir²⁰. Bu araştırmada, deneysel olarak enfekte edilen tavşanlarda beş farklı gerçek zamanlı PCR protokolü ile gram-negatif, gram-pozitif, panfungal, *Aspergillus* ve *Candida* PCR testleri her örnek için ayrı ayrı çalışılmıştır. Çalışmamızın temel amacı, deneysel bir modelde bakteriyemi, fungemi ve çok etkenli enfeksiyonlarda PCR yönteminin bakteri ve mantarlara ait DNA taramasındaki performansını belirlemektir. Tarama için bakterileri gram-negatif ve gram-pozitif olarak ayırabilen bir primer-prob eşleştirmesi tercih edilmiş; mantarlar için de panfungal tarama uygulanmıştır. Bu nedenle çalışmamız geniş spektrumlu (broad-range) tarama yapabilen bir PCR uygulaması olarak kabul edilebilir. Etkenleri tek tek aramaktansa, bu tür bir tarama yapılması testin maliyetini düşürmüştür. Çalışmada gram-negatif, gram-pozitif, *Aspergillus* ve *Candida* PCR yöntemlerinin duyarlılık alt sınırı 50 kob/ml olarak bulunurken, panfungal PCR için bu değer 100 CFU/ml olarak belirlenmiş; yöntemler arasında çapraz reaktivite saptanmamıştır.

Birden fazla patojenin birlikte veya tek tek gösterilmesi, etkene özgül veya çok hedefli (multipleks) moleküler sistemler ile mümkün olmaktadır. Sepsis tanısında tek etkene

yönelik sonuç verebildikleri için etkene özgül sistemler yetersiz kalmaktadır. Bu sorunu aşabilmek için çok hedefli DNA arayan çeşitli ticari sistemler [örn. SeptiFast (Roche), SepsiTest (Molzym), VYOO (SIRS-Lab)] geliştirilmiştir²¹⁻²³. Çalışmamızda kullandığımız sistem çok hedefli bir PCR uygulaması değildir. Birkaç ayrı basamakta birden fazla mikroorganizmanın tanımlanmasına yönelik olarak tasarlanmıştır. Ancak bakteri ve mantarların aynı basamakta, tek test tüpü içinde saptanabileceği şekilde çok hedefli (multipleks) bir sistem olarak geliştirilmesi mümkündür.

Enfeksiyonun erken döneminde, örneğin ateşin yükseldiği ilk günde, hasta örneklerinin mikroorganizma DNA'ları açısından taranması, etkenin gram-pozitif ya da gram-negatif bir bakteri ve/veya mantar olduğunun belirlenmesi ve sonucun aynı gün klinisyene bildirilmesi, doğru ve hızlı tedavinin başlanması ve hasta yönetimi açısından büyük önem taşımaktadır²⁴. Bu çalışmada böyle bir taramanın yapılabileceği PCR protokolleri tanımlanmıştır. Bu çalışmanın en önemli sınırlaması, yöntem karşılaştırmasına dayalı bir çalışma olarak planlanması nedeniyle, hastalara ait klinik örneklerin kullanılmamış olmasıdır. Dolayısıyla, klinik örnekler seçilerek yapılacak olan geniş ve karşılaştırmalı prospektif çalışmalarla bu verilerin desteklenmesi gerekmektedir. Sonuç olarak, deneysel model örneklerinde uygulanan bu PCR yöntemlerinin, gelecekte planlanacak olan klinik çalışmalar için yol gösterici olacağı düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Ecker DJ, Sampath HL, Massire C, et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev Mol Diagn* 2010; 10(4): 399-415.
2. Andrade SS, Bispo PJ, Gales AC. Advances in the microbiological diagnosis of sepsis. *Shock* 2008; 30(7): 41-6.
3. Regueiro BJ, Varela-Ledo E, Martinez-Lamas L, et al. Automated extraction improves multiplex molecular detection of infection in septic patients. *PLoS One* 2010; 5(10): e13387.
4. Wallet F, Nseir S, Baumann L, et al. Preliminary clinical study using a multiplex real-time PCR test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(6): 774-9.
5. Paolucci M, Landini MP, Sambri V. Conventional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia. *Int J Antimicrob Agent* 2010; 36(2): 6-16.
6. Peman J, Zaragoza R. Current diagnostic approaches to invasive candidiasis in critical care. *Mycoses* 2009; 53(5): 424-33.
7. Polanco A, Mellado E, Castilla C, Rodriguez-Tudela JL. Detection of *Candida albicans* in blood by PCR in a rabbit animal model of disseminated candidiasis. *Diag Microbiol Infect Dis* 1999; 34(3): 177-83.
8. Khan ZU, Mustafa AS. Detection of *Candida* species by polymerase chain reaction (PCR) in blood samples of experimentally infected mice and patients with suspected candidemia. *Microbiol Res* 2001; 156(1): 95-102.
9. Basunu AA, Butterworth LA, Cooksley G, Locarnini S, Carman WF. An efficient extraction method from blood clots for studies requiring both host and viral DNA. *J Viral Hepat* 2000; 7(3): 241-3.
10. Wu YD, Chen LH, Wu XJ, et al. Gram stain-specific-probe-based real-time PCR for diagnosis and discrimination of bacterial neonatal sepsis. *J Clin Microbiol* 2008; 46(8): 2613-9.
11. Schabereiter-Gurtner C, Selitsch B, Rotter ML, Hirschl AM, Willinger B. Development of novel real-time PCR assays for detection and differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2007; 45(3): 906-14.
12. Gaibani P, Rossini G, Ambretti S, et al. Blood culture systems: rapid detection - how and why? *Int J Antimicrob Agent* 2009; 34(4): 13-5.

13. Swoboda-Kopec E, Netsvetyeyeva I, Paczek L, et al. Algorithm of clinical protocol lowering the risk of systemic mycosis infections in allografts recipients. *Transplant Proceed* 2009; 41(8): 3264-6.
14. Bingold T, Wissing H. Improved detection of blood stream pathogens by real-time PCR in severe sepsis. *Intensive Care Med* 2010; 36(1): 49-56.
15. Dark PM, Dean P, Warhurst G. Bench-to-bedside review: the promise of rapid infection diagnosis during sepsis using polymerase chain reaction-based pathogen detection. *Crit Care* 2009; 13(4): 217.
16. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(1): 235-51.
17. Zhao Y, Park S, Kreiswirth BN, et al. Rapid real-time nucleic acid sequence-based amplification-molecular beacon platform to detect fungal and bacterial bloodstream infections. *J Clin Microbiol* 2009; 47(7): 2067-78.
18. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, et al. Molecular diagnosis of polymicrobial sepsis. *J Clin Microbiol* 2009; 47(4): 1274-5.
19. Stefania S. Diagnostic techniques in blood stream infections: where are we going? *Int J Antimicrob Agent* 2009; 34(4): 9-12.
20. Bauer M, Reinhart K. Molecular diagnostics of sepsis-Where are we today? *Int J Med Microbiol* 2010; 300(6): 411-3.
21. Peters RP, van Agtmael MA, Danner SA, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* 2004; 4(12): 751-60.
22. Louie RF, Tang Z, Albertson TE, Cohen S, Tran NK, Kost GJ. Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit Care Med* 2008; 36(5): 1487-92.
23. Vince A, Lepej SZ, Barsic B, et al. LightCycler SeptiFast assay as a tool for the rapid diagnosis of sepsis in patients during antimicrobial therapy. *J Med Microbiol* 2008; 57(10): 1306-7.
24. Lisboa T, Waterer G, Rello J. We should be measuring genomic bacterial load and virulence factors. *Crit Care Med* 2010; 38(10): 656-62.